

## 5. Zusammenfassung

Die fundamentale Bedeutung der Pyridinnukleotide [NAD(P)] für die Energietransduktion der Zelle ist seit langem bekannt. Darüber hinaus dient NAD<sup>+</sup> als Substrat in Reaktionswegen, deren physiologische Rolle in der Signalvermittlung zunehmend etabliert wird. ADP-Ribosylierung ist die posttranslationale Modifikation von Akzeptorproteinen mit dem ADP-Riboserest, der aus dem NAD<sup>+</sup> stammt. Sowohl die nicht-enzymatische Reaktion freier ADP-Ribose mit Proteinen als auch die enzym-katalysierte Übertragung von ADP-Ribose aus dem NAD<sup>+</sup> durch ADP-Ribosyltransferasen (ADPRTs) sind bekannt. Die Entstehung freier ADP-Ribose aus NAD<sup>+</sup>, die die Voraussetzung für eine nicht-enzymatische ADP-Ribosylierung ist, wird durch NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolasen (NADasen) katalysiert. Einige dieser Enzyme katalysieren auch den Metabolismus des neuartigen Ca<sup>2+</sup>-mobilisierenden Signalmoleküls cyclische ADP-Ribose (cADP-Ribose). Untersuchungen der letzten zehn Jahre haben belegt, daß NADasen eine grundlegende Rolle bei der Regulation der zellulären Calcium-Homöostase spielen.

Der mitochondrialen NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolase kommt bei einem vorgeschlagenen Modell der prooxidans-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus den Organellen eine Schlüsselrolle zu. Der Nettoverlust der Pyridinnukleotide, das extramitochondriale Auftreten von Nikotinamid und die ADP-Ribosylierung mitochondrialer Proteine sind die markanten Beobachtungen, die nach der Behandlung der Organellen mit Prooxidantien gemacht wurden; ihre Kausalität wurde bisher jedoch nicht nachgewiesen.

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

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

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die mitochondriale ADP-Ribosylierung unter den gewählten Bedingungen über eine enzymatische Reaktion verläuft, die von einer cystein-spezifischen ADP-Ribosyltransferase katalysiert wird. Das Modell der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus Mitochondrien bedingt durch eine nicht-enzymatische Modifizierung mit freier ADP-Ribose, die zunächst durch die Katalyse der NAD<sup>+</sup>-Glycohydrolase gebildet wird, hat sich damit als unwahrscheinlich erwiesen.

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

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

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