

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 [32 P]-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 Effektorkonzentration 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.

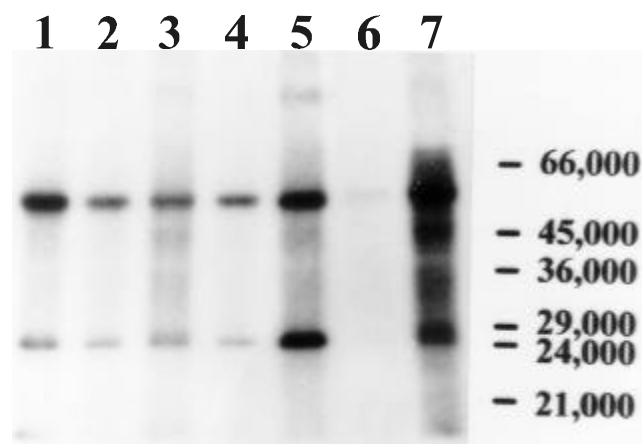


Abb. 5 Einfluß verschiedener Effektoren auf die mitochondriale ADP-Ribosylierung. Die Inkubation isolierter Mitochondrien (200µg) erfolgte für 15 Minuten bei 30°C in 50µl Ribosylierungspuffer (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 25µM [32 P]-NAD⁺ [1µCi/nmol]) in Gegenwart der unten aufgeführten Komponenten. Die Reaktion 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 quencheden 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).

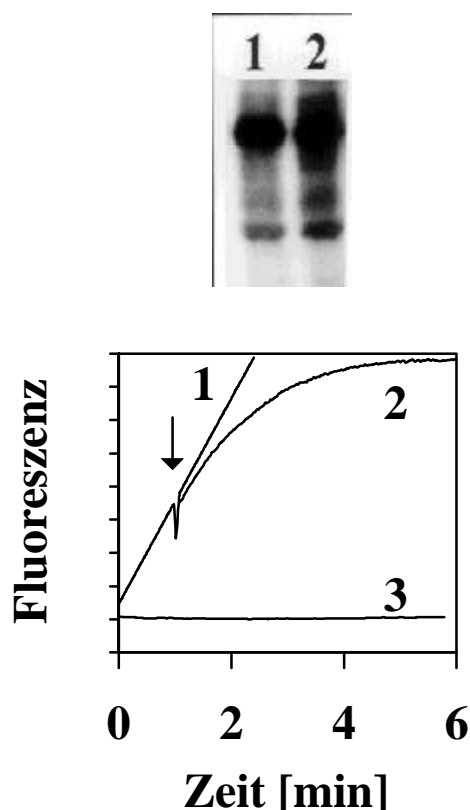
**A**

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).

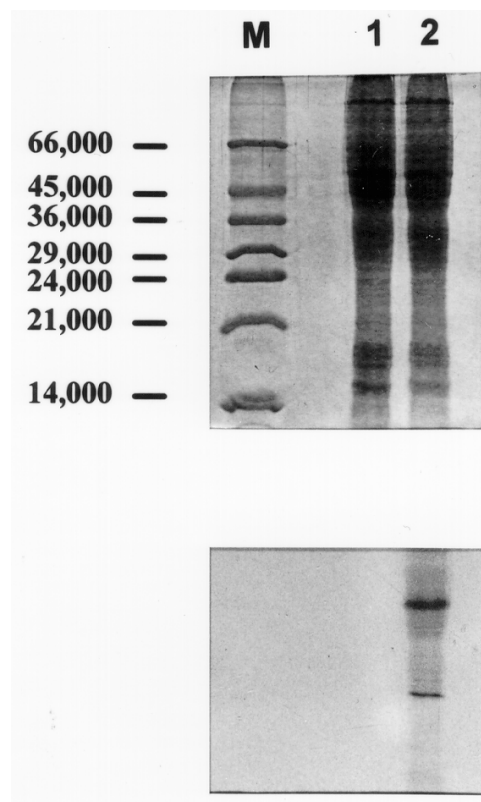


Abb. 7 ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine mit [Nikotinamid- $^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$ oder [Adenin- $^{14}\text{C}]\text{-NAD}^+$. Die Durchführung erfolgte wie unter Abb. 5 beschrieben; anstelle von $[^{32}\text{P}]$ -markiertem NAD^+ wurde $[^{14}\text{C}]$ -markiertes NAD^+ mit einer spezifischen 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

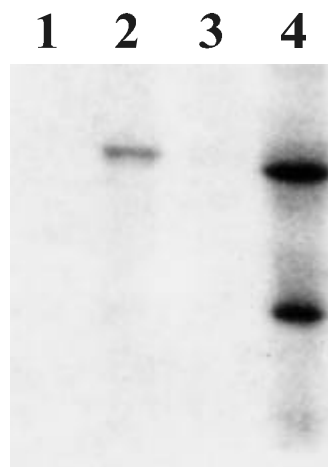


Abb. 8 Enzymatische ADP-Ribosylierung der ALDH durch die mitochondriale ADPRT. ALDH (20 μg) wurde mit 25 μM [^{32}P]-NAD $^{+}$ oder 25 μM [^{32}P]-ADP-Ribose für 15 Minuten ohne (Spuren 1 und 3) bzw. in Anwesenheit von 10 μg Mitochondrien (Spur 2) in Ribosylierungspuffer (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 10mM 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.

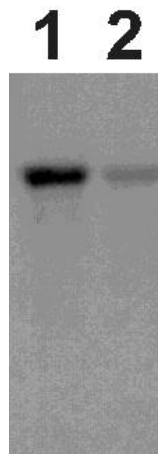


Abb. 9 Die Modifizierung von Thiolgruppen der ALDH verhindert ihre ADP-Ribosylierung durch die mitochondriale ADPRT. Spur 2, ALDH (20 μg) wurde 30 Minuten mit 1mM NEM in 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 1mM EDTA bei 30°C vorbehandelt und nach Zugabe von 20mM DTT weitere 30 Minuten inkubiert. Spur 1, Kontrollprobe: 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.

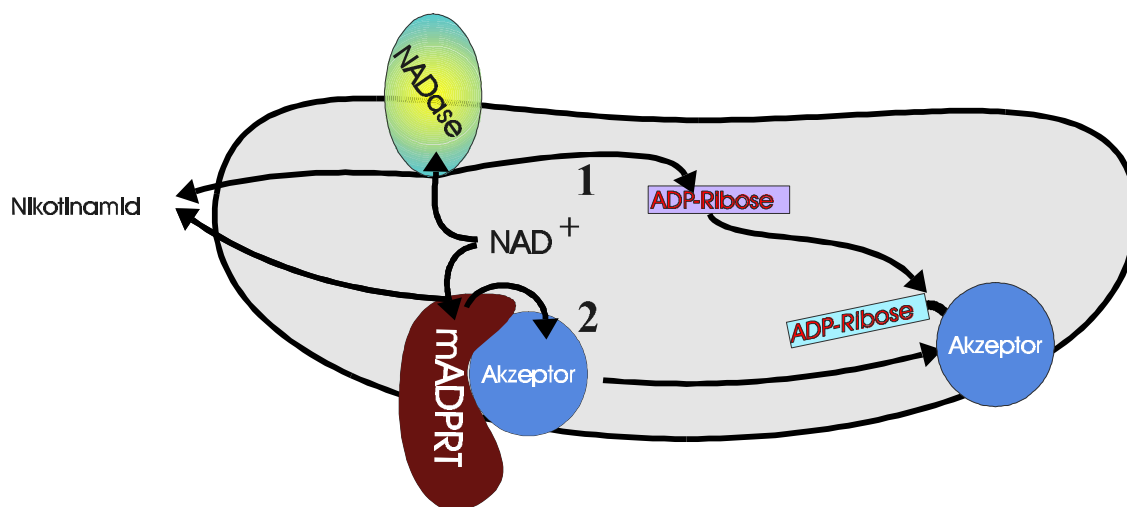


Abb. 10 Mögliche Wege der ADP-Ribosylierung in Mitochondrien.

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-solubilierten 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.

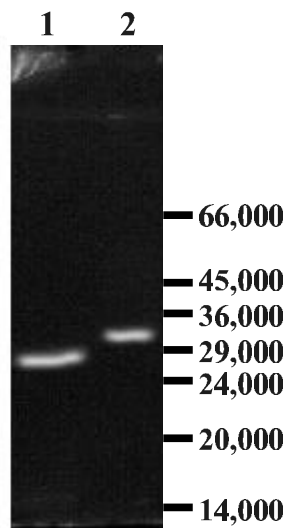


Abb. 11 Direktnachweis der mitochondrialen NADase-Aktivität nach SDS-PAGE. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase (20µg) nach Detergenz-(Spur 2) bzw. Steapsinsolubilisierung (Spur 1) wurde durch SDS-PAGE (12% Gel) getrennt. Einer Renaturierung in 50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,5% (w/v) LDAO folgte die Inkubation mit 150µM 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 Ca^{2+} -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 $\epsilon\text{-NAD}^+$, 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 Guanindiphosphoribose (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

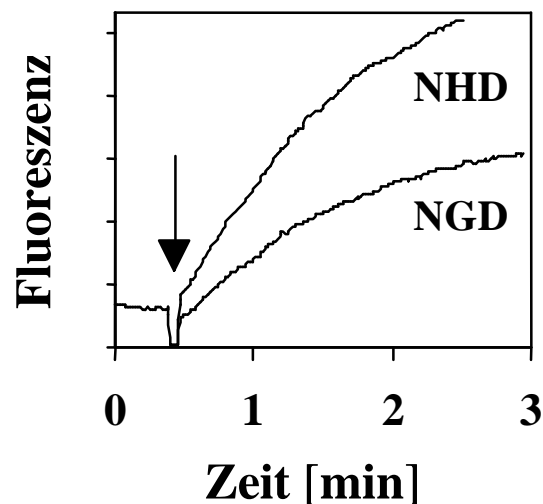


Abb. 12 **Synthese cyclischer ADP-Ribose-Derivate durch die mitochondriale NADase.** Die Bildung von cGDP-Ribose aus NGD⁺ sowie von cIDP-Ribose aus NHD⁺ wurde durch Fluoreszenzmessung bei $\lambda_{EM}=410\text{nm}$ verfolgt. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda_{EX}=310\text{nm}$. Der Pfeil markiert 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

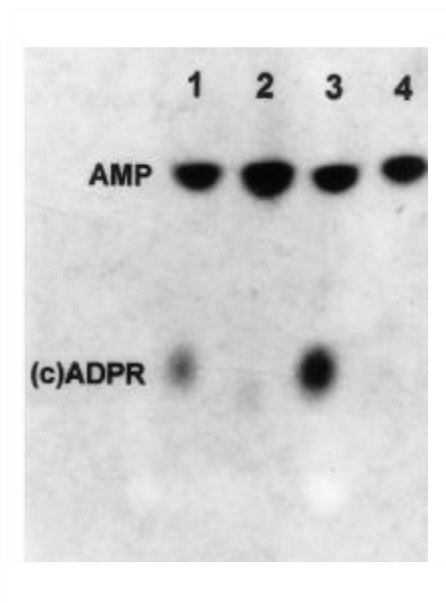


Abb. 13 Synthese von [^{32}P]-cADP-Ribose (cADPR) durch die mitochondriale NADase. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase wurde für fünf Minuten bei 30°C mit 25µM [^{32}P]-NAD⁺ im Reaktionsmedium (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% LDAO) einschließlich der unten angegebenen Zusätze inkubiert. Die Reaktion wurde durch Acetonfällung beendet und die Ansätze getrocknet. Präzipitierte Nukleotide wurden anschließend mit 25µl 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, + 20µM ZnCl₂, 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, c¹). 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. 19²).

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).

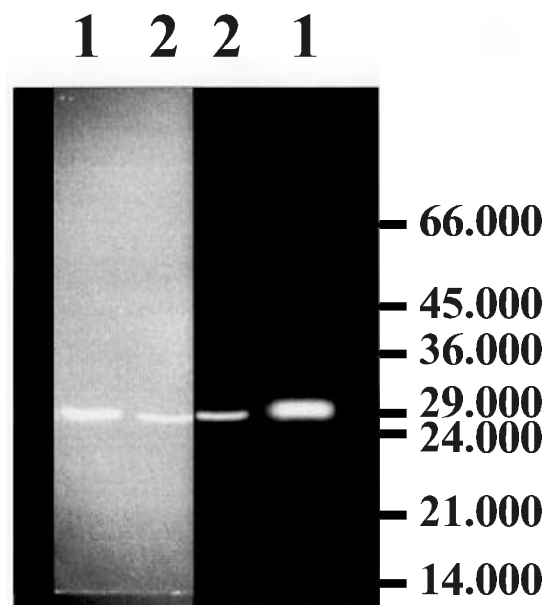


Abb. 14 Komigration mitochondrialer NADase- und ADP-ribosyl Cyclase-Aktivität. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase (Spuren 1) und ADP-ribosyl Cyclase aus *Aplysia californica* (Spuren 2) wurden durch SDS-PAGE (12% Gel) getrennt. Nach der Elektrophorese erfolgte die Renaturierung durch mehrmaliges 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).

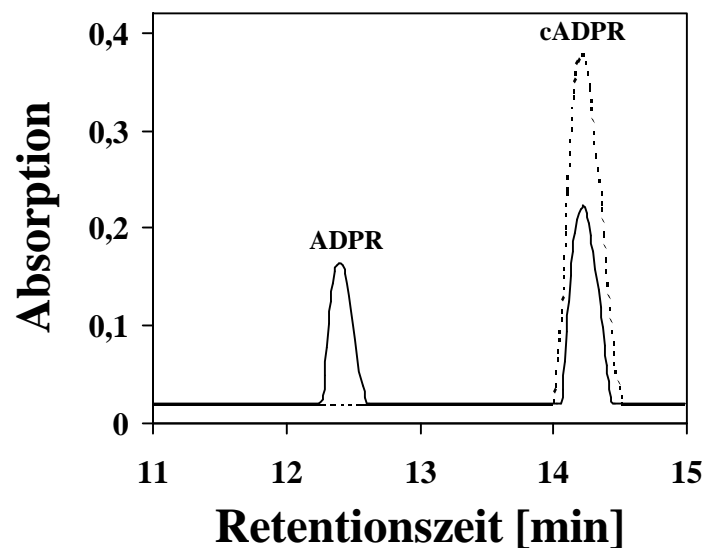


Abb. 15 Die mitochondriale NADase katalysiert die Hydrolyse von cADP-Ribose. Partiiell gereinigte mitochondriale NADase wurde im Reaktionsmedium (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% LDAO) in Gegenwart von 100 μM cADP-Ribose (cADPR) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Nukleotide 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).

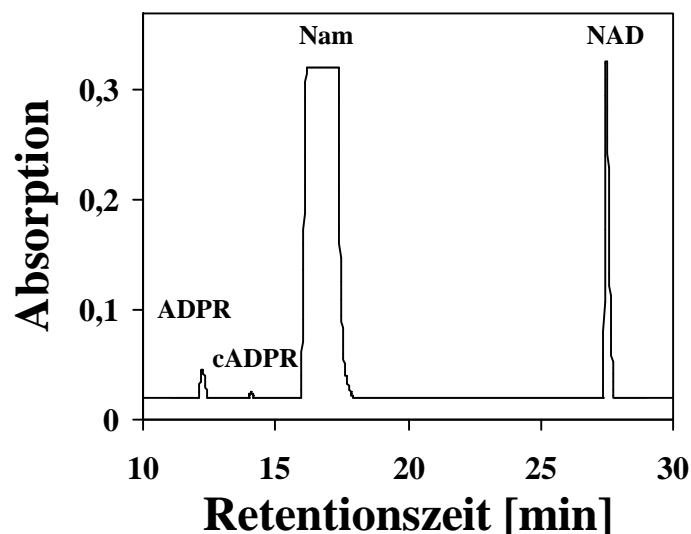


Abb. 16 Die mitochondriale NADase katalysiert die Synthese von NAD^+ . Partiiell gereinigte mitochondriale NADase wurde im Reaktionsmedium (50mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,03% LDAO) in Gegenwart von $100\mu\text{M}$ cADP-Ribose (cADPR) und 1mM Nikotinamid (Nam) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend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

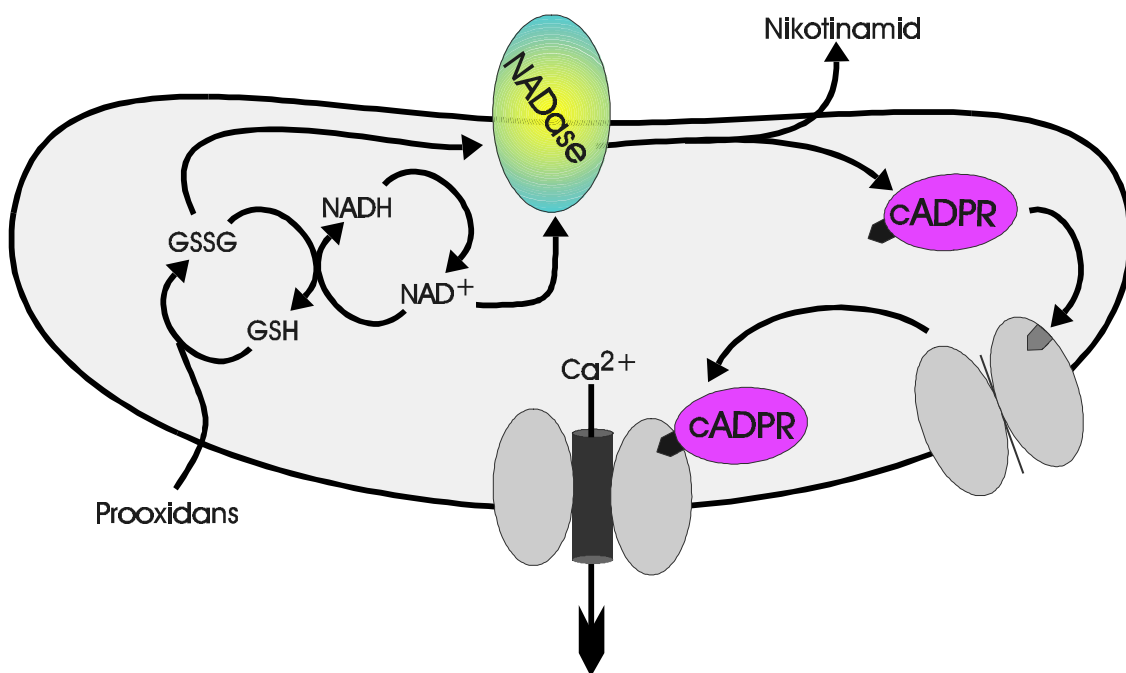


Abb. 17 Hypothetischer Mechanismus der prooxidans-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus Mitochondrien. Reaktive Sauerstoffspezies, wie das Superoxidanionradikal, Wasserstoffperoxid oder *tert.*-Butylhydroperoxid bewirken die Oxidation des intramitochondrialen Glutathions (GSH) sowie der Pyridinnukleotide (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.