

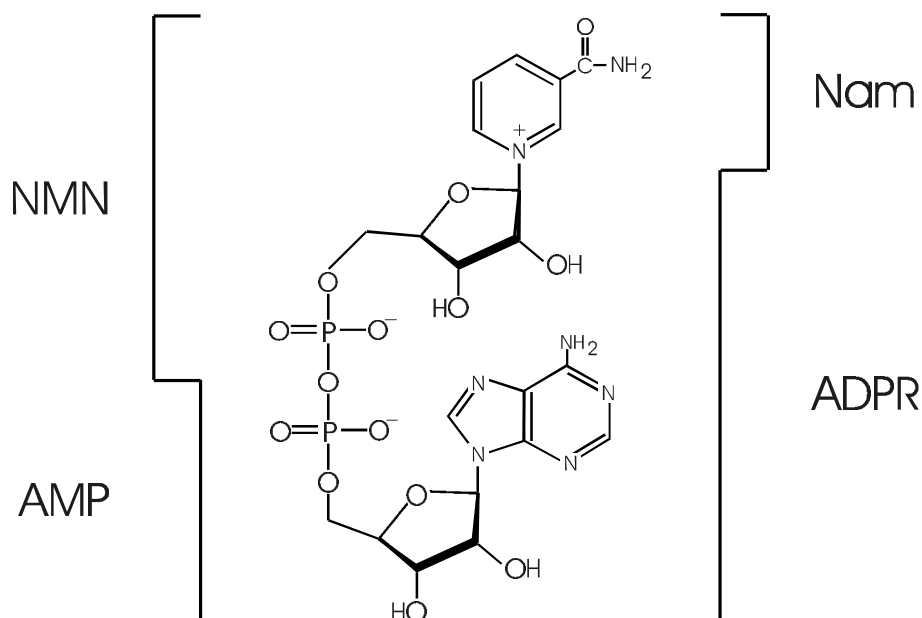
## 1. Einleitung

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)<sup>+</sup>] gesteuert werden, sind die Pyridinnukleotide augenblicklich erneut ins Zentrum des Interesses gerückt. Bemerkenswerterweise dient das NAD<sup>+</sup> 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)<sup>+</sup> als Vorstufe Calcium-freisetzender Nukleotide erklärt werden könnte.

Die Struktur des NAD<sup>+</sup>, 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  $\beta$ -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<sup>+</sup> die ADP-Ribose-Einheit auf unterschiedliche Nukleophile übertragen.



**Abb. 1** Struktur von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>). Linke Seite: Eine Pyrophosphatbindung verbindet die beiden Mononukleotide Adenosinmonophosphat (AMP) und Nikotinamidmononukleotid (NMN). Rechte Seite: Nikotinamid (Nam) und Adenosindiphosphoribose (ADPR) sind durch eine energiereiche  $\beta$ -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  $\text{NAD}^+$  (und  $\text{NADP}^+$ ) ein Substrat für  $\text{NAD(P)}^+$ -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  $\text{NAD}^+$  von der eines respiratorischen Coenzym zu der eines Substrates für "Nicht-Oxidations- / Reduktions-Reaktionen".

## 1.1 $\text{NAD}^+$ -metabolisierende Enzymaktivitäten

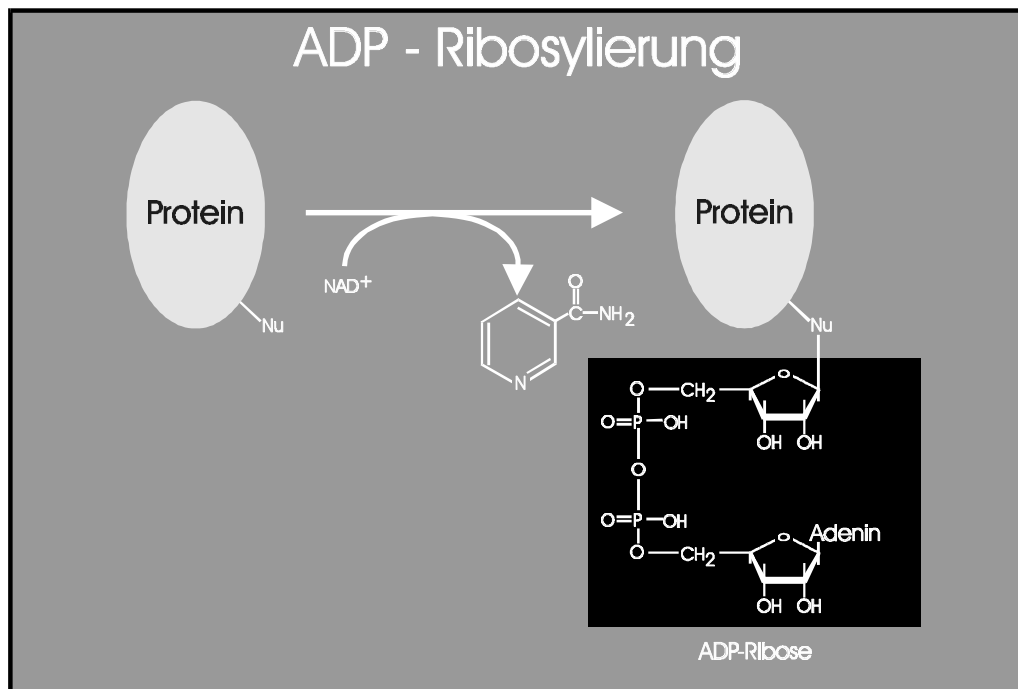
### 1.1.1 ADP-Ribosyltransferasen

ADP-Ribosyltransferasen katalysieren die posttranslationale Modifikation spezifischer Akzeptoren, bei der unter Verwendung von  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\alpha$ -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<sup>-</sup> mod<sup>-</sup>) 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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, Nucleophil (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  $\text{NAD}^+$  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  $\alpha$ -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  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolase (Abschnitte 1.1.2 und 1.2.2) die Hydrolyse des  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$ , 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	$\text{Hg}^{2+}$ (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<sup>+</sup>-Glycohydrolasen

NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolasen (NADasen) sind die am längsten bekannten NAD<sup>+</sup>-katabolisierenden Enzyme (Handler und Klein, 1942). Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung des NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> eingeordnet (Gholson, 1966), jedoch wird das Konzept eines aktiven Synthese-/Abbau-Kreislaufs durch die benötigte hohe Energiemenge für die Re-synthese des NAD<sup>+</sup> aus ADP-Ribose und Nikotinamid in Frage gestellt (Price und Pekala, 1987; Ziegler et al., 1997a<sup>1</sup>).

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., 1997a<sup>1</sup>), 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., 1997a<sup>1</sup>). Eine mit mitochondrialen Membranen assoziierte NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolase wurde ebenfalls mehrfach beschrieben (Ziegler et al., 1997a<sup>1</sup>); 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 Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus Seeigeelei-Mikrosomen durch einen Metaboliten des NAD<sup>+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung unabhängig vom Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>)-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<sup>+</sup>-Glycohydrolase klassifiziert. Die enzymatische Synthese von cADP-Ribose, katalysiert von ADP-ribosyl Cyclasen bzw. cADP-Ribose Synthesen, bedingt die Spaltung der β-N-glykosidischen Nikotinamid-Ribose-Bindung. Im Anschluß daran erfolgt eine Cyclisierung des N<sup>1</sup>-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).

---

<sup>1</sup> siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

Die Entdeckung, daß die Synthese von cADP-Ribose durch ein zunächst als NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolase klassifiziertes Enzym katalysiert wird, führte zu der Identifizierung zahlreicher dieser Enzyme als ADP-ribosyl Cyclasen (Ziegler et al., 1997a<sup>1</sup>); 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.

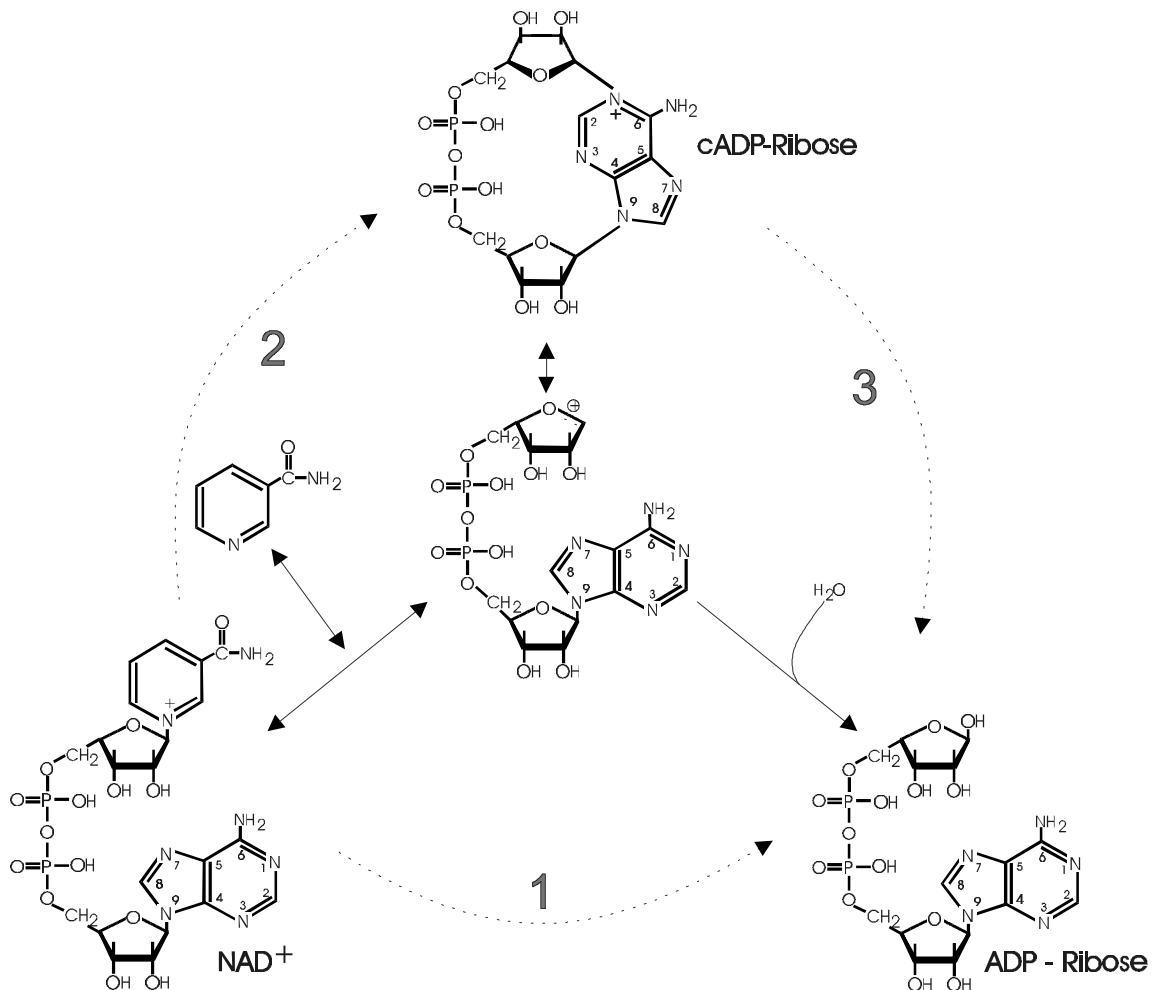
ADP-ribosyl Cyclase-Aktivitäten (Rusinko und Lee, 1989; Lee et al., 1994a) sowie die Existenz endogener cADP-Ribose (Walseth et al., 1991) konnten in einer großen Zahl von Zellen bzw. Geweben nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die Ca<sup>2+</sup>-freisetzende Wirkung der cADP-Ribose für viele Systeme etabliert (Ziegler et al., 1997a<sup>1</sup>). Folglich kann cADP-Ribose als ein weitverbreitetes intrazelluläres Nukleotid angesehen werden, das von grundlegender Bedeutung bei der Regulation der zellulären Ca<sup>2+</sup>-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<sup>+</sup> (Graeff et al., 1994; Ziegler et al., 1997a<sup>1</sup>).

Die hohe Effizienz, mit der cADP-Ribose eine Ca<sup>2+</sup>-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<sup>+</sup>-Glycohydrolasen als eine Sequenz zweier aufeinanderfolgender katalytischer Teilschritte angesehen werden (Abb. 3, Routen 2 und 3):

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

---

<sup>1</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> und zahlreicher NAD<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-Analoge, wie z. B. Nikotinsäureadenindinukleotid oder 3-Acetylpyridinadenindinukleotid ausgenutzt (Ziegler et al., 1997a<sup>1</sup>).

<sup>1</sup> siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen



Die Reaktionsprodukte der Transglykosylierung weisen alle die ursprüngliche  $\beta$ -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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$ -Analoga in der von ihnen katalysierten Reaktion (Ziegler et al., 1997a<sup>1</sup>). Neben Pyridinbasenderivaten in der bereits erwähnten Transglykosylierung (s.o.) dienen auch einige Derivate mit Modifikationen im Purinring als Substrate.  $\text{NAD}^+$ -Analoga, wie 1,N<sup>6</sup>-Etheno- $\text{NAD}^+$  ( $\epsilon\text{-NAD}^+$ ), Nikotinamidguanidinukleotid ( $\text{NGD}^+$ ) sowie Nikotinamidhypoxanthidinukleotid ( $\text{NHD}^+$ ), 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 N<sup>1</sup>-Atom des Adenins bei der cADP-Ribose (Abb. 3) - über das N<sup>7</sup>-Atom des jeweiligen Purinringes erfolgt (Zhang und Sih, 1995; Graeff et al., 1996; siehe auch Abb. 19<sup>2</sup>).

Zusätzlich können die ADP-ribosyl Cyclase aus *Aplysia* sowie CD38 ein cyclisches Produkt unter Verwendung von  $\text{NADP}^+$  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  $\text{NADP}^+$  kann noch ein weiterer Metabolit synthetisiert werden: Nikotinsäureadeninukleotidphosphat ( $\text{NAADP}^+$ ) wird in Gegenwart von  $\text{NADP}^+$  und Nikotinsäure in einer Transglykosylierung generiert (Chini und Dousa, 1995; Aarhus et al., 1995). Sowohl 2'-P-cADP-Ribose als auch  $\text{NAADP}^+$  bewirken eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Während 2'-P-cADP-Ribose in Hirn-Mikrosomen Calcium aus einem cADP-Ribose-sensitiven aber  $\text{InsP}_3$ -insensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool freisetzt (Vu et al., 1996), mobilisiert  $\text{NAADP}^+$  Calcium aus Speichern, die scheinbar weder von  $\text{InsP}_3$  noch von cADP-Ribose aktiviert werden (Chini et al., 1995; Lee und Aarhus, 1995).

---

<sup>1</sup> siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen

<sup>2</sup> 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 $\mu$ M (Carafoli, 1987). Dieser deutliche Unterschied in der freien Calciumkonzentration zwischen extra- und intrazellulären Flüssigkeiten bedingt eine große nach innen gerichtete elektrochemische Kraft für  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden unter Depolarisation der Membran geöffnet, wodurch es zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Cytosol kommt. Über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter werden in einem elektrogenen Prozeß drei  $\text{Na}^+$ -Ionen pro  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion ausgetauscht. Bei polarisierter Membran sorgt die einwärts gerichtete Bewegung von  $\text{Na}^+$ -Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten für die benötigte Energie des auswärts gerichteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms entgegen dem Konzentrationsgefälle. Unter Depolarisation wird die Richtung der Ionenbewegung umgekehrt. Schließlich wird Calcium durch eine ATP-betriebene  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe aus der Zelle transportiert, die ihre Energie aus der Hydrolyse von einem Mol ATP pro Mol transportierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bezieht.

Das endoplasmatische bzw. sarkoplasmatische Retikulum (ER / SR) stellt einen wichtigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool von Zellen dar (Berridge, 1993; Richter und Kass, 1991). Der Transport von Calcium in das Retikulum erfolgt durch spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal bilden (Carafoli, 1987; Berridge, 1993). In nicht-erregbaren Zellen führt die Bindung des "second messengers" Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) an seinen Rezeptor ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) zur Öffnung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und damit zur Freisetzung von Calcium ins Cytoplasma. Der Hauptweg der  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{InsP}_3\text{R}$  (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  $\text{InsP}_3$ -Rezeptoren weisen beide eine Sensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf, die zu einer verstärkten Mobilisierung ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool der Zelle dar (Rossi und Lehninger, 1963; Carafoli, 1979, 1987). Der Transport von Calcium in die mitochondriale Matrix erfolgt energiegekoppelt über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten beider Transportsysteme ( $K_m \cong 10\mu\text{M}$ ) für eine Regulation von Reaktionen, die im sub- $\mu\text{M}$ -Bereich moduliert werden, zu gering ist (Carafoli, 1987), geht man davon aus, daß die Funktion der Mitochondrien nicht primär die Pufferung cytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen physiologischer Bereiche, sondern vielmehr eine langsamere und langfristige  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation ist (Halestrap, 1989; Gunter und Pfeiffer, 1990; Denton und McCormack, 1990). Dauerhafte oder exzessive Erhöhungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -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).

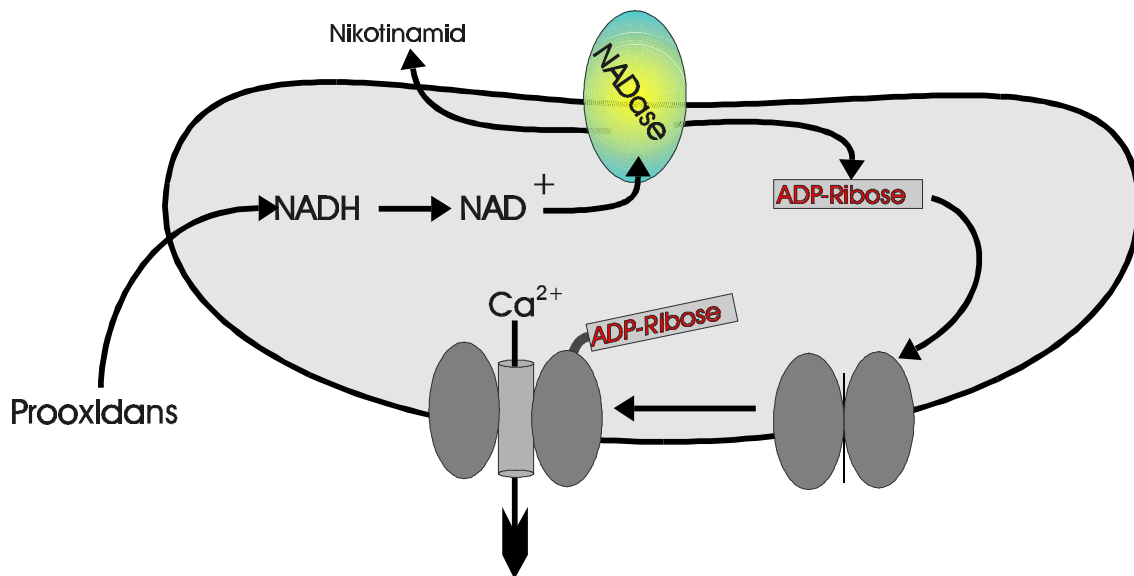
Verschiebungen der intrazellulären Homöostase sind oft die Folge schädigender Einwirkungen, wobei das vermehrte Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als eine häufige Ursache angesehen wird. Ein etabliertes Modell für die Belastung von Zellen oder isolierten Mitochondrien mit ROS ("oxidativer Stress") 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  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (elektrophoretischer Uniport) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux (elektroneutraler Antiport) - zu einem Calcium-Kreislauf ( $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -Cycling der Mitochondrien. Letzlich 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  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxen über die innere Mitochondrienmembran wurde zuerst von Lehninger et al. (1978) beschrieben. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und -Retention wird bevorzugt, wenn die Pyridinnukleotide stärker reduziert vorliegen, während ihre Oxidation den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom bedingt (Lehninger et al., 1978; Richter und Frei, 1988). In neueren Untersuchungen konnte dargelegt werden, daß eine enge Beziehung zwischen cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen nach  $\text{InsP}_3$ -abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und Mitochondrien besteht. Während der metabolische Zustand der Mitochondrien signifikant die Art cytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen beeinflusst (Jouaville et al., 1995), wird die Aktivität von Calcium-sensitiven Dehydrogenasen der Mitochondrienmatrix durch Änderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{NAD(P)}^+$  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  $\text{NAD}^+$ -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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{NAD}^+$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolase katalysiert die Hydrolyse der Pyridinnukleotide.
3. Freie ADP-Ribose modifiziert in einer nicht-enzymatischen aber spezifischen Reaktion mitochondriale Proteine, die mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux-System in Zusammenhang stehen. (Nikotinamid kann die Mitochondrien verlassen).
4. Es erfolgt ein  $\text{Ca}^{2+}$ -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 Enzymsystem beschrieben, daß mit NAD<sup>+</sup> als Substrat hauptsächlich ein Membranprotein ( $M_r \approx 50.000$ ) 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  $\text{NAD}^+$ , katalysiert von einer  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolase, wird eine wichtige Funktion in dem von Richter und Kass (1991) vorgeschlagenen Mechanismus der durch Prooxidantien induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -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., 1996<sup>1</sup>). 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., 1996<sup>1</sup>) wurde benannt. Aus Rattenleber-Mitochondrien wurde eine NADase partiell gereinigt und ihr Molekulargewicht mit  $M_r \cong 62.000$  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  $\text{NAD}^+$ -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., 1996<sup>1</sup>). Anhand dieses Verfahrens konnte das Molekulargewicht der NADase unter nicht-reduzierenden Bedingungen, in Bestätigung des zuvor erhaltenen Befundes (Zhang et al., 1995), mit  $M_r \cong 30.000$  abgeschätzt werden (Ziegler et al., 1996<sup>1</sup>). 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., 1996<sup>1</sup>; Jorcke et al., 1997<sup>1</sup>). Das Molekulargewicht der mit Steapsin behandelten NADase ist mit  $M_r \cong 28.000$  nur geringfügig kleiner als das des nativen Enzyms ( $M_r \cong 30.000$ ); dennoch ist damit der Verlust der Regulierbarkeit durch bivalente Kationen verbunden. Reduzierende Agenzien, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), wirken inhibitorisch auf die mitochondriale NADase (Ziegler et al., 1996<sup>1</sup>; Jorcke et al., 1997<sup>1</sup>). Interessanterweise zeigt die gut charakterisierte bifunktionelle  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolase, CD38, eine vergleichbare Sensitivität. Das Enzym wird durch bivalente Kationen ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) aktiviert (Zocchi et al., 1993) und durch reduzierende Reagenzien inhibiert (Franco et al., 1994; Zocchi et al., 1995). Die Charakterisierung der mitochondrialen  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolase ist in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Untersuchungen des letzten Jahrzehntes haben belegt, daß  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolasen eine fundamentale Rolle bei der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase spielen (Abschnitt 1.1.2). Einige dieser Enzyme katalysieren den Metabolismus des neuartigen  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Signalmoleküls cADP-Ribose (Ziegler et al., 1997a<sup>1</sup>). 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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.

---

<sup>1</sup> siehe Abschnitt 7.2, eigene Veröffentlichungen