

8. Anhang

8.1 Fluoreszente Analoga cyclischer ADP-Ribose

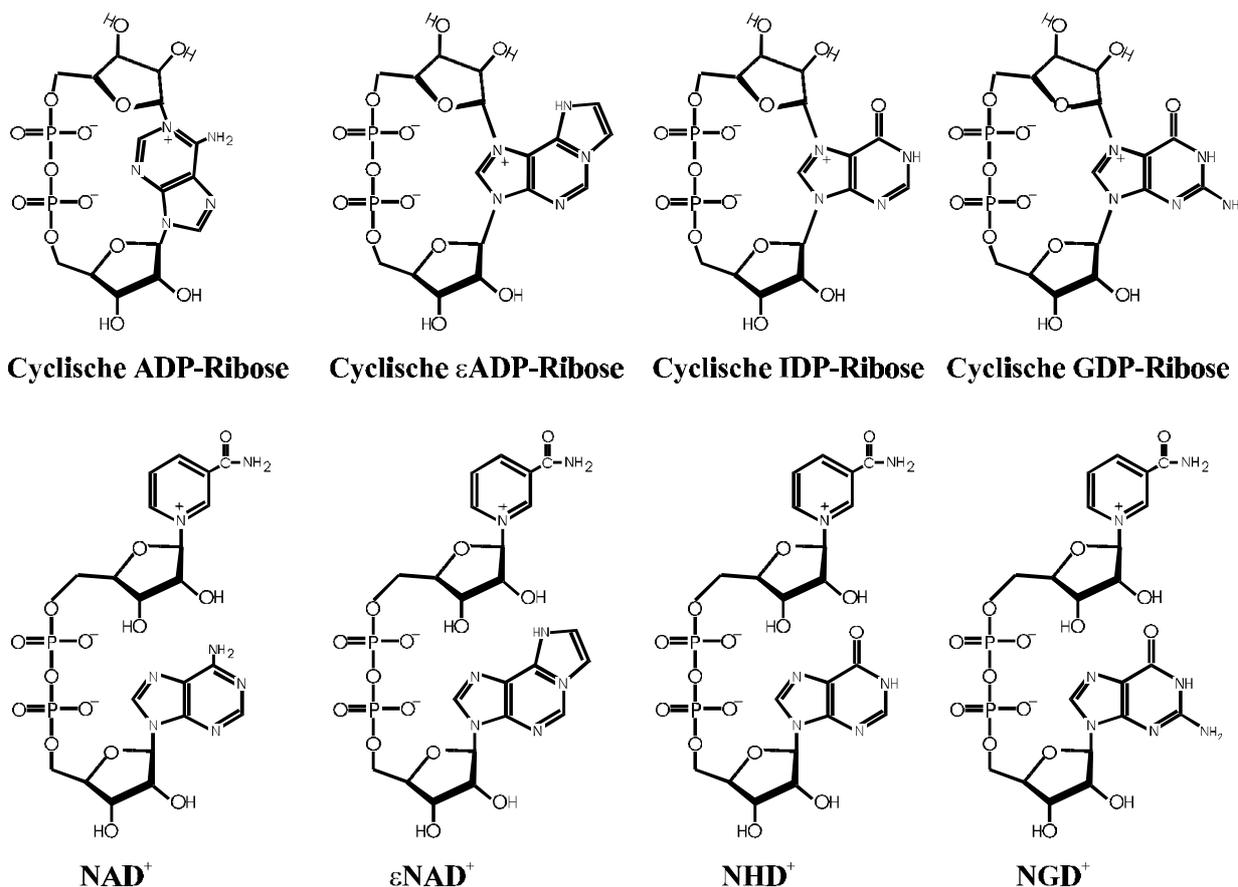


Abb. 19 Fluoreszente Analoga cyclischer ADP-Ribose. Mehrere an der NAD⁺-abhängigen Signalübertragung beteiligte Enzyme besitzen die bemerkenswerte Eigenschaft, zahlreiche NAD⁺-Derivate als Substrate zu akzeptieren (siehe Text). ADP-ribosyl Cyclasen, einschließlich der mitochondrialen NAD⁺-Glycohydrolase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

8.2 Kurzfassung der Ergebnisse

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

Moreover, it was found that under several conditions, which strongly inhibit the NADase, the extent of ADP-ribosylation in bovine liver mitochondria with NAD⁺ as substrate was only slightly diminished, if at all. The reaction led to the specific modification of two proteins with apparent molecular masses of approx. 26 and 53 kDa, respectively. Under these selected conditions mitochondrial ADP-ribosylation seems to occur as an enzymatic reaction, rather than a non-enzymatic transfer of ADP-ribose previously liberated from NAD⁺ by NADase activity.

The chemical stability of the protein-ADP-ribose bonds in mitochondria indicated that cysteine residues are the predominant acceptors. Furthermore, yeast aldehyde dehydrogenase was efficiently ADP-ribosylated utilizing the mitochondrial activity and NAD⁺ as substrate.

Pretreatment of this acceptor with *N*-ethylmaleimide, a thiol-specific reagent, substantially decreased its modification. It is, therefore, concluded that bovine liver mitochondria contain a cysteine-specific ADP-ribosyltransferase.

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

8.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

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

8.4 Abkürzungen

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

8.5 Lebenslauf

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

Studium

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

8.6 Danksagung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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