

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, Robison, 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}P]- 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 Seeigeleiern 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 Seeigeleiern 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 Seeigeleiern 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 **b**-Mercaptoethanol enthält (Ziegler et al., 1996). Sowohl die NAD^+ -Glycohydrolase-Aktivität, gemessen mit dem Substratanalogen $\epsilon\text{-NAD}^+$ (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.

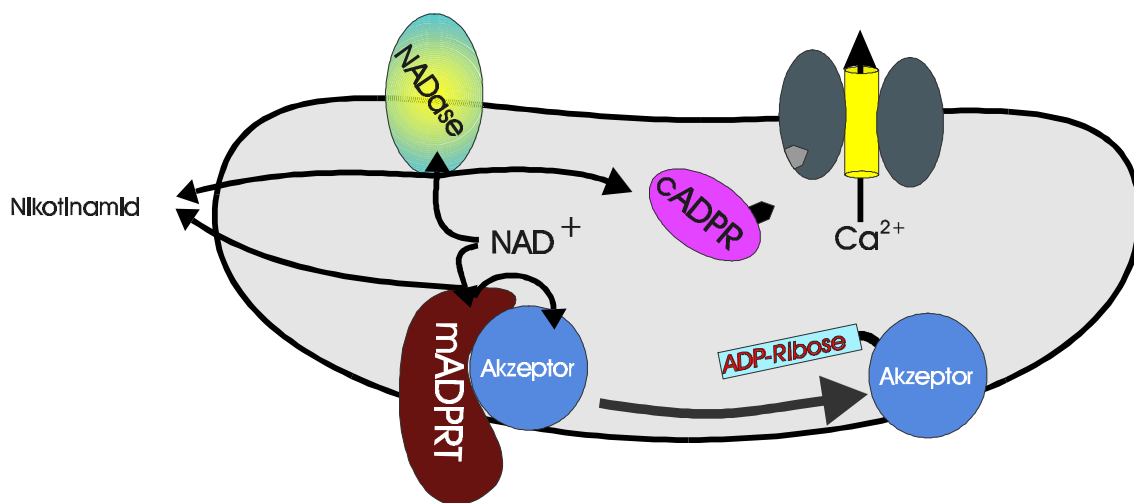


Abb. 18 NAD^+ -abhängige Wege der Signalübertragung in Mitochondrien. Das vorgeschlagene Modell sieht die Synthese von cyclischer ADP-Ribose (cADPR) und die enzymatische ADP-Ribosylierung vor.