

NAD⁺-abhängige Signalwege in Mitochondrien

ADP-Ribosyltransferase und NAD⁺-Glycohydrolase

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Chemie
an der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Dierk Jorcke
aus Berlin**

1998

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 1995 bis November 1998 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt zu haben.

1. Gutachter : Prof. Dr. Dr. M. Schweiger

2. Gutachter : Prof. Dr. F. Hucho

Tag der Disputation : 11.02.1999

Für
Meike,
Frederic und Tabea

Prophet 16f., Von den Kindern.
Eure Kinder sind nicht eure Kinder.
Sie sind die Söhne und Töchter der Sehnsucht des Lebens nach sich selber.
Sie kommen durch euch, aber nicht von euch,
Und obwohl sie mit euch sind, gehören sie euch doch nicht.
Ihr dürft ihnen eure Liebe geben, aber nicht eure Gedanken,
Denn sie haben ihre eigenen Gedanken.
Ihr dürft ihren Körpern ein Haus geben, aber nicht ihren Seelen,
Denn ihre Seelen wohnen im Haus von morgen,
das ihr nicht besuchen könnt, nicht einmal in euren Träumen.
Ihr dürft euch bemühen, wie sie zu sein,
aber versucht nicht, sie euch ähnlich zu machen.
Denn das Leben läuft nicht rückwärts, noch verweilt es im Gestern.
Ihr seid die Bogen, von denen eure Kinder als lebende Pfeile ausgeschickt werden.
Der Schütze sieht das Ziel auf dem Pfad der Unendlichkeit, und Er spannt euch mit
Seiner Macht, damit seine Pfeile schnell und weit fliegen.
Laßt euren Bogen von der Hand des Schützen auf Freude gerichtet sein;
Denn so wie Er den Pfeil liebt, der fliegt, so liebt Er auch den Bogen, der fest ist.

Khalil Gibran

1. EINLEITUNG	1
1.1 NAD⁺-METABOLISIERENDE ENZYMAKTIVITÄTEN	2
1.1.1 ADP-RIBOSYLTRANSFERASEN	2
1.1.2 NAD ⁺ -GLYCOHYDROLASEN	6
1.2 REGULATION DER ZELLULÄREN CALCIUM-HOMÖOSTASE	10
1.2.1 BEDEUTUNG DER MITOCHONDRIEN FÜR DIE ZELLULÄRE CALCIUM-HOMÖOSTASE	11
1.2.2 REGULATION MITOCHONDRIALER CALCIUM-FLUXE DURCH PYRIDINNUKLEOTIDE	12
2. ZIELSETZUNG	15
3. ERGEBNISSE	16
3.1 ADP-RIBOSYLIERUNG IN RINDERLEBERMITOCHONDRIEN	16
3.1.1 DIE KOVALENTE MODIFIZIERUNG MITOCHONDRIALER PROTEINE MIT ADP-RIBOSE IST EINE ENZYMATISCHE REAKTION	17
3.1.2 IDENTIFIZIERUNG DER MODIFIZIERENDEN GRUPPE ALS ADP-RIBOSE	19
3.1.3 DIE ADP-RIBOSYLIERUNG MITOCHONDRIALER PROTEINE ERFOLGT ÜBERWIEGEND AN CYSTEINRESTEN	20
3.1.4 DIE ALDEHYD-DEHYDROGENASE AUS HEFE WIRD DURCH DIE MITOCHONDRIALE ADPRT MODIFIZIERT	21
3.1.5 KONSEQUENZEN FÜR DIE MITOCHONDRIALE ADP-RIBOSYLIERUNG	23
3.2 DIE MITOCHONDRIALE NAD⁺-GLYCOHYDROLASE - EIN BIFUNKTIONELLES ENZYM	24
3.2.1 ADP-RIBOSYL CYCLASE-AKTIVITÄT DER MITOCHONDRIALEN NADASE	25
3.2.2 DIE MITOCHONDRIALE NADASE KATALYSIERT DIE HYDROLYSE VON CADP-RIBOSE	29
3.2.3 REVERSIBILITÄT DER ADP-RIBOSYL CYCLASE-REAKTION - TRANSGLYKOSYLIERUNG	30
3.2.4 MODELL DER PROOXIDANS-INDUZIERTEN CALCIUM-FREISETZUNG AUS MITOCHONDRIEN	31
4. DISKUSSION	33
5. ZUSAMMENFASSUNG	38
6. MATERIAL UND METHODEN	40
6.1 ZELLFRAKTIONIERUNG DER RINDERLEBER	40
6.1.1 ISOLIERUNG VON MITOCHONDRIEN	40
6.1.2 HERSTELLUNG VON SUBMITOCHONDRIALEN PARTIKELN (SMPS)	40
6.1.3 GEWINNUNG VON MIKROSOMEN	41
6.1.4 BESTIMMUNG VON MARKERENZYM-AKTIVITÄTEN MEMBRANÄRER ZELLBESTANDTEILE	41
6.1.4.1 SUCCINAT-DEHYDROGENASE	41
6.1.4.2 GLUCOSE-6-PHOSPHATASE	42
6.1.4.3 ATPASEN	42

6.2 ISOLIERUNG DER NAD⁺-GLYCOHYDROLASE	43
6.2.1 DETERGENZSOLUBILISIERUNG	43
6.2.2 CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN	44
6.2.3 FLUORESCENZPHOTOMETRISCHER NACHWEIS ENZYMATISCHER AKTIVITÄTEN DER NADASE	45
I. VERWENDUNG VON 1,N ⁶ -ETHENO-NAD ⁺ (ε-NAD ⁺)	46
II. VERWENDUNG VON NIKOTINAMIDGUANINDINUKLEOTID (NGD ⁺) UND NIKOTINAMIDHYPOXANTHINDINUKLEOTID (NHD ⁺)	46
6.2.4 IDENTIFIZIERUNG DER NADASE IN DER SDS-PAGE DURCH FLUORESCENZFÄRBUNG	47
I. VERWENDUNG VON 1,N ⁶ -ETHENO-NAD ⁺ (ε-NAD ⁺)	47
II. VERWENDUNG VON NIKOTINAMIDHYPOXANTHINDINUKLEOTID (NHD ⁺)	47
6.2.5 IDENTIFIZIERUNG DER REAKTIONSPRODUKTE DER ISOLIERTEN NADASE	48
6.2.5.1 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE	48
6.2.5.2 HOCHAUFLÖSENDE FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE (HPLC)	49
6.3 ADP-RIBOSYLIERUNG	50
6.3.1 MITOCHONDRIALE ADP-RIBOSYLIERUNG	50
6.3.2 CHEMISCHE STABILITÄT DER ADP-RIBOSE-BINDUNGEN MITOCHONDRIALER PROTEINE	51
6.3.3 ADP-RIBOSYLIERUNG DER ALDEHYD-DEHYDROGENASE (ALDH) AUS HEFE	51
6.3.4 MODIFIZIERUNG VON THIOLGRUPPEN DER ALDH	52
6.4 PROTEINANALYTIK	52
6.4.1 PROTEINBESTIMMUNG	52
6.4.1.1 BIURET-METHODE	52
6.4.1.2 BCA-METHODE	53
6.4.2 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	53
6.4.3 COOMASSIE-FÄRBUNG	54
6.4.4 SILBERFÄRBUNG	55
6.4.5 AUTORADIOGRAPHIE	55
7. LITERATUR	56
7.1 ZITIERTER LITERATUR ANDERER AUTOREN	56
7.2 ZITIERTER EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	65
8. ANHANG	66
8.1 FLUORESZENTE ANALOGA CYCLISCHER ADP-RIBOSE	66
8.2 KURZFASSUNG DER ERGEBNISSE	67
ABSTRACT	68
8.3 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	69
8.4 ABKÜRZUNGEN	70
8.5 LEBENS LAUF	71
8.6 DANKSAGUNG	73

1. Einleitung

Die Pyridinnukleotide, Nikotinamidadenindinukleotid und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat [NAD(P)], sind ubiquitär auftretende Coenzyme, die an zahlreichen Reaktionen der zellulären Energietransformation beteiligt sind. Seit langem ist ihre fundamentale Bedeutung als Cofaktoren vieler Dehydrogenasen, die Hydridtransferreaktionen zentral zum Energieumsatz katalysieren, bekannt.

Mit der Entdeckung von Signalwegen, die durch Metabolite der oxidierten Formen [NAD(P)⁺] gesteuert werden, sind die Pyridinnukleotide augenblicklich erneut ins Zentrum des Interesses gerückt. Bemerkenswerterweise dient das NAD⁺ sowohl als Substrat für kovalente Proteinmodifikationen sowie auch als Vorläufer für neuartige intrazelluläre Calcium-mobilisierende Botenstoffe. Von großer Bedeutung in diesem Zusammenhang ist die Beteiligung der Mitochondrien an der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase, die durch die zusätzlichen Kapazitäten des NAD(P)⁺ als Vorstufe Calcium-freisetzender Nukleotide erklärt werden könnte.

Die Struktur des NAD⁺, bestehend aus zwei Mononukleotiden, wurde bereits 1936 geklärt (Von Euler et al., 1936). Dabei sind die Nukleotide Adenosin-5'-monophosphat (AMP) und Nikotinamidmononukleotid (NMN) über eine energiereiche Pyrophosphatbindung miteinander verknüpft (Abb. 1, links).

Alle im folgenden beschriebenen Gruppentransferreaktionen (Abschnitt 1.1) beinhalten die Spaltung der β -N-glykosidischen Bindung, die den Adenosin-5'-diphosphoribose (ADP-Ribose)-Rest mit dem quartanären Stickstoff des Pyridinrings verbindet (Abb.1, rechts). Unter Freisetzung des Nikotinamids (Nam) wird aus dem Substrat NAD⁺ die ADP-Ribose-Einheit auf unterschiedliche Nukleophile übertragen.

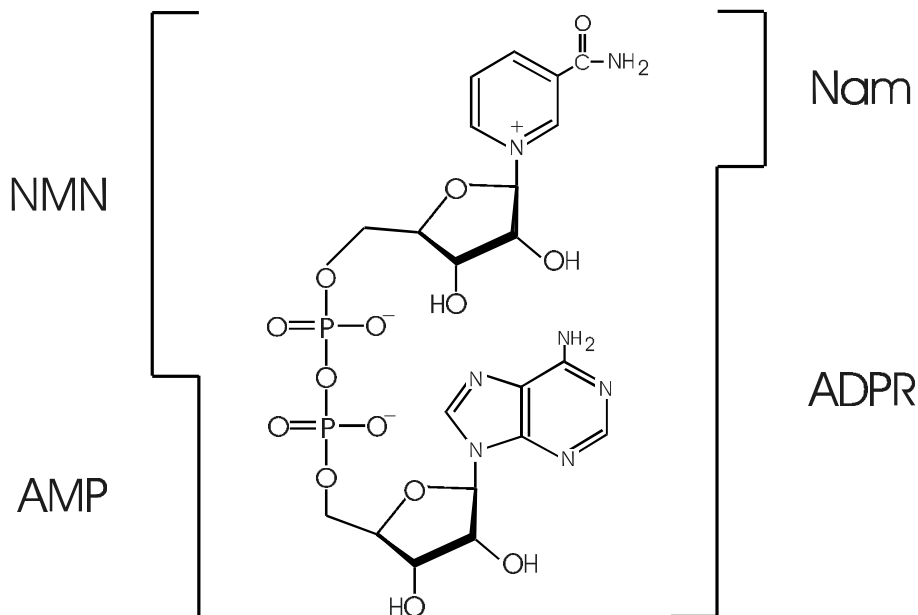


Abb. 1 Struktur von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺). Linke Seite: Eine Pyrophosphatbindung verbindet die beiden Mononukleotide Adenosinmonophosphat (AMP) und Nikotinamidmononukleotid (NMN). Rechte Seite: Nikotinamid (Nam) und Adenosindiphosphoribose (ADPR) sind durch eine energiereiche β -N-glykosidische Bindung verknüpft.

ADP-Ribosyltransferasen (ADPRTs) stellen eine Gruppe ADP-Ribose übertragender Enzyme dar, die den Transfer auf spezifische Aminosäuren ihrer Zielproteine katalysieren (Abschnitt 1.1.1).

Zusätzlich ist NAD^+ (und NADP^+) ein Substrat für NAD(P)^+ -Glycohydrolasen (NADasen), Enzyme, die seit mehr als 50 Jahren bekannt sind (Handler und Klein, 1942). Ihre Funktion wurde jedoch bis heute nicht umfassend geklärt (Abschnitt 1.1.2). Im Gegensatz zu den ADPRTs katalysieren NADasen die hydrolytische Spaltung der Bindung zwischen ADP-Ribose und Nikotinamid und damit die Übertragung des ADP-Riboserestes auf Wasser als Nukleophil (Price und Pekala, 1987).

Die Entdeckung derartiger Transfer-Reaktionen erweiterte die biologische Rolle des NAD^+ von der eines respiratorischen Coenzym zu der eines Substrates für "Nicht-Oxidations- / Reduktions-Reaktionen".

1.1 NAD^+ -metabolisierende Enzymaktivitäten

1.1.1 ADP-Ribosyltransferasen

ADP-Ribosyltransferasen katalysieren die posttranslationale Modifikation spezifischer Akzeptoren, bei der unter Verwendung von NAD^+ als Substrat ein ADP-Riboserest kovalent auf spezielle Aminosäuren ihrer Zielproteine übertragen wird (ADP-Ribosylierung). Die ADP-Ribosylierung von Proteinen wurde erstmalig als eine Modifikation von nukleären Proteinen durch Polymere aus ADP-Riboseresten, die aus dem NAD^+ stammen, entdeckt (Chambon et al., 1963, 1966). Das polymerisierende Enzym, polyADP-Ribosyltransferase (pADPRT), ist ein Kernprotein, das bisher in allen untersuchten Eukaryonten (einzige Ausnahme: Hefe) nachgewiesen wurde. Es handelt sich um ein multifunktionelles Enzym, das sowohl den Transfer der ersten ADP-Ribose vom NAD^+ auf Glutamatreste als auch das Wachstum der ADP-Ribosekette und deren Verzweigung katalysiert (Oei et al., 1997). Obwohl die physiologische Funktion der pADPRT noch weitgehend unklar ist, wurde eine Beteiligung an zahlreichen Prozessen, wie DNA-Reparatur, Zelldifferenzierung und Apoptose, nachgewiesen (Oei et al., 1997). Neueren Untersuchungen zufolge hat die polyADP-Ribosylierung einen direkten Einfluß auf die RNA Polymerase II-abhängige Transkription, die in einem NAD^+ benötigenden Prozeß inhibiert wird (Oei et al., 1998).

Eine zweite Klasse ADP-ribosylierender Enzyme wird von monoADP-Ribosyltransferasen (mADPRTs) repräsentiert, die eine Proteinmodifikation mit nur einem ADP-Riboserest katalysieren (Abb. 2). Die am besten charakterisierten mADPRTs sind prokaryontischen Ursprungs. Wesentliche Erkenntnisse über die ADP-Ribosylierung wurden in bezug auf den Bakteriophagen T4 erhalten (Mailhammer et al., 1975a, b). Das Phagengenom kodiert für zwei monoADP-Ribosyltransferasen, die während der Infektion von *Escherichia coli* die wirtseigene RNA-Polymerase modifizieren. Während eine ADPRT, Alt (alteration), ein internes Protein des Phagokopfes ist und mit der Virus-DNA in die Zelle injiziert wird, wird die zweite ADPRT, Mod (modification), im Verlauf der Infektion gebildet. Beide Enzyme ADP-ribosylieren die α -Untereinheit der *E. coli* RNA-Polymerase. Es konnte gezeigt werden, daß die Modifizierung zu einer generellen Reduktion der Transkription von Wirts-DNA führt, d. h. kaum mRNA von Genen des Bakteriums synthetisiert wird (Mailhammer et al., 1975a).

Obwohl die ADP-Ribosylierung nicht essentiell für die Phagenentwicklung ist, da auch Doppelmutanten (T4 alt⁻ mod⁻) überlebensfähig sind, konnte durch diese Ergebnisse erstmalig ein Mechanismus aufgezeigt werden, der erklären kann, wie der T4-Phage sein genetisches Programm Schritt für Schritt in der Wirtszelle ausführt (Mailhammer et al., 1975a).

Diverse Bakterienspezies sekretieren Toxine, die nach Eindringen in die Wirtszelle spezifische Proteine mit ADP-Ribose modifizieren (Moss und Vaughan, 1988). Auffallend ist, daß alle bisher beschriebenen Toxine mit mADPRT-Aktivität nukleotidbindende Proteine, in den meisten Fällen guaninnukleotidbindende Proteine (G-Proteine), ADP-ribosylieren. Ein sekretorisches Produkt des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis*, das Pertussis Toxin, modifiziert eine Komponente des Rezeptor-Adenylat-Cyclase-Systems, die α -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins (G_i), in einem NAD^+ -abhängigen Prozeß (Katada und Ui, 1982a, b). Es wurde gezeigt, daß die enzym-katalysierte Reaktion zu einer kovalenten Verknüpfung der ADP-Ribose mit einem Cystein des Akzeptors führt (West et al., 1985). Die ADP-Ribosylierung von $G_{i\alpha}$ bedingt eine verminderte Dissoziation von $G_{\beta\gamma}$ und eine Abnahme der Affinität zu GTP bei gleichzeitig verstärkter Bindung von GDP. Dadurch wird eine effektive Entkopplung vom inhibitorischen Rezeptor erreicht, so daß dessen Agonisten nicht mehr zu einer Hemmung der Adenylat Cyclase und damit Abnahme des zellulären cAMP-Spiegels führen (Moss und Vaughan, 1988). Über einen homologen Mechanismus verursacht das Cholera Toxin, ein sekretiertes Produkt von *Vibrio cholerae*, seine pathologischen Effekte. Das primäre Zielprotein der enzym-katalysierten, NAD^+ -abhängigen Reaktion ist die α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins (G_s) des Adenylat-Cyclase-Systems (Cassel und Pfeuffer, 1978). Die spezifische Modifikation von $G_{s\alpha}$ mit ADP-Ribose an einem Argininrest führt zu einer Inhibition der intrinsischen GTPase-Aktivität (Moss und Vaughan, 1977). Dadurch wird die Lebenszeit der aktiven $G_{s\alpha}/GTP$ - Komponente verlängert, die eine Stimulation der Adenylat Cyclase und folglich eine erhöhte cAMP-Konzentration bewirkt (Moss und Vaughan, 1988).

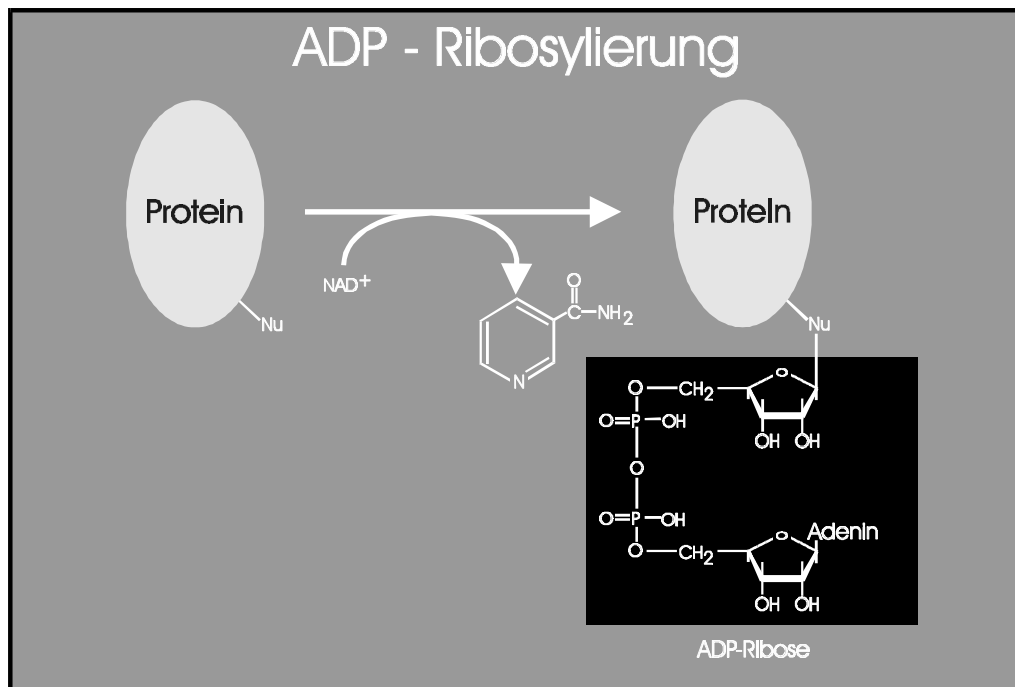


Abb. 2 ADP-Ribosylierung. MonoADP-Ribosylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Zielproteinen, bei der - unter Freisetzung des Nikotinamids - ein ADP-Riboserest des NAD^+ kovalent auf eine spezifische Aminosäure übertragen wird. Nu, Nukleophil (Aminosäure des Zielproteins).

Diphthamid, ein posttranslational veränderter Histidinrest im Elongationsfaktor-2 (EF-2), wird durch das Diphtherie Toxin des Bakteriums *Corynebacterium diphtheriae* sowie durch das Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* ADP-ribosyliert. Dadurch kommt es zu einer (irreversiblen) Hemmung der Proteinbiosynthese und letztlich zum Zelltod (Collier, 1975; Moss und Vaughan, 1988).

Toxine mit mADPRT-Aktivität werden von diversen Clostridienspezies produziert (Aktories, 1997). Eine Familie clostridialer Toxine ADP-ribosyliert monomeres Aktin spezifisch an einem Argininrest (Vandekerckhove et al., 1988), eine andere Gruppe clostridialer mADPRTs modifiziert an der Regulation der Aktin-Cytoskelettstruktur beteiligte GTP-bindende Proteine der Rho-Familie an einem Asparaginrest (Sekine et al., 1989). Mit der Intoxikation wird eine dramatische Veränderung der Cytoskelettstruktur beobachtet, die durch veränderte Polymerisationseigenschaften des Aktins hervorgerufen wird (Aktories, 1994).

Die bisher genannten prokaryontischen mADPRT-Aktivitäten führen zu einer irreversiblen Modifikation ihrer jeweiligen Zielproteine in der Wirtszelle, für die bisher kein wirksamer Gegenmechanismus beschrieben wurde (Okazaki und Moss, 1996).

Daß eine endogene ADP-Ribosylierung ein Teil eines Regulationskreislaufs sein kann, wurde für das photosynthetische Bakterium *Rhodospirillum rubrum* gezeigt (Ludden, 1994). In *R. rubrum* wird die Fixierung von Stickstoff derart reguliert, daß die Dinitrogenase-Reduktase, ein Teil des stickstofffixierenden Enzymkomplexes, durch ADP-Ribosylierung eines Argininrestes inaktiviert wird. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert - die Dinitrogenase-Reduktase ADP-Ribosyltransferase - wird durch Umweltstimuli, wie Dunkelheit oder eine Quelle fixierten Stickstoffs, aktiviert. Die Entfernung der Stickstoffquelle oder Lichteinwirkung führen zu einer Aktivierung der Dinitrogenase-Reduktase. Das Enzym Dinitrogenase-Reduktase ADP-Ribose Hydrolase katalysiert die Abspaltung der zuvor eingebauten ADP-Ribose und regeneriert den freien Argininrest, wodurch der Regulationskreislauf geschlossen wird.

Mehrere eukaryontische monoADP-Ribosyltransferasen wurden identifiziert und beschrieben (Okazaki und Moss, 1996). Die meisten dieser Enzyme, deren *in vivo* Zielproteine nur wenig charakterisiert sind, modifizieren Argininreste in verschiedenen *in vitro* Substraten (Okazaki und Moss, 1996). Die ADP-Ribosylierung von Argininen scheint ein reversibler Prozeß zu sein: In Truthahnerythrocyten konnte sowohl eine argininspezifische ADPRT-Aktivität (Moss et al., 1980) als auch die enzymatische Aktivität einer ADP-Ribosylarginin Hydrolase identifiziert werden (Moss et al., 1985; Moss et al., 1988). Die erste eukaryontische mADPRT, die gereinigt, sequenziert und deren kodierender cDNA-Bereich kloniert wurde, stammt aus dem Skelettmuskel von Kaninchen (Zolkiewska et al., 1992). Als physiologisches Substrat dieses Enzyms konnte Integrin $\alpha 7$ identifiziert werden, dessen argininspezifische ADP-Ribosylierung jedoch nicht vollständig reversibel ist und damit außerhalb eines postulierten Regelkreislaufs stattzufinden scheint (Zolkiewska und Moss, 1993). Eine zelluläre mADPRT, die entsprechend den bakteriellen Toxinen (s.o.) den Diphthamidrest des Elongationsfaktors-2 modifiziert, wurde in Hamsternierenzellen beschrieben (Lee und Iglewski, 1984). Der endogene Transfer der ADP-Ribose aus dem NAD^+ erfolgt jedoch im Gegensatz zur toxin-katalysierten Modifikation nur auf einen Teil des EF-2-Pools (Iglewski, 1994).

Endogene ADP-Ribosylierungen von Cysteinresten wurden ebenfalls mehrfach nachgewiesen. Ein für neuronales Gewebe spezifisches Protein, B-50, das unter anderem an der Regulation eines G-Proteins beteiligt zu sein scheint (Strittmatter et al., 1990), wird cystein-spezifisch mit ADP-Ribose modifiziert (Philibert und Zwiers, 1995). Bemerkenswert ist, daß die ADP-Ribosylierung der beiden einzigen Cysteinreste innerhalb von B-50 (Cys-3 und/oder Cys-4) eine verminderte Assoziation dieses Proteins mit Membranen bewirkt, weil dadurch die Palmitoylierung dieser Aminosäuren verhindert wird (Zwiers et al., 1997).

Für Cysteinreste spezifische mADPRTs wurden in Erythrocyten aus Rindern (Saxty und van Heyningen, 1995) sowie Menschen (Tanuma et al., 1987) nachgewiesen. Ein Substrat der humanen ADPRT ist die α -Untereinheit eines inhibitorischen G-Proteins (Tanuma et al., 1988). In menschlichen Erythrocyten wurde zusätzlich eine für ADP-Ribosylcystein spezifische Hydrolase entdeckt (Tanuma und Endo, 1990), ein Hinweis auf einen möglichen ADP-Ribosylierungskreislauf, der Cysteinreste in Proteinen involviert (Okazaki und Moss, 1996). Die Modifikation von Proteinen mit ADP-Ribose scheint außerdem über einen nicht-enzymatischen Mechanismus erfolgen zu können (Just et al., 1994; McDonald und Moss, 1993a, b). Es wurde vermutet, daß eine NAD^+ -Glycohydrolase (Abschnitte 1.1.2 und 1.2.2) die Hydrolyse des NAD^+ katalysiert und die gebildete freie ADP-Ribose eine nicht-enzymatische Cysteinmodifikation bewirkt (McDonald et al., 1992; Okazaki und Moss, 1996).

In vielen Fällen erhält man die erste Information einer ADP-Ribosylierung über kovalent modifizierte Proteinsubstrate nach Inkubation mit radioaktiv markiertem NAD^+ , bevor eine Charakterisierung des katalytischen Enzyms erfolgt. Die Spezifität aller bekannten ADPRTs für eine bestimmte Aminosäure ist daher ein wichtiges Kriterium für die Einteilung dieser Enzyme. Die Aminosäure, mit der die ADP-Ribose-Einheit verknüpft wurde, kann durch die Empfindlichkeit der Bindung gegenüber verschiedenen Chemikalien (Tab. 1) bestimmt werden (Jacobson et al., 1994). Die chemische Stabilität möglicher Aminosäure-ADP-Ribose-Bindungen wurde anhand von synthetisierten Modellverbindungen sowie mittels bakterieller Toxine modifizierter Proteine ermittelt (Cervantes-Laurean et al., 1993, 1995).

ADP-Ribosylierung in Mitochondrien wurde in verschiedenen Veröffentlichungen dokumentiert; sie wird getrennt im Abschnitt 1.2.2 behandelt.

ADPR-Bindung mit	Ameisensäure (44%), 37°C	Hydroxylamin (1M), 37°C	Hg^{2+} (10mM), 25°C	CHES (50mM), 37°C	NaOH (1M), 37°C
Glutamat	stabil	Spaltung, schnell	stabil	Spaltung, langsam	Spaltung
Arginin	stabil	Spaltung, langsam	stabil	stabil	Spaltung
Cystein	stabil	stabil	Spaltung	stabil	Spaltung
Histidin (Diphthamid)	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil
Asparagin	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil
Serin	Spaltung	stabil	stabil	stabil	stabil
Lysin	stabil	stabil	stabil	Spaltung, schnell	Spaltung

Tab. 1 Chemische Stabilitäten von Aminosäure-ADP-Ribose-Bindungen. Die Behandlung eines ADP-ribosylierten Proteins mit unterschiedlichen Chemikalien ermöglicht die Identifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäure. Eine Bindung gilt als stabil, wenn ihre Halbwertszeit unter den angegebenen Bedingungen mehr als zehn Stunden beträgt (Jacobson et al., 1994).

1.1.2 NAD⁺-Glycohydrolasen

NAD⁺-Glycohydrolasen (NADasen) sind die am längsten bekannten NAD⁺-katabolisierenden Enzyme (Handler und Klein, 1942). Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung des NAD⁺ zu Nikotinamid und ADP-Ribose (Abb. 3, Route 1). Damit unterscheiden sie sich von den zuvor beschriebenen ADP-Ribosyltransferasen in der Hinsicht, daß sie Wasser als nukleophilen Akzeptor des ADP-Riboserestes annehmen. Die durch NADasen katalysierte Reaktion wurde zunächst in den Katabolismus des NAD⁺ eingeordnet (Gholson, 1966), jedoch wird das Konzept eines aktiven Synthese-/Abbau-Kreislaufs durch die benötigte hohe Energiemenge für die Resynthese des NAD⁺ aus ADP-Ribose und Nikotinamid in Frage gestellt (Price und Pekala, 1987; Ziegler et al., 1997a¹).

NADasen sind weit verbreitete Enzyme, die sowohl in Prokaryonten als auch Eukaryonten nachgewiesen wurden (Price und Pekala, 1987). Während die Mehrzahl der eukaryontischen Enzyme membrangebunden ist (Ziegler et al., 1997a¹), stellen die bekannten prokaryontischen NADasen wasserlösliche Proteine dar (Price und Pekala, 1987). Wasserlösliche NADasen eukaryontischen Ursprungs wurden bisher in der Samenflüssigkeit (Yuan und Anderson, 1971) und im Hirngewebe (Yamauchi und Tanuma, 1994) von Rindern, sowie bei *Neurospora crassa*, *Bungarus fasciatus* (Price und Pekala, 1987) und *Aplysia californica* (Hellmich und Strumwasser, 1991; Lee und Aarhus, 1991) entdeckt. NADase-Aktivitäten sind oft mit der Plasmamembran oder mit Mikrosomen organisiert (Price und Pekala, 1987), jedoch ist die subzelluläre Lokalisation dieser Enzyme in vielen Geweben von Säugetieren noch nicht eindeutig geklärt (Ziegler et al., 1997a¹). Eine mit mitochondrialen Membranen assoziierte NAD⁺-Glycohydrolase wurde ebenfalls mehrfach beschrieben (Ziegler et al., 1997a¹); sie wird getrennt im Abschnitt 1.2.2 behandelt.

Seit nunmehr elf Jahren haben NADasen eine erneute große Aufmerksamkeit erlangt und sind Inhalt zahlreicher Untersuchungen: In der Arbeitsgruppe von Lee (Clapper et al., 1987) wurde entdeckt, daß eine Ca²⁺-Freisetzung aus Seeigeli-Mikrosomen durch einen Metaboliten des NAD⁺ bewirkt wird. Dieses Molekül wurde später als cyclische ADP-Ribose (cADP-Ribose) identifiziert (Lee et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, daß dieser Weg der Ca²⁺-Mobilisierung unabhängig vom Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃)-Mechanismus, jedoch genauso effektiv erfolgt (Dargie et al., 1990). Das Enzym, mit dem erstmalig die Bildung der cADP-Ribose nachgewiesen werden konnte, ist aus den Ototestes der Meeresschnecke *Aplysia californica* isoliert worden (Hellmich und Strumwasser, 1991; Lee und Aarhus, 1991); bis zu diesem Zeitpunkt wurde das Enzym als NAD⁺-Glycohydrolase klassifiziert. Die enzymatische Synthese von cADP-Ribose, katalysiert von ADP-ribosyl Cyclasen bzw. cADP-Ribose Synthasen, bedingt die Spaltung der β-N-glykosidischen Nikotinamid-Ribose-Bindung. Im Anschluß daran erfolgt eine Cyclisierung des N¹-Atoms des Adeninringes mit dem anomeren Kohlenstoff der terminalen Ribose (Abb. 3, Route 2).

Die cDNAs von drei eukaryontischen NADasen wurden bisher kloniert und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen bestimmt. Dazu gehören zum einen das Enzym der Meeresschnecke *Aplysia* (Glick et al., 1991; Nata et al., 1995) und zum anderen zwei Proteine des Menschen bzw. verschiedener Nagetierspezies: CD38, ein Blutzell-Differenzierungsmarker (Jackson und Bell, 1990; Harada et al., 1993; Koguma et al., 1994) sowie BST-1, dessen kodierendes Gen zuerst aus einer Knochenmarks-Stromazelllinie kloniert wurde (Kaisho et al., 1994; Dong et al., 1994; Itoh et al., 1994; Furuya et al., 1995).

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

Die Entdeckung, daß die Synthese von cADP-Ribose durch ein zunächst als NAD⁺-Glycohydrolase klassifiziertes Enzym katalysiert wird, führte zu der Identifizierung zahlreicher dieser Enzyme als ADP-ribosyl Cyclasen (Ziegler et al., 1997a¹); darunter befindet sich interessanterweise auch ein prokaryontisches Protein aus *Streptococcus pyogenes* (Karasawa et al., 1995).

Die Ektoenzyme CD38 (Howard et al., 1993; Zocchi et al., 1993; Takasawa et al., 1993; Summerhill et al., 1993) sowie BST-1 (Hirata et al., 1994) besitzen ebenfalls die Fähigkeit, die Synthese von cADP-Ribose zu katalysieren. Im Gegensatz zu der löslichen ADP-ribosyl Cyclase aus *Aplysia* sind diese beiden Enzyme mit der Plasmamembran verbunden. Während CD38 ein typisches Typ II Membranprotein darstellt (Malavasi et al., 1994; Lund et al., 1995; Jacobson et al., 1995), ist BST-1 über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Membran verbunden (Kaisho et al., 1994). Die katalytische Domäne der bisher isolierten ADP-ribosyl Cyclasen aus Säugetieren ist ausnahmslos auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert. Mit diesem Befund, der ihre Beteiligung an der Bildung intrazellulärer cADP-Ribose unwahrscheinlich erscheinen läßt, ist eine der fundamentalen offenen Fragen bezüglich der Funktion dieser Enzyme verbunden.

ADP-ribosyl Cyclase-Aktivitäten (Rusinko und Lee, 1989; Lee et al., 1994a) sowie die Existenz endogener cADP-Ribose (Walseth et al., 1991) konnten in einer großen Zahl von Zellen bzw. Geweben nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die Ca²⁺-freisetzende Wirkung der cADP-Ribose für viele Systeme etabliert (Ziegler et al., 1997a¹). Folglich kann cADP-Ribose als ein weitverbreitetes intrazelluläres Nukleotid angesehen werden, das von grundlegender Bedeutung bei der Regulation der zellulären Ca²⁺-Homöostase zu sein scheint. Dennoch ist es bislang trotz intensiver Forschung nicht gelungen, den Rezeptor für cADP-Ribose zu identifizieren; die Evidenzen weisen cADP-Ribose jedoch eine Beteiligung an der Calcium-induzierten Calcium-Freisetzung, die über Ryanodin-Rezeptoren vermittelt wird, zu (Lee, 1996). Interessanterweise sind nicht alle NADasen in der Lage, das cyclische Nukleotid zu bilden. Das Enzym aus *Neurospora crassa* z. B. katalysiert ausschließlich die Bildung freier ADP-Ribose (und Nikotinamid) aus NAD⁺ (Graeff et al., 1994; Ziegler et al., 1997a¹).

Die hohe Effizienz, mit der cADP-Ribose eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt, läßt es offensichtlich erscheinen, daß es einen wirksamen Mechanismus der Inaktivierung geben muß. cADP-Ribose Hydrolasen, Enzyme, die die hydrolytische Spaltung der cADP-Ribose zu ADP-Ribose katalysieren (Abb. 3, Route 3), sind in der Tat in verschiedenen Geweben nachgewiesen worden (Lee und Aarhus, 1993). Die ersten Befunde, daß die Hydrolase-Aktivität mit der ADP-ribosyl Cyclase korreliert, wurden in der Arbeitsgruppe von Jacobson erbracht (Kim et al., 1993). Für die zur Homogenität gereinigte ADP-ribosyl Cyclase aus Hundemilz-Mikrosomen, die scheinbar homolog zu CD38 ist (Jacobson et al., 1995) sowie für das Enzym aus *Bungarus fasciatus*, konnte die cADP-Ribose Hydrolase-Aktivität nachgewiesen werden. Bisher gehören alle als Hydrolasen identifizierten Enzyme auch zur Klasse der Cyclasen, so daß beide Aktivitäten in einem bifunktionellen Protein vereint sind. Damit kann die "klassische" Reaktion der NAD⁺-Glycohydrolasen als eine Sequenz zweier aufeinanderfolgender katalytischer Teilschritte angesehen werden (Abb. 3, Routen 2 und 3):

1. Synthese cyclischer ADP-Ribose aus NAD⁺ unter Freisetzung des Nikotinamids.
2. Hydrolyse cyclischer ADP-Ribose und Generierung freier ADP-Ribose.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

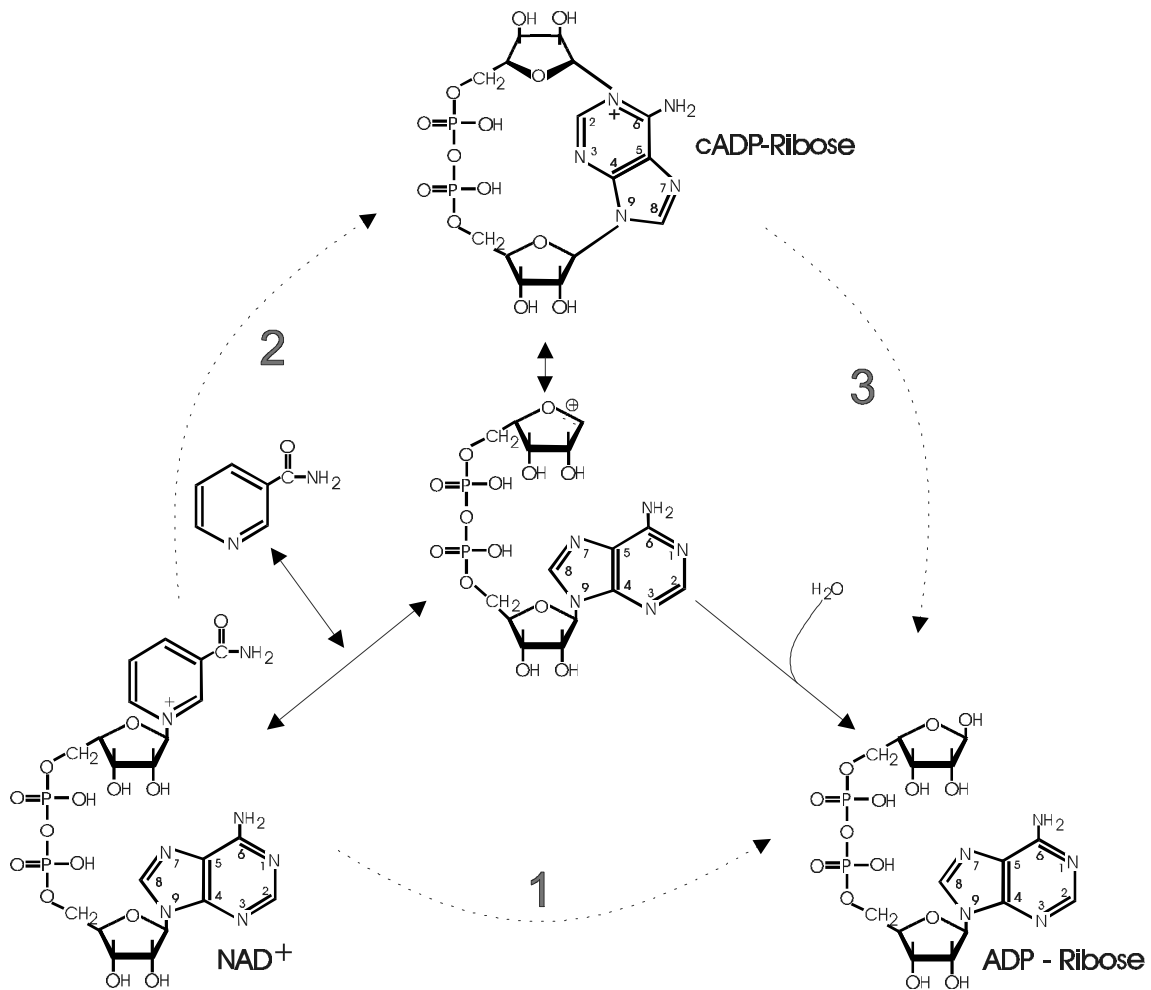


Abb. 3 Struktur und Metabolismus von cyclischer ADP-Ribose (cADP-Ribose). Die bisher bekannten bifunktionellen Enzyme katalysieren die klassische NADase-Reaktion **1**, die Synthese **2** sowie die Hydrolyse von cADP-Ribose **3**. Reaktion **2** ist reversibel, so daß die Synthese von NAD⁺ aus cADP-Ribose und Nikotinamid möglich ist.

Die NADase aus Kälbermilz-Mikrosomen ist eines der am umfassendsten charakterisierten bifunktionellen Enzyme. Sie katalysiert sowohl die Hydrolyse von NAD⁺ und zahlreicher NAD⁺-Analoge (Schuber et al., 1978, 1979) als auch die cADP-Ribose Hydrolase-Reaktion (Muller-Steffner et al., 1994). Darüber hinaus ist dieses Enzym zu einer sogenannten Transglykosylierungsreaktion befähigt, die mit Nikotinamidanaloga (z. B. 3-Acetylpyridin) zu einem Pyridinbasenaustausch (Schuber et al., 1976) und in Anwesenheit von Methanol (Methanolyse) zur Entstehung des Methylribosids führt (Muller-Steffner et al., 1994). Die Transglykosylierungsreaktion verschiedener NADasen wurde zur Synthese zahlreicher NAD⁺-Analoge, wie z. B. Nikotinsäureadenindinukleotid oder 3-Acetylpyridinadenindinukleotid ausgenutzt (Ziegler et al., 1997a¹).

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

Die Reaktionsprodukte der Transglykosylierung weisen alle die ursprüngliche β -Konfiguration bezüglich der terminalen Ribose auf. Daher sowie aufgrund kinetischer Analysen wurde ein Reaktionsmechanismus postuliert (Bull et al., 1978, Schuber et al., 1979; Tarnus et al., 1988; Oppenheimer, 1994), der ein enzymstabilisiertes ADP-ribosyl-Oxocarbeniumion als Intermediat annimmt, welches sowohl aus NAD^+ als auch aus cADP-Ribose gebildet werden kann (Abb. 3, Mitte). Ausgehend von der Zwischenstufe ermöglicht die Konkurrenz zwischen unterschiedlichen Nukleophilen drei Reaktionswege:

1. Die irreversible Entstehung freier ADP-Ribose, die nicht zum Intermediat zurückreagieren kann, da ihr die konservierte Energie der glykosidischen Bindung fehlt.
2. Die reversible Synthese von cyclischer ADP-ribose.
3. Die reversible Bildung von NAD^+ bzw. entsprechender Derivate.

Außerordentlich bemerkenswert ist, daß einige der bifunktionellen NADasen ein sehr breites Spektrum bezüglich ihrer Substrate und Reaktionsprodukte besitzen. Diese Enzyme akzeptieren eine Reihe von NAD^+ -Analoga in der von ihnen katalysierten Reaktion (Ziegler et al., 1997a¹). Neben Pyridinbasenderivaten in der bereits erwähnten Transglykosylierung (s.o.) dienen auch einige Derivate mit Modifikationen im Purinring als Substrate. NAD^+ -Analoga, wie 1,N⁶-Etheno- NAD^+ ($\epsilon\text{-NAD}^+$), Nikotinamidguanidinukleotid (NGD^+) sowie Nikotinamidhypoxanthinukleotid (NHD^+), werden von ADP-ribosyl Cyclasen zu fluoreszenten cyclischen Nucleotiden umgesetzt (Graeff et al., 1994; 1996; Zhang und Sih, 1995). Von großem Interesse dabei ist, daß der Ringschluß der terminalen Ribose in diesen Fällen - im Gegensatz zum N¹-Atom des Adenins bei der cADP-Ribose (Abb. 3) - über das N⁷-Atom des jeweiligen Purinringes erfolgt (Zhang und Sih, 1995; Graeff et al., 1996; siehe auch Abb. 19²).

Zusätzlich können die ADP-ribosyl Cyclase aus *Aplysia* sowie CD38 ein cyclisches Produkt unter Verwendung von NADP^+ bilden (F-J. Zhang et al., 1995; Vu et al., 1996), dessen Identität als cyclische ADP-Ribose-2'-phosphat (2'-P-cADP-Ribose) nachgewiesen wurde. Aus NADP^+ kann noch ein weiterer Metabolit synthetisiert werden: Nikotinsäureadeninukleotidphosphat (NAADP^+) wird in Gegenwart von NADP^+ und Nikotinsäure in einer Transglykosylierung generiert (Chini und Dousa, 1995; Aarhus et al., 1995). Sowohl 2'-P-cADP-Ribose als auch NAADP^+ bewirken eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Während 2'-P-cADP-Ribose in Hirn-Mikrosomen Calcium aus einem cADP-Ribose-sensitiven aber InsP_3 -insensitiven Ca^{2+} -Pool freisetzt (Vu et al., 1996), mobilisiert NAADP^+ Calcium aus Speichern, die scheinbar weder von InsP_3 noch von cADP-Ribose aktiviert werden (Chini et al., 1995; Lee und Aarhus, 1995).

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

² siehe Abschnitt 8.1, Anhang

1.2 Regulation der zellulären Calcium-Homöostase

Calciumionen sind an der Regulation zahlreicher Prozesse, wie Muskelkontraktion, Transmission von Nervenimpulsen, Blutgerinnung, Differenzierung und Proliferation, beteiligt (Berridge, 1993). Die Calciumkonzentration im Extrazellulärraum beträgt ca. 3mM, wovon etwa die Hälfte des Calciums ionisiert, also frei vorliegt. Innerhalb der Zelle tritt Calcium nur ungefähr zu 0,1% ionisiert auf; die cytosolische freie Calciumkonzentration einer ruhenden Zelle liegt im Bereich von 0,1-0,2 μ M (Carafoli, 1987). Dieser deutliche Unterschied in der freien Calciumkonzentration zwischen extra- und intrazellulären Flüssigkeiten bedingt eine große nach innen gerichtete elektrochemische Kraft für Ca^{2+} -Ionen. Intrazelluläres freies Calcium erfüllt die Rolle eines bedeutenden Botenmoleküls für eine Vielzahl von Aktivitäten und muß daher einer grundlegenden Feinregulation unterliegen.

Mit dem Transport von Calciumionen über die Plasmamembran bzw. über Membranen subzellulärer Kompartimente besitzt eine Zelle prinzipiell zwei Hauptwege, um eine Veränderung der intrazellulären Konzentration von Calcium zu bewirken. Die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften verschiedener Calciumtransportsysteme, insbesondere ihre Calcium-Affinität und -Kapazität, lassen auf distinkte Funktionen bei der Regulation der Calciumkonzentration schließen (Carafoli, 1987).

In der Plasmamembran sind drei verschiedene Calciumtransportsysteme lokalisiert (Carafoli, 1987; Richter und Frei, 1988; Richter und Kass, 1991). Die spannungssensitiven Ca^{2+} -Kanäle werden unter Depolarisation der Membran geöffnet, wodurch es zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Cytosol kommt. Über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter werden in einem elektrogenen Prozeß drei Na^+ -Ionen pro Ca^{2+} -Ion ausgetauscht. Bei polarisierter Membran sorgt die einwärts gerichtete Bewegung von Na^+ -Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten für die benötigte Energie des auswärts gerichteten Ca^{2+} -Stroms entgegen dem Konzentrationsgefälle. Unter Depolarisation wird die Richtung der Ionenbewegung umgekehrt. Schließlich wird Calcium durch eine ATP-betriebene Ca^{2+} -Pumpe aus der Zelle transportiert, die ihre Energie aus der Hydrolyse von einem Mol ATP pro Mol transportierter Ca^{2+} -Ionen bezieht.

Das endoplasmatische bzw. sarkoplasmatische Retikulum (ER / SR) stellt einen wichtigen Ca^{2+} -Pool von Zellen dar (Berridge, 1993; Richter und Kass, 1991). Der Transport von Calcium in das Retikulum erfolgt durch spezifische Ca^{2+} -ATPasen, die eine hohe Affinität zu Calciumionen haben. Im Retikulumlumen werden große Mengen von Calcium an Proteine, wie Calsequestrin oder Calreticulin, mit niedriger Affinität gebunden.

Die Freisetzung des intraluminalen Calciums aus dem ER / SR wird durch spezielle Rezeptoren gewährleistet, die einen Ca^{2+} -Kanal bilden (Carafoli, 1987; Berridge, 1993). In nicht-erregbaren Zellen führt die Bindung des "second messengers" Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3) an seinen Rezeptor (InsP_3R) zur Öffnung des Ca^{2+} -Kanals und damit zur Freisetzung von Calcium ins Cytoplasma. Der Hauptweg der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR erregbarer Zellen (Herz-, Skelettmuskel) erfolgt über den Ryanodin-Rezeptor (RyR). Ryanodin-Rezeptoren, die ihren Namen aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber dem Pflanzenalkaloid Ryanodin erhielten, besitzen eine hohe strukturelle und funktionelle Homologie zum InsP_3R (Ogawa, 1994). Der physiologische Ligand der RyRs ist bisher nicht bekannt. Es gibt jedoch erste Evidenzen, daß cADP-Ribose sowohl in Seeigelleiern (Galione et al., 1991) als auch in Herz- und Pankreaszellen (Mészáros et al., 1993; Thorn et al., 1994) einen physiologisch relevanten RyR-Agonisten darstellt.

Ryanodin- und InsP_3 -Rezeptoren weisen beide eine Sensitivität gegenüber Ca^{2+} -Ionen auf, die zu einer verstärkten Mobilisierung ihrer Ca^{2+} -Pools führt. Dieser als Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung (CICR, "calcium-induced calcium-release") bekannte Mechanismus wird als wichtiger Bestandteil der Generierung zeitlicher und räumlicher Varianzen der Ca^{2+} -Freisetzung und -Konzentration (Oszillationen bzw. Wellen) angesehen (Carafoli, 1987; Berridge, 1993; Clapham, 1995).

1.2.1 Bedeutung der Mitochondrien für die zelluläre Calcium-Homöostase

Isolierte, energetisierte Mitochondrien können eine große Menge an Calcium aufnehmen und stellen damit einen wichtigen Ca^{2+} -Pool der Zelle dar (Rossi und Lehninger, 1963; Carafoli, 1979, 1987). Der Transport von Calcium in die mitochondriale Matrix erfolgt energiegekoppelt über einen Ca^{2+} -Uniporter, angetrieben durch die elektrische Komponente der protonenmotorischen Kraft (Carafoli, 1979). Der Calciumausstrom aus Mitochondrien wird durch einen elektroneutralen Antiport gewährleistet, wobei ein $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher sowie ein $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, deren Expression vermutlich gewebespezifisch erfolgt, beschrieben wurden (Gunter und Pfeiffer, 1990; Denton und McCormack, 1990). Da die Ca^{2+} -Affinitäten beider Transportsysteme ($K_m \cong 10\mu\text{M}$) für eine Regulation von Reaktionen, die im sub- μM -Bereich moduliert werden, zu gering ist (Carafoli, 1987), geht man davon aus, daß die Funktion der Mitochondrien nicht primär die Pufferung cytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen physiologischer Bereiche, sondern vielmehr eine langsamere und langfristige Ca^{2+} -Regulation ist (Halestrap, 1989; Gunter und Pfeiffer, 1990; Denton und McCormack, 1990). Dauerhafte oder exzessive Erhöhungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen jedoch aufgrund der großen mitochondrialen Kapazität zu einer Akkumulation des Calciums in den Organellen, die damit als wichtiger Speicher eine Calciumüberladung der Zellen verhindern können (Carafoli, 1987; Richter und Frei, 1988; Halestrap, 1989; Gunter und Pfeiffer, 1990).

Verschiebungen der intrazellulären Homöostase sind oft die Folge schädigender Einwirkungen, wobei das vermehrte Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als eine häufige Ursache angesehen wird. Ein etabliertes Modell für die Belastung von Zellen oder isolierten Mitochondrien mit ROS ("oxidativer Stress") ist die Behandlung mit Peroxidationsmitteln, wie Wasserstoffperoxid oder *tert.*-Butylhydroperoxid (Carafoli, 1987; Richter und Kass, 1991). Hydroperoxide induzieren eine Oxidation mitochondrialer Pyridinnukleotide sowie einen Ausstrom zuvor akkumulierten Calciums (Lötscher et al., 1979, 1980; Hofstetter et al., 1981; Richter und Frei, 1988; Richter, 1990; Richter und Kass, 1991). Die damit verbundene Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytoplasma führt - aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen für den Ca^{2+} -Influx (elektrophoretischer Uniport) und Ca^{2+} -Efflux (elektroneutraler Antiport) - zu einem Calcium-Kreislauf (Ca^{2+} -Cycling) über die innere Mitochondrienmembran (Carafoli, 1979). Eine dauerhafte Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration, die als wichtiger Faktor der Zellnekrose nach Xenobiotikaeinwirkung oder Ischämie/Reoxygenierung gilt (Nicotera, 1992; Carafoli, 1987; Richter und Frei, 1988; Clapham, 1995), resultiert in einem exzessiven Ca^{2+} -Cycling der Mitochondrien. Letztlich ist damit die Abnahme des Membranpotentials und die Verminderung der ATP-Synthese verbunden (Richter und Frei, 1988; Halestrap, 1989; Gunter und Pfeiffer, 1990; Richter und Kass, 1991). Die herabgesetzte Bereitstellung von Energie in Form von ATP und die anhaltende hohe cytosolische Calciumkonzentration münden in einer Zellschädigung, die u. a. durch die Aktivierung zahlreicher kataboler Enzyme, wie Proteasen, Phospholipasen und Nukleasen herbeigeführt wird (Halestrap, 1989; Gunter und Pfeiffer, 1990; Richter und Kass, 1991; Weis et al., 1992; Nicotera, 1992).

1.2.2 Regulation mitochondrialer Calcium-Fluxe durch Pyridinnukleotide

Ein Zusammenhang zwischen dem Redox-Status der Pyridinnukleotide und der Regulation von Ca^{2+} -Fluxen über die innere Mitochondrienmembran wurde zuerst von Lehninger et al. (1978) beschrieben. Die Ca^{2+} -Aufnahme und -Retention wird bevorzugt, wenn die Pyridinnukleotide stärker reduziert vorliegen, während ihre Oxidation den Ca^{2+} -Ausstrom bedingt (Lehninger et al., 1978; Richter und Frei, 1988). In neueren Untersuchungen konnte dargelegt werden, daß eine enge Beziehung zwischen cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen nach InsP_3 -abhängiger Ca^{2+} -Freisetzung und Mitochondrien besteht. Während der metabolische Zustand der Mitochondrien signifikant die Art cytosolischer Ca^{2+} -Wellen beeinflusst (Jouaville et al., 1995), wird die Aktivität von Calcium-sensitiven Dehydrogenasen der Mitochondrienmatrix durch Änderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration moduliert (Denton und McCormack, 1990; Hajnóczky et al., 1995).

Wie bereits erwähnt, führt die Behandlung von isolierten Mitochondrien mit Prooxidantien zu einer verstärkten Oxidation der Pyridinnukleotide und einem Ausstrom von Calcium aus den Organellen (Lötscher et al., 1979, 1980; Hofstetter et al., 1981; Richter et al., 1983). Zusätzlich gibt es Befunde, daß es unter diesen Bedingungen zu einem Nettoverlust von NAD(P)^+ und zu einer kovalenten Modifikation eines mitochondrialen Proteins mit ADP-Ribose kommt (Lötscher et al., 1980; Hofstetter et al., 1981). Der Verlust der Pyridinnukleotide wird durch die Katalyse einer NAD^+ -Glycohydrolase erklärt, die Nikotinamid und freie ADP-Ribose bildet (Lötscher et al., 1980). In Mitochondrien aus Hirn, Leber und Herz der Ratte, scheint die Inkubation sowohl mit NAD^+ als auch mit ADP-Ribose bei gleicher Effizienz und vor allem gleicher Sensitivität zur Modifikation zweier Hauptakzeptoren ($M_r \cong 30.000$ und $M_r \cong 50.000$) zu führen (Richter et al., 1983; Hilz et al., 1984). Da die Inhibition der mitochondrialen NADase durch ATP (Hofstetter et al., 1981) sowie Nikotinamid (Richter et al., 1983; Hilz et al., 1984) im gleichen Maße die ADP-Ribosylierung verminderte, wurde vorgeschlagen, daß die apparent enzymatische ADP-Ribosylierung die Folge einer NADase-katalysierten Hydrolyse des NAD^+ mit anschließender nicht-enzymatischer Reaktion der generierten ADP-Ribose ist (Hofstetter et al., 1981; Richter et al., 1983; Hilz et al., 1984; Frei und Richter, 1988). Weiterhin wurde beobachtet, daß die Einwirkung von *tert.*-Butylhydroperoxid auf isolierte Mitochondrien mit einer verstärkten ADP-Ribosylierung eines mitochondrialen Proteins mit einem Molekulargewicht von $M_r \cong 30.000$ einhergeht (Hofstetter et al., 1981; Richter et al., 1983). Es wurde postuliert, daß diese Proteinmodifikation mit dem beobachteten Ca^{2+} -Ausstrom aus Mitochondrien in kausalem Zusammenhang steht (Richter und Kass, 1991). Das von Richter und Mitarbeitern erarbeitete Modell (Abb. 4) schlägt folgenden Reaktionsablauf vor:

1. Prooxidantien induzieren die Oxidation der mitochondrialen Pyridinnukleotide.
2. Eine NAD^+ -Glycohydrolase katalysiert die Hydrolyse der Pyridinnukleotide.
3. Freie ADP-Ribose modifiziert in einer nicht-enzymatischen aber spezifischen Reaktion mitochondriale Proteine, die mit dem Ca^{2+} -Efflux-System in Zusammenhang stehen. (Nikotinamid kann die Mitochondrien verlassen).
4. Es erfolgt ein Ca^{2+} -Ausstrom aus Mitochondrien.

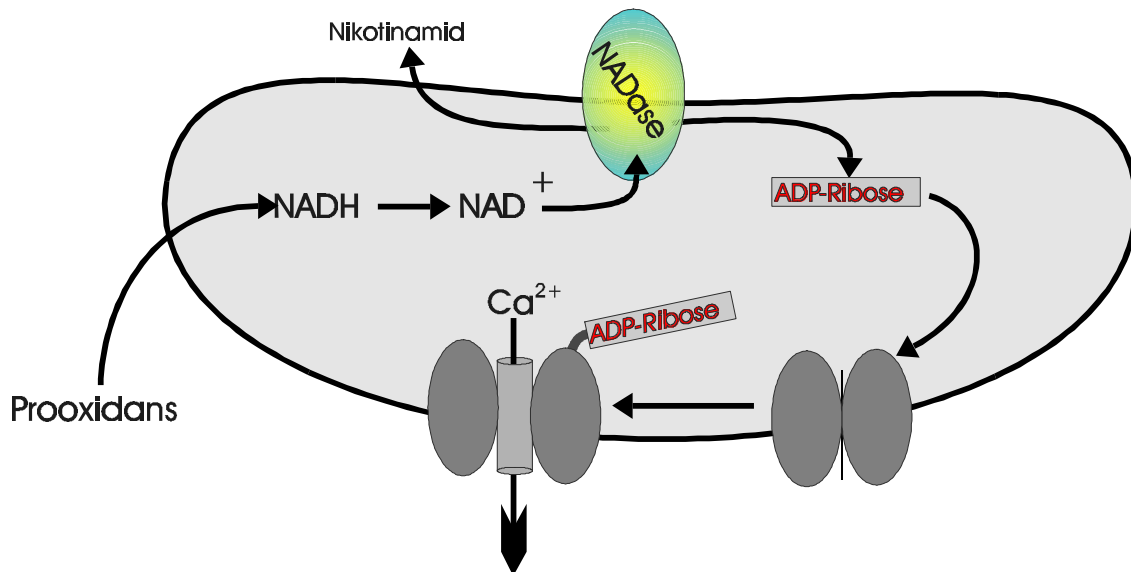


Abb. 4 Vorgeschlagener Mechanismus der prooxidans-induzierten Calciumfreisetzung aus Mitochondrien (Richter und Kass, 1991).

Darüber hinaus scheint es jedoch auch enzymatische ADP-Ribosylierung in Mitochondrien zu geben. So wurde in Mitochondrien der Rattenleber ein Magnesium-abhängiges Enzymssystem beschrieben, daß mit NAD⁺ als Substrat hauptsächlich ein Membranprotein ($M_r \cong 50.000$) mit ADP-Ribose modifiziert (Kun et al., 1975). In Mitochondrien aus dem Hodengewebe verschiedener Tiere wurde ebenfalls eine ADP-Ribosyltransferase identifiziert (Burzio et al., 1981). In beiden Fällen wurde vermutet, daß zumindest ein Teil der proteingebundenen ADP-Ribose als Oligomer vorliegt. In der Arbeitsgruppe von Paul Mandel konnte gezeigt werden, daß die effiziente Inhibition der mitochondrialen NADase aus Hirn und Leber der Ratte durch Nikotinamid, 3-Aminobenzamid oder ATP das Ausmaß der enzymatischen ADP-Ribosylierung in Mitochondrien nur geringfügig vermindert (Masmoudi und Mandel, 1987; Masmoudi et al, 1988).

Die modifizierte(n) Aminosäure(n) der mitochondrialen Akzeptoren konnte(n) bisher nicht identifiziert werden. Die Inhibition der ADP-Ribosylierung durch Arginin-blockierende Reagenzien, wie Butandion (Richter et al., 1983), oder meta-Iodobenzylguanidin, ein Akzeptor Arginin-spezifischer ADP-Ribosylierung (Richter, 1990), wurde beschrieben. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Stabilität (siehe auch Tab. 1) der ADP-Ribose-Bindungen in isolierten inneren Mitochondrienmembranen wurden drei verschiedene Arten kovalenter ADP-Ribose-Addukte vorgeschlagen: Carboxylat-, Arginin- und Cystein-Typ (Frei und Richter, 1988). Erst kürzlich konnten endogene ADP-Ribose-Proteinbindungen in Mitochondrien detektiert werden, die durch ihre Säurelabilität auf eine Beteiligung von modifizierten Hydroxylgruppen hinweisen (Cervantes-Laurean et al., 1995).

Der Hydrolyse des NAD^+ , katalysiert von einer NAD^+ -Glycohydrolase, wird eine wichtige Funktion in dem von Richter und Kass (1991) vorgeschlagenen Mechanismus der durch Prooxidantien induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus Mitochondrien zugeordnet (Abb. 4). Eine mitochondriale NADase-Aktivität ist mehrfach dokumentiert worden (Lötscher et al., 1980; Mas-moudi und Mandel, 1987; Richter und Frei, 1988; Zhang et al., 1995; Ziegler et al., 1996¹). Die genaue Lokalisierung dieses Enzyms innerhalb der Organelle ist bis heute noch unklar: sowohl die äußere (Boyer et al., 1993) als auch die innere Mitochondrienmembran (Moser et al., 1983; Frei und Richter, 1988; Zhang et al., 1995; Ziegler et al., 1996¹) wurde benannt. Aus Rattenleber-Mitochondrien wurde eine NADase partiell gereinigt und ihr Molekulargewicht mit $M_r \approx 62.000$ bestimmt (Moser et al., 1983). Im Gegensatz dazu konnte die mitochondriale Enzymaktivität der Kalbsleber mit einem 32kDa-Protein korreliert werden (Zhang et al., 1995). Wesentliche Informationen über die mitochondriale NAD^+ -Glycohydrolase sind im Rahmen meiner Diplomarbeit erarbeitet worden. Sie lieferten eine wichtige Grundlage für die in Abschnitt 3 aufgeführten Ergebnisse und werden an dieser Stelle kurz zusammengefaßt. Zum einen wurde ein direkter Nachweis der Enzymaktivität in der Gelmatrix nach SDS-Polyacrylamidelektrophorese etabliert (Ziegler et al., 1996¹). Anhand dieses Verfahrens konnte das Molekulargewicht der NADase unter nicht-reduzierenden Bedingungen, in Bestätigung des zuvor erhaltenen Befundes (Zhang et al., 1995), mit $M_r \approx 30.000$ abgeschätzt werden (Ziegler et al., 1996¹). Auf der anderen Seite wurde durch die Behandlung isolierter Mitochondrien mit Steapsin - einem Pankreas-Rohprodukt mit proteo- und lipolytischen Enzymaktivitäten - eine wasserlösliche Form des ansonsten membran-assoziierten Enzyms erhalten, deren katalytischen Eigenschaften denen der detergenzsolubilisierten Form vergleichbar sind (Ziegler et al., 1996¹; Jorcke et al., 1997¹). Das Molekulargewicht der mit Steapsin behandelten NADase ist mit $M_r \approx 28.000$ nur geringfügig kleiner als das des nativen Enzyms ($M_r \approx 30.000$); dennoch ist damit der Verlust der Regulierbarkeit durch bivalente Kationen verbunden. Reduzierende Agenzien, wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), wirken inhibitorisch auf die mitochondriale NADase (Ziegler et al., 1996¹; Jorcke et al., 1997¹). Interessanterweise zeigt die gut charakterisierte bifunktionelle NAD^+ -Glycohydrolase, CD38, eine vergleichbare Sensitivität. Das Enzym wird durch bivalente Kationen (Zn^{2+} , Cu^{2+}) aktiviert (Zocchi et al., 1993) und durch reduzierende Reagenzien inhibiert (Franco et al., 1994; Zocchi et al., 1995). Die Charakterisierung der mitochondrialen NAD^+ -Glycohydrolase ist in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Untersuchungen des letzten Jahrzehntes haben belegt, daß NAD^+ -Glycohydrolasen eine fundamentale Rolle bei der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase spielen (Abschnitt 1.1.2). Einige dieser Enzyme katalysieren den Metabolismus des neuartigen Ca^{2+} -mobilisierenden Signalmoleküls cADP-Ribose (Ziegler et al., 1997a¹). Eine Verbindung zwischen mitochondrialer NADase und dem Calcium-Ausstrom der Organellen ist bereits hergestellt worden (Richter und Kass, 1991; Abb. 4). Damit scheint es naheliegend, dieses Enzym bezüglich einer ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität und den prooxidans-induzierten Ca^{2+} -Efflux in Hinblick auf einen möglichen cADP-Ribose-abhängigen Signalweg zu untersuchen. Die Identifizierung der mitochondrialen NADase als ADP-ribosyl Cyclase würde aus einem weiteren Grund ein eminent wichtiges Ergebnis darstellen: Zum ersten Mal könnte ein intrazelluläres Enzym mit der Bildung von cADP-Ribose in Beziehung gebracht werden (Abschnitt 1.1.2). Wenn die physiologische Funktion der mitochondrialen NADase nicht in der Generierung freier ADP-Ribose als Substrat nicht-enzymatischer ADP-Ribosylierung besteht, müßte dieser Mechanismus der Modifizierung neu beurteilt und unter anderen Gesichtspunkten überprüft werden.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

2. Zielsetzung

Mit der NAD^+ -Glycohydrolase-Aktivität und der ADP-Ribosylierung sind zwei elementare Bestandteile NAD^+ -abhängiger Signalübertragung mit Mitochondrien verknüpft. Ein Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es, die Verbindung dieser beiden Komponenten grundlegend zu hinterfragen. Deshalb war es von großer Bedeutung, mitochondriale Proteine, die an der Metabolisierung der Pyridinnukleotide beteiligt sind bzw. Akzeptoren der Modifikation darstellen, eingehend zu untersuchen. Vor allem die Abgrenzung enzymatischer ADP-Ribosylierung, katalysiert durch eine ADP-Ribosyltransferase, von einer nicht-enzymatischen Modifikation, der die Bildung freier ADP-Ribose durch eine NADase vorangeht, sollte wichtige Informationen über die eventuelle Beteiligung NAD^+ -metabolisierender Enzymaktivitäten an der Ca^{2+} -Regulation der Mitochondrien liefern. Obwohl mehrfach dokumentiert, sind bis heute nur wenige Daten über eine enzymatische ADP-Ribosylierung, insbesondere die ADPRT, bekannt. Die Identifizierung einer ADPRT in Mitochondrien einschließlich einer molekularen Charakterisierung des Enzyms und der ADP-ribosylierten Akzeptoren, sollte interessante Hinweise auf die Modulation mitochondrialer Funktionen ergeben.

Die mitochondriale NAD^+ -Glycohydrolase katalysiert die klassische Reaktion, die aus NAD^+ freie ADP-Ribose und Nikotinamid generiert. Der Nachweis zusätzlicher katalytischer Fähigkeiten, die die Synthese und den Abbau von cADP-Ribose einschließen sowie der qualitative Vergleich dieser Enzymaktivitäten, stand für die mitochondriale NADase im Vordergrund. Die Etablierung der NADase als bifunktionelles Enzym, das den Metabolismus des neuartigen Signalmoleküls cADP-Ribose katalysiert, war aus verschiedenen Gründen ein vorrangiges Ziel. Zum einen könnte erstmalig in Säugern die Synthese von cADP-Ribose durch ein intrazelluläres Enzym belegt werden. Zum anderen ist die große Potenz dieses Nukleotids den Ca^{2+} -Ausstrom intrazellulärer Speicher zu modulieren vielfach dokumentiert. Da die NAD^+ -Glycohydrolase bereits mit dem Ca^{2+} -Efflux aus Mitochondrien in Beziehung gebracht wurde, ließe sich die Funktion des mitochondrialen Ca^{2+} -Pools bei der zellulären Calcium-Regulation festigen und darüber hinaus diesbezüglich ein interessanter Mechanismus ableiten.

3. Ergebnisse

3.1 ADP-Ribosylierung in Rinderlebermitochondrien

Die Inkubation isolierter Mitochondrien mit [³²P]-markiertem NAD⁺ resultiert in einer spezifischen Inkorporation der Radioaktivität in zwei Proteine mit apparenten Molekulargewichten von $M_r \cong 26.000$ und $M_r \cong 53.000$ (Jorcke et al., 1998¹; Abb. 5, Spur 1). Enzymatische sowie nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung ist in Mitochondrien mehrfach beschrieben worden (Abschnitt 1.2.2). Die Untersuchung der ADP-Ribosylierung unter Verwendung des NAD⁺ stellt dabei ein großes Problem dar, da sowohl NAD⁺-Glycohydrolasen als auch ADP-Ribosyltransferasen dieses Nukleotid als Substrat nutzen. Die Bildung freier ADP-Ribose durch die katalytische Aktivität einer NADase ist für eine nicht-enzymatische Modifizierung die Voraussetzung. Um die beiden beobachteten Mechanismen der kovalenten Modifikation mitochondrialer Proteine voneinander abzugrenzen, war es deshalb von großer Bedeutung, Bedingungen zu etablieren, unter denen die mitochondriale NADase inaktiviert wird und die Entstehung freier ADP-Ribose ausgeschlossen werden kann. Die NADase aus Mitochondrien der Rinderleber wurde bereits eingehend charakterisiert (Ziegler et al., 1996¹; Jorcke et al., 1997¹). Insbesondere die inhibitorischen Eigenschaften der Effektoren Nikotinamid, EDTA und DTT (Tab. 2) ermöglichen die Untersuchung der enzymatischen ADP-Ribosylierung unter Inaktivierung der mitochondrialen NADase.

Solubilisierung durch	Detergenz	Steapsin
M_r (app.)	30.000	28.000
K_M (ϵ -NAD ⁺)	10 μ M	9 μ M
K_I (Nikotinamid)	150 μ M	128 μ M
pH-Optimum	8,3	8,5
Temperatur-Optimum	39°C	36°C
<u>Restaktivität nach:</u>		
NaCl, 1 M	20 %	12 %
DTT, 10 mM	keine	keine
EDTA, 2 mM	5 %	97 %

Tab. 2 Eigenschaften der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase nach Detergenz- oder Steapsinsolubilisierung. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte unter Verwendung des Substratanalogons 1,N⁶-Etheno-NAD⁺ (ϵ -NAD⁺) im Fluoreszenzphotometer (Jorcke et al., 1997¹; Ziegler et al., 1996¹).

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

3.1.1 Die kovalente Modifizierung mitochondrialer Proteine mit ADP-Ribose ist eine enzymatische Reaktion

In Abbildung 5 ist der Einfluß verschiedener Effektoren auf die mitochondriale ADP-Ribosylierung dargestellt. Die kovalente Modifikation der Proteine nach Inkubation mit [³²P]-NAD⁺ und anschließender SDS-PAGE wurde durch Autoradiographie visualisiert. 3-Aminobenzamid (3-ABA) und Nikotinamid sind effektive Inhibitoren der mitochondrialen NADase (Masmoudi und Mandel, 1987; Masmoudi et al., 1988; Ziegler et al., 1996¹, 1997b¹); bei einer Effekorkonzentration von 5mM, die ausreicht, um die NADase nahezu vollständig zu inhibieren, wird die ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine nur geringfügig vermindert (Abb. 5, Spuren 2 und 4). Die Anwesenheit von 2mM EDTA führt sogar zu einer leicht verstärkten Inkorporation von Radioaktivität (Abb. 5, Spur 5), wohingegen die Aktivität der NADase unter diesen Bedingungen drastisch abnimmt (Tab. 2). Während die Aktivität der mitochondrialen NADase bei Zugabe von 1mM ATP um mehr als 50% reduziert wird (nicht gezeigt), erfolgt eine Stimulierung der ADP-Ribosylierung durch ATP (Abb. 5, Spur 7). In Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen (z. B. 2,5mM MgCl₂) ist die Proteinmodifikation nur noch sehr schwach detektierbar (Abb. 5, Spur 6), die NADase-Aktivität wird hierdurch nicht beeinflusst (Ziegler et al., 1996¹). Die in Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, daß die mitochondriale ADP-Ribosylierung mit NAD⁺ als Substrat über eine enzymatische Reaktion erfolgt, da unter allen gewählten Bedingungen, die die NADase signifikant inhibieren, die ADP-Ribosylierung nur unwesentlich vermindert wird.

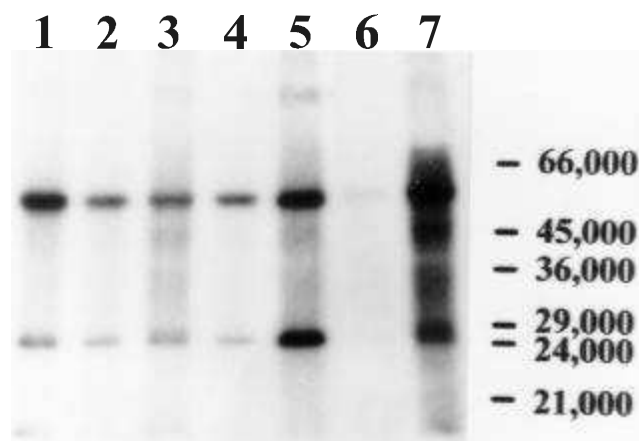
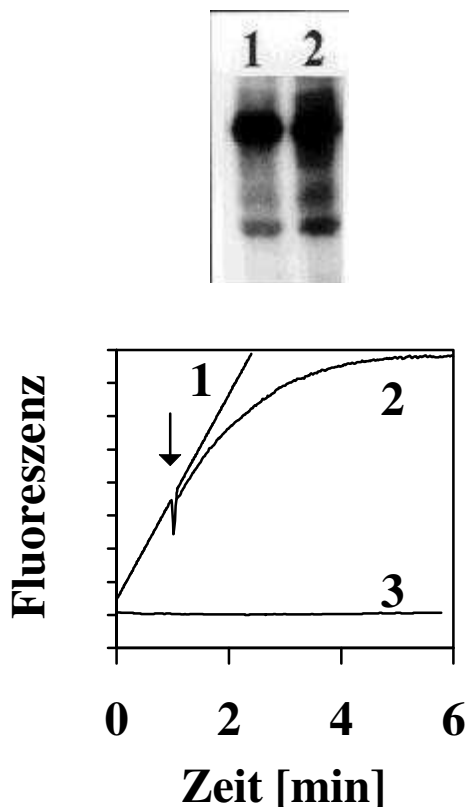


Abb. 5 Einfluß verschiedener Effektoren auf die mitochondriale ADP-Ribosylierung. Die Inkubation isolierter Mitochondrien (200µg) erfolgte für 15 Minuten bei 30°C in 50µl Ribosylierungspuffer (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 25µM [³²P]-NAD⁺ [1µCi/nmol]) in Gegenwart der unten aufgeführten Komponenten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 450µl eiskaltem Aceton gestoppt. Präzipitierte Proteine wurden nach Resuspendierung in Probenpuffer durch SDS-PAGE (12% Gel) getrennt. Gezeigt ist das Autoradiogramm des Gels. Auf der rechten Seite sind die molaren Massen (in Da) von Markerproteinen angegeben. Spur 1, Kontrolle (ohne Zusätze); Spur 2, Nikotinamid (5mM); Spur 3, ADP-Ribose (0,5mM); Spur 4, 3-ABA (5mM), Spur 5, EDTA (2mM); Spur 6, MgCl₂ (2,5mM); Spur 7, ATP (1mM).

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

Ein weiterer Befund, der diese Annahme unterstützt, ergibt sich durch die Versuchsdurchführung in Anwesenheit von 10mM DTT (Abb. 6). Die mitochondriale NADase-Aktivität kann in einem kontinuierlichen fluoreszenzphotometrischen Verfahren mit Hilfe des Substratanalogons 1,N⁶-Etheno-NAD⁺ (ϵ -NAD⁺) gemessen werden (Ziegler et al., 1996¹). Die Abtrennung der quenchenden Nikotin-amidgruppe vom Fluorophor, Etheno-Adenin, führt zu einem ca. zehnfachen Anstieg der Fluoreszenz (Barrio et al., 1972).

Die Zugabe von DTT (10mM Endkonzentration) in den Reaktionsansatz einer laufenden Messung macht die Inhibition der mitochondrialen NADase durch reduzierende Reagenzien deutlich (Abb. 6B, vergleiche Graphen 1 und 2), während eine 15-minütige Vorinkubation des Enzyms mit 10mM DTT zu einer scheinbar vollständigen Inaktivierung der NADase führt (Abb. 6, Graph 3). Im Gegensatz dazu wird die ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine durch die Anwesenheit von 10mM DTT nicht beeinflusst (Abb. 6A). Unter Verwendung von NAD⁺ als Substrat ist die Generierung freier ADP-Ribose die Grundvoraussetzung für eine nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung. In Gegenwart von 10mM DTT kann jedoch keine meßbare Bildung von ADP-Ribose beobachtet werden (Abb. 6). Darüber hinaus vermindert ein 20-facher molarer Überschuß an unmarkierter freier ADP-Ribose die Inkorporation von Radioaktivität aus [³²P]-NAD⁺ nur in geringem Maße (Abb. 5, Spur 3). Eine ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine nach 15-minütiger Inkubation mit [³²P]-ADP-Ribose anstelle von [³²P]-NAD⁺ konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



A **Abb. 6 Einfluß reduzierender Agenzien auf die mitochondriale ADP-Ribosylierung und NAD⁺-Glycohydrolase-Aktivität.**

(A) Autoradiogramm eines ADP-Ribosylierungsexperimentes. Mitochondrien wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur ohne DTT (Spur 1) bzw. in Gegenwart von 10mM DTT (Spur 2) vorinkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte, wie unter Abb. 5 beschrieben, ohne DTT (Spur 1) bzw. in Anwesenheit von 10mM DTT (Spur 2).

B (B) Fluoreszenzphotometrischer Nachweis der enzymatischen Aktivität der mitochondrialen NADase. Partiiell gereinigtes Enzym (Ziegler et al., 1996¹) wurde in einem 700 μ l Ansatz, bestehend aus 50mM Tris/HCl pH 7,5; 0,03% LDAO und 10 μ M ϵ -NAD⁺, inkubiert. Der Pfeil markiert die Zugabe von DTT (Graph 2, Endkonzentration 10mM) bzw. eines gleichen Volumens (7 μ l) Wasser in die Kontrollprobe (Graph 1). In einem weiteren Ansatz wurde das Enzym zunächst 15 Minuten mit 10mM DTT vorinkubiert und anschließend in den Meßpuffer (inklusive 10mM DTT) überführt (Graph 3).

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

3.1.2 Identifizierung der modifizierenden Gruppe als ADP-Ribose

Aufgrund der Anwesenheit verschiedener funktioneller Gruppen innerhalb des NAD^+ -Moleküls ist es sehr wichtig, die Natur der inkorporierten Gruppe nach Inkubation mit NAD^+ zu bestimmen. Für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) konnte z. B. gezeigt werden, daß die beobachtete Modifizierung nach der Reaktion mit NAD^+ , die durch Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert wird, keine ADP-Ribosylierung ist (McDonald und Moss, 1993a). Der Cysteinrest im aktiven Zentrum der GAPDH scheint primär durch Nitrosylierung mittels NO so verändert zu werden, daß eine kovalente Bindung des intakten NAD^+ -Moleküls ermöglicht wird (McDonald und Moss, 1993a). Um die Art, der in mitochondriale Proteine inkorporierten Gruppe nach Inkubation mit NAD^+ zu bestimmen, wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. Isolierte Mitochondrien wurden mit $[^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$ inkubiert, das die radioaktive Markierung entweder im Nikotinamidring [Nikotinamid- $^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$ oder im Adeninrest [Adenin- $^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$ trug. Ein Einbau von Radioaktivität in mitochondriale Proteine kann nur detektiert werden, wenn der Adeninrest des NAD^+ die Markierung trägt (Abb. 7, Spur 2), nicht jedoch, wenn der Nikotinamidring mit $[^{14}\text{C}]$ markiert ist (Abb. 7, Spur 1).

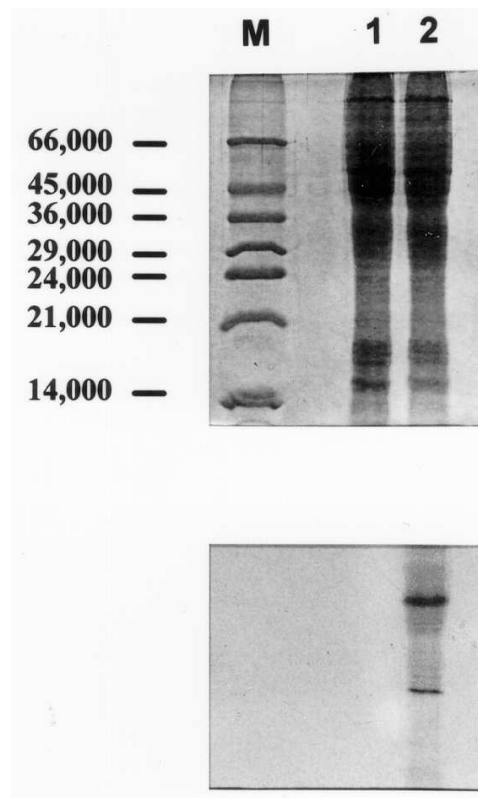


Abb. 7 ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine mit [Nikotinamid- $^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$ oder [Adenin- $^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$. Die Durchführung erfolgte wie unter Abb. 5 beschrieben; anstelle von $[^{32}\text{P}]$ -markiertem NAD^+ wurde $[^{14}\text{C}]$ -markiertes NAD^+ mit einer spezifischen Aktivität von 10 nCi/nmol eingesetzt. Der obere Teil zeigt das mit Coomassie-Blau gefärbte Proteingel; am linken Rand sind die molaren Massen (in Da) von Markerproteinen angegeben. Im unteren Teil ist das dazugehörige Autoradiogramm gezeigt. Spur M, Markerproteine; Spur 1, Inkubation mit [Nikotinamid- $^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$; Spur 2, Inkubation mit [Adenin- $^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$.

2. ADP-ribosylierte mitochondriale Proteine wurden mit der Phosphodiesterase I aus Schlangengift behandelt. Dieses Enzym spaltet spezifisch die Phosphoanhydridbindung von NAD^+ oder ADP-Ribose. Dabei freigesetzte Reaktionsprodukte wurden durch Dünnschichtchromatographie getrennt und mittels Autoradiographie detektiert (nicht gezeigt). Für diesen Versuch wurden zunächst isolierte Mitochondrien mit $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ radioaktiv markiert und nicht gebundene Nukleotide durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die anschließende Behandlung ADP-ribosylierter Proteine mit Phosphodiesterase setzte $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-AMP}$ frei (nicht gezeigt).

Die Inkubation isolierter Mitochondrien mit radioaktiv markiertem NAD^+ führt zu einer Inkorporation von Radioaktivität in mitochondriale Proteine, wenn die Markierung im α -Phosphat der Adenylatgruppe $[\text{Adenylat-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ sowie im Adeninring $[\text{Adenin-}^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$ vorliegt, nicht jedoch, wenn der Nikotinamidring $[\text{Nikotinamid-}^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$ die Markierung trägt. Darüber hinaus wird durch die Behandlung mit Phosphodiesterase aus zuvor ADP-ribosylierten mitochondrialen Proteinen AMP freigesetzt. Diese Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, daß mitochondriale Proteine während der Inkubation mit NAD^+ kovalent durch den ADP-Riboserest modifiziert werden.

3.1.3 Die ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine erfolgt überwiegend an Cysteinresten

Alle bisher bekannten monoADP-ribosyltransferasen weisen eine hohe Spezifität gegenüber der Akzeptor-Aminosäure auf. Die Überprüfung der chemischen Stabilität der kovalenten Bindung mit ADP-Ribose ermöglicht die Identifizierung der an der Modifikation beteiligten Aminosäure (Abschnitt 1.1.1, Tab. 1).

Für die Untersuchung der Sensitivität mitochondrialer Protein-ADP-Ribose-Bindungen gegenüber verschiedenen Chemikalien wurden isolierte Mitochondrien zunächst mit $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ inkubiert. Aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse (Abschnitt 3.1.1) erfolgte die ADP-Ribosylierung in Anwesenheit von 10mM DTT und 1mM EDTA, so daß eine signifikante Beteiligung nicht-enzymatischer Modifizierung ausgeschlossen werden kann. Die Detektion verbleibender, proteingebundener Radioaktivität nach Inkubation mit unterschiedlichen Chemikalien kann als Maß für die Stabilität der ADP-Ribose-Bindungen dienen. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen bezüglich mitochondrialer Proteine zusammengefaßt. Unter stark alkalischen Bedingungen (1M NaOH) wird die inkorporierte ADP-Ribose fast vollständig freigesetzt. Mit Hydroxylamin (1M, pH 7,0), das ADP-Ribose-Bindungen vom Carboxylat- sowie Arginintyp spaltet (Tab. 1), wird kein signifikanter Verlust proteinassoziierter Radioaktivität beobachtet. Im Gegensatz dazu kann ein Großteil der radioaktiven Markierung mitochondrialer Proteine durch 10mM HgCl_2 abgelöst werden, was unverkennbar auf die Beteiligung von Cysteinresten an den Bindungen hinweist. Ein signifikanter Anteil der mitochondrialen Protein-ADP-Ribose-Bindungen läßt eine Säurelabilität erkennen; ein Merkmal, das bereits für endogene ADP-Ribose-Bindungen in Mitochondrien beschrieben wurde (Cervantes-Laurean et al., 1995).

Behandlung	Freigesetzte Radioaktivität (% der Kontrolle)
44% (v/v) Ameisensäure	20 ± 5
1 M NaOH	90 ± 7
1 M Hydroxylamin (pH 7,0)	7 ± 4
10 mM HgCl ₂	62 ± 11

Tab. 3 Chemische Stabilität der ADP-Ribose-Bindungen in Mitochondrien. Isolierte Mitochondrien wurden für zwei Stunden bei 30°C mit 25µM [³²P]-NAD⁺ in Ribosylierungspuffer (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 10mM DTT; 1mM EDTA) inkubiert. Durch mehrfaches Waschen wurden nicht gebundene Nukleotide entfernt bis keine weitere Abnahme der proteinassoziierten Radioaktivität mehr nachweisbar war. Anschließend wurde das Pellet in 50mM MOPS/KOH-Puffer, pH 7,0 resuspendiert und nach Zugabe der aufgeführten Reagenzien zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Nach Präzipitation der Proteine mit Trichloressigsäure (10% (w/v), Endkonzentration) wurde die Radioaktivität bestimmt und auf die präzipitierte Proteinmenge bezogen. Die angegebenen Werte (± S.E.M., n=3) wurden bezüglich der freigesetzten Radioaktivität der Kontrolle (Inkubation für zwei Stunden bei 30°C, ohne weitere Zugabe) korrigiert.

3.1.4 Die Aldehyd-Dehydrogenase aus Hefe wird durch die mitochondriale ADPRT modifiziert

Die mitochondriale Isoform der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) aus Hefe wurde als Akzeptor einer thiolassozierten ADP-Ribosylierung beschrieben, die in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit freier ADP-Ribose, nicht jedoch mit NAD⁺ stattfindet (McDonald und Moss, 1993b). Die Modifikation erfolgt anscheinend im aktiven Zentrum der ALDH am katalytisch aktiven Cysteinrest unter Abnahme der enzymatischen Aktivität (McDonald und Moss, 1993b). Die Ergebnisse dieser Arbeit in bezug auf ein Mitochondrienprotein haben uns veranlaßt, die ALDH aus Hefe in Hinblick auf eine mögliche enzymatische ADP-Ribosylierung durch die ADPRT aus Rinderlebermitochondrien zu untersuchen.

Unter den bisher beschriebenen Bedingungen der enzymatischen ADP-Ribosylierung (25µM Substrat und 15 Minuten Inkubationszeit) kann bei Verwendung von [³²P]-ADP-Ribose als Substrat ein Einbau von Radioaktivität weder in mitochondriale Proteine (nicht gezeigt) noch in die ALDH der Hefe (Abb. 8, Spur 1) detektiert werden. Erst nach einer vierfach verlängerten Reaktionszeit sowie einer dreifach erhöhten Expositionszeit des Röntgenfilms läßt sich eine Inkorporation von Radioaktivität mittels [³²P]-ADP-Ribose nachweisen (Jorcke et al., 1998¹). Im Gegensatz dazu findet ein Einbau von Radioaktivität in die ALDH nach Inkubation mit 25µM [³²P]-NAD⁺ statt, jedoch nur in Anwesenheit der mitochondrialen ADP-Ribosyltransferase-Aktivität (Abb. 8, vergleiche Spuren 2 und 3).

Die enzymatische ADP-Ribosylierung der ALDH aus Hefe scheint ebenfalls einen Cysteinrest zu involvieren. Nach einer Vorinkubation der ALDH mit N-Ethylmaleimid (NEM), einem thiolpezifischen Reagenz, wird die Modifizierung dieses Enzyms durch die mitochondriale ADPRT-Aktivität mit NAD⁺ als Substrat erheblich verringert (Abb. 9).

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

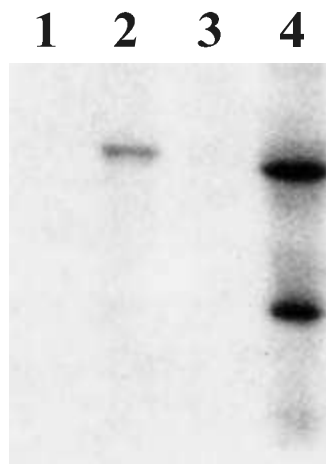


Abb. 8 Enzymatische ADP-Ribosylierung der ALDH durch die mitochondriale ADPRT. ALDH (20 μg) wurde mit 25 μM [^{32}P]-NAD $^{+}$ oder 25 μM [^{32}P]-ADP-Ribose für 15 Minuten ohne (Spuren 1 und 3) bzw. in Anwesenheit von 10 μg Mitochondrien (Spur 2) in Ribosylierungspuffer (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 10mM DTT; 1mM EDTA) inkubiert. Mitochondrien wurden in Gegenwart von 10mM DTT für 15 Minuten präinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des radioaktiven Substrates gestartet und mit 450 μl eiskaltem Aceton gestoppt. Präzipitierte Proteine wurden in Probenpuffer resuspendiert und durch SDS-PAGE (12% Gel) getrennt. Das Autoradiogramm des Gels ist gezeigt. Spur 1, ALDH + [^{32}P]-ADP-Ribose, Spur 2, ALDH + [^{32}P]-NAD $^{+}$ + Mitochondrien, Spur 3, ALDH + [^{32}P]-NAD $^{+}$, Spur 4, Kontrolle: [^{32}P]-NAD $^{+}$ + Mitochondrien (ohne ALDH), vergleiche Abb. 5, Spur 1.



Abb. 9 Die Modifizierung von Thiolgruppen der ALDH verhindert ihre ADP-Ribosylierung durch die mitochondriale ADPRT. Spur 2, ALDH (20 μg) wurde 30 Minuten mit 1mM NEM in 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 1mM EDTA bei 30°C vorbehandelt und nach Zugabe von 20mM DTT weitere 30 Minuten inkubiert. Spur 1, Kontrollprobe: In einer 30-minütigen Vorinkubation von 1mM NEM und 20mM DTT wurde das NEM zunächst inaktiviert. Die Zugabe der ALDH (20 μg) fand im Anschluß daran statt. Nach der jeweiligen Vorbehandlung wurde die ADP-Ribosylierung durch Hinzugabe von 25 μM [^{32}P]-NAD $^{+}$ und 10 μg Mitochondrien gestartet und die Ansätze 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Die durch Aceton präzipitierten Proteine wurden anschließend in Probenpuffer resuspendiert und durch SDS-PAGE (12% Gel) getrennt. Das Autoradiogramm des Gels ist abgebildet.

3.1.5 Konsequenzen für die mitochondriale ADP-Ribosylierung

Das von Richter und Kass (1991) vorgeschlagene Modell der Ca^{2+} -Freisetzung aus Mitochondrien (Abb. 4) beinhaltet die nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung spezifischer Akzeptoren durch freie ADP-Ribose, die zuvor durch eine NAD^+ -Glycohydrolase gebildet wurde. Daß freie ADP-Ribose in der Tat mitochondriale Proteine modifizieren kann, ist mehrfach gezeigt worden (Richter et al., 1983; Hilz et al., 1984; Frei und Richter, 1988). Demgegenüber steht, daß eine mitochondriale ADP-Ribosylierung mit NAD^+ als Substrat nur geringfügig beeinflusst wird, wenn die NADase scheinbar vollständig gehemmt ist und damit die Generierung von ADP-Ribose ausgeschlossen werden kann (Masmoudi und Mandel, 1987; Masmoudi et al., 1988). Die hier dargestellten Ergebnisse unterstützen diese Befunde und zeigen, daß Rinderlebermitochondrien eine enzymatische Aktivität besitzen, die den Transfer der ADP-Ribose aus NAD^+ auf spezifische mitochondriale Akzeptoren katalysiert (Abb. 5-7). Darüber hinaus erfolgt die enzymatische ADP-Ribosylierung unter Bedingungen (z. B. in Anwesenheit von Nikotinamid, EDTA oder DTT), die eine nahezu vollständige Inaktivierung der mitochondrialen NADase verursachen (Abb. 5, 6). Zusätzlich findet die Inkorporation von Radioaktivität in mitochondriale Proteine sowie in die ALDH aus Hefe mit deutlich höherer Effizienz statt, wenn $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ als Substrat eingesetzt wird im Gegensatz zu freier $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-ADP-Ribose}$. Die ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine erfolgt auch in invertierten Vesikeln der inneren Mitochondrienmembran (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, daß sowohl die ADP-ribosyltransferase-Aktivität als auch die Akzeptoren der Modifikation mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert sind. Als ein mögliches physiologisches Zielprotein der ADPRT-Aktivität konnte die Aldehyd-Dehydrogenase identifiziert werden (Abb. 8). Die Modifizierung dieses Enzyms findet nur in Gegenwart der mitochondrialen ADPRT-Aktivität und NAD^+ als Substrat mit hoher Effizienz statt. Die Verringerung der enzymatischen Modifizierung der ALDH nach Blockierung von Thiolgruppen mit NEM (Abb. 9) sowie die chemische Stabilität der mitochondrialen Akzeptor-ADP-Ribose-Bindungen (Tab. 3) deuten auf eine cysteinspezifische ADP-ribosyltransferase-Aktivität in Mitochondrien der Rinderleber. Zusammengefasst unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, daß es neben einer möglichen nicht-enzymatischen Reaktion freier ADP-Ribose mit Mitochondrienproteinen (Abb. 10, Route 1) eine spezifische enzymatische ADP-Ribosylierung von Zielproteinen in Mitochondrien (Abb. 10, Route 2) gibt.

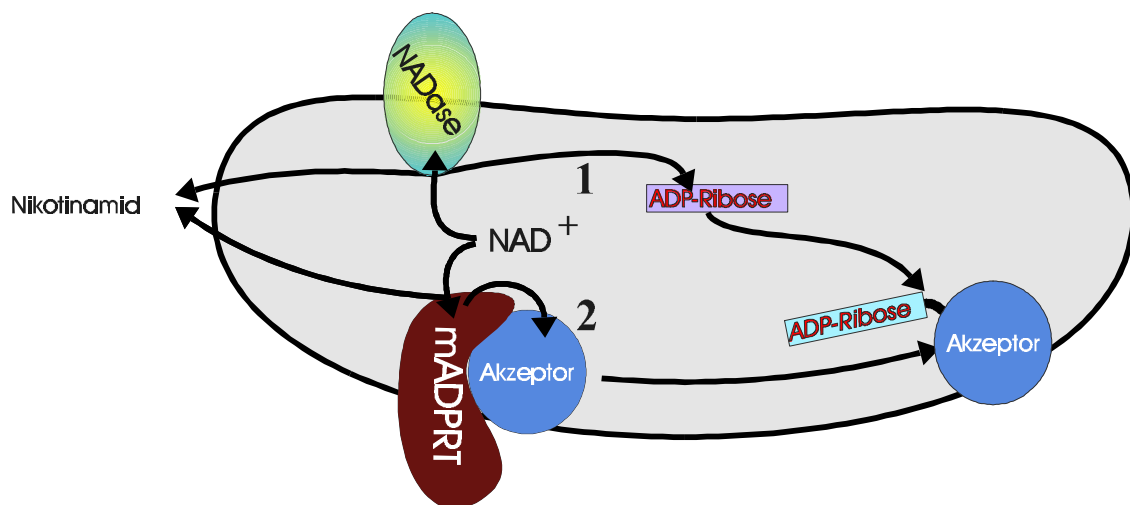


Abb. 10 Mögliche Wege der ADP-Ribosylierung in Mitochondrien.

Route 1 - nicht-enzymatisch über eine NAD^+ -Glycohydrolase (NADase) und freie ADP-Ribose.
Route 2 - enzymatisch über eine monoADP-ribosyltransferase (mADPRT).

3.2 Die mitochondriale NAD⁺-Glycohydrolase - ein bifunktionelles Enzym

Die NAD⁺-Glycohydrolase aus Mitochondrien der Rinderleber ist ein stark hydrophobes, membran-assoziiertes Protein, das auch noch nach der Solubilisierung mit Detergenzien eine Tendenz zur Aggregation aufweist (Zhang et al., 1995). Das Enzym konnte 1660-fach angereichert werden und besitzt ein apparentes Molekulargewicht von $M_r \cong 32.000$ (Zhang et al., 1995). Bemerkenswert ist, daß die mitochondriale NADase durch die Behandlung mit Steapsin, einem Pankreas-Rohprodukt der Phospholipase C, in eine wasserlösliche Form mit einem geringfügig reduzierten Molekulargewicht ($\Delta M_r \cong 2.000$) überführt werden kann (Ziegler et al., 1996¹; Abb. 11). Diese Form des Enzyms wurde eingehend mit der detergenten-solubilisierten NADase verglichen (Tab. 2) und kinetisch charakterisiert (Ziegler et al., 1996¹; Jorcke et al., 1997¹). Die Durchführung dieser Arbeiten erfolgte überwiegend unter Verwendung des Substratanalogons ϵ -NAD⁺, dessen optische Eigenschaften (Barrio et al., 1972) u.a. eine kontinuierliche Detektion der enzymatischen Reaktion mittels Fluoreszenzphotometrie gestatten. Darüber hinaus wurde ein effizienter Direktnachweis für NAD⁺-Glycohydrolasen in der Gelmatrix etabliert. Er ermöglicht es, nach einer Renaturierung und Inkubation mit ϵ -NAD⁺, NADasen als fluoreszente Banden zu detektieren (Ziegler et al., 1996¹; Abb. 11). Dieses Nachweisverfahren konnte später auch auf weitere NAD⁺-katabolisierende Enzyme, wie Phosphodiesterasen, übertragen werden (Hagen und Ziegler, 1997).

In Abbildung 11 ist der Direktnachweis der mitochondrialen NADase nach Detergenz- bzw. Steapsinsolubilisierung dargestellt. Die Spaltung des Substratanalogons ϵ -NAD⁺ führt zu einer ca. zehnfachen Fluoreszenzzunahme. NAD⁺-metabolisierende Enzymaktivitäten sind innerhalb der Gelmatrix als fluoreszente Banden auf einem UV-Transilluminator visualisierbar. Eine anschließende Proteinfärbung des Gels ermöglicht die Abschätzung von Molekulargewichten durch Vergleich mit Standardproteinen.

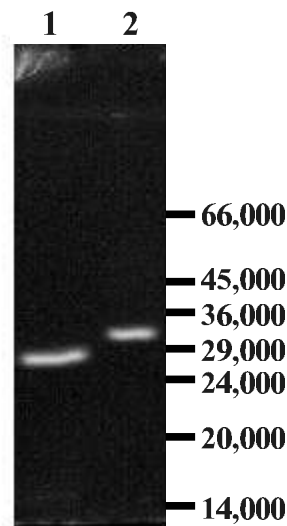


Abb. 11 Direktnachweis der mitochondrialen NADase-Aktivität nach SDS-PAGE. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase (20 μ g) nach Detergenz- (Spur 2) bzw. Steapsinsolubilisierung (Spur 1) wurde durch SDS-PAGE (12% Gel) getrennt. Einer Renaturierung in 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,5% (w/v) LDAO folgte die Inkubation mit 150 μ M ϵ -NAD⁺ in 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% (w/v) LDAO. Die NADase wird durch Auflegen des Gels auf einen UV-Transilluminator als fluoreszente Bande detektiert. Auf der rechten Seite sind die molaren Massen (in Da) von Markerproteinen angegeben.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

Die unter Abschnitt 3.1 dargelegten Resultate führen unmittelbar zu der Fragestellung nach der Funktion der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase, da dieses Enzym für die ADP-Ribosylierung nicht erforderlich zu sein scheint. Die Identifizierung klassischer NADasen als bifunktionelle Enzyme, die den Metabolismus des neuartigen Signalmoleküls cADP-Ribose katalysieren, sowie die Beteiligung der cADP-Ribose an der Ca²⁺-Freisetzung aus internen Speichern, waren die Veranlassung, auch die mitochondriale NADase in Hinblick auf weitere katalytische Kapazitäten zu untersuchen (Ziegler et al., 1997c¹).

Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurde ausschließlich die Detergenz-Präparation der mitochondrialen NADase eingesetzt, die bereits eingehend charakterisiert wurde (Ziegler et al., 1996¹; Jorcke et al., 1997¹). Diese partiell gereinigte, angereicherte Fraktion der NADase besitzt keine NAD⁺-katabolisierenden Fremdaktivitäten (Ziegler et al., 1996¹) und konnte somit konsequenterweise für die weiteren Versuche verwendet werden.

3.2.1 ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität der mitochondrialen NADase

Eine interessante Eigenschaft vieler NAD⁺-metabolisierender Enzyme ist die Akzeptanz zahlreicher NAD⁺-Derivate als Substrate. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß Analoga des NAD⁺ mit Substitutionen in der Purinbase der polyADP-Ribosyltransferase als Substrate dienen (Oei et al., 1996¹). Mit ϵ -NAD⁺, NHD⁺ sowie NGD⁺ (siehe auch Abb. 19²) erfolgt die Synthese von Polymeren, jedoch mit signifikant geringerer Geschwindigkeit und Polymergröße verglichen mit dem physiologischen Substrat NAD⁺ (Oei et al., 1996¹).

Ein eleganter Nachweis der ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität wurde von Lee und Mitarbeitern entwickelt (Graeff et al., 1994). Er nutzt die Fähigkeit dieser Enzyme aus, NAD⁺-Derivate mit Modifikationen der Purinbase in cyclische ADP-Ribose-Analoga (Abb. 19²) zu konvertieren. Durch die Katalyse von ADP-ribosyl Cyclasen werden NGD⁺ und NHD⁺ zu cyclischer Guanosindiphosphoribose (cGDP-Ribose) respektive cyclischer Inosindiphosphoribose (cIDP-Ribose) umgesetzt. Im Gegensatz zu den Substraten (NGD⁺ und NHD⁺) sowie den Hydrolyseprodukten (GDP-Ribose und IDP-Ribose) sind die cyclischen Purinnukleosiddiphosphoribosen fluoreszent. Diese Eigenschaft erleichtert ihren Nachweis erheblich, so daß ihre Entstehung einfach fluoreszenzphotometrisch verfolgt werden kann, ohne Substrate oder Nebenprodukte abzutrennen.

Zur Überprüfung der ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität der mitochondrialen NADase wurden dem Enzym Substratanaloga angeboten und die Bildung cyclischer Reaktionsprodukte in einem kontinuierlichen Verfahren im Fluoreszenzphotometer verfolgt. In Abbildung 12 ist gezeigt, daß die Inkubation der NADase mit 1mM NGD⁺ oder NHD⁺ zu einer Fluoreszenzzunahme führt, die auf eine ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität schließen läßt.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

² siehe Abschnitt 8.1, Anhang

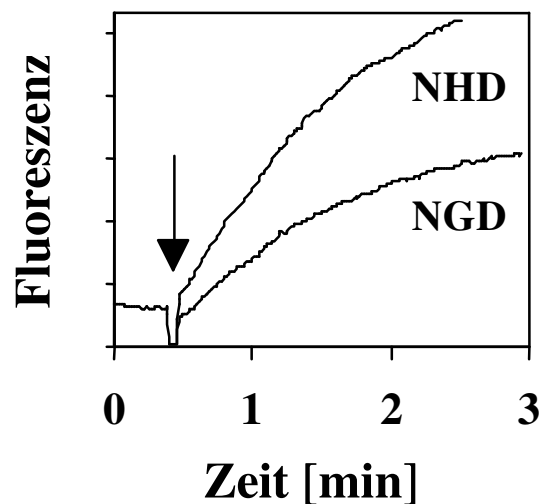


Abb. 12 **Synthese cyclischer ADP-Ribose-Derivate durch die mitochondriale NADase.** Die Bildung von cGDP-Ribose aus NGD⁺ sowie von cIDP-Ribose aus NHD⁺ wurde durch Fluoreszenzmessung bei $\lambda_{EM}=410\text{nm}$ verfolgt. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda_{EX}=310\text{nm}$. Der Pfeil markiert die Zugabe von 5 μg partiell gereinigter mitochondrialer NADase in den Reaktionsansatz, bestehend aus 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% (w/v) LDAO und 1mM Substrat.

Darüber hinaus wird durch die mitochondriale NADase auch die Bildung von cADP-Ribose aus dem physiologischen Substrat NAD⁺ katalysiert. Für den Nachweis der Synthese von cADP-Ribose wurde eine Kombination enzymatischer Reaktionen durchgeführt, da das verwendete Chromatographie-System ADP-Ribose nicht ausreichend von cyclischer ADP-Ribose trennte. Die im ersten Schritt erfolgende Inkubation der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase mit 25 μM [³²P]-NAD⁺ wurde durch Acetonpräzipitation gestoppt. Wieder in Lösung gebrachte Nukleotide wurden anschließend mit der Phosphodiesterase I aus Schlangengift (PDE) behandelt. Die PDE generiert [³²P]-AMP⁺ sowohl aus NAD⁺ als auch aus ADP-Ribose, während cADP-Ribose diesem Enzym nicht als Substrat dient (Kim et al., 1993).

Abbildung 13 demonstriert, daß die mitochondriale NADase aus NAD⁺ ein Produkt synthetisiert, das mit (c)ADP-Ribose komigriert und nicht durch die PDE gespalten werden kann (Abb. 13, Spur 1). In Anwesenheit von Zinkionen (Abb. 13, Spur 3) wird eine deutliche Zunahme dieses Reaktionsproduktes verzeichnet. Die Stimulierung der NADase durch bivalente Kationen wurde bereits früher beschrieben (Ziegler et al., 1996¹). Zusätzlich steht dieser Befund in Einklang mit der Aktivierung der ADP-ribosyl Cyclase CD38 durch Kupfer- oder Zinkionen (Zocchi et al., 1993). Die Cyclase-Aktivität des mitochondrialen Enzyms wird durch einen Überschuß an unmarkierter ADP-Ribose inhibiert (Abb. 13, Spur 2); ferner wird deutlich, daß die Reaktion der PDE bezüglich der als Substrat dienenden Nukleotide vollständig ist. Die Vorbehandlung der mitochondrialen NADase mit 10mM DTT verhindert sowohl die Fluoreszenzentstehung bei Inkubation mit NHD⁺ und NGD⁺ (nicht gezeigt) als auch die Umsetzung von [³²P]-NAD⁺, so daß die radioaktive Markierung nach PDE-Behandlung ausschließlich als [³²P]-AMP detektiert wird (Abb. 13, Spur 4).

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

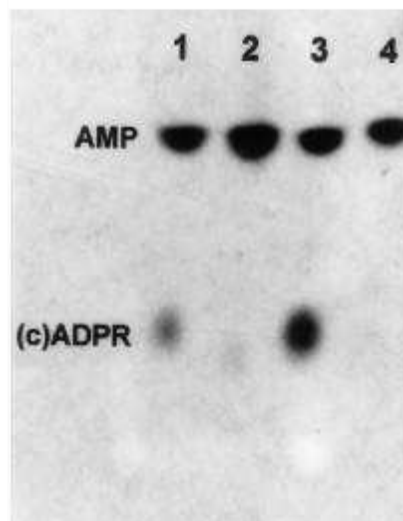


Abb. 13 Synthese von [^{32}P]-cADP-Ribose (cADPR) durch die mitochondriale NADase. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase wurde für fünf Minuten bei 30°C mit 25 μM [^{32}P]-NAD $^{+}$ im Reaktionsmedium (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% LDAO) einschließlich der unten angegebenen Zusätze inkubiert. Die Reaktion wurde durch Acetonfällung beendet und die Ansätze getrocknet. Präzipitierte Nukleotide wurden anschließend mit 25 μl Wasser in Lösung gebracht und ungelöstes Protein sedimentiert. Aliquots der Überstände wurden nach einer Behandlung mit Phosphodiesterase I aus Schlangengift (20 Minuten bei 30°C) über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Das Autoradiogramm der Dünnschichtchromatographie ist gezeigt. Spur 1, ohne Zusätze; Spur 2, + 1mM unmarkierte ADP-Ribose; Spur 3, + 20 μM ZnCl $_2$, Spur 4, Vorinkubation der mitochondrialen NADase für 20 Minuten mit 10mM DTT und anschließende Inkubation im Reaktionsmedium mit 10mM DTT.

Der effiziente Aktivitätsnachweis NAD $^{+}$ -metabolisierender Enzyme direkt in der Gelmatrix, verbunden mit der möglichen Korrelation zu einer anfärbaren Proteinbande (Abschnitt 3.2, Abb. 11), läßt sich auch auf die ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität übertragen (Ziegler et al., 1997a, c 1). Die Detektion der enzymatischen Aktivität wird durch die Visualisierung fluoreszenter Reaktionsprodukte am Ort ihrer Synthese ermöglicht und kann unter Verwendung unterschiedlicher NAD $^{+}$ -Derivate erreicht werden (siehe auch Abb. 19 2).

Die Übereinstimmung der Mobilitäten von mitochondrialer NADase- und ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität in der SDS-PAGE ist in Abbildung 14 (Spuren 1) gezeigt. Innerhalb der Gelmatrix wurde dabei die NADase-Reaktion mit Hilfe von ϵ -NAD $^{+}$ (Abb. 14, rechte Seite) und die Cyclase-Reaktion unter Verwendung von NHD $^{+}$ als Substrat (Abb. 14, linke Seite) über die Bildung fluoreszenter Produkte visualisiert. Das scheinbar ausschließlich als ADP-ribosyl Cyclase agierende Enzym aus *Aplysia californica* diente in diesem Experiment als Kontrolle (Abb. 14, Spuren 2). Das Molekulargewicht des *Aplysia*-Enzyms konnte in Übereinstimmung mit vorangegangenen Befunden (Lee und Aarhus, 1991) mit $M_r \cong 28.000$ abgeschätzt werden.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

² siehe Abschnitt 8.1, Anhang

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, erneut darauf hinzuweisen, daß die Fluoreszenzzunahme nach Spaltung von ϵ -NAD⁺ auf der Trennung des Nikotinamidringes vom modifizierten Adeninring beruht, d. h. bei der Entstehung sowohl freier ADP-Ribose als auch cyclischer ADP-Ribose auftritt. Konsequenterweise kann ϵ -NAD⁺ für den Nachweis von NADase- und ADP-ribosyl Cyclase-Aktivitäten eingesetzt werden, während die Verwendung von NHD⁺ der Bestätigung einer Cyclase-Aktivität dient. Die NAD⁺-Glycohydrolase aus *Neurospora crassa*, die scheinbar keine Cyclase-Aktivität besitzt (Graeff et al., 1994), läßt sich in der Tat mittels ϵ -NAD⁺ in der Gelmatrix nachweisen (Ziegler et al., 1996¹); die Detektion mit NHD⁺ (oder NGD⁺) gelingt erwartungsgemäß nicht (Ziegler et al., 1997a¹).

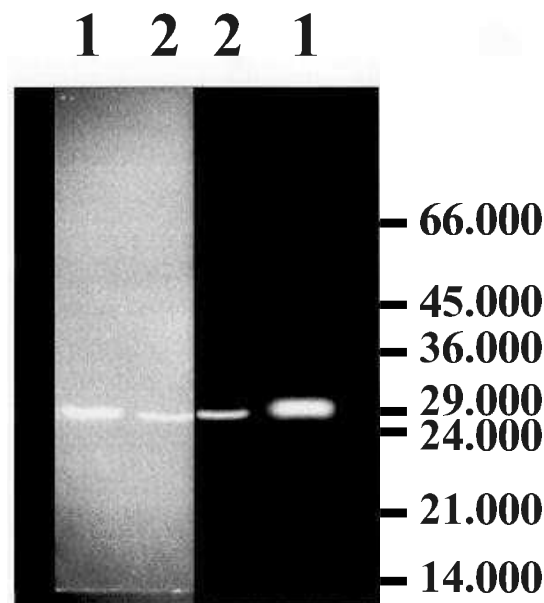


Abb. 14 Komigration mitochondrialer NADase- und ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase (Spuren 1) und ADP-ribosyl Cyclase aus *Aplysia californica* (Spuren 2) wurden durch SDS-PAGE (12% Gel) getrennt. Nach der Elektrophorese erfolgte die Renaturierung durch mehrmaliges Waschen des Gels in 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,5% (w/v) LDAO. Eine Hälfte des Gels wurde anschließend für 15 Minuten in 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% (w/v) LDAO und 3mM NHD⁺ inkubiert (linke Seite), während die andere Hälfte mit 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% (w/v) LDAO und 150 μ M ϵ -NAD⁺ behandelt wurde (rechte Seite). Die Fluoreszenzaufnahme wurde nach Platzierung der Gelhälften auf einen UV-Transilluminator gemacht. Auf der rechten Seite sind die molaren Massen (in Da) von Markerproteinen angegeben.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

3.2.2 Die mitochondriale NADase katalysiert die Hydrolyse von cADP-Ribose

Die Wirkung von cADP-Ribose als potentes Agens der Ca^{2+} -Freisetzung ist mittlerweile ausreichend belegt (Lee et al., 1994a; Lee, 1996). Für eine Beteiligung an regulativen Prozessen ist die Inaktivierung dieses Metaboliten demzufolge eine notwendige Bedingung. Die Hydrolyse cyclischer ADP-Ribose in das biologisch inaktive Nukleotid ADP-Ribose wird durch eine cADP-Ribose Hydrolase-Aktivität katalysiert, die bisher ausschließlich bei ADP-ribosyl Cyclasen detektiert wurde (Ziegler et al., 1997a¹).

Die mitochondriale NAD^+ -Glycohydrolase besitzt ebenfalls die Fähigkeit die Hydrolyse von cADP-Ribose zu katalysieren (Abb. 15). Die Inkubation des mitochondrialen Enzyms mit cADP-Ribose resultiert in der Entstehung freier ADP-Ribose. Die Hydrolyse von NAD^+ wird durch die mitochondriale NADase unter den gleichen Bedingungen um den Faktor acht schneller katalysiert (nicht gezeigt); dabei entsteht neben Nikotinamid als Hauptprodukt freie ADP-Ribose und nur weniger als 2% cADP-Ribose (Ziegler et al., 1997c¹). In Gegenwart von Zinkionen kann die Ausbeute an cADP-Ribose jedoch deutlich erhöht werden (Abb. 13, vergleiche Spuren 1 und 3). Die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von NAD^+ (NADase-Reaktion) und cADP-Ribose (Hydrolase-Reaktion) sind vergleichbar mit der für CD38 ermittelten Relation, die mit einem Verhältnis von 10:1 angegeben wurde (Zocchi et al., 1993).

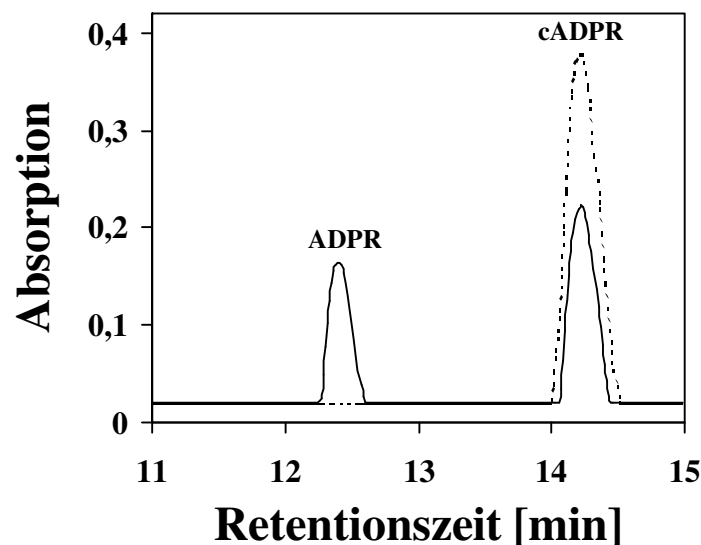


Abb. 15 Die mitochondriale NADase katalysiert die Hydrolyse von cADP-Ribose. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase wurde im Reaktionsmedium (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% LDAO) in Gegenwart von 100 μM cADP-Ribose (cADPR) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Nukleotide sofort über HPLC getrennt. Die verwendete cADP-Ribose enthielt keine detektierbare freie ADP-Ribose (ADPR) und war innerhalb der Inkubationszeit in Abwesenheit des Enzyms stabil (gestrichelte Linie). Gezeigt sind typische Chromatogramme.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

3.2.3 Reversibilität der ADP-ribosyl Cyclase-Reaktion - Transglykosylierung

Der vorgeschlagene katalytische Mechanismus der bifunktionellen ADP-ribosyl Cyclasen/cADP-Ribose Hydrolasen legt den Schluß nahe, daß diese Enzyme die Bildung von NAD^+ aus cADP-Ribose und Nikotinamid katalysieren können (Abschnitt 1.1.2, Abb. 3).

In Abbildung 16 ist die Synthese von NAD^+ durch die mitochondriale NADase dargestellt. Während der Inkubation dieses Enzyms mit $100\mu\text{M}$ cADP-Ribose und 1mM Nikotinamid wird ein Produkt gebildet, das mit authentischem NAD^+ koeluiert. Dabei ist es erstaunlich, daß unter den gewählten Bedingungen cADP-Ribose nahezu quantitativ zu NAD^+ umgesetzt wurde.

Cyclische ADP-Ribose besitzt die konservierte Energie der glykosidischen Bindung zwischen terminaler Ribose und N^1 -Atom des Adeninringes, die das Molekül befähigt, das postulierte Intermediat der Reaktion (Abb. 3, Mitte) zu erreichen. Ausgehend von der (ADP-ribosyl-Oxocarbenium)-Zwischenstufe erscheint die NAD^+ -Synthese, als eine der möglichen Konkurrenzreaktionen zwischen verfügbaren Nukleotiden, plausibel. Die Fähigkeit der mitochondrialen NADase aus cADP-Ribose und Nikotinamid NAD^+ zu synthetisieren, unterstützt diese Annahme und verdeutlicht ihre Identifizierung als bifunktionelles Enzym (Ziegler et al., 1997c¹).

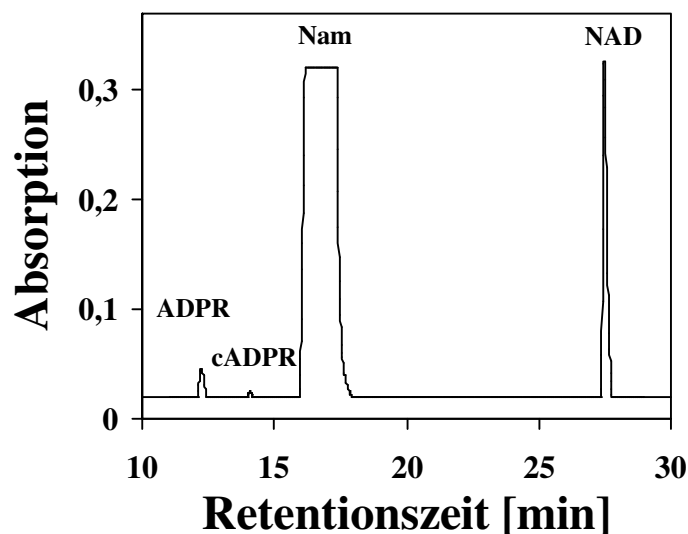


Abb. 16 Die mitochondriale NADase katalysiert die Synthese von NAD^+ . Partiiell gereinigte mitochondriale NADase wurde im Reaktionsmedium (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% LDAO) in Gegenwart von $100\mu\text{M}$ cADP-Ribose (cADPR) und 1mM Nikotinamid (Nam) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte sofort über HPLC getrennt. Gezeigt ist ein typisches Chromatogramm.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

3.2.4 Modell der prooxidans-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus Mitochondrien

Aus den zuvor dargestellten Ergebnissen wird deutlich, daß die mitochondriale NAD^+ -Glycohydrolase zu der Klasse der bifunktionellen Enzyme gehört, die den Metabolismus cyclischer ADP-Ribose katalysieren. In einer großen Zahl experimenteller Systeme wirkt cADP-Ribose als potentes Ca^{2+} -mobilisierendes Agens (Lee et al., 1994a). Es erscheint daher naheliegend, die NADase mit der Regulation mitochondrialer Ca^{2+} -Fluxe über die Synthese von cADP-Ribose in Verbindung zu bringen. Seit langem ist bekannt, daß die Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien von dem Redoxstatus der Pyridinnukleotide abhängt (Lehninger et al., 1978; Richter, 1996). Zusätzliche Befunde weisen darauf hin, daß der prooxidans-induzierte Ausstrom von Calcium aus den Mitochondrien sensitiv gegenüber reduzierenden Bedingungen ist (Schweizer und Richter, 1996). Die Hydrolyse der Pyridinnukleotide und der Ca^{2+} -Efflux aus intakten Mitochondrien benötigt die Oxidation von benachbarten Thiolgruppen innerhalb der Mitochondrien (Schweizer und Richter, 1994; Schweizer et al., 1994). Es wurde vermutet, daß die kritischen vicinalen Thiolgruppen innerhalb der NAD^+ -Glycohydrolase bzw. eines die NADase regulierenden Moleküls vorliegen (Richter, 1996).

Die Inaktivierung der mitochondrialen NADase durch reduzierende Reagenzien ist in diesem Zusammenhang ein außerordentlich wichtiges Ergebnis. Eine Reversibilität der Reduktion (bzw. Oxidation) kritischer Thiolgruppen der mitochondrialen NADase könnte ein Regulationsprinzip in bezug auf den Mechanismus der prooxidans-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung darstellen. Zur Klärung dieser Frage wurde die NADase zunächst durch Inkubation mit 100mM DTT inaktiviert. Der Aktivitätsnachweis des Enzyms erfolgte in diesem Experiment über die Umsetzung des Substratanalogons $\epsilon\text{-NAD}^+$ (Ziegler et al., 1996¹, 1997c¹). Die inaktivierte NADase wurde im Anschluß gegen einen Puffer (20mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% (w/v) LDAO) dialysiert, der entweder 1mM oxidiertes Glutathion, 400 μM *tert.*-Butylhydroperoxid bzw. 400 μM Wasserstoffperoxid oder keine weiteren Zusätze enthielt. Die Anwesenheit der verwendeten Oxidationsmittel führte zu einer teilweisen Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität, wobei oxidiertes Glutathion die effektivste Regenerierung bewirkte (Tab. 4).

Oxidationsmittel	Enzymatische Aktivität der NADase (% der Ausgangsaktivität)
ohne	<1
1mM Glutathion, oxidiert	20
400 μM <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid	3
400 μM Wasserstoffperoxid	5

Tab. 4 Reversibilität der Reduktion der mitochondrialen NADase. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase wurde durch eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 100mM DTT im Reaktionsmedium (20mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% LDAO) inaktiviert. Die Wiederherstellung enzymatischer Aktivität wurde im Anschluß an eine zweimalige Dialyse (je eine Stunde) gegen das 1000-fache Volumen Dialysepuffer, bestehend aus 20mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% (w/v) LDAO und den angegebenen Oxidationsmitteln, gemessen. Unter Verwendung von $\epsilon\text{-NAD}^+$ als Substrat wurde die Aktivität der mitochondrialen NADase im Fluoreszenzphotometer bestimmt (Material und Methoden). Die Aktivität ist in Prozent, bezogen auf die Ausgangsaktivität der nicht reduzierten NADase, angegeben.

¹ siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

Die Inaktivierung der mitochondrialen NAD^+ -Glycohydrolase durch Reduktion, scheint demnach einen reversiblen Prozeß darzustellen. Die potentielle Regulation der NADase-Aktivität über den Redoxstatus kritischer Thiolgruppen läßt sich darüber hinaus plausibel in ein Modell der Ca^{2+} -Freisetzung aus Mitochondrien, induziert durch Prooxidantien, integrieren (Abb. 17). Physiologisch vorherrschende, reduzierende Bedingungen sorgen gleichermaßen für den Mangel an verfügbarem Substrat (oxidierte Pyridinnukleotide) der NADase sowie für ihre Inaktivierung. Andererseits würde eine oxidative Belastung der Mitochondrien (i) die Oxidation des Glutathions und (ii) der Pyridinnukleotide sowie (iii) die Aktivierung der NAD^+ -Glycohydrolase durch oxidiertes Glutathion bedingen. Die aktive NADase synthetisiert in der Folge aus NAD^+ das Signalmolekül cADP-Ribose, welches nach Bindung an seinen Rezeptor einen Ca^{2+} -Efflux aus den Mitochondrien bewirkt.

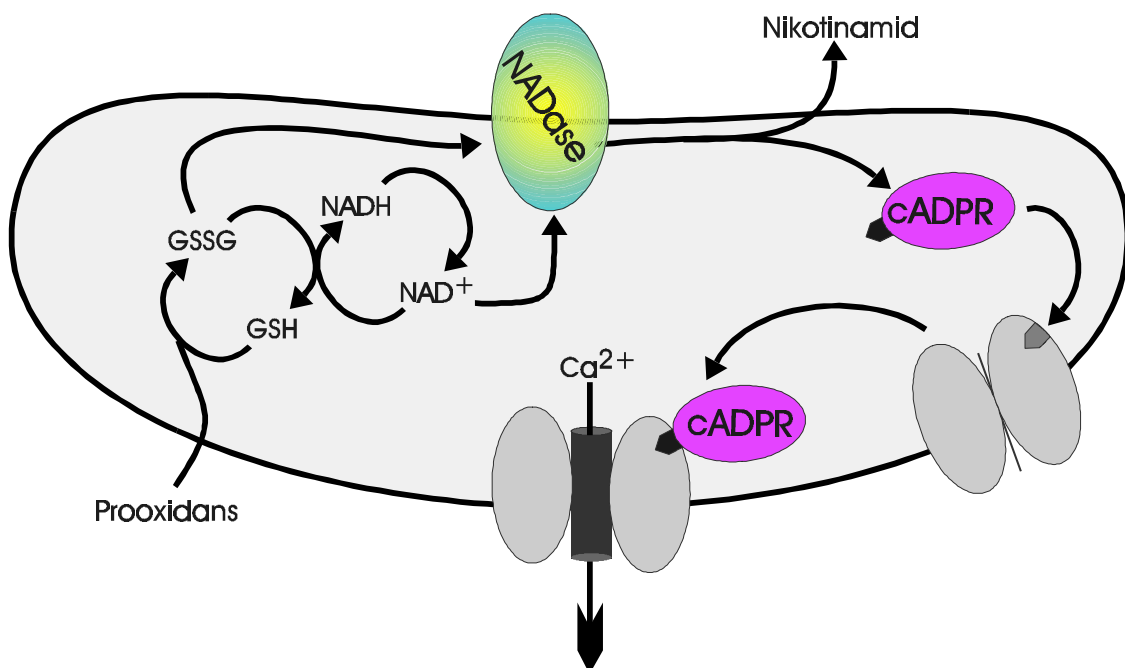


Abb. 17 Hypothetischer Mechanismus der prooxidans-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus Mitochondrien. Reaktive Sauerstoffspezies, wie das Superoxidanionradikal, Wasserstoffperoxid oder *tert.*-Butylhydroperoxid bewirken die Oxidation des intramitochondrialen Glutathions (GSH) sowie der Pyridinnukleotide (NAD(P)H) (Richter und Kass, 1991). Die mitochondriale NAD^+ -Glycohydrolase (NADase) wird durch oxidiertes Glutathion (GSSG), vermutlich durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke innerhalb des Enzyms, aktiviert und synthetisiert cADP-Ribose (cADPR) aus NAD^+ . Die Bindung der cADP-Ribose an ihren Rezeptor könnte die Öffnung eines postulierten Ca^{2+} -Kanals bewirken, wodurch Calcium aus den Mitochondrien ausströmt.

4. Diskussion

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung der mitochondrialen NAD^+ -Glycohydrolase als ADP-ribosyl Cyclase. Die Cyclase-Aktivität konnte sowohl durch die Bildung cyclischer Purinnukleosiddiphosphoribosen (cGDP-Ribose/cIDP-Ribose) aus NAD^+ -Analoga (Abb. 12 und Abb. 14) als auch über die Synthese von cADP-Ribose aus dem physiologischen Substrat NAD^+ (Abb. 13) etabliert werden. Die Generierung von cADP-Ribose deutet auf die Existenz eines Signalweges in diesen Organellen hin, der die Beteiligung des mitochondrialen Calcium-Pools an der Regulation cytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen erklären könnte. Erstmals konnte damit gezeigt werden, daß ein intrazelluläres Enzym aus Säugetieren mit der Entstehung dieses neuartigen Signalmoleküls in Verbindung steht. Die katalytische Domäne aller anderen bisher beschriebenen ADP-ribosyl Cyclasen aus Säugern ist auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert, was die Rolle dieser Enzyme bei der intrazellulären Signalübertragung in Frage stellt. Eine Internalisierung von CD38 sowie GPI-geankerter Proteine, wie BST-1, wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Funaro et al., 1998; Maxfield und Mayor, 1997, Robinson, 1997); damit verbunden sollte jedoch, zumindest vorübergehend, eine enzymatisch aktive Form dieser Proteine in der Zelle nachzuweisen sein.

Die NAD^+ -vermittelte Ca^{2+} -Mobilisierung aus internen Speichern von Seeigeleiern war die grundlegende Beobachtung, die zur Entdeckung der cyclischen ADP-Ribose führte (Clapper et al., 1987; Lee et al., 1989). Darüber hinaus moduliert cADP-Ribose die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern unabhängig von InsP_3 (Dargie et al., 1990; Galione et al., 1991). Gegenüber InsP_3 - oder cADP-Ribose-desensitivierte Homogenate aus Seeigeleiern, weisen weiterhin eine Empfindlichkeit gegenüber dem jeweils anderen Molekül auf. Folglich gibt es mindestens zwei unabhängig verlaufende Mechanismen, die zur Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen, und auf die Aktivierung intrazellulärer Speicher zurückzuführen sind (Galione et al., 1993a; Lee et al., 1993). Erste Evidenzen deuten daraufhin, daß cADP-Ribose seine Wirkung über Ryanodin-Rezeptoren vermittelt (Galione et al., 1991; Galione et al., 1993a). Da cADP-Ribose die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Retikulum nur in Gegenwart erhöhter Calciumkonzentrationen bewirkt, wurde vorgeschlagen, daß cADP-Ribose als Modulator des CICR fungiert, indem es die Sensitivität des Ryanodin-Rezeptors gegenüber Calcium erhöht (Galione und White, 1994). In Säugetieren scheint nur eine Isoform des Ryanodin-Rezeptors (Typ 2) von cADP-Ribose angesprochen zu werden (Sitsapesan et al., 1995). Die Kanalaktivität hängt dabei stark von den gewählten Bedingungen, insbesondere von der luminalen Ca^{2+} -Konzentration, ab. Interessanterweise ist auch die Ca^{2+} -Freisetzung der Mitochondrien von der vorherigen Beladung der Organellen mit Calcium abhängig (Lötscher et al., 1979; 1980). Bisher wurde aber noch kein spezifischer Mechanismus für den Ca^{2+} -Efflux beschrieben; die bekannten Signalwege via InsP_3 und Stimulation des Ryanodin-Rezeptors aktivieren die Mitochondrien nicht.

Das von Richter und Kass (1991) vorgeschlagene Modell verbindet die Aktivität der mitochondrialen NAD^+ -Glycohydrolase gefolgt von einer nicht-enzymatischen ADP-Ribosylierung mit dem Ca^{2+} -Efflux aus diesen Organellen. In der vorliegenden Arbeit wird hingegen nachgewiesen, daß Rinderleber-Mitochondrien eine enzymatische Aktivität besitzen, die den Transfer von ADP-Ribose auf spezifische Akzeptoren katalysiert. Während der Inkubation von isolierten Mitochondrien mit $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ als Substrat werden zwei Proteine spezifisch radioaktiv markiert (Abb. 5). Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei dieser Markierung in der Tat um ADP-Ribosylierung handelt und nicht um eine andere Art der Modifikation (Abschnitt 3.1.2).

Die enzymatische Natur der Reaktion wurde auf unterschiedliche Weise dokumentiert. Zum einen findet die ADP-Ribosylierung nahezu unverändert unter Bedingungen statt, die die NADase substantiell inhibieren (Abb. 5, 6). Zum anderen erfolgt die Proteinmodifikation durch den ADP-Riboserest unter Verwendung von NAD^+ wesentlich effizienter als mit freier ADP-Ribose. Nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung mittels freier ADP-Ribose als Substrat kann auch in unseren Experimenten beobachtet werden. Allerdings waren dafür sehr hohe Substratkonzentrationen (1mM ADP-Ribose) und lange Inkubationszeiten (\geq eine Stunde) erforderlich. Ein vergleichbares Ausmaß der ADP-Ribosylierung konnte mit $25\mu\text{M NAD}^+$ innerhalb einer 15-minütigen Inkubation erreicht werden. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die mitochondriale ADP-Ribosylierung unter physiologischen Bedingungen überwiegend durch eine enzymatische Reaktion, katalysiert von einer ADP-Ribosyltransferase, bewirkt wird. Die Untersuchungen in bezug auf die Aldehyd-Dehydrogenase aus Hefe unterstützen diese Annahme. Dieses Enzym wurde bereits früher als Akzeptor einer ADP-Ribosylierung identifiziert (McDonald und Moss, 1993b). Für die beschriebene Inaktivierung der ALDH, die anscheinend durch die Reaktion freier ADP-Ribose mit einem Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms erfolgt, wurden hingegen lange Inkubationszeiten (mehrere Stunden) und hohe Konzentrationen an ADP-Ribose (1-2mM) benötigt (McDonald und Moss, 1993b). In Abbildung 8 ist dagegen dargestellt, daß die ALDH durch Inkubation mit $25\mu\text{M NAD}^+$ modifiziert werden kann, jedoch ausschließlich in Gegenwart der mitochondrialen ADPRT-Aktivität.

Die chemische Stabilität der mitochondrialen Protein-ADPR-Bindungen weist auf eine Beteiligung von Cysteinresten bei dieser Modifikation hin, da ein signifikanter Anteil durch Hg^{2+} -Ionen gespalten werden kann (Tab. 3). Auch die enzymatische Modifikation der ALDH scheint einen Cysteinrest zu involvieren. Die vorherige Alkylierung der Thiolgruppen durch N-Ethylmaleimid vermindert die spätere ADP-Ribosylierung mittels der mitochondrialen ADPRT und NAD^+ als Substrat (Abb. 9). Cysteinspezifische ADP-Ribosyltransferasen konnten bereits in humanen und Rinder-Erythrocyten identifiziert werden (Tanuma et al., 1987; Saxty und van Heyningen, 1995). Damit scheint diese Art der Proteinmodifikation von physiologischer Bedeutung zu sein.

Die Identifizierung der Akzeptorproteine mitochondrialer ADP-Ribosylierung ist bis jetzt noch nicht gelungen. Es gibt aber Hinweise, daß die Zielproteine, wie auch die ADPRT-Aktivität, mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert sind, da die ADP-Ribosylierung gleichermaßen in submitochondrialen Vesikeln stattfindet (Jorcke et al., 1998). Darüber hinaus besitzt die mitochondriale ALDH aus Rindern ein ungefähres Molekulargewicht von 55kDa, das der Mobilität eines der beiden in Rinderleber-Mitochondrien modifizierten Proteine entspricht. Weitere Untersuchungen, die die Isolierung und Identifizierung der ADPRT sowie der Akzeptoren der kovalenten Modifikation zum Inhalt haben, sind dringend erforderlich, um die physiologische Relevanz der mitochondrialen, enzymatischen ADP-Ribosylierung zu untermauern. Die vorliegenden Ergebnisse haben die Voraussetzung für derartige Studien geschaffen, da sie belegen, daß in Mitochondrien eine enzymatische, cysteinspezifische ADPRT existiert und, daß die Proteinmodifikation in diesen Organellen die Aktivität von Enzymen beeinflussen könnte. Diese Resultate bestärken die Ansicht, daß der prooxidans-induzierte Ca^{2+} -Ausstrom nicht in Zusammenhang mit einer nicht-enzymatischen ADP-Ribosylierung steht.

Die Anwesenheit einer ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität in Mitochondrien macht eine Beteiligung an der Ca^{2+} -Regulation wahrscheinlich, die durch cADP-Ribose und nicht über die Generierung freier ADP-Ribose und folgender nicht-enzymatischer ADP-Ribosylierung eines Ca^{2+} -Transporters bewirkt wird. Wie hier gezeigt katalysiert die mitochondriale ADP-ribosyl Cyclase zusätzlich auch die Hydrolyse von cADP-Ribose zu dem biologisch inaktiven Nukleotid ADP-Ribose. Das Enzym gehört damit zu der Klasse der bifunktionellen NAD^+ -Glycohydrolasen. Es ist erstaunlich, daß cADP-Ribose Hydrolase-Aktivitäten bisher ohne Ausnahme mit den ADP-ribosyl Cyclasen verbunden sind. Das Aufrechterhalten des Gleichgewichtes zwischen Synthese und Degradation der cADP-Ribose durch ein einziges Enzym, eine bifunktionelle NADase, wäre für ein Signalmolekül sehr ungewöhnlich. In diesem Zusammenhang ist es sehr interessant, daß die Cyclase-Aktivität durch andere Faktoren reguliert werden könnte. In Seeigeliern konnte gezeigt werden, daß cGMP die Bildung von cADP-Ribose stimuliert (Galione et al., 1993b). Diese Regulation könnte über eine cGMP-abhängige Phosphorylierung verlaufen, da CD38 sowie die Cyclase aus *Aplysia* potentielle Phosphorylierungsstellen für eine cGMP-abhängige Kinase besitzen (Lee et al., 1994a). Andererseits wurde eine Calmodulin-Abhängigkeit der cADP-Ribose-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung beschrieben (Takasawa et al., 1995; Tanaka und Tashjian, 1995; Lee et al., 1994b; 1995). Calmodulin, das selbst keinen Ausstrom von Calcium in Seeigeliern bewirkt (Tanaka und Tashjian, 1995), scheint einen positiven Modulator des cADPR-vermittelten Ca^{2+} -Efflux aus Mikrosomen darzustellen (Lee et al., 1994b; 1995; Takasawa et al., 1995). In Mikrosomen aus Inselzellen des Rattenpankreas konnte die Calmodulin-aktivierte Ca^{2+} -Freisetzung der cADP-Ribose durch Inhibitoren der Calmodulin-abhängigen Kinase II vermindert werden (Takasawa et al., 1995); in Seeigeliern wurde eine Interaktion mit dem Rezeptor vorgeschlagen, an dem auch cADP-Ribose wirkt (Lee et al., 1994b; Tanaka und Tashjian, 1995). In vivo könnte die Synthese bzw. die Hydrolyse von cADP-Ribose durch die Verfügbarkeit der erforderlichen Nukleophile bevorzugt werden. Der Ausschluß von Wasser im aktiven Zentrum des Enzyms durch Änderungen in der Konformation - möglicherweise cGMP- oder Calmodulin-abhängig gesteuert - würde den Ringschluß der terminalen Ribose mit dem N^1 -Atom des Adenins unter Entstehung des cyclischen Nukleotids favorisieren.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation von NADasen ist durch ihre Empfindlichkeit gegenüber reduzierenden Bedingungen gegeben (Cayama et al., 1973; Kontani et al., 1993; Zocchi et al., 1993; Ziegler et al., 1996). Während das Enzym aus *Aplysia*, das nahezu ausschließlich als ADP-ribosyl Cyclase fungiert (Lee und Aarhus, 1991), durch reduzierende Agenzien nicht beeinflusst wird (Zocchi et al., 1995), führt die Anwesenheit von DTT zu einer Aggregation von CD38-Molekülen, die anschließend enzymatisch inaktiv sind (Guida et al., 1995). Die essentielle Rolle der Cysteinreste wird durch die Konservierung der meisten Cysteine zwischen dem *Aplysia*-Enzym und CD38 unterstützt. Zwei Cysteinreste, die in allen bekannten Sequenzen von CD38 vorkommen, treten in der Aminosäuresequenz der *Aplysia*-Cyclase nicht auf. Durch Mutagenese-Experimente wurde eine katalytische Rolle der Cysteine angedeutet (Tohgo et al., 1994). Eine Mutante der *Aplysia kurodai* NADase, bei der diese beiden Cysteine an den Stellen eingefügt wurden, die der CD38-Sequenz entsprechen, erlangt zusätzlich die cADP-Ribose Hydrolase-Aktivität (Tohgo et al., 1994). Auf der anderen Seite zeigen CD38-Mutanten, in denen die Cysteinreste durch die betreffenden Aminosäuren der *Aplysia*-Sequenz substituiert wurden, keine Hydrolase-Aktivität mehr, behalten aber ihre Fähigkeit zur Bildung von cADP-Ribose (Tohgo et al., 1994). Die mitochondriale NAD^+ -Glycohydrolase wird unter reduzierenden Bedingungen scheinbar vollständig inhibiert. Die Aktivitätsfärbung des mitochondrialen Enzyms in der Gelmatrix nach SDS-PAGE gelingt nicht, wenn der Probenpuffer β -Mercaptoethanol enthält (Ziegler et al., 1996). Sowohl die NAD^+ -Glycohydrolase-Aktivität, gemessen mit dem Substratanalogen ϵ - NAD^+ (Abb. 6B), als auch die ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität (Abb. 13) sind in Gegenwart von DTT nicht detektierbar.

Es ist ein entscheidender Befund, daß die Inhibition der mitochondrialen NADase nach Reduktion mit DTT unter Verwendung von oxidiertem Glutathion teilweise rückgängig gemacht werden kann. Die Regenerierung der Aktivität zeigt für die mitochondriale NADase ein Regulationsprinzip auf, das in die bisherigen Ergebnisse und das Modell der mitochondrialen Beteiligung an der Regulation cytoplasmatischer Ca^{2+} -Konzentrationen integriert werden kann (Abb. 17).

Der Aktivitätsnachweis NAD^+ -katabolisierender Enzyme direkt in der Gelmatrix ist ein maßgeblicher Fortschritt bei der Reinigung und Charakterisierung dieser Proteine. Unter anderem kann hiermit die Abschätzung der apparenten Molekulargewichte dieser Enzyme erfolgen. Die Verwendung von $\epsilon\text{-NAD}^+$ ermöglicht es, vorrangig die klassische NADase-Reaktion nachzuweisen. Die ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität eines Enzyms kann durch die Verwendung von NHD^+ (oder NGD^+) als Substrat verifiziert werden. Da auch andere Enzymaktivitäten, e.g. Phosphodiesterasen, $\epsilon\text{-NAD}^+$ unter Fluoreszenzzunahme umsetzen, muß die Spezifität durch eine Produktanalyse der Reaktion geklärt werden. Dies läßt sich leicht realisieren, da die bereits renaturierten Proteine nach dem Aktivitätsnachweis aus der Matrix ausgeschnitten und z. B. mit radioaktiven Substraten inkubiert werden können (Hagen und Ziegler, 1997). Diese Kombination erlaubt es auch, die tatsächliche(n) Aktivität(en) einer Probe ohne Anwesenheit von Fremdaktivitäten zu bestimmen (Hagen und Ziegler, 1997). Die Voraussetzung für die Detektion in diesem Verfahren ist allerdings, daß sich die zu untersuchenden Proteine nach der SDS-PAGE renaturieren lassen. Weiterhin ist die Methode nur auf Proteine anwendbar, die als Monomere oder Homo-Oligomere enzymatisch aktiv sind, da nicht-kovalent verbundene Hetero-Oligomere durch die Elektrophorese separiert werden. Für die bisher untersuchten NAD^+ -Glycohydrolasen aus *Neurospora crassa*, *Aplysia californica*, Schweinehirn und Rinderleber-Mitochondrien treffen diese Bedingungen zu (Ziegler et al., 1996; 1997).

Ein weiteres Modell, das die Ca^{2+} -Freisetzung aus Mitochondrien zu erklären versucht, beschreibt die reversible Öffnung einer proteinhaltigen Pore in der inneren Mitochondrienmembran (Crompton et al., 1987). Dabei handelt es sich scheinbar um einen latenten Mechanismus, der die innere Membran für verschiedene Moleküle permeabel macht (Gunter und Pfeiffer, 1990; Zoratti und Szabò, 1995). Bemerkenswert ist, daß auch für dieses System die vorherige Akkumulation von Calcium in der Mitochondrien-Matrix eine Voraussetzung ist. Darüber hinaus gibt es weitere Parallelen in bezug auf das von Richter und in dieser Arbeit vorgeschlagene Modell. Die Öffnung der Pore wird durch die Oxidation der Pyridinnukleotide sowie des intramitochondrialen Glutathions induziert. Eine Hemmung des Permeabilitätsüberganges kann durch Cyclosporin A, einem Immunsuppressant, erreicht werden (Crompton et al., 1988; Broekemeier et al., 1989). Die Inhibition der Hydrolyse der oxidierten Pyridinnukleotide durch Cyclosporin A wurde ebenfalls beschrieben (Schweizer et al., 1993). Nach der Öffnung der mitochondrialen Pore wird allerdings neben dem Efflux von Calcium auch der Verlust von anderen Ionen und sogar der langsame Ausstrom von Matrixproteinen beobachtet (Gunter und Pfeiffer, 1990). Es erscheint unwahrscheinlich, daß ein so wenig selektiver Mechanismus für die spezifische Calcium-Freisetzung aus Mitochondrien verantwortlich gemacht werden kann. Bis zum Erhalt weiterer molekularer Daten bezüglich der Komponenten der Pore aber auch der in dieser Arbeit beschriebenen mitochondrialen ADP-ribosyl Cyclase, läßt es sich nicht ausschließen, daß mehrere Systeme nebeneinander oder auch miteinander verbunden existieren. Insbesondere wird es wichtig sein zu etablieren, ob cADP-Ribose in Mitochondrien spezifisch einen Ca^{2+} -Ausstrom bewirken kann. In diese Untersuchungen müßten darüber hinaus weitere neuartige Signalmoleküle, wie 2'-P-cADP-Ribose und NAADP⁺ mit einbezogen werden, die ebenfalls in die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern involviert zu sein scheinen (Lee und Aarhus, 1995; Chini et al., 1995; Vu et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Anwesenheit einer cystein-spezifischen ADP-Ribosyltransferase in Mitochondrien nachgewiesen werden. Eine gezielte Regulation mitochondrialer Funktionen erscheint durch die Spezifität der enzymatischen ADP-Ribosylierung wahrscheinlich. Darüber hinaus ist die Identifizierung der mitochondrialen NAD^+ -Glycohydrolase als bifunktionelles Enzym mit ADP-ribosyl Cyclase- / cADP-Ribose Hydrolase-Aktivitäten etabliert worden. Über die Synthese von cyclischer ADP-Ribose in Mitochondrien kann die Beteiligung an der Aufrechterhaltung der zellulären Calcium-Homöostase plausibel erklärt werden. Damit wurden zwei wichtige Wege NAD^+ -abhängiger Signalübertragung mit diesen Organellen in Zusammenhang gebracht (Abb. 18). Die physiologische Bedeutung des NAD^+ , die bereits eng mit der Energieübertragung verbunden ist, wird durch seine Rolle als Substrat in Signaltransduktionswegen entscheidend erweitert.

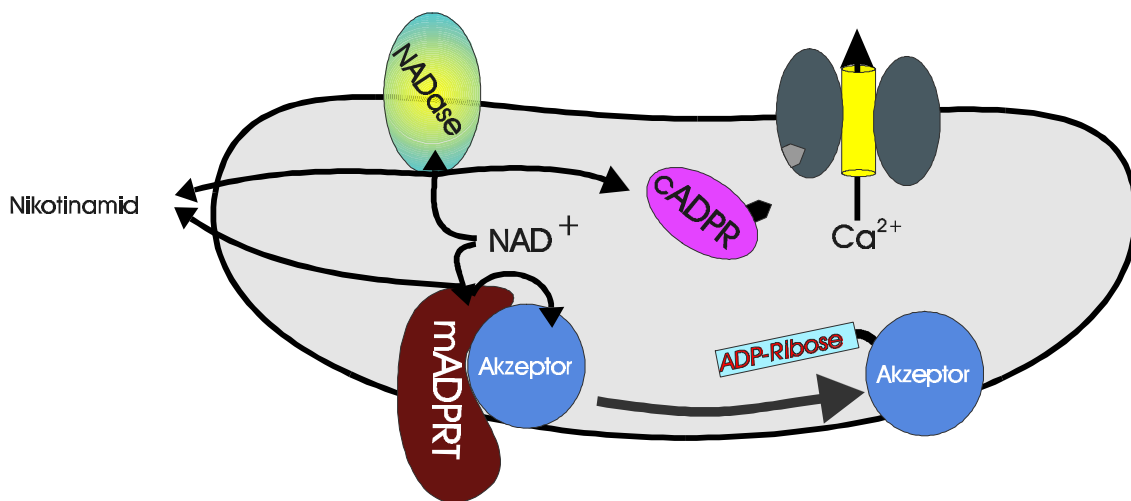


Abb. 18 NAD^+ -abhängige Wege der Signalübertragung in Mitochondrien. Das vorgeschlagene Modell sieht die Synthese von cyclischer ADP-Ribose (cADPR) und die enzymatische ADP-Ribosylierung vor.

5. Zusammenfassung

Die fundamentale Bedeutung der Pyridinnukleotide [NAD(P)] für die Energietransduktion der Zelle ist seit langem bekannt. Darüber hinaus dient NAD⁺ als Substrat in Reaktionswegen, deren physiologische Rolle in der Signalvermittlung zunehmend etabliert wird. ADP-Ribosylierung ist die posttranslationale Modifikation von Akzeptorproteinen mit dem ADP-Riboserest, der aus dem NAD⁺ stammt. Sowohl die nicht-enzymatische Reaktion freier ADP-Ribose mit Proteinen als auch die enzym-katalysierte Übertragung von ADP-Ribose aus dem NAD⁺ durch ADP-Ribosyltransferasen (ADPRTs) sind bekannt. Die Entstehung freier ADP-Ribose aus NAD⁺, die die Voraussetzung für eine nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung ist, wird durch NAD⁺-Glycohydrolasen (NADasen) katalysiert. Einige dieser Enzyme katalysieren auch den Metabolismus des neuartigen Ca²⁺-mobilisierenden Signalmoleküls cyclische ADP-Ribose (cADP-Ribose). Untersuchungen der letzten zehn Jahre haben belegt, daß NADasen eine grundlegende Rolle bei der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase spielen.

Der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase kommt bei einem vorgeschlagenen Modell der prooxidans-induzierten Ca²⁺-Freisetzung aus den Organellen eine Schlüsselrolle zu. Der Nettoverlust der Pyridinnukleotide, das extramitochondriale Auftreten von Nikotinamid und die ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine sind die markanten Beobachtungen, die nach der Behandlung der Organellen mit Prooxidantien gemacht wurden; ihre Kausalität wurde bisher jedoch nicht nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wird dokumentiert, daß die ADP-Ribosylierung in Mitochondrien der Rinderleber unter physiologischen Bedingungen offenbar ausschließlich über einen enzymatischen Mechanismus erfolgt. Die Untersuchung der enzymatischen ADP-Ribosylierung unter Verwendung von NAD⁺ als Substrat stellte dabei ein großes Problem dar, da sowohl NAD⁺-Glycohydrolasen als auch ADP-Ribosyltransferasen dieses Nukleotid als Substrat nutzen. Verschiedene Bedingungen konnten etabliert werden, die die mitochondriale NADase substantiell inhibieren, so daß die Generierung freier ADP-Ribose - das Substrat einer nicht-enzymatischen Modifikation - ausgeschlossen werden konnte.

Die enzymatische ADP-Ribosylierung in Mitochondrien führt zu einer spezifischen Modifizierung von zwei Proteinen mit ungefähren Molekulargewichten von $M_r \cong 26.000$ und $M_r \cong 53.000$. Die chemische Stabilität der Protein-ADP-Ribose-Bindungen in Mitochondrien weist auf die Beteiligung von Cysteinresten an der Bindung hin. Weiterhin konnte die Aldehyd-Dehydrogenase der Hefe (ALDH), die als Akzeptor einer thiolgerichteten ADP-Ribosylierung beschrieben wurde, mit Hilfe der mitochondrialen ADPRT und NAD⁺ als Substrat modifiziert werden. Die ALDH aus Rinderleber-Mitochondrien besitzt eine Molekülmasse von 53.000, die der Mobilität (im SDS-Gel) eines der beiden in Rinderlebermitochondrien modifizierten Proteine entspricht. Die ALDH könnte somit ein potentielles Zielprotein der ADPRT darstellen.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die mitochondriale ADP-Ribosylierung unter den gewählten Bedingungen über eine enzymatische Reaktion verläuft, die von einer cystein-spezifischen ADP-Ribosyltransferase katalysiert wird. Das Modell der Ca²⁺-Freisetzung aus Mitochondrien bedingt durch eine nicht-enzymatische Modifizierung mit freier ADP-Ribose, die zunächst durch die Katalyse der NAD⁺-Glycohydrolase gebildet wird, hat sich damit als unwahrscheinlich erwiesen.

Diese Annahme wird unterstützt durch die hier beschriebene Identifizierung der mitochondrialen NAD^+ -Glycohydrolase als bifunktionelles Enzym, das den Metabolismus von cADP-Ribose katalysieren kann. Die Synthese von cADP-Ribose in diesen Organellen stellt erstmalig eine Beziehung dieses Nukleotids zu der Calcium-Freisetzung aus Mitochondrien her. Das mitochondriale Enzym akzeptiert zusätzlich die NAD^+ -Analoge NGD^+ und NHD^+ als Substrate und katalysiert die Synthese fluoreszenter cyclischer Purinnukleosiddiphosphoribosen.

Durch die Entwicklung eines effizienten Direktnachweises, der es ermöglicht, die enzymatische Aktivität in der Gelmatrix nach einer SDS-PAGE zu detektieren, konnte die Identität von NADase- und ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität durch die Übereinstimmung der Mobilitäten gesichert werden. Darüber hinaus katalysiert die mitochondriale NADase auch die Hydrolyse von cADP-Ribose in das biologisch inaktive Nukleotid ADP-Ribose sowie die Synthese von NAD^+ in Gegenwart von cADP-Ribose und Nikotinamid.

Sowohl die NADase- als auch die ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität des Enzyms werden durch reduzierende Reagenzien stark inhibiert. Es ist ein entscheidender Befund, daß die enzymatische Aktivität nach der Entfernung des reduzierenden Agens mit Hilfe von oxidiertem Glutathion teilweise regeneriert werden kann, da hiermit ein potentielles Regulationsprinzip der mitochondrialen NADase über den Redoxstatus von Thiolgruppen verbunden ist. Anhand der erzielten Ergebnisse wird ein Modell vorgeschlagen, in dem der prooxidans-induzierte Ausstrom von Calcium aus diesen Organellen mit der Bildung von cyclischer ADP-Ribose verbunden ist und nicht mit der Entstehung freier ADP-Ribose mit nachfolgender nicht-enzymatischer ADP-Ribosylierung.

6. Material und Methoden

6.1 Zellfraktionierung der Rinderleber

Die Gewinnung verschiedener Zellorganellen wird durch eine konventionelle Methode der differentiellen Zentrifugation erreicht. Nach einer grob mechanischen Zerkleinerung des Ausgangsmaterials wird die unterschiedliche Dichte der Organellen ausgenutzt, um eine sukzessive Abtrennung zu bewirken. Der Transport der Rinderleber frisch geschlachteter Tiere findet auf Eis statt. Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C.

6.1.1 Isolierung von Mitochondrien

Nach der Entfernung der Kapsel wird die Leber in kleine (ca. 3x3cm) Gewebestücke zerschnitten; dabei werden größere Gefäße und Bindegewebsanteile entfernt. Anschließend werden die Gewebestücke gründlich mit Homogenisationspuffer gewaschen bis das Waschwasser keine Rotfärbung mehr aufweist.

(1) Das Homogenisieren des Gewebes erfolgt danach in einem Waring-Blender in Homogenisationspuffer (drei Zyklen zu je 20 Sekunden, mittlere Stufe). (2) Für die Abtrennung von Zelltrümmern, nicht homogenisiertem Gewebe und der Kernfraktion wird das Homogenat 15 Minuten bei $2.000 \times g$ zentrifugiert und der resultierende Überstand durch zwei Lagen Gaze (Mull) filtriert. (3) Aus diesem Filtrat werden nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei $12.000 \times g$ Mitochondrien gewonnen, die im Anschluß in einem motorbetriebenen Dounce-Homogenisator (B. Braun-Melsungen) mit Homogenisationspuffer resuspendiert werden. (4) Um Verunreinigungen, insbesondere mit der Kernfraktion, zu minimieren, werden die Schritte (2, ohne Filtration) und (3) zweimal wiederholt. (5) Nach der letzten Zentrifugation werden die Mitochondrien in wenig Homogenisationspuffer resuspendiert (s.o.), aliquotiert und tiefgefroren (-70°C) aufbewahrt.

Homogenisationspuffer: 50mM Tris/HCl, pH 7,5
 250mM Saccharose
 0,5mM EDTA

6.1.2 Herstellung von submitochondrialen Partikeln (SMPs)

Für einige Kontrollexperimente wurden invertierte Vesikel der inneren Mitochondrienmembran, sogenannte submitochondriale Partikel, hergestellt. Isolierte Mitochondrien (6.1.1) werden dazu in eine vorgekühlte French-Press Zelle überführt und dreimal bei einem Druck von 10.000 psi (690 bar) aufgeschlossen. Der resultierende Überstand einer 20-minütigen Zentrifugation bei $12.000 \times g$ wird anschließend in der Ultrazentrifuge eine Stunde bei $215.000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet der Ultrazentrifugation (SMPs) wird mit einem Dounce-Homogenisator in 50mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert. In dieser Präparation befindet sich die enzymatische Aktivität der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase (Zhang et al., 1995). Die ADP-Ribosylierung (6.3.1) findet in diesen Partikeln vergleichbar mit der in isolierten Mitochondrien statt (Jorcke et al., 1998).

6.1.3 Gewinnung von Mikrosomen

Für einige Experimente wurde der postmitochondriale Überstand (6.1.1, Arbeitsschritt 3) eine Stunde bei $180.000 \times g$ zentrifugiert und das Mikrosomen enthaltende Pellet in Homogenisationspuffer (6.1.1) resuspendiert. Diese mikrosomale Fraktion sowie das Gewebehomogenat (6.1.1, Arbeitsschritt 1) wurden ebenfalls bezüglich der in isolierten Mitochondrien beobachteten ADP-Ribosylierung (6.3.1) getestet. Die radioaktive Markierung der beiden Proteinbanden, wie sie in Mitochondrien detektiert wird (Abb. 5), war, bezogen auf die Proteinmenge (in mg), in Mitochondrien ca. vierfach höher als im Homogenat und ca. zehnfach höher als in Mikrosomen (nicht gezeigt). Die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase konnte in Übereinstimmung damit bei der Präparation der Mitochondrien siebenfach gegenüber dem Homogenat angereichert werden (nicht gezeigt).

6.1.4 Bestimmung von Markerenzym-Aktivitäten membranärer Zellbestandteile

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades einer Präparation von Zellfraktionen werden organellen-spezifische Enzymaktivitäten bestimmt. Gleichzeitig ist es erforderlich, Markerproteine anderer Zellkompartimente zu detektieren, um Verunreinigungen der Präparation abzuschätzen. Die im folgenden aufgeführten Nachweise spezifischer Enzymaktivitäten wurden routinemäßig bei jeder Mitochondrienpräparation angewendet.

6.1.4.1 Succinat-Dehydrogenase

Die Succinat-Dehydrogenase ist ein integrales Protein der inneren Mitochondrienmembran und dient daher als spezifisches Markerenzym dieser Organellen. Sie enthält ein kovalent gebundenes Molekül Flavinadenindinukleotid, das bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat reduziert wird. In der Nachweisreaktion der enzymatischen Aktivität der Succinat-Dehydrogenase wird hingegen ein künstlicher Elektronenakzeptor [2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium (INT), Sigma] angeboten, der nach Reduktion eine rote Farbe besitzt.

Es werden 100 μ l (0,2 -0,5mg Protein) der zu untersuchenden Fraktion mit 900 μ l Substratlösung für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch TCA-Fällung (10% (w/v), 1ml) gestoppt. Anschließend wird der gebildete Farbstoff mit 4ml Essigsäureethylester (unter dem Abzug) extrahiert und eine Phasentrennung mittels Zentrifugation erreicht. Ein Milliliter des Überstandes wird in die photometrische Bestimmung der Extinktion bei $\lambda=490\text{nm}$ eingesetzt. Der millimolare Extinktionskoeffizient des reduzierten Produkts in Essigsäureethylester beträgt $\epsilon=20,1 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{mmol}$.

Substratlösung:	55mM Kaliumphosphat, pH 7,0
	25mM Saccharose
	55mM Natriumsuccinat
	0,11 % (w/v) INT

6.1.4.2 Glucose-6-phosphatase

Die Glucose-6-phosphatase wird in der Leber von Wirbeltieren charakteristischerweise im endoplasmatischen Retikulum gefunden. Sie katalysiert die irreversible Dephosphorylierung von Glucose-6-phosphat zu freier Glucose, die von der Leber ins Blut abgegeben wird. Der Nachweis der Enzymaktivität wird über die Detektion des freigesetzten Phosphates ermöglicht.

Die Inkubation von 0,2-0,5mg Protein in 100µl erfolgt für 15-30 Minuten bei 37°C mit 900µl Substratlösung. Die Reaktion wird durch TCA-Fällung (Zugabe von 1ml 10%iger (w/v) TCA) gestoppt. Präzipitiertes Protein wird anschließend abzentrifugiert und ein Milliliter des Überstandes in die nachfolgende Phosphatbestimmung eingesetzt. Anorganisches Phosphat reagiert in stark saurer Lösung mit Ammoniummolybdat unter Reduktion zu einem blauen Farbkomplex, dessen Extinktion bei $\lambda=660\text{nm}$ bestimmt wird.

Dem Überstand der Umsatzreaktion werden 500µl Molybdatlösung, 200µl Reduktionsmittel und 3,3ml Wasser zugegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation kann die Extinktion gegen einen Reagenzienleerwert gemessen werden. Zur Bestimmung der Phosphatkonzentration wird eine Standardreihe über den Bereich 0,2-1,5µmol Phosphat erstellt.

Substratlösung:	55mM Tris/HCl, pH 6,6 11mM Glucose-6-Phosphat 11mM β -Mercaptoethanol
Molybdatlösung:	2,5% (w/v) Ammoniummolybdat 5N Schwefelsäure
Reduktionsmittel:	nach Fiske und Subbarow (Sigma)

6.1.4.3 ATPasen

Verschiedene Zellkompartimente enthalten spezifische ATPasen, die selektiv inhibiert werden können. Das Verhältnis der hemmbaren Anteile in unterschiedlichen präparierten Organellen (Mikrosomen, Plasmamembran, Mitochondrien) läßt auf den Grad der Verunreinigung schließen. Die ATPase-Aktivitäten der gewonnenen Fraktionen können auf zwei Wegen ermittelt werden (s.u.). Dabei wird jede Probe ohne ATPase-Hemmstoff sowie in Gegenwart von 1µg/ml der spezifischen Inhibitoren (Sigma, siehe Tabelle) untersucht.

Organelle	spezif. ATPase	selektiver Inhibitor
Plasmamembran	Na^+/K^+ -ATPase	Ouabain (Strophantin)
Mikrosomen	Ca^{2+} -ATPase	Thapsigargin
Mitochondrien	F_0F_1 -ATPase	Oligomycin

a) Phosphatbestimmung:

Eine 15-minütige Inkubation der Organelle (50-100µg Protein) bei 37°C in einem Milliliter Substratlösung wird mit 10%iger (w/v) TCA (1ml) gestoppt und Protein abzentrifugiert. In der Substratlösung ist ein ATP-regenerierendes System (s.u.) enthalten, damit der ATP-Verbrauch nicht limitierend ist. Ein Milliliter des Überstandes wird in die colorimetrische Bestimmung des freigesetzten Phosphats eingesetzt (siehe 6.1.4.2).

b) Optischer gekoppelter Test:

In dieser Methode wird die Aktivität der ATPase (Umsatzreaktion) über die Abnahme der NADH-Absorption bei $\lambda=340\text{nm}$ (Nachweisreaktion) kontinuierlich im Photometer verfolgt: In einer zweiten Reaktion katalysiert die Pyruvat-Kinase (PK) die Synthese von ATP aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und dem in der Umsatzreaktion gebildeten ADP (Regenerierung des ATP). Das gleichzeitig entstehende Pyruvat wird durch die Laktat-Dehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert bei paralleler Oxidation von NADH zu NAD^+ . Die Abnahme der NADH-Konzentration pro Zeit ist damit über die beschriebene Reaktionsfolge der ATPase-Aktivität direkt proportional, die aus der Steigung der resultierenden Geraden berechnet werden kann. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgt, bis auf die Anwesenheit von NADH^* , wie unter a) beschrieben bei Raumtemperatur. Die Zugabe der selektiven Inhibitoren findet im Verlauf der Messung statt.

Substratlösung: 100µl ATPase-stock
100µl Salt-stock
3µl PK/LDH (Sigma)
A. dest. ad 1ml

ATPase-stock:	0,5M Tris/HCl, pH 7,5	Salt-stock:	50mM MgCl_2
	50mM PEP		500mM KCl
	10mM ATP		100mM NaCl
	2mM NADH^*		10mM CaCl_2

* nur für den optischen Test erforderlich

6.2 Isolierung der NAD^+ -Glycohydrolase

6.2.1 Detergenzsolubilisierung

Die Reinigung der mitochondrialen NADase nach Solubilisierung mit Detergenzien ist unlängst beschrieben worden (Zhang et al., 1995). Um ein nahezu homogenes Protein zu erhalten, mußte in der Aufarbeitung ein Denaturierungsschritt eingeführt werden (Zhang et al., 1995). Da die enzymatischen Eigenschaften durch diese Behandlung möglicherweise wesentlich beeinträchtigt werden, erschien es für eine kinetische Charakterisierung sinnvoll, eine partiell gereinigte Form des Enzyms zu verwenden (Ziegler et al., 1996). Insbesondere in Hinblick auf den Vergleich mit einer steapsinsolubilisierten, wasserlöslichen Form der NADase wurde auf eine analoge Reinigungsprozedur Wert gelegt (Ziegler et al., 1996).

Isolierte Mitochondrien (6.1.1) werden im Anschluß an den letzten Zentrifugationsschritt in Solubilisierungspuffer aufgenommen und mit einem Dounce-Homogenisator resuspendiert. Nach zwei Stunden Inkubation unter Rühren auf Eis werden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei $215.000 \times g$ für 45 Minuten abgetrennt. Der Überstand, der die detergenten-solubilisierete NADase-Aktivität enthält, wird nachfolgend durch Säulenchromatographie aufgearbeitet.

Solubilisierungspuffer: 50mM Tris/HCl, pH 7,5
 100mM NaCl
 6% (w/v) Triton X-100

6.2.2 Chromatographische Verfahren

Aufgrund der maximalen Effizienz (im Vergleich zu anderen getesteten Detergenzien) wurde für die Solubilisierung der NADase Triton X-100 bevorzugt. Während der chromatographischen Schritte diente Lauryldimethylamin-*N*-oxid (LDAO) als Detergenz. LDAO hat den Vorteil einer geringen Absorption bei $\lambda=280\text{nm}$ und ermöglicht daher die photometrische Überwachung der Aufarbeitung. 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium] propansulfonat (CHAPS) wurde im letzten Schritt der Aufarbeitung als Detergenz eingesetzt (s.u.), da es die Elution der NADase deutlich vereinfachte und die alternative Verwendung hoher Salzkonzentrationen die mitochondriale NAD⁺-Glycohydrolase signifikant inhibierte (Ziegler et al., 1996).

Die durch Detergenz solubilisierete mitochondriale NADase wird zunächst auf einer Hydroxylapatit (HTP)-Säule (Hydroxylapatit Bio-Gel, Bio-Rad) chromatographiert, die mit HTP(A)-Puffer äquilibriert wurde. Der Hauptanteil der NADase-Aktivität bindet an die stationäre Phase. Nach dem Probenauftrag wird die Matrix mit dem zehnfachen Säulenvolumen des gleichen Puffers, jedoch mit 0,05% (w/v) LDAO anstelle von Triton X-100, gewaschen, um den Austausch der Detergenzien zu erreichen. Die Elution erfolgt durch Anlegen eines linearen Phosphatpuffer-Gradienten von HTP(B1)- nach HTP(B2)-Puffer. Fraktionen, die eine NADase-Aktivität beinhalten (60-150mM Kaliumphosphat), werden vereinigt und gegen DEAE-Puffer dialysiert.

Die Proteinlösung wird anschließend auf eine Diethylaminoethyl (DEAE)-52-Cellulose (Whatman)-Säule aufgetragen, die mit DEAE-Puffer äquilibriert war. Die enzymatische Aktivität bindet nicht an diese Matrix und wird im Durchlauf der Säule detektiert, der nachfolgend mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt wird.

Der enzymatisch aktive Pool wird dann direkt auf einer Carboxymethyl (CM)-Trisacryl (Serva)-Säule chromatographiert, die zuvor mit CM(A)-Puffer äquilibriert wurde. Nach dem Probenauftrag wird die Matrix mit dem fünffachen Säulenvolumen CM(A)-Puffer gewaschen, wonach sich die Elution durch Anlegen eines linearen Gradienten von diesem Puffer nach CM(B)-Puffer anschließt.

Die Fraktionen mit NADase-Aktivität (120-150mM Kaliumphosphat) werden vereinigt und gegen AFB(A)-Puffer dialysiert, gefolgt von einer Chromatographie mit Blue Sepharose-Matrix (Affi-Blue, AFB). Die Säule wird in demselben Puffer äquilibriert sowie nach dem Auftrag der Proteinlösung mit fünf Säulenvolumina gewaschen. Ein linearer Gradient, ausgehend von diesem Puffer bis zu AFB(B)-Puffer, dient der Elution der enzymatischen NAD⁺-Glycohydrolase-Aktivität (30-50% AFB(B)-Puffer).

Verglichen mit gewaschenen Mitochondrien konnte die NADase ca. 280-fach angereichert werden. Die hier beschriebene partiell gereinigte Fraktion der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase enthält keine weiteren NAD⁺-katabolisierenden Enzymaktivitäten, wie durch die Produktanalyse mittels Dünnschichtchromatographie dargelegt wurde (Ziegler et al., 1996). Konsequenterweise konnte diese Präparation für die kinetische Charakterisierung (Ziegler et al., 1996) sowie für die weiterführenden Arbeiten (Kapitel 3) eingesetzt werden.

Die Affinitätsmatrix Blue Sepharose (Affi-Blue) wird durch die Kopplung des Farbstoffs Cibacron Blue F₃GA (Serva) an Sepharose CL4-B oder CL6-B (Pharmacia Biotech) eigens hergestellt. Dazu wird eine wässrige Lösung (1g/60ml) von Cibacron Blue F₃GA tropfenweise unter Rühren zu einer Suspension von 175ml Sepharose (in 175ml Wasser) bei 60°C gegeben und 30 Minuten gerührt. Im Anschluß an die Zugabe von 22,5g Natriumchlorid wird eine Stunde inkubiert, die Suspension auf 80°C erwärmt und mit 2g Natriumcarbonat versetzt. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation bei 80°C unter Rühren läßt man die Matrix auf Raumtemperatur abkühlen und saugt die Flüssigkeit mit einem Büchnertrichter ab. Die Blue Sepharose wird nachfolgend solange mit Wasser gewaschen bis das Eluat farblos erscheint. Das abgesaugte Material wird dann in AFB(A)-Puffer inklusive 1mM Natriumazid aufgenommen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

HTP(A)-Puffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 100mM NaCl 0,5% (w/v) Triton X-100 bzw. 0,05% (w/v) LDAO	HTP(B1/2)-Puffer:	50mM bzw. 500mM Kaliumphosphat, pH 7,0 0,05% (w/v) LDAO
DEAE-Puffer:	20mM Tris/HCl, pH 8,5 0,05% (w/v) LDAO		
CM(A)-Puffer:	20mM Natriumacetat, pH 5,0 0,05% (w/v) LDAO	CM(B)-Puffer:	250mM Kaliumphosphat, pH 7,0 0,05% (w/v) LDAO
AFB(A)-Puffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 100mM NaCl 0,05% (w/v) LDAO	AFB(B)-Puffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 200mM NaCl 0,5% (w/v) CHAPS

6.2.3 Fluoreszenzphotometrischer Nachweis enzymatischer Aktivitäten der NADase

Aufgrund der einfachen Handhabung ist diese Methode sowohl für die Verlaufskontrolle der Aufarbeitung als auch für eine Erfassung kinetischer Daten der NAD⁺-Glycohydrolase geeignet. Die Durchführung der Messungen erfolgte in einem Fluoreszenzphotometer (Perkin Elmer: Luminescence Spectrometer LS 50B) in LS50-Puffer; die Aufnahme der Daten startete gleichzeitig mit der Zugabe einer geeigneten Menge des Enzyms.

LS50-Puffer:	50mM Tris/HCl, pH 7,5 0,03% (w/v) LDAO
--------------	-------------------------------------------

I. *Verwendung von 1,N⁶-Etheno-NAD⁺ (ϵ -NAD⁺)*

1,N⁶-Etheno-NAD⁺ (ϵ -NAD⁺) wurde entweder von Sigma bezogen oder in Anlehnung an die Methode von Barrio et al. (1972) selbst synthetisiert:

In der Umsatzreaktion wird eine 50mM NAD⁺-Lösung in 0,4M Ammoniumformiat (pH 5,0) mit einem 30-fachen Überschuß an frisch destilliertem Chloracetaldehyd für 48 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit verdünntem Ammoniak auf pH 6,8 titriert und bei -20°C mit konzentriertem Ethanol gefällt. Nach einer Zentrifugation wird der erhaltene Niederschlag mit eiskaltem Ethanol zweimal gewaschen und in destilliertem Wasser resuspendiert. Die Ethanolfällung und die Wasch-Schritte werden fünfmal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wird eine konzentrierte Lösung in destilliertem Wasser hergestellt. In allen Schritten der ϵ -NAD⁺-Synthese wird β -Mercaptoethanol in einer Konzentration von 50mM zugegeben. Die Konzentration des selbst hergestellten ϵ -NAD⁺ wurde durch Reduktion mittels der Alkoholdehydrogenase-Reaktion bestimmt; dabei wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $6,2 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ für ϵ -NADH (entsprechend NADH) bei einer Wellenlänge von $\lambda=340\text{nm}$ vorausgesetzt.

Das Nachweisverfahren unter Verwendung des Substratanalogons ϵ -NAD⁺ beruht auf einer Zunahme der Fluoreszenz, die nach der Trennung des Fluorophors (Etheno-Adenin) vom quenchenden Nikotinamidring beobachtet wird (Barrio et al., 1972). Die Methode ist per se nicht spezifisch für NADasen. Weitere NAD⁺-katabolisierende Enzyme, wie z. B. Phosphodiesterasen, die ϵ -NAD⁺ als Substrat akzeptieren, führen ebenfalls zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Deshalb ist es von großer Bedeutung, eine Produktanalyse der enzymkatalysierten Reaktion durchzuführen, um die tatsächliche enzymatische Aktivität zu bestimmen und die Anwesenheit unerwünschter Fremdaktivitäten nachzuweisen bzw. auszuschließen (6.2.5). Der Test wurde bei Raumtemperatur in einem Volumen von 700 μ l LS50-Puffer mit 10 μ M ϵ -NAD⁺ in einer Halbmikro-Kunststoffküvette ausgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda=310\text{nm}$; die Emission der Fluoreszenz wurde bei $\lambda=410\text{nm}$ verfolgt. Die Anfangssteigung der resultierenden Geraden - Fluoreszenzzunahme versus Zeit - der enzymkatalysierten Reaktion ist der Umsatzrate des Enzyms proportional und dient als ein Maß für dessen Aktivität. Für die Ermittlung des Einflusses reduzierender Agenzien auf die Aktivität der mitochondrialen NADase (Abb. 6B) wurde das partiell gereinigte Enzym (Ziegler et al., 1996) mit 10mM Dithiothreitol (DTT) behandelt. Die Zugabe von DTT erfolgte entweder in den Reaktionsansatz der laufenden Messung oder in einer 15-minütigen Vorinkubation des Enzyms.

II. *Verwendung von Nikotinamidguanidinukleotid (NGD⁺) und Nikotinamidhypoxanthinukleotid (NHD⁺)*

Die NAD⁺-Analoga NHD⁺ und NGD⁺ wurden von Sigma bezogen. Sie dienen dem Nachweis von ADP-ribosyl Cyclase-Aktivitäten, wobei die Fähigkeit dieser Enzyme ausgenutzt wird, die Entstehung fluoreszenter cyclischer Purindinukleotiddiphosphoribosen zu katalysieren (Graeff et al., 1994). Weder die Substrate noch die Hydrolyseprodukte (GDP-Ribose bzw. IDP-Ribose) weisen eine Fluoreszenz auf, so daß die Entstehung der cADP-Ribose-Analoga kontinuierlich ohne Trennverfahren erfolgen kann. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die hohe Ausbeute an fluoreszenten Produkten, die eine erhöhte Hydrolysebeständigkeit im Vergleich zu cADP-Ribose aufweisen. Die Bildung fluoreszenter cGDP-Ribose oder cIDP-Ribose wurde im Fluoreszenzphotometer unter Verwendung von 1mM NHD⁺ bzw. NGD⁺ als Substrat verfolgt. Die Durchführung fand in einem Volumen von 400 μ l LS50-Puffer bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette statt. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda=300\text{nm}$; die Emission der Fluoreszenz wurde bei $\lambda=410\text{nm}$ detektiert.

6.2.4 Identifizierung der NADase in der SDS-PAGE durch Fluoreszenzfärbung

Die zu untersuchende Proteinlösung wird zunächst in einer SDS-PAGE nach Laemmli (1970) mit der angegebenen Acrylamidkonzentration getrennt. Für den späteren Nachweis der enzymatischen Aktivitäten ist es unerlässlich, daß der Probenpuffer keine reduzierenden Agenzien (z. B. β -Mercaptoethanol) enthält und die Proben nicht gekocht werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Polyacrylamidgel in einen Renaturierungspuffer überführt und für 30-60 Minuten unter Schütteln behandelt; dabei wird der Puffer mehrfach ausgewechselt. Die Anwesenheit hoher Detergenzkonzentrationen ist für den Renaturierungsprozeß erforderlich und erleichtert vermutlich die Entfernung des denaturierenden Dodecylsulfates.

Für die parallele Detektion der NADase-Aktivität (mit ϵ -NAD⁺) und der Cyclase-Aktivität (mit NHD⁺) wurden identische Proben in benachbarten Spuren durch SDS-PAGE getrennt. Die als Kontrolle dienende ADP-ribosyl Cyclase aus *Aplysia californica* wurde von Sigma bezogen. Nach der Renaturierung wird das Gel in zwei Hälften geteilt, in denen identische Proben separiert wurden. Die beiden übereinstimmenden Gelhälften werden im Anschluß wie folgt behandelt.

Renaturierungspuffer: 50mM Tris/HCl, pH 7,5
 0,5% (w/v) LDAO

I. *Verwendung von 1,N⁶-Etheno-NAD⁺ (ϵ -NAD⁺)*

Nach der Renaturierung wird das Gel (respektive die Gelhälfte (s.o.)) mit 150 μ M ϵ -NAD⁺ in LS50-Puffer (6.2.3) für 5-30 Minuten inkubiert bis die gewünschte Fluoreszenzfärbung visualisiert werden kann. Dazu wird das Gel auf einen UV-Transilluminator plaziert, dessen anregendes Licht die enzymatisch aktive NADase als fluoreszierende Bande detektieren läßt. Dieses Nachweisverfahren ist auch auf andere NAD⁺-katabolisierende Enzymaktivitäten anwendbar (Hagen und Ziegler, 1997).

Eine Abschätzung der Molekulargewichte der Proteine kann nach einer Markierung der Banden und anschließender Coomassie-Färbung des Gels durch Vergleich mit Markerproteinen erreicht werden. In einigen Fällen wurden die fluoreszenten Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und bei 4°C bis zur Produktanalyse (6.2.5) aufbewahrt.

II. *Verwendung von Nikotinamidhypoxanthidinukleotid (NHD⁺)*

Der Nachweis der IDP-ribosyl Cyclase-Aktivität in der Gelmatrix erfolgt wie unter 6.2.4.1 beschrieben, jedoch mit 3mM NHD⁺ als Substrat anstelle von ϵ -NAD⁺ in LS50-Puffer (6.2.3). 1,N⁶-Etheno-ADP-Ribose (ϵ -ADP-Ribose) besitzt eine wesentlich stärkere Fluoreszenz als cyclische IDP-Ribose, so daß die Reaktionszeit mit NHD⁺ bisweilen verlängert werden muß. Aus dem gleichen Anlaß ist der fluoreszierende Hintergrund bei der Inkubation mit NHD⁺ stärker (siehe Abb. 15). Die weitere Verfahrensweise verläuft wie bei der Verwendung von ϵ -NAD⁺ angegeben.

6.2.5 Identifizierung der Reaktionsprodukte der isolierten NADase

6.2.5.1 Dünnschichtchromatographie

Für den Nachweis der Reaktionsprodukte der mitochondrialen NADase wurden zwei verschiedene Chromatographiesysteme verwendet. Da die fluorometrischen Verfahren unter Verwendung von ϵ -NAD⁺ keine ausreichende Spezifität für NADasen aufweisen, ist es von großer Bedeutung, die tatsächliche Enzymaktivität durch die Produktanalyse zu verifizieren. Die Identifizierung von Standardkomponenten erfolgt durch ihre Fluoreszenzlöschung, wohingegen radioaktive Produkte der Reaktion mittels Autoradiographie der Platten nachgewiesen werden. [³²P]-NAD⁺ wurde von ICN erhalten und [¹⁴C]-NAD⁺ von Amersham bezogen. Die Ethenoderivate der Nukleotide sowie cGDP-Ribose zeigen eine blaue Fluoreszenz unter Anregung mit UV-Licht.

System 1:

Die mobile Phase besteht aus : Isobuttersäure / Wasser / 25% Ammoniak (96/19/4, v/v/v). Eine Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte auf Cellulose-Platten mit Fluoreszenzindikator (Polygram[®]CEL 400 UV₂₅₄, Macherey-Nagel) durch aufsteigende Chromatographie (Lötscher et al., 1980).

Partiell gereinigte mitochondriale NADase (10 μ g) wurde entweder mit 50 μ M ϵ -NAD⁺, 25 μ M [Nikotinamid-¹⁴C]-NAD⁺ (0,1 μ Ci) oder 1mM NGD⁺ in LS50-Puffer (6.2.3) für 15 Minuten bei 37°C in einem Endvolumen von 50 μ l inkubiert. Alternativ können auch die nach Aktivitätsfärbung aus dem Gel ausgeschnittenen Banden (6.2.4) eingesetzt werden, die nach beendeter Inkubation aus dem Ansatz entfernt werden. Die Reaktion wird durch Acetonpräzipitation (Zugabe von 450 μ l eiskaltem Aceton) gestoppt. Aus dem getrockneten Pellet werden die präzipitierten Reaktionsprodukte mit 10 μ l Wasser wieder in Lösung gebracht und ungelöstes Protein sedimentiert. Aliquots der Überstände werden dann auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und getrennt.

Substanz	NAD ⁺	(c)ADPR	AMP	NMN	Nam	ϵ NAD ⁺	ϵ (c)ADPR	ϵ AMP	NGD ⁺	cGDPR	GDPR
R _f - Wert	0,33	0,17	0,49	0,45	0,85	0,32	0,18	0,43	0,097	0,061	0,031

System 2:

Die Nukleotide wurden auf Polyethylenimin (PEI)-Celluloseplatten mit Fluoreszenzindikator (Schleicher und Schuell) mit einer mobilen Phase, bestehend aus 1M Essigsäure und 0,3M LiCl, separiert.

Partiell gereinigt mitochondriale NADase (10 μ g) wurde mit 25 μ M [³²P]-NAD⁺ (1nCi/nmol) in LS50-Puffer (6.2.3) für 5 Minuten bei 30°C in einem Endvolumen von 50 μ l inkubiert. Die Zugabe weiterer Komponenten ist der Legende von Abbildung 14 zu entnehmen. Die Reaktion wurde durch Acetonpräzipitation (s.o.) gestoppt und die Ansätze getrocknet. Die präzipitierten Nukleotide lassen sich durch die Zugabe von 25 μ l Wasser wieder in Lösung bringen; ungelöstes Protein wird sedimentiert. Da die Trennung freier ADP-Ribose von cyclischer ADP-Ribose in beiden verwendeten Systemen nicht ausreichend ist, wurde der Dünnschichtchromatographie ein zusätzlicher enzymatischer Schritt vorangestellt. Die Phosphodiesterase I (PDE) aus Schlangengift (*Crotalus adamanteus*, Sigma) bildet [³²P]-AMP aus NAD⁺ und ADP-Ribose (sowie NMN bzw. Ribose-5'-phosphat), während cADP-Ribose diesem Enzym nicht als Substrat dient. Infolgedessen wurden die Überstände in einer 20-minütigen Inkubation bei 30°C mit 1mU PDE behandelt und anschließend unmittelbar auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

6.2.5.2 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Trennung von ADP-Ribose, cADP-Ribose, AMP, Nikotinamid und NAD^+ wurde unter Verwendung des BioLogic Systems (FPLC) der Firma Bio-Rad mit einer C_{18} - "reverse-phase"-Säule (4,6mm \times 250mm) als stationäre Phase (Nucleosil 100, Muder & Wochele) mit einer Flußrate von 0,5ml/min durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus 50mM NaCl und 3mM Trifluoressigsäure (Puffer A). Puffer B wurde zusätzlich mit 5% (v/v) Acetonitril versehen. Das Auftragen des zu trennenden Materials erfolgte über eine 25 μ l Probenschleife. Die Elution wurde wie folgt bewirkt: Einer 15-minütigen isokratischen Elution mit Puffer A schloß sich ein linearer Gradient von 100% (v/v) Puffer A bis 100% (v/v) Puffer B innerhalb von sechs Minuten an. Um die Elution zu vervollständigen, wurde die Säule anschließend für zehn Minuten mit 100% (v/v) Puffer B gewaschen. Vor jedem neuen Probenauftrag wurde die Matrix zunächst mit Puffer A für zehn Minuten äquilibriert.

Die Durchführung der Experimente erfolgte in LS50-Puffer (6.2.3) bei 30°C mit 5 μ g der partiell gereinigten mitochondrialen NAD^+ -Glycohydrolase. Im Anschluß an die Inkubation mit den angegebenen Zeiten wurden die Ansätze mittels eines Mikrokonzentrators (Mikron-10, Amicon) filtriert und das Filtrat mit einer Hamilton-Spritze in die Probenschleife injiziert.

1. NAD^+ als Substrat:

0,1-1mM NAD^+ (Retentionszeit: 26,3 min) wurden mit der NADase für 10-60 Minuten inkubiert und die Reaktionsprodukte über HPLC getrennt (s.o.). Frisch angesetzte NAD^+ -Lösungen waren innerhalb der gewählten Inkubationsperioden in Abwesenheit des Enzyms stabil. Unter Katalyse der mitochondrialen NADase wurde in allen Experimenten die Bildung der beiden Hauptprodukte ADP-Ribose (Retentionszeit: 12,4 min) sowie Nikotinamid (Retentionszeit: 15,4 min) beobachtet. Die Synthese von cADP-Ribose (Retentionszeit: 14,2 min) konnte unter den gewählten Bedingungen nur sehr schwer detektiert werden, da lediglich weniger als 2% dieses Nukleotids gebildet wurden. In einigen Fällen wurde die Entstehung geringer Mengen von AMP (Retentionszeit: 19,5 min) beobachtet. Bei der Inkubation von ADP-Ribose (Sigma) in Abwesenheit von Enzym entstand allerdings auch AMP (und vermutlich Ribosephosphat, das aufgrund der fehlenden Absorption bei $\lambda=254\text{nm}$ nicht detektiert wird), was die Anwesenheit einer Fremdaktivität (e.g. PDE) ausschließt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind nicht dargestellt.

2. cADP-Ribose als Substrat:

Für den Nachweis der cADP-Ribose Hydrolase-Aktivität der mitochondrialen NADase wurde das partiell gereinigte Enzym in Gegenwart von 100 μ M cADP-Ribose 30 Minuten lang inkubiert und wie oben beschrieben bearbeitet. Als Kontrolle wurde ein Parallelansatz mit 100 μ M cADP-Ribose ohne Zugabe des Enzyms gewählt.

3. cADP-Ribose und Nikotinamid als Substrate:

Die NAD^+ -Synthese durch die NADase wurde in Anwesenheit von 100 μ M cADP-Ribose und 0,1-1mM Nikotinamid in einem Zeitraum von 30-60 Minuten überprüft. Bei geringeren Konzentrationen von Nikotinamid (0,1-0,5mM) scheint die cADP-Ribose Hydrolase-Aktivität der NADase zu überwiegen, so daß in der HPLC die Entstehung freier ADP-Ribose detektiert wird (nicht gezeigt). In Gegenwart von 1mM Nikotinamid wird cADP-Ribose jedoch kaum hydrolysiert, sondern fast vollständig zu NAD^+ umgesetzt.

6.3.2 Chemische Stabilität der ADP-Ribose-Bindungen mitochondrialer Proteine

Isolierte und gewaschene Mitochondrien werden in Ribosylierungspuffer (inklusive DTT und EDTA) mit $25\mu\text{M}$ [^{32}P]-NAD⁺ zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Nach beendeter Reaktion werden nicht gebundene Nukleotide durch fünfmaliges Waschen entfernt. Zu diesem Zweck findet in jedem Durchgang die Zentrifugation der Organellen, gefolgt von einer Resuspendierung in Ribosylierungspuffer statt (nach dem vierten Wasch-Schritt konnte keine weitere Abnahme der proteinassoziierten Radioaktivität nachgewiesen werden).

Das Pellet mit radioaktiv markierten Mitochondrien wird nachfolgend in 50µl MK-Puffer aufgenommen und mit dem gleichen Volumen zweifach konzentrierter Chemikalienlösungen (1.-4.) versehen, um die angegebene Endkonzentration (s. u.) zu erreichen. Der Kontrollprobe werden 50µl Wasser zupipettiert. Für die Ermittlung der chemischen Stabilität der Protein-ADP-Ribose-Bindungen wurden folgende Chemikalien eingesetzt:

1. 44% (v/v) Ameisensäure
2. 1M NaOH
3. 1M Hydroxylamin (pH 7,0; mit KOH eingestellt)
4. 10mM HgCl₂

Nach der Inkubation für zwei Stunden bei 30°C werden die Proteine mit TCA (10 % (w/v), Endkonzentration) gefällt und die Radioaktivität der Pellets und der Überstände durch Cherenkov-Zählung (Beckmann LS 6000SC) bestimmt. Die präzipitierten Proteine werden anschließend mit 3%iger (w/v) Natriumhydroxidlösung resuspendiert und der Proteingehalt (6.4.1) ermittelt. Die gemessene Radioaktivität der Pellets wird auf die präzipitierte Proteinmenge bezogen und in Hinblick auf die freigesetzte Radioaktivität der Kontrolle korrigiert.

MK-Puffer: 50mM MOPS/KOH, pH 7,0

6.3.3 ADP-Ribosylierung der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) aus Hefe

Die Modifizierung der ALDH (20µg) aus Hefe (Boehringer-Mannheim) wurde unter den zuvor beschriebenen Bedingungen mit dem erweiterten Ribosylierungspuffer (6.3.1) durchgeführt. Für die nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung werden, in Abwesenheit der mitochondrialen ADPRT-Aktivität, entweder $25\mu\text{M}$ [^{32}P]-ADP-Ribose oder $25\mu\text{M}$ [^{32}P]-NAD⁺ eingesetzt. Die Überprüfung der enzymatischen Modifizierung der ALDH erfolgt in Gegenwart von $25\mu\text{M}$ [^{32}P]-NAD⁺ und 10µg isolierten Mitochondrien, die in einer 15-minütigen Vorinkubation mit 10mM DTT behandelt werden. Die Reaktion wird durch Acetonpräzipitation gestoppt und die in Probenpuffer resuspendierten Proteine durch SDS-PAGE getrennt.

6.4.1.2 BCA-Methode

Die Proteinbestimmungsmethode BCA (Pierce) kombiniert die Reaktion von Proteinen mit Kupferionen in alkalischer Lösung mit einem hochsensitiven und selektiven Nachweis des Cu^+ -Ions. Dabei erfolgt zunächst eine Komplexierung von Kupfer(II)-Ionen, die nach Reduktion zu einwertigem Kupfer mit zwei Molekülen Bicinchonsäure (bicinchonic acid, BCA) interagieren. Das resultierende violette Reaktionsprodukt ist wasserlöslich und kann bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ absorptionsphotometrisch gemessen werden. Die Empfindlichkeit der Methode hängt von den gewählten Inkubationsbedingungen ab (Herstellerangaben beachten). In einem Halbmikroansatz werden 50 μl Proteinlösung (5-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit einem Milliliter BCA-Reagenz gemischt und 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt sind, wird ihre Extinktion gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Die Methode eignet sich ebenfalls für Proteinpräzipitate, die nach einer Säurefällung erhalten werden, die direkt in dem stark alkalischen BCA-Reagenz resuspendiert werden können. Die Standardkurve wurde mittels BSA erstellt.

BCA-Reagenz :	Lösung A (BCA-Entwickler)
	Lösung B (4% Kupfersulfat)
	im Verhältnis 50 + 1 (v/v)

6.4.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Im Gelsystem von Laemmli (1970) wird die Tertiärstruktur der Proteine mit dem stark denaturierenden Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgebrochen. Die SDS-Anionen binden an die Polypeptidkette (ca. 1 Molekül SDS pro 2 Aminosäuren) und überlagern die Eigenladung der Proteine. Die Trennung erfolgt daher nach dem Molekulargewicht, da die Ladung des SDS/Protein-Komplexes der Masse der Proteine annähernd proportional ist. In der diskontinuierlichen Gelelektrophorese besteht das Polyacrylamidgel aus zwei Systemen. Durch eine Isotachophorese werden Proteine im Sammelgel konzentriert; im folgenden Trenngel wird die Separation nach dem Molekulargewicht erreicht. Die SDS-PAGE wurde in Minigelapparaturen (Hoefer Scientific) ausgeführt. Die Polyacrylamidkonzentrationen (w/v) betragen 5% für die Sammel- und 10-15% für die Trenngele.

Die Proben der ADP-Ribosylierungsexperimente werden mit dem gleichen Volumen an $2\times$ SDS-Probenpuffer versehen und fünf Minuten im Wasserbad gekocht. Pellets der Aceton- bzw. TCA-Fällung werden in $1\times$ SDS-Probenpuffer resuspendiert und gekocht. Proteinlösungen, die für den Nachweis enzymatischer Aktivitäten in der Gelmatrix getrennt werden sollen, werden 30 Minuten bei Raumtemperatur mit SDS-Probenpuffer, der kein reduzierendes Agens enthält, unter Schütteln inkubiert. Diese Proben werden vor der Elektrophorese nicht aufgekocht. Als Molekulargewichtsmarker wurde der "Low Molecular-Weight" Marker der Firma Sigma benutzt. Er enthält folgendes Proteingemisch:

Rinder Serum Albumin	66kDa
Ovalbumin	45kDa
GAPDH	36kDa
Carboanhydrase	29kDa
Trypsinogen	24kDa
Trypsin Inhibitor	20kDa
α -Lactalbumin	14kDa

Die Zusammensetzung der Sammel- bzw. Trenngellösungen kann den folgenden Tabellen entnommen werden (Angaben in ml, ausreichend für vier Minigele).

1. Sammelgel (10ml)

% (w/v) Acrylamid	5
Acrylamid-Stammlsg.	1,7
Sammelgelpuffer	2,5
Wasser (dest.)	5,6
SDS (10 %)	0,1
TEMED	0,01
APS (10 %)	0,1

2. Trenngel (20ml)

% (w/v) Acrylamid	10	12	13	15
Acrylamid-Stammlsg.	6,7	8,0	8,7	10,0
Trenngelpuffer	5,0	5,0	5,0	5,0
Wasser (dest.)	7,9	6,6	5,9	4,6
SDS (10 %)	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,015	0,015	0,015	0,015
APS (10 %)	0,2	0,2	0,2	0,2

Acrylamidstammlösung : 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid

Sammelgelpuffer : 0,5 M Tris/HCl, pH 6.8

Trenngelpuffer : 1,5 M Tris/HCl, pH 8.8

2× SDS-Probenpuffer: 62,5mM Tris/HCl, pH 6,8
3% (w/v) SDS
10% (w/v) Glycerin
0,025mg Bromphenolblau
10mM β -Mercaptoethanol*

Laufpuffer: 0,3% (w/v)Tris
1,44% (w/v) Glycin
0,1% (w/v) SDS

* nicht enthalten, wenn die Proben einer Aktivitätsfärbung (6.2.4) dienen

6.4.3 Coomassie-Färbung

Die Färbung von Polyacrylamidgelen zur Detektion von Proteinen ($\geq 1\mu\text{g}$) erfolgt unter leichtem Schütteln für 10-30 Minuten. Wird die Coomassie-Färbung im Anschluß an den Direktnachweis enzymatischer Aktivitäten ausgeführt, sollte das Gel zunächst mit der Entfärbelösung fixiert und mehrmals gewaschen werden, um das Detergenz zu entfernen.

Färbelösung : 0,16% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Um die Gele zu trocknen, werden sie nach der Färbung 30 Minuten mit Wasser gewaschen, anschließend auf ein feuchtes Filterpapier übertragen und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Die Gele werden dann im Vakuum des Geltrockners (Drystar, H. Hölzel GmbH) bei 70-80°C innerhalb von zwei Stunden getrocknet.

6.4.4 Silberfärbung

Dieses Nachweisverfahren ist bis zu 100-fach empfindlicher als die Coomassie-Färbung und kann Proteinmengen von nur 10ng detektieren. Die Silberfärbung wird wie folgt ausgeführt:

1. Fixierung der Proteine:
15 Minuten, 10% (w/v) Essigsäure, 40% (w/v) Methanol
15 Minuten, 5% (w/v) Essigsäure, 10% (w/v) Methanol
2. Oxidation der Proteine:
5 Minuten, 3,4mM Kaliumdichromat, 3,2mM Salpetersäure

Anschließend wird das Gel zweimal fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

3. Anlagerung von Silberionen:
30 Minuten, 12mM Silbernitratlösung

Nachfolgend wird das Gel zweimal eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen.

4. Reduktion der Silberionen:
2% (w/v) Natriumcarbonat, 0,05% (v/v) Formalin (37% (v/v))
5. Stopp:
1% (v/v) Essigsäure

Die Gele werden danach fotografiert (Dokumentationsanlage E.A.S.Y., Herolab) und/oder wie oben beschrieben getrocknet.

6.4.5 Autoradiographie

Die getrockneten Gele (bzw. die Platten der Dünnschichtchromatographie) werden nachfolgend in eine X-Omatic Kassette mit Verstärkerfolie (Kodak) deponiert. Das Auflegen des Films (Bio Max MR-1/X-OMAT AR, Kodak; Reflection NEF-496, Dupont) sowie dessen spätere Entwicklung erfolgen in der Dunkelkammer. Die Gelkassette wird bis zur Entwicklung der Autoradiographie bei -70°C gelagert.

7. Literatur

7.1 Zitierte Literatur anderer Autoren

- Aarhus R., Graeff RM., Dickey DM., Walseth TF., and Lee HC. (1995) ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP⁺. *J. Biol. Chem.* **270**, 30327-30333.
- Aktories K. (1994) Clostridial ADP-ribosylating toxins: effects on ATP- and GTP-binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **138**, 167-176.
- Aktories K. (1997) Identification of the catalytic site of clostridial ADP-Ribosyltransferases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 53-60.
- Barrio JR., Secrist III JA., and Leonard NJ. (1972) A fluorescent analog of nicotinamide adenine dinucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2039-2042.
- Berridge MJ. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- Boyer CS., Moore GA., and Moldéus P. (1993) Submitochondrial localization of the NAD⁺ glycohydrolase: implications for the role of pyridine nucleotide hydrolysis in mitochondrial calcium fluxes. *J. Biol. Chem.* **268**, 4016-4020.
- Broekemeier KM., Dempsey ME., and Pfeiffer DR. (1989) Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **264**, 7826-7830.
- Bull HG., Ferraz JP., Cordez EH., Ribbi A., and Apitz-Castro R. (1978) Concerning the mechanism of the enzymatic and nonenzymatic hydrolysis of nicotinamide nucleotide coenzymes. *J. Biol. Chem.* **253**, 5186-5192.
- Burzio LO., Saez L., and Cornejo R. (1981) Poly(ADP-ribose)synthetase activity in rat testis mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**, 369-375.
- Carafoli E. (1979) The calcium cycle of mitochondria. *FEBS Lett.* **104**, 1-5.
- Carafoli E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 395-433.
- Cassel D. and Pfeuffer T. (1978) Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2669-2673.
- Cayama E., Apitz-Castro R., and Cordes EH. (1973) Substrate-dependent, thiol-dependent, inactivation of pig brain nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* **248**, 6479-6483.
- Cervantes-Laurean D., Minter DE., Jacobson EL., and Jacobson MK. (1993) Protein glycation by ADP-ribose : studies of model conjugates. *Biochemistry* **32**, 1528-1534.
- Cervantes-Laurean D., Loflin PT., Minter DE., Jacobson EL., and Jacobson MK. (1995) Protein modification by ADP-ribose via acid-labile linkages. *J. Biol. Chem.* **270**, 7929- 7936.
- Chambon P., Weil JD., and Mandel P. (1963) Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 39-43.
- Chambon P., Weil JD., Doly J., Strasser MT., and Mandel P. (1966) On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 638-643.

- Chini EN. and Dousa TP. (1995) Enzymatic synthesis and degradation of nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP), a Ca^{2+} -realising agonist, in rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 167-174.
- Chini EN., Beers KW., and Dousa TP. (1995) Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.* **270**, 3216-3223.
- Clapham DE. (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**, 259-268.
- Clapper DL., Walseth TF., Dargie PJ., and Lee HC. (1987) Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **262**, 9561-9568.
- Collier RJ. (1975) Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol. Rev.* **39**, 54-85.
- Crompton M., Costi A., and Hayat L. (1987) Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* **245**, 915-918.
- Crompton M., Ellinger H., and Costi A. (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357-360.
- Dargie PJ., Agre MC., and Lee HC. (1990) Comparison of Ca^{2+} mobilizing activities of cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *Cell Regul.* **1**, 279-290.
- Denton RM. and McCormack JG. (1990) Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 451-466.
- Dong C., Wang J., Neame P., and Copper MD. (1994) The murine BP-3 gene encodes a relative of the CD38/NAD glycohydrolase family. *Int. Immunol.* **6**, 1353-1360.
- Euler Von H., Albers H., and Schlenk F. (1936) Chemische Untersuchungen an hochgereinigter Co-Zymase. *Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem.* **240**, 113-126.
- Frei B. and Richter C. (1988) Mono(ADP-ribosylation) in rat liver mitochondria. *Biochemistry* **27**, 529-535.
- Funaro A., Reinis M., Trubiani O., Santi S., Di Primio R., and Malavasi F. (1998) CD38 functions are regulated through an internalization step. *J. Immunol.* **160**, 2238-2247.
- Furuya Y., Takasawa S., Yonekura H., Tanaka T., Takahara J., and Okamoto H. (1995) Cloning of a cDNA encoding rat bone marrow stromal cell antigen 1 (BST-1) from the islets of Langerhans. *Gene* **165**, 329-330.
- Franco L., Zocchi E., Calder L., Guida L., Benatti U., and De Flora A. (1994) Self-aggregation of the transmembrane glycoprotein CD38 purified from human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1710-1715.
- Galione A. and White A. (1994) Ca^{2+} -release induced by cyclic ADP-ribose. *Trends Cell. Biol.* **4**, 431-436.
- Galione A., Lee HC., and Busa WB. (1991) Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-Rribose. *Science* **253**, 1143-1146.
- Galione A., McDougall A., Busa WB., Willmott N., Gillot I., and Whitaker M. (1993a) Redundant mechanisms of calcium-induced calcium-release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. *Science* **261**, 348-352.

- Galione A., White A., Willmott N., Turner M., Potter BVL., and Watson SP. (1993b) cGMP mobilizes intracellular Ca^{2+} in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature* **365**, 456-459.
- Gholson RK. (1966) The pyridine nucleotide cycle. *Nature* **212**, 933-935.
- Glick DL., Hellmich MR., Beushausen S., Tempst P., Bayley H., and Strumwasser F. (1991) Primary structure of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul.* **2**, 211-218.
- Graeff RM., Walseth TF., Fryxell K., Branton WD., and Lee HC. (1994) Enzymatic synthesis and characterization of cyclic GDP-ribose: a procedure for distinguishing enzymes with ADP-ribosyl cyclase activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 30260-30267.
- Graeff RM., Walseth TF., Hill HK., and Lee HC. (1996) Fluorescent analogs of cyclic ADP-ribose: synthesis, spectral characterization, and use. *Biochemistry* **35**, 379-386.
- Guida L., Franco L., Zocchi E., and De Flora A. (1995) Structural role of disulfide bridges in the cyclic ADP-ribose related bifunctional ectoenzyme CD38. *FEBS Lett.* **368**, 481-484.
- Gunter TE. and Pfeiffer DR. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* **258**, C755-C786.
- Hagen T. and Ziegler M. (1997) Detection and identification of NAD-catabolizing activities in rat tissue homogenates. *Biochim. Biophys. Acta* **1340**, 7-12.
- Hajnoczky G., Robb-Gaspers LD., Seitz MB., and Thomas AP. (1995) Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* **82**, 415-424.
- Halestrap AP. (1989) The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **973**, 355-383.
- Handler P. and Klein JR. (1942) The inactivation of pyridine nucleotides by animal tissues in vitro. *J. Biol. Chem.* **143**, 49-57.
- Harada N., Santos-Argumedo L., Chang R., Grimaldi JC., Lund FE., Brannan CI., Copeland NG., Jenkins NA., Heath AW., Parkhouse RME., and Howard M. (1993) Expression cloning of a cDNA encoding a novel murine B cell activation marker: homology to human CD38. *J. Immunol.* **151**, 3111-3118.
- Hellmich MR. and Strumwasser F. (1991) Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul.* **2**, 193-202.
- Hilz H., Koch R., Fanick W., Klapproth K., and Adamietz P. (1984) Nonenzymic ADP-ribosylation of specific mitochondrial polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3929-3933.
- Hirata Y., Kimura N., Sato K., Ohsugi Y., Takasawa S., Okamoto H., Ishikawa J., Kaisho T., Ishihara K., and Hirano T. (1994) ADP-ribosyl cyclase activity of a novel stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett.* **356**, 244-248.
- Hofstetter W., Mühlebach T., Lötscher HR., Winterhalter KH., and Richter C. (1981) ATP prevents both hydroperoxide-induced hydrolysis of pyridine nucleotides and release of calcium in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **117**, 361-367.
- Howard M., Grimaldi JC., Bazan JF., Lund FE., Santos-Argumedo L., Parkhouse RME., Walseth TF., and Lee HC. (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* **262**, 1056-1059.

- Iglewski WJ. (1994) Cellular ADP-ribosylation of elongation factor 2. *Mol. Cell. Biochem.* **138**, 131-133.
- Itoh M., Ishihara K., Tomizawa H., Tanaka H., Kobune Y., Ishikawa T., Kaisho T., and Hirano T. (1994) Molecular cloning of murine BST-1 having homology with CD38 and *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 1309-1317.
- Jackson DG. and Bell JI. (1990) Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J. Immunol.* **144**, 2811-2815.
- Jacobson EL., Cervantes-Laurean D., and Jacobson MK. (1994) Glycation of proteins by ADP-ribose. *Mol. Cell. Biol.* **138**, 207-212.
- Jacobson MK., Amé J-C., Lin W., Coyle DL., and Jacobson EL. (1995) Cyclic ADP-ribose: a new component of calcium signaling. *Receptor* **5**, 43-49.
- Jouaville LS., Ichas F., Holmuhamedov EL., Camacho P., and Lechleiter JD. (1995) Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* **377**, 438-441.
- Just I., Wollenberg P., Moss J., and Aktories K. (1994) Cysteine-specific ADP-ribosylation of actin. *Eur. J. Biochem.* **221**, 1047-1054.
- Kaisho T., Ishikawa J., Oritani K., Inazawa J., Tomizawa H., Muraoka O., Ochi T., and Hirano T. (1994) BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5325-5329.
- Katada T. and Ui M. (1982a) Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3129-3133.
- Katada T. and Ui M. (1982b) ADP-ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* **257**, 7210-7216.
- Karasawa T., Takasawa S., Yamakawa K., Yonekura H., Okamoto H., and Nakamura S. (1995) NAD⁺-glycohydrolase from streptococcus pyogenes shows cyclic ADP-ribose forming activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**, 201-204.
- Kim H., Jacobson EL., and Jacobson MK. (1993) Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD glycohydrolases. *Science* **261**, 1330-1333.
- Koguma T., Takasawa S., Tohgo A., Karasawa T., Furuya Y., Yonekura H., and Okamoto H. (1994) Cloning and characterization of cDNA encoding rat ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase (homologue to human CD38) from islets of Langerhans. *Biochim. Biophys. Acta* **1223**, 160-162.
- Kontani K., Nishina H., Ohoka Y., Takahashi K., and Katada T. (1993) NAD glycohydrolase specifically induced by retinoic acid in human leukemic HL-60 cells: identification of the NAD glycohydrolase as leukocyte cell surface antigen CD38. *J. Biol. Chem.* **268**, 16895-16898.
- Kun E., Zimmer PH., Chang ACY., Puschendorf B., and Grunicke H. (1975) Macromolecular enzymatic product of NAD⁺ in liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1436-1440.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee H. and Iglewski WJ. (1984) Cellular ADP-ribosyltransferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and Pseudomonas toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2703-2707.

- Lee HC. (1996) Modulator and messenger functions of cyclic ADP-ribose in calcium signaling. *Recent Prog. Horm. Res.* **51**, 355-389.
- Lee HC. and Aarhus R. (1991) ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul.* **2**, 203-209.
- Lee HC. and Aarhus R. (1993) Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. *Biochim. Biophys. Acta* **1164**, 68-74.
- Lee HC. and Aarhus R. (1995) A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol triphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* **270**, 2152-2157.
- Lee HC., Walseth TF., Bratt GT., Hayes RN., and Clapper DL. (1989) Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 1608-1615.
- Lee HC., Aarhus R., and Walseth TF. (1993) Calcium mobilization by dual receptors during fertilization of sea urchin eggs. *Science* **261**, 352-355.
- Lee HC., Galione A., and Walseth TF. (1994a) Cyclic ADP-ribose: metabolism and calcium mobilizing function. *Vitamins and Hormones* **48**, 199-257.
- Lee HC., Aarhus R., Graeff ME., Gurnack ME., and Walseth TF. (1994b) Cyclic ADP-ribose activation of the ryanodine receptor is mediated by calmodulin. *Nature* **370**, 307-309.
- Lee HC., Aarhus R., and Graeff RM. (1995) Sensitization of calcium-induced calcium release by cyclic ADP-ribose and calmodulin. *J. Biol. Chem.* **270**, 9060-9066.
- Lehninger AL., Vercesi A., and Bababunmi EA. (1978) Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1690-1694.
- Lötscher HR., Winterhalter KH., Carafoli E., and Richter C. (1979) Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4340-4344.
- Lötscher HR., Winterhalter KH., Carafoli E., and Richter C. (1980) Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **255**, 9325-9330.
- Ludden PW. (1994) Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol. Cell. Biochem.* **138**, 123-129.
- Lund F., Solvason N., Grimaldi JC., Parkhouse RME., and Howard M. (1995) Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme. *Immunol. Today* **16**, 469-473.
- Mailhammer R., Reiness G., Ponta H., Yang H.-L., Schweiger M., Zillig W., and Zubay G. (1975a) RNA polymerase modifications after T-phage infections of *E. coli*. In: Shaltiel S. (ed.) *Metabolic interconversion of enzymes 1975*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg pp 160-167.
- Mailhammer R., Yang H.-L., Reiness G., and Zubay G. (1975b) Effects of bacteriophage T4-induced modification of *Escherichia coli* RNA polymerase on gene expression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4928-4932.
- Malavasi F., Funaro A., Roggero S., Horenstein A., Calosso L., and Mehta K. (1994) Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol. Today* **15**, 95-97.
- Masmoudi A. and Mandel P. (1987) ADP-ribosyl transferase and NAD glycohydrolase activities in rat liver mitochondria. *Biochemistry* **26**, 1965-1969.

- Masmoudi A., Islam F., and Mandel P. (1988) ADP-ribosylation of highly purified rat brain mitochondria. *Neurochem. J.* **51**, 188-193.
- Maxfield FR. and Mayor S. (1997) Cell surface dynamics of GPI-anchored proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 355-364.
- McDonald LJ., Wainschel LA., Oppenheimer NJ., and Moss J. (1992) Amino acid-specific ADP-ribosylation: structural characterization and chemical differentiation of ADP- ribosyl-cysteine adducts formed nonenzymatically and in pertussis catalyzed reactions. *Biochemistry* **31**, 11881-11887.
- McDonald LJ. and Moss J. (1993a) Stimulation by nitric oxide of an NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6238- 6241.
- McDonald LJ. and Moss J. (1993b) Nitric oxide-independent, thiol-associated ADP- ribosylation inactivates aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 17878-17882.
- Mészáros LG., Bak J., and Chu A. (1993) Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. *Nature* **364**, 76-79.
- Moss J. and Vaughan M. (1977) Mechanism of action of cholera toxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity with arginine as an acceptor. *J. Biol. Chem.* **252**, 2455- 2457.
- Moss J. and Vaughan M. (1988) ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins. *Adv. Enzymol.* **61**, 303-379.
- Moss J., Stanley SJ., Watkins PA. (1980) Isolation and properties of an NAD- and guanidine-dependent ADP-ribosyltransferase from turkey erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **255**, 5838- 5840
- Moss J., Jacobson MK., and Stanley SJ. (1985) Reversibility of arginine-specific mono(ADP-ribosylation): identification in erythrocytes of an ADP-ribose-L-arginine cleavage enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5603-5607.
- Moss J., Tsai S-C., Adamitz R., Chen H-C., and Stanley SJ. (1988) Purification and characterization of ADP-ribosylarginine hydrolase from turkey erythrocytes. *Biochemistry* **27**, 5819-5823.
- Moser B., Winterhalter KH., and Richter C. (1983) Purification and properties of a mitochondrial NAD^+ glycohydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 358-364.
- Muller-Steffner H., Muzard M., Oppenheimer N., Schuber F. (1994) Mechanistic implications of cyclic ADP-ribose hydrolysis and methanolysis catalyzed by calf spleen NAD^+ glycohydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 1279-1285.
- Nata K., Sugimoto T., Tohgo A., Takamura T., Noguchi N., Matsuoka A., Numakunai T., Shikama K., Yonekura H., and Takasawa S. (1995) The structure of the *Aplysia kurodai* gene encoding ADP-ribosyl cyclase, a second-messenger enzyme. *Gene* **158**, 213-218.
- Nicotera P., Bellomo G., and Orrenius S. (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 449-370.
- Oei SL., Griesenbeck J., and Schweiger M. (1997) The role of poly(ADP-ribosylation). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **131**, 127-173.
- Oei SL., Griesenbeck J., Ziegler M., and Schweiger M. (1998) A novel function of poly(ADP-ribosylation): silencing of RNA polymerase II-dependent transcription. *Biochemistry* **37**, 1465-1469.
- Ogawa Y. (1994) Role of ryanodine receptors. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 229-274.

- Okazaki IJ. and Moss J. (1996) Structure and function of eukaryotic mono-ADP- ribosyltransferases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **129**, 51-104.
- Oppenheimer NJ. (1994) NAD hydrolysis: chemical and enzymatic mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* **138**, 245-251.
- Philibert K. and Zwiers H. (1995) Evidence for multisite ADP-ribosylation of neuronal phosphoprotein B-50/GAP-43. *Mol. Cell. Biochem.* **150**, 183-190.
- Price SR. and Pekala PH. (1987) Pyridine nucleotide-linked glycohydrolases. In: Dolphin D., Avramovic O., Poulson R (eds) Pyridine nucleotide coenzymes: chemical, biochemical, and medical aspects, vol II, part B. *Wiley-Interscience, New York* pp 513-548.
- Richter C. (1990) The prooxidant-induced and spontaneous mitochondrial calcium release: inhibition by meta-iodo-benzylguanidine (MIBG), a substrate for mono(ADP- ribosylation). *Free Rad. Res. Commun.* **8**, 329-334.
- Richter C. (1996) Control of the pro-oxidant-dependent calcium release from intact liver mitochondria. *Redox Report* **2**, 217-221.
- Richter C. and Frei B. (1988) Ca²⁺ release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **4**, 365-375.
- Richter C. and Kass GEN. (1991) Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. *Chem-Biol. Interactions* **77**, 1-23.
- Richter C., Winterhalter KH., Baumhuter S., Lötscher HR., and Moser B. (1983) ADP- ribosylation in the inner membrane of rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3188-3192.
- Robinson PJ. (1997) Signal transduction via GPI-anchored proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 365-370.
- Rossi CS. and Lehninger AL. (1963) Stoichiometric relationships between accumulation of ions by mitochondria and the energy-coupling sites in the respiratory chain. *Biochem. Z.* **338**, 698-713.
- Rusinko N. and Lee HC. (1989) Widespread occurrence in animal tissues of an enzyme catalyzing the conversion of NAD⁺ into a cyclic metabolite with intracellular Ca²⁺- mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 11725-11731.
- Saxty BA. and van Heyningen S. (1995) The purification of a cysteine dependent NAD⁺ glycohydrolase from bovine erythrocytes and evidence that it exhibits a novel ADP- ribosyltransferase activity. *Biochem. J.* **310**, 931-937.
- Schuber F., Travo P., and Pascal M. (1976) Calf-spleen nicotinamide-adenine dinucleotide glycohydrolase: kinetic mechanism. *Eur. J. Biochem.* **69**, 593-602.
- Schuber F., Pascal M., and Travo P. (1978) Calf-spleen nicotinamide-adenine dinucleotide glycohydrolase: properties of the active site. *Eur. J. Biochem.* **83**, 205-214.
- Schuber F., Travo P., and Pascal M. (1979) On the mechanism of action of calf spleen NAD⁺ glycohydrolase. *Bioorg. Chem.* **8**, 83-90.
- Schweizer M. and Richter C. (1994) Gliotoxin stimulates Ca²⁺ release from intact rat liver mitochondria. *Biochemistry* **33**, 13401-13405.
- Schweizer M. and Richter C. (1996) Peroxynitrite stimulates the pyridine nucleotide-linked Ca²⁺ release from intact rat liver mitochondria. *Biochemistry* **35**, 4524-4528.

- Schweizer M., Schlegel J., Baumgartner D., and Richter C. (1993) Sensitivity of mitochondrial peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, pyridine nucleotide hydrolysis and Ca^{2+} release to cyclosporin A and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 641-646.
- Schweizer M., Durrer P., and Richter C. (1994) Phenylarsine oxide stimulates pyridine nucleotide-linked Ca^{2+} release from rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 967-973.
- Sekine A., Fujiwara M., and Narumiya S. (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**, 8602-8605.
- Sitsapesan R., Mc Garry SJ., and Williams AJ. (1995) Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca^{2+} release. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 386-391.
- Strittmatter SM., Valenzuela D., Kennedy TE., Neer EJ., and Fishman MC. (1990) G_o is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* **344**, 836-841.
- Summerhill RJ., Jackson DG., and Galione A. (1993) Human lymphocyte antigen CD38 catalyzes the production of cyclic ADP-ribose. *FEBS Lett.* **335**, 231-233.
- Takasawa S., Togho A., Noguchi N., Koguma T., Nata K., Sugimoto T., Yonekura H., and Okamoto H. (1993) Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP. *J. Biol. Chem.* **268**, 26052-26054.
- Takasawa S., Ishida A., Nata K., Nakagawa K., Noguchi N., Togho A., Kato I., Yonekura H., Fujisawa H., and Okamoto H. (1995) Requirement of calmodulin-dependent protein kinase II in cyclic ADP-ribose-mediated intracellular Ca^{2+} mobilization. *J. Biol. Chem.* **270**, 30257-30259.
- Tanaka Y. and Tashjian Jr. AH. (1995) Calmodulin is a selective mediator of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release via the ryanodine receptor-like Ca^{2+} channel triggered by cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11352-11356.
- Tanuma S., Kawashima K., and Endo H. (1987) An NAD : cysteine ADP-ribosyltransferase is present in human erythrocytes. *Biochem. J.* **101**, 821-824.
- Tanuma S., Kawashima K., and Endo H. (1988) Eukaryotic mono(ADP-ribosyl)transferase that ADP-ribosylates GTP-binding regulatory G_i protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 5485-5489.
- Tanuma S. and Endo H. (1990) Identification in human erythrocytes of mono(ADP-ribosyl)protein hydrolase that cleaves mono(ADP-ribosyl) G_i linkages. *FEBS Lett.* **261**, 381-384.
- Tarnus C., Muller H., and Schuber F. (1988) Chemical evidence in favor of a stabilized oxocarbenium-ion intermediate in the NAD^+ glycohydrolase-catalyzed reactions. *Bioorg. Chem.* **16**, 38-51.
- Thorn P., Gerasimenko O., and Petersen OH. (1994) Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca^{2+} oscillations in pancreatic acinar cells. *EMBO J.* **13**, 2038-2043.
- Tohgo A., Takasawa S., Noguchi N., Koguma T., Nata K., Sugimoto T., Furuya Y., Yonekura H., and Okamoto H. (1994) Essential cysteine residues for cyclic ADP-ribose synthesis and hydrolysis by CD38. *J. Biol. Chem.* **260**, 28555-28557.
- Vandekerckhove B., Schering B., Bärman M., and Aktories K. (1988) Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates cytoplasmic β/γ - actin in arginine 177. *J. Biol. Chem.* **263**, 696-700.
- Vu CQ., Lu PJ., Chen CS., and Jacobson MK. (1996) 2'-Phospho-cyclic ADP-ribose, a calcium- mobilizing agent derived from NADP. *J. Biol. Chem.* **271**, 4747-4754.
- Walseth TF., Aarhus R., Zeleznikar Jr. RJ., and Lee HC. (1991) Determination of endogenous levels of cyclic ADP-Ribose in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 113-120.

- Weis M., Kass GEN., Orrenius S., and Moldeus P. (1992) N-acetyl-p-benzoquinone imine induces Ca^{2+} release from mitochondria by stimulating pyridine nucleotide hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **267**, 804-809.
- West Jr. RE., Moss J., Vaughan M., Liu T., and Liu TY. (1985) Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *J. Biol. Chem.* **260**, 14428-14430.
- Yamauchi J. and Tanuma S. (1994) Occurrence of an NAD^+ glycohydrolase in bovine brain cytosol. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 327-329.
- Yuan JH. and Anderson BM. (1971) Bull semen nicotinamide adenine dinucleotide nucleosidase. I. purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **246**, 2111- 2115.
- Zhang F-J. and Sih CJ. (1995) Novel enzymatic cyclizations of pyridine nucleotide analogs: cyclic-GDP-ribose and cyclic-HDP-ribose. *Tetrahedron Lett.* **36**, 9289-9292.
- Zhang F-J., Gu QM., Jing PC., and Sih CJ. (1995) Enzymatic cyclization of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). *Bioorg. Med. Chem Lett.* **5**, 2267-2272.
- Zhang J., Ziegler M., Schneider R., Klocker H., Auer B., Schweiger M. (1995) Identification and purification of a bovine liver mitochondrial NAD^+ -glycohydrolase. *FEBS Lett.* **377**, 530-534.
- Zocchi E., Franco L., Guida L., Benatti U., Bargellesi A., Malavasi F., Lee HC., and De Flora A. (1993) A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD^+ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1459-1465.
- Zocchi E., Franco L., Guida L., Calder L., and De Flora A. (1995) Self-aggregation of purified and membrane-bound erythrocyte CD38 induces extensive decrease of its ADP-ribosyl cyclase activity. *FEBS Lett.* **359**, 35-40.
- Zolkiewska A., Nightingale MS., and Moss J. (1992) Molecular characterization of NAD : arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11352-11356.
- Zolkiewska A. and Moss J. (1993) Integrin $\alpha 7$ as a substrate for a glycosylphosphatidyl-anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 25273-25276.
- Zoratti M. and Szabò I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139-176.
- Zwiers H., Hollenberg MD., McLean KN., and Philibert KD. (1997) Endogenous ADP- ribosylation of phosphoprotein B-50/GAP-43 and other neuronal substrates. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 279-288.

7.2 Zitierte eigene Veröffentlichungen

- Jorcke D., Ziegler M., and Schweiger M. (1997) Characterization of hydrosoluble and detergent-solubilized forms of mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase from bovine liver. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 447-451.
- Jorcke D., Ziegler M., Herrero-Yraola A., and Schweiger M. (1998) Enzymic, cysteine-specific ADP-ribosylation in bovine liver mitochondria. *Biochem. J.* **332**, 189-193.
- Oei SL., Griesenbeck J., Buchlow G., Jorcke D., Mayer-Kuckuk P., Wons T., and Ziegler M. (1996) NAD⁺ analogs substituted in the purine base as substrates for poly(ADP-ribosyl)transferase. *FEBS Lett.* **397**, 17-21.
- Ziegler M., Jorcke D., Zhang J., Schneider R., Klocker H., Auer B., and Schweiger M. (1996) Characterization of detergent-solubilized beef liver mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase and its truncated hydrosoluble form. *Biochemistry* **35**, 5207-5212.
- Ziegler M., Jorcke D., and Schweiger M. (1997a) Metabolism of cyclic ADP-ribose : A new role for NAD⁺ glycohydrolases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **131**, 89-126.
- Ziegler M., Jorcke D., Herrero-Yraola A., and Schweiger M. (1997b) Bovine liver mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase. Relationship to ADP-ribosylation and calcium fluxes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 443-446.
- Ziegler M., Jorcke D., and Schweiger M. (1997c) Identification of bovine liver mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem. J.* **326**, 401-405.

8. Anhang

8.1 Fluoreszente Analoga cyclischer ADP-Ribose

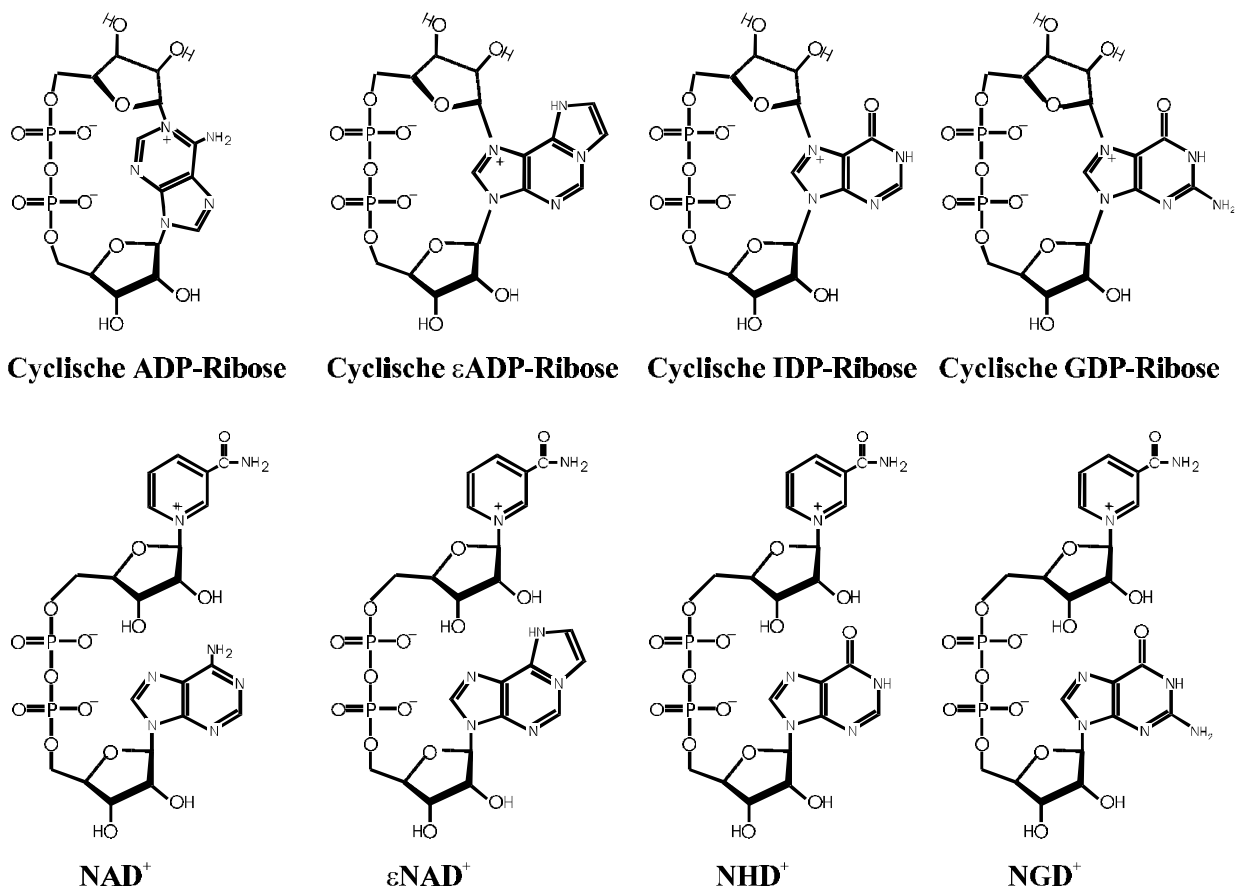


Abb. 19 Fluoreszente Analoga cyclischer ADP-Ribose. Mehrere an der NAD⁺-abhängigen Signalübertragung beteiligte Enzyme besitzen die bemerkenswerte Eigenschaft, zahlreiche NAD⁺-Derivate als Substrate zu akzeptieren (siehe Text). ADP-ribosyl Cyclasen, einschließlich der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase (Abb. 13-15), katalysieren die Synthese cyclischer Purinnukleosiddiphosphoribosen aus (ε)NAD⁺, NGD⁺ und NHD⁺. Freie GDP-Ribose und IDP-Ribose (nicht abgebildet) sowie NGD⁺ und NHD⁺ sind nicht fluoreszent im Gegensatz zu cGDP-Ribose und cIDP-Ribose. Die Fluoreszenz von εNAD⁺ wird durch den Nikotinamidring gequencht: seine Entfernung bedingt eine Fluoreszenzunahme, die bei der Bildung von freier εADP-Ribose (nicht abgebildet) und cyclischer εADP-Ribose auftritt. In der cADP-Ribose ist die terminale Ribose mit dem N¹-Atom des Adeninringes verknüpft, während die fluoreszenten cyclischen Analoga die Bindung zum N⁷-Atom des jeweiligen Purinringes aufweisen. (ε)NAD⁺, 1,N⁶-Etheno-NAD⁺; cyclische εADP-Ribose, cyclische 1,N⁶-Etheno-ADP-Ribose; N[G/H]D⁺, Nikotinamid[guanin/hypoxanthin]dinukleotid; cyclische [G/I]DPR, cyclische [Guanosin/Inosin]diphosphoribose.

8.2 Kurzfassung der Ergebnisse

Die durch Prooxidantien induzierte Calciumfreisetzung aus Mitochondrien wurde bisher mit einer NAD^+ -Glycohydrolase (NADase)-Aktivität und der ADP-Ribosylierung spezifischer Proteine in Zusammenhang gebracht. Es wurde vorgeschlagen, daß die mitochondriale NADase zunächst aus NAD^+ Nikotinamid und ADP-Ribose bildet. Freie ADP-Ribose würde daraufhin zu einer nicht-enzymatischen, kovalenten Modifikation von Proteinen führen, die mit dem Calcium-Efflux-System der Mitochondrien in Beziehung stehen. Ein derartiger Mechanismus weist der Hydrolyse des NAD^+ , katalysiert durch die mitochondriale NADase, eine Schlüsselrolle in der Calcium-Freisetzung dieser Organellen zu.

In der vorliegenden Arbeit wird hingegen die Identifizierung der NAD^+ -Glycohydrolase aus Mitochondrien der Rinderleber als ein Mitglied der Klasse multifunktionaler ADP-ribosyl Cyclasen/cyclische ADP-Ribose Hydrolasen dargestellt. Diese potentiellen "second messenger" Enzyme katalysieren die Bildung und den Abbau von cyclischer ADP-Ribose (cADP-Ribose), einem hochwirksamen Nukleotid in der intrazellulären Calcium-Mobilisierung. Die erzielten Ergebnisse unterstützen ein neuartiges Modell der prooxidans-induzierten Calciumfreisetzung aus Mitochondrien, die durch die Bildung des spezifischen Botenmoleküls cADP-Ribose erklärt werden kann und nicht durch eine nicht-enzymatische Modifikation mitochondrialer Proteine mit ADP-Ribose.

Die ADP-Ribosylierung in Rinderleber-Mitochondrien bei Verwendung von NAD^+ als Substrat erfolgt unter zahlreichen Bedingungen (nahezu) unvermindert, unter denen die NADase substantiell inhibiert wird. Während der Reaktion werden spezifisch zwei mitochondriale Proteine ADP-ribosyliert, deren Molekulargewichte zu ca. 26 bzw. 53 kDa bestimmt werden konnten. Die mitochondriale ADP-Ribosylierung scheint unter den gewählten Bedingungen über einen enzymatischen Mechanismus zu verlaufen und nicht über einen nicht-enzymatischen Transfer freier ADP-Ribose, die zunächst aus NAD^+ durch die NADase-Aktivität generiert werden muß.

Die chemische Stabilität der ADP-Ribose-Protein-Bindungen weist auf Cysteinreste als Hauptakzeptor-Aminosäuren hin. Zusätzlich konnte die Aldehyd-Dehydrogenase aus Hefe mittels der mitochondrialen Aktivität aus Rinderleber und NAD^+ als Substrat ADP-ribosyliert werden. Die Vorbehandlung der Aldehyd-Dehydrogenase mit *N*-Ethylmaleimid, einem thiol-spezifischen Reagenz, vermindert ihre enzymatische Modifikation deutlich. Diese Befunde lassen auf die Anwesenheit einer cysteinspezifischen ADP-Ribosyltransferase in Mitochondrien der Rinderleber schließen.

Zusammengenommen weisen die erzielten Ergebnisse dem mitochondrialen NAD^+ -Pool - neben seiner Funktion in der Energieübertragung - eine weitere Rolle in der Signaltransduktion zu.

Abstract

NAD⁺ glycohydrolase (NADase) activity and ADP-ribosylation have been proposed to be involved in the pro-oxidant induced calcium efflux from mitochondria. It has been suggested that NADase activity results in the generation of free ADP-ribose from NAD⁺, which in turn would lead to non-enzymatic covalent modification of mitochondrial proteins related to the calcium release system. Such a mechanism would assign hydrolysis of NAD⁺ by NADase a key step in the calcium efflux from these organelles.

However, the present work describes the identification of bovine liver mitochondrial NAD⁺ glycohydrolase as a member of the class of multifunctional ADP-ribosyl cyclases/cyclic ADP-ribose hydrolases, known to be potential second messenger enzymes. These enzymes catalyze the synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose (cADP-ribose), a potent intracellular calcium-mobilizing agent. The results support a new model for the pro-oxidant-induced calcium release from mitochondria involving cADP-ribose as a specific messenger, rather than the non-enzymatic modification of proteins by ADP-ribose.

Moreover, it was found that under several conditions, which strongly inhibit the NADase, the extent of ADP-ribosylation in bovine liver mitochondria with NAD⁺ as substrate was only slightly diminished, if at all. The reaction led to the specific modification of two proteins with apparent molecular masses of approx. 26 and 53 kDa, respectively. Under these selected conditions mitochondrial ADP-ribosylation seems to occur as an enzymatic reaction, rather than a non-enzymatic transfer of ADP-ribose previously liberated from NAD⁺ by NADase activity. The chemical stability of the protein-ADP-ribose bonds in mitochondria indicated that cysteine residues are the predominant acceptors. Furthermore, yeast aldehyde dehydrogenase was efficiently ADP-ribosylated utilizing the mitochondrial activity and NAD⁺ as substrate. Pretreatment of this acceptor with *N*-ethylmaleimide, a thiol-specific reagent, substantially decreased its modification. It is, therefore, concluded that bovine liver mitochondria contain a cysteine-specific ADP-ribosyltransferase.

Besides its function in energy-conversion reactions, the results presented establish an additional role of the mitochondrial NAD⁺-pool - the transduction of signals.

8.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	<i>Struktur von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)</i>	1
Abbildung 2:	<i>ADP-Ribosylierung</i>	3
Tabelle 1:	<i>Chemische Stabilitäten von Aminosäure-ADP-Ribose-Bindungen</i>	5
Abbildung 3:	<i>Struktur und Metabolismus von cyclischer ADP-Ribose (cADP-Ribose)</i>	8
Abbildung 4:	<i>Vorgeschlagener Mechanismus der prooxidans-induzierten Calcium-freisetzung aus Mitochondrien</i>	13
Tabelle 2:	<i>Eigenschaften der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase nach Detergenz- oder Steapsinsolubilisierung</i>	16
Abbildung 5:	<i>Einfluß verschiedener Effektoren auf die mitochondriale ADP-Ribosylierung</i>	17
Abbildung 6:	<i>Einfluß reduzierender Agenzien auf die mitochondriale ADP-Ribosylierung und NAD⁺-Glycohydrolase-Aktivität</i>	18
Abbildung 7:	<i>ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine mit [Nikotinamid-¹⁴C]-NAD⁺ oder [Adenin-¹⁴C]-NAD⁺</i>	19
Tabelle 3:	<i>Chemische Stabilität der ADP-Ribose-Bindungen in Mitochondrien</i>	21
Abbildung 8:	<i>Enzymatische ADP-Ribosylierung der ALDH durch die mitochondriale ADPRT</i>	22
Abbildung 9:	<i>Die Modifizierung von Thiolgruppen der ALDH verhindert ihre ADP-Ribosylierung durch die mitochondriale ADPRT</i>	22
Abbildung 10:	<i>Mögliche Wege der ADP-Ribosylierung in Mitochondrien</i>	23
Abbildung 11:	<i>Direktnachweis der mitochondrialen NADase-Aktivität nach SDS-PAGE</i>	24
Abbildung 12:	<i>Synthese cyclischer ADP-Ribose-Derivate durch die mitochondriale NADase</i>	26
Abbildung 13:	<i>Synthese von [³²P]-cADP-Ribose (cADPR) durch die mitochondriale NADase</i>	27
Abbildung 14:	<i>Komigration mitochondrialer NADase- und ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität</i>	28
Abbildung 15:	<i>Die mitochondriale NADase katalysiert die Hydrolyse von cADP-Ribose</i>	29
Abbildung 16:	<i>Die mitochondriale NADase katalysiert die Synthese von NAD⁺</i>	30
Tabelle 4:	<i>Reversibilität der Reduktion der mitochondrialen NADase</i>	31
Abbildung 17:	<i>Hypothetischer Mechanismus der prooxidans-induzierten Ca²⁺-Freisetzung aus Mitochondrien</i>	32
Abbildung 18:	<i>NAD⁺-abhängige Wege der Signalübertragung in Mitochondrien</i>	37
Abbildung 19:	<i>Fluoreszente Analoga cyclischer ADP-Ribose</i>	66

8.4 Abkürzungen

3-ABA	3-Aminobenzamid
ADPR / ADP-Ribose	Adenosin-5'-diphosphoribose
cADPR	Cyclische ADP-Ribose
2'-P-cADP-Ribose	Cyclische ADP-Ribose -2'-phosphat
ADP / ATP	Adenosin-5'-diphosphat/triphosphat
(c)AMP	(3',5'-cyclo-)Adenosin-5'-monophosphat
(m/p)ADPRT	(mono/poly)ADP-Ribosyltransferase
AFB / "Affi-Blue"	Blue Sepharose
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
BST-1	NADase einer Knochenmarks-Stromazelllinie
CD38	Ein Lymphocyten-Differenzierungsantigen mit NADase-Aktivität
CHAPS	[(Cholamidopropyl)diethylammonium]propansulfonat
CICR	Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung
CM	Carboxymethyl (- Trisacrylsäure)
DEAE	Diethylaminoethyl (- Cellulose)
DTT	1,4 - Dithio-DL-Threitol
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP/GTP	Guanosin-5'-diphosphat/triphosphat
(c)GMP	(3',5'-cyclo-)Guanosin -5'-monophosphat
(c)GDP-Ribose	(Cyclische) Guanosin-5'-diphosphoribose
GPI-Anker	Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker
G-Proteine	Guaninnukleotid-bindende Proteine
HTP	Hydroxylapatit
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
(c)IDP-Ribose	(Cyclische) Inosin-5'-diphosphoribose
InsP₃(R)	Inositol -1,4,5 -trisphosphat(-Rezeptor)
LDAO	Lauryldimethylamin-N-oxid
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NAADP⁺	Nikotinsäureadeninindinukleotidphosphat, oxidierte Form
NAD(P)⁺	Nikotinamidadeninindinukleotid(phosphat), oxidierte Formen
NAD(P)H	Nikotinamidadeninindinukleotid(phosphat), reduzierte Formen
NAD(P)	oxidierte und reduzierte Formen der Pyridinnukleotide
ε-NAD⁺	Nikotinamid-1,N ⁶ -ethenoadeninindinukleotid
NADase	NAD(P) ⁺ -Glycohydrolase
Nam	Nikotinamid
NEM	N-Ethylmaleimid
NGD⁺	Nikotinamidguanindinukleotid
NHD⁺	Nikotinamidhypoxanthindinukleotid
NMN	Nikotinamidmononukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
PAG(E)	Polyacrylamidgel(elektrophorese)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PDE	Phosphodiesterase Typ I
PK	Pyruvatkinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Ry(R)	Ryanodin(-Rezeptor)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris - (hydroxymethyl-)aminomethan

8.5 Lebenslauf

	Persönliche Angaben
	Geburtsdatum: 25.10.1966 Geburtsort: Berlin Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
	Schulbildung
1972 - 1978	Nord-Grundschule <i>Berlin-Zehlendorf</i>
1978 - 1985	Schadow-Gymnasium <i>Berlin-Zehlendorf</i> Abitur, Dezember 1985
	Praktikum
Frühjahr 1986	Behring-Krankenhaus <i>Berlin-Zehlendorf</i> Krankenpflegepraktikum
	Ausbildung
April 1986 - 1988	Landeslehranstalt für technische Assistenten in der Medizin Berlin <i>Berlin-Lankwitz</i> Staatsexamen für Medizinisch-technische Laboratoriumsassistenten, März 1988
	Qualifikationen
1.5.1988 - 30.6.1988	Robert-Koch-Institut, Abteilung Biochemie <i>Berlin-Wedding</i>
1.7.1988 - 30.9.1989	Laborgemeinschaft für seltene Untersuchungen <i>Berlin-Wilmersdorf</i>
16.10.1989 - 30.11.1995	Zentrallabor des Sankt-Gertrauden-Krankenhauses <i>Berlin-Wilmersorf</i> Mit dem Studienbeginn 1990 - Übergang vom Tagdienst in den Bereitschafts-Nachtdienst

	Studium
April 1990	Freie Universität Berlin Berlin-Dahlem Studium der Biochemie Vordiplom Biochemie, März 1994
Juni 1994	Institut für Biochemie, Sequenzierungslabor des SFB 344 Berlin-Dahlem Studentischer Tutor bei Dr. W. Schröder Betreuung eines Fortgeschrittenenpraktikums proteinbiochemischer Arbeitsmethoden
15.7.95 - 14.11.1995	Institut für Biochemie Berlin-Dahlem Diplomarbeit über die: „Isolierung und Charakterisierung einer mitochondrialen NAD ⁺ -Glycohydrolase der Rinderleber“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. M. Schweiger Diplom Biochemie, November 1995
November 1995	Institut für Biochemie Berlin-Dahlem Beginn der Doktorarbeit bei P. D. Dr. M. Ziegler in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. M. Schweiger
15.11.1995 - 31.12.1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Betreuung des Praktikums „Chemie für Mediziner“
seit 1.1.1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter mit DFG-Sachbeihilfe Betreuung des Praktikums „Biologische Membranen und Tansport“

8.6 Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an meine Mutter, die mir meine Ausbildung ermöglicht und mich darüber hinaus immer vielfältig unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. M. Schweiger danke ich für die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsmöglichkeiten sowie für die Vermittlung und Finanzierung meiner Stellen, die diese Arbeit ermöglichen. Ich möchte ihm außerdem für die Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und das freundliche Arbeitsverhältnis danken.

Ganz besonders möchte ich P. D. Dr. Mathias Ziegler für seine außergewöhnliche Anleitung und Hilfsbereitschaft danken. Seine Kompetenz und Motivationskunst haben gleichermaßen meinen Ehrgeiz und meine Freude an der wissenschaftlichen Arbeit gefördert.

Ein großer Dank gehört Andrés Herrero-Yraola. Seine Lebenslust, seine beispielhafte Auffassung von Teamwork und seine vielseitige Unterstützung machen mir die Zusammenarbeit mit ihm unvergeßlich.

Gerhard Buchlow möchte ich für alle hilfreichen Tips und Tricks danken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Zusätzlich war sein Beistand, insbesondere bei der Erstellung von Abbildungen ("Corel-Gerd"), von unschätzbarem Wert.

Ein Dankeschön geht an alle meine Kollegen in der Arbeitsgruppe im Institut für Biochemie. Das immer freundliche Arbeitsklima sowie die zahlreichen gemeinsamen "Arbeitsessen" haben wesentlich zur guten Stimmung beigetragen. Dem Meisterkoch Thomas gebührt dabei ein besonderer Dank - natürlich auch für die Synthese von "Wobmens best".

Lity, Philipp, Meike, Helga und Ingolf möchte ich für die gründliche Durchsicht dieser Arbeit, die Anregungen und Hilfestellungen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. W. Schröder, Dr. C. Weise und Dr. P. Franke für ihre ständige Bereitschaft, Proteinsequenzierungen durchzuführen bzw. Massenspektren aufzunehmen.

Für die vielen Runden "discussion of key observations" (DoKo), teilweise in ungewöhnlicher Atmosphäre, möchte ich mich bei Mathias (M.D.G.), Andrés (Horst), Andreas (Schulle) und Feli (Venus) bedanken - sie haben geholfen, eine weitere Art wissenschaftlicher Betrachtung aufzubauen.

Ganz besonders möchte ich meiner Frau Meike danken. Sie war immer für mich da und hat mich in allen Lebenslagen bestärkt. Meine Kinder Frederic und Tabea haben mein Leben nachhaltig beeinflusst; auf ihre Weise liefern sie täglich einen Beitrag zu meiner Arbeit, wofür ich ihnen dankbar bin.