

3. Ergebnisse

3.1 Molekular- und zellbiologische Charakterisierung der NAD⁺-Kinase

3.1.1 Reinigung der NAD⁺-Kinase aus Rinderleber

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keinerlei Sequenzdaten zu einer NAD⁺-Kinase vor. Es war daher ein Ziel, die NAD⁺-Kinase bis zur Homogenität zu reinigen, um eine Sequenzierung des Proteins und die Klonierung der cDNA zu ermöglichen.

Verschiedene Gewebetypen kamen als Ausgangsmaterial für eine Reinigung in Frage, darunter humane Plazenta, Rinderhirn, Rinderleber, Rinderherz, Rinderblut und Rindermilz, da sie relativ einfach und in großen Mengen erhältlich waren. Aus diesen Geweben wurden Homogenate hergestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Überstände der Homogenate mit einem photometrischen Test gemessen, der zum spezifischen Nachweis der NAD⁺-Kinase entwickelt worden war. Bei diesem Test wurde das von der NAD⁺-Kinase synthetisierte NADP⁺ von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Gegenwart von Glucose-6-Phosphat zu NADPH reduziert. Diese Reduktion wurde bei 340 nm verfolgt und diente dem qualitativen und quantitativen Nachweis der NAD⁺-Kinase. In Rinderleber und Rinderhirn wurde eine relativ niedrige spezifische Aktivität von 0,16 nmol/min x mg und 0,04 nmol/min x mg gemessen. In keinem der anderen untersuchten Gewebe konnte eine NAD⁺-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden. Eine weitere Reinigung wurde daher aus Rinderleber durchgeführt.

In der Literatur fanden sich Hinweise, daß es sich bei der NAD⁺-Kinase um ein lösliches, cytosolisch lokalisiertes Protein handelt. Für die Reinigung wurde daher zunächst durch einen weiteren Zentrifugationsschritt eine cytosolische Fraktion aus dem Überstand des Rinderleberhomogenats präpariert. Die NAD⁺-Kinase-Aktivität war dabei ohne Verlust im Überstand nachweisbar.

Die cytosolische Fraktion konnte ohne Abnahme der NAD⁺-Kinase-Aktivität einem fünfminütigen Hitzedenaturierungsschritt unterzogen werden. Aus dem Überstand der Hitzedenaturierung wurde die NAD⁺-Kinase vollständig mit 70 prozentiger Ammoniumsulfatsättigung gefällt. Das Pellet konnte anschließend ohne den Verlust von NAD⁺-Kinase-Aktivität mit 55 Prozent gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen werden.

Zur weiteren Reinigung wurde das Pellet der Ammoniumsulfatfällung resuspendiert und nacheinander einer DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie, einer Hydroxylapatit-Chromatographie mittels FPLC, einer HighQ-Anionenaustauscher-Chromatographie mittels FPLC und einer Cibacron Blue-Affinitäts-Chromatographie unterzogen.

Mit diesen säulenchromatographischen Methoden wurde insgesamt eine Anreicherung um den Faktor 4700 aus dem Überstand des Rinderleberhomogenats erreicht. Eine Reinigung bis zur Homogenität war jedoch nicht möglich, wie sich anhand einer SDS-PAGE zeigte, in der nach den beschriebenen Reinigungsschritten immer noch eine Vielzahl von Proteinen nachweisbar waren. Eine Zusammenfassung der Reinigung ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Protein (mg)	spez.Akt. (U/mg)	Aktivität (U)	Anreicherung	Ausbeute (%)
30000 x g	100	45	4500	0,00016	0,72	1	100
60 °C-ÜS	70	35	2450	0,00064	1,6	4	216
AS-Fäll.	50	20	1000	0,0014	1,4	9	198
DEAE	15	3,5	52,5	0,025	1,3	150	173
HA (FPLC)	20	0,5	10	0,05	0,5	300	66
High Q (FPLC)	10	0,2	2	0,125	0,25	750	33
Affi-Blue	3	0,02	0,06	0,78	0,05	4700	6

Tab. 3.1: Reinigung der NAD⁺-Kinase aus Rinderleber. Die cytosolische Fraktion aus Rinderleberhomogenat (30000 x g) wurde einer Hitzedenaturierung (60 °C-ÜS), Ammoniumsulfatfällung (AS-Fäll.), Anionenaustauscher-Chromatographie (DEAE), Hydroxylapatit-Chromatographie (HA (FPLC)), Anionenaustauscher-Chromatographie (High Q (FPLC)) und Cibacron Blue-Affinitäts-Chromatographie (Affi-Blue) unterzogen. Die Enzymaktivität ist definiert als μmol synthetisiertes NADP⁺ pro min und mg Protein.

Um eine weitere Reinigung der NAD⁺-Kinase zu erzielen, wurde eine native Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde eine Nachweismethode entwickelt, mit der es möglich war, die NAD⁺-Kinase im nativen Gel auf Grund ihrer Aktivität mit Hilfe einer Farbreaktion zu detektieren. Hierfür wurde das Gel mit den Substraten der NAD⁺-Kinase inkubiert. Das synthetisierte NADP⁺ wurde von der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu NADPH reduziert. Dieses NADPH reduzierte nun seinerseits das Tetrazoliumsalz MTT. Bei dieser Reduktion entstand ein unlöslicher, blau-violetter Farbstoff, der an der Stelle des Gels ausfiel, an dem sich die NAD⁺-Kinase nach einer nativen Gelelektrophorese befand.

Das Eluat der DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie (Tab. 3.1) wurde vor einer solchen Elektrophorese mittels Gelfiltration entsalzt. Eine NAD⁺-Kinase-positive Fraktion wurde neben einer NAD⁺-Kinase-negativen Fraktion auf ein natives Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel einerseits mittels Aktivitätsfärbung und andererseits mit Coomassie Blue gefärbt (Abb. 3.1).

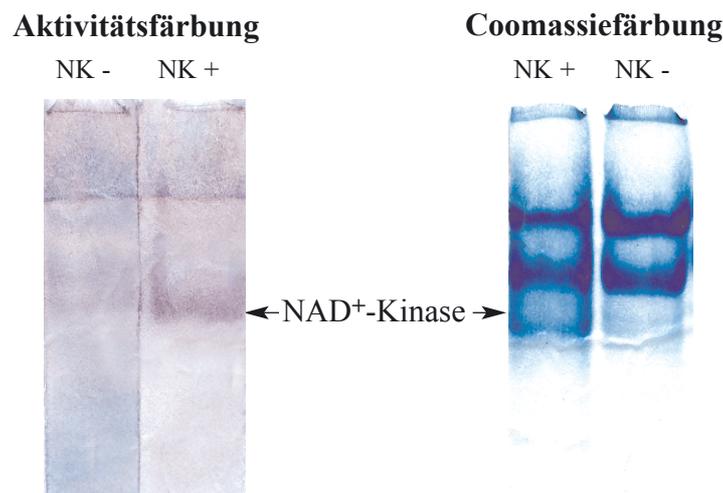


Abb. 3.1: Aktivitätsnachweis der angereicherten NAD⁺-Kinase aus Rinderleber nach nativer Gelelektrophorese. Jeweils 200 μg Protein einer NAD⁺-Kinase-negativen (NK -) und einer NAD⁺-Kinase-positiven (NK +) Fraktion (0,006 U) wurden nebeneinander auf ein 6 prozentiges Tris/Tricin-Gel (pH 9) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gels mittels Aktivitätsfärbung zum Nachweis der NAD⁺-Kinase (links) oder mit Coomassie Blue (rechts) gefärbt.

Die Aktivitätsfärbung zeigte in der NAD^+ -Kinase-positiven Fraktion eine Bande, die in der NAD^+ -Kinase-negativen Fraktion nicht detektiert werden konnte. Eine so aktivitätsgefärbte Proteinbande wurde aus dem nativen Gel ausgeschnitten, in kleine Stücke geschnitten, in SDS-Probenpuffer gekocht und auf ein SDS-PAG aufgetragen. Gleichzeitig wurde die entsprechende Stelle des Gels der NAD^+ -Kinase-negativen Fraktion ausgeschnitten und ebenso behandelt. Die Coomassie Blue-Färbung des SDS-PAGs zeigte, daß im Vergleich zur Negativkontrolle in der NAD^+ -Kinase positiven Fraktion ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 47 kDa detektierbar war (Abb. 3.2).

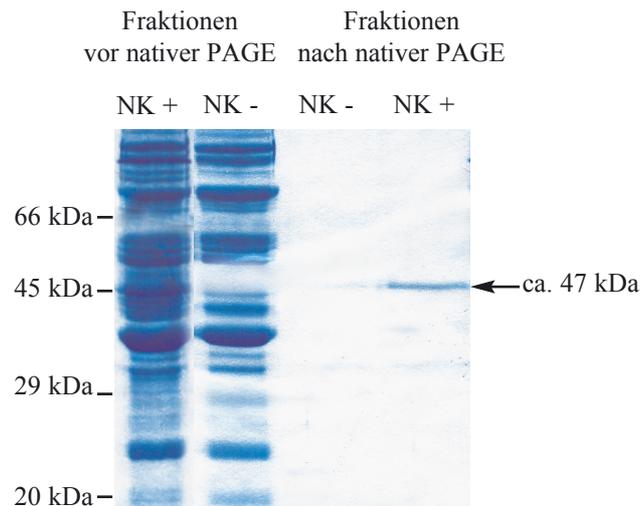


Abb. 3.2: Analyse der durch native PAGE gereinigten NAD^+ -Kinase aus Rinderleber. Nach einer nativen PAGE wurde die aktivitätsgefärbte Bande der NAD^+ -Kinase-positiven Gelspur und der korrespondierende Bereich der NAD^+ -Kinase-negativen Gelspur (Abb. 3.1) ausgeschnitten, in kleine Stücke geschnitten und in SDS-Probenpuffer gekocht. Diese Fraktionen und die entsprechenden Fraktionen vor der nativen PAGE wurden auf ein SDS-PAG aufgetragen und mit Coomassie Blue gefärbt.

Um Proteinsequenzen zu erhalten, wurde so gereinigte NAD^+ -Kinase nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Mittels Edman-Abbau wurde das Protein mit der molekularen Masse von etwa 47 kDa N-terminal ansequenziert und wurde als Acyl-CoA-Dehydrogenase (long chain) identifiziert. Es wurde daher davon ausgegangen, daß es mit dieser Methode nicht möglich war, ausreichend NAD^+ -Kinase zu erhalten um das Protein mit Coomassie Blue im SDS-PAG nachzuweisen. Eine solche Reinigung wurde daher im präparativem Maßstab wiederholt, wobei wiederum in der NAD^+ -Kinase positiven Fraktion ausschließlich ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 47 kDa detektiert werden konnte.

3.1.2 Klonierung und Expression der humanen NAD⁺-Kinase

Im Laufe der Durchführung dieser Arbeit gelang es einer japanischen Gruppe, erstmals eine NAD⁺-Kinase aus *Mycobacterium tuberculosis* zu reinigen und zu klonieren. Die Sequenzdaten, die durch diese Arbeit zugänglich wurden, konnten im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendet werden, um eine humane NAD⁺-Kinase zu klonieren.

Ein BLAST-Abgleich der Proteinsequenz der NAD⁺-Kinase aus *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank Zugangs-Nr.: O33196) mit humanen *Expressed Sequence Tag* (EST)-Datenbanken ergab die Sequenzen von drei überlappenden ESTs (GenBank Zugangs-Nr.: BE741979, BF664458 und AV752796), die übersetzt in ihre Proteinsequenz 41 Prozent Sequenzhomologie mit der Proteinsequenz der NAD⁺-Kinase aus *Mycobacterium tuberculosis* aufwiesen. Diese Sequenzen wurden in BLAST mit Nukleotid-Datenbanken abgeglichen. Auf diese Weise konnten zwei vollständige humane cDNA-Sequenzen unterschiedlicher Länge ermittelt werden (GenBank Zugangs-Nr.: BC001709 und AF250320).

Die beiden cDNA-Sequenzen unterschieden sich voneinander in der kodierenden Region lediglich durch zwei zusätzliche Sequenzabschnitte innerhalb der längeren cDNA von 123 bp und 312 bp. Die kürzere cDNA-Sequenz (BC001709) umfasste 3140 bp mit einer kodierenden Sequenz von 1341 bp. Die längere cDNA-Sequenz (AF250320) umfasste 3676 bp mit einer kodierenden Sequenz von 1773 bp.

Die Sequenzen wurden verwendet, um Primer für eine PCR zu generieren, die eine Amplifikation beider cDNAs erlaubte. Es wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen humanen Zelllinien (Wi-38, HeLa-S3, Hek-293-Zellen) isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde als *Template* für eine PCR verwendet. Primer, die ausschließlich die kodierende Sequenz beider cDNAs einschlossen, ließen keine Amplifikation zu. Aus diesem Grund wurden neue Primer generiert. Diese schlossen einen kurzen Teil der nicht-kodierenden Sequenz der beiden cDNAs mit ein. Durch eine PCR mit diesen Primern konnte ein einzelnes Fragment mit einer Größe von etwa 1400 bp amplifiziert werden (Abb. 3.3).

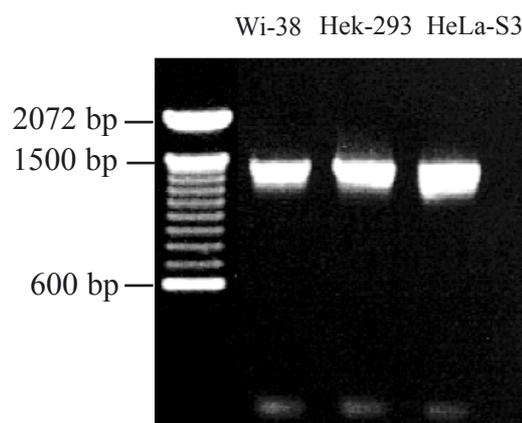


Abb. 3.3: Amplifikation der putativen NAD⁺-Kinase-cDNA aus Gesamt-cDNA humaner Zellen. Aus verschiedenen humanen Zelllinien wurde Gesamt-RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde als *Template* für eine PCR mit Primern verwendet, die aus Sequenzabgleichen der NAD⁺-Kinase aus *Mycobacterium tuberculosis* mit humanen Sequenzdatenbanken ermittelt worden waren. Die PCR-Ansätze wurden einer Agarosegelelektrophorese unterzogen, und das Gel wurde unter UV-Licht dokumentiert.

Das PCR-Produkt aus Wi-38-Zellen wurde in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Die ermittelte Sequenz stimmte mit der in der Datenbank angegebenen Sequenz der kürzeren cDNA (BC001709) überein.

Um diese cDNA funktionell zu überprüfen, sollte eine Überexpression des rekombinanten Proteins vorgenommen werden. Zu diesem Zweck wurde die cDNA in den pQE-30-Vektor kloniert. Dieser bakterielle Expressionsvektor ermöglicht die Überexpression der klonierten cDNA in Bakterienzellen durch eine Induktion mit IPTG. Das rekombinante Protein wird dabei mit einem N-terminalen 6 x Histidin-*Tag* ausgestattet, der eine Anreicherung des Proteins durch Affinitätschromatographie erlaubt.

Das Konstrukt aus putativer NAD⁺-Kinase-cDNA und pQE-30-Vektor wurde in *E. coli* transformiert, eine Überexpression wurde durch IPTG-Zugabe induziert. Unter Berücksichtigung des N-terminalen 6 x Histidin-*Tags* wurde ein Protein mit einer molekularen Masse von 50 kDa erwartet. Die Expression eines solchen Proteins konnte bereits zwei Stunden nach IPTG-Induktion beobachtet werden (Abb. 3.4).

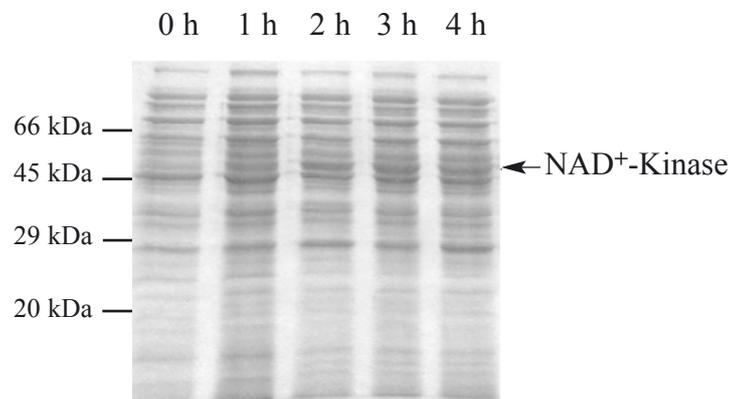


Abb. 3.4: Überexpression der humanen NAD⁺-Kinase in *E. coli*. Die putative kodierende cDNA-Sequenz der humanen NAD⁺-Kinase wurde in den pQE-30-Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* M15 transformiert. Durch IPTG-Zugabe (2 mM Endkonzentration) wurde die Überexpression des Proteins induziert. Vor Induktion sowie 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion wurden Bakterienzellen abgenommen, in SDS-Probenpuffer lysiert und auf ein SDS-PAG aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt.

Nach vier Stunden Induktion wurden die Zellen mit der *French Press* aufgeschlossen und abzentrifugiert. Der Zellüberstand wurde mit dem photometrischen NAD⁺-Kinase-Aktivitäts-Assay überprüft. Das Zellysate wies nach der vierstündigen IPTG-Induktion eine deutlich meßbare NAD⁺-Kinase-Aktivität (0,32 U/mg) auf, wohingegen in einem Zellysate nicht induzierter Bakterienzellen keinerlei NAD⁺-Kinase-Aktivität messbar war.

Durch die Überexpression des kodierten Proteins und den Nachweis seiner Aktivität konnte bestätigt werden, daß die identifizierte cDNA-Sequenz für eine humane NAD⁺-Kinase kodiert.

3.1.3 Analyse der humanen NAD⁺-Kinase-cDNA

Die hier klonierte humane NAD⁺-Kinase-cDNA (GenBank Zugangs-Nr.: AAM01195) umfaßt eine kodierende Region von 1341 bp, die für ein Protein mit 446 Aminosäuren kodiert (Abb. 3.5).

```

1  atggaaatggaacaagaaaaatgaccatgaataaggaattgagtcagacgcggctgcttactgctgctcggcctgccacggcgatgag 90
   M E M E Q E K M T M N K E L S P D A A A Y C C S A C H G D E
                                     15                               30
91  acctggagttacaaccacccatccggggccggccaagtctcgcagcctgtctgcctcggcccgctggggagcaccaaggagttcagg 180
   T W S Y N H P I R G R A K S R S L S A S P A L G S T K E F R
                                     45                               60
181 aggcacgctctcttcatgggcatgcccgggtgaccacttttgaccaaaggcctgtgtgctgcagaacccccagaccatcatgcacatt 270
   R T R S L H G P C P V T T F G P K A C V L Q N P Q T I M H I
                                     75                               90
271 caggaccccgcgagccagcggctgacgtggaacaagtcaccaagagcgtccttgcacatcaagaagatgagagatgccacgctactgcag 360
   Q D P A S Q R L T W N K S P K S V L V I K K M R D A S L L Q
                                     105                              120
361 ccgttcaaggagctctgcacgcacctcatggaggagaacatgctgtatgtgaaaagaaagtgctagaagacctgccatgccagc 450
   P F K E L C T H L M E E N M I V Y V E K K V L E D P A I A S
                                     135                              150
451 gatgaaagctttggggcagtgagaagaagaattctgtaccttcgagaagattatgatgacattccaatcagatagacttcatcatctgc 540
   D E S F G A V K K K F C T F R E D Y D D I S N Q I D F I I C
                                     165                              180
541 ctggggggagacgggacgctgctgtacgcttctcgtctttccagggcagcgtccctccggctcatggccttccacctgggctccctgggc 630
   L G G D G T L L Y A S S L F Q G S V P P V M A F H L G S L G
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     195                              210
631 ttctgacccattcagctttgagaacttcagtcaccaagttactcaggtgatagaggggaacgcagctgttgttctccggagtcggctg 720
   F L T P F S F E N F Q S Q V T Q V I E G N A A V V L R S R L
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     225                              240
721 aaggtcagggtggtgaaggactccgggggaagaagacggcctgacacaatgggctgggtgagaaggctcgcagcctcaggcctggac 810
   K V R V V K E L R G K K T A V H N G L G E N G S Q A A G L D
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     255                              270
811 atggatgctcgggaagcaggccatgcagtaccaggtcctgaatgaggtggtgattgacagaggccctcctcctacctgtccaatgtggat 900
   M D V G K Q A M Q Y Q V L N E V V I D R G P S S Y L S N V D
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     285                              300
901 gtctacctggacggacacctcaccacgggtgcagggcgacggagtgatcgtgtccaccccgacggggcagcacggcgatgcgggccgg 990
   V Y L D G H L I T T V Q G D G V I V S T P T G S T A Y A A A
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     315                              330
991 gccggggcctccatgatccacccaacgtgccggccatgatcacgcccatctgccccactcgtgtccttccggccatcgtgttc 1080
   A G A S M I H P N V P A I M I T P I C P H S L S F R P I V V
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     345                              360
1081 cccgcagggtgcagctgaagatcatgctgacctgaagcaaggaacacagcatgggtgtcctttgatggacggaagagacaagagatc 1170
   P A G V E L K I M L S P E A R N T A W V S F D G R K R Q E I
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     375                              390
1171 cgccatggagacagcatcagcatcactacctatgctaccgctccctccatctgtgtgctgggaccccgtagcagcactggtttgagagc 1260
   R H G D S I S I T T S C Y P L P S I C V R D P V S D W F E S
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     405                              420
1261 ctgccccagtgcctgcatggaacgtccggaagaagcaagcccacttcgaggaggaggaggaggaggaggaggaggaggaggaggaggagg 1341
   L A Q C L H W N V R K K Q A H F E E E E E E E E E E G
   (blau) (gelb) (rot) (grün)
                                     434                              446

```

Abb. 3.5: Kodierende cDNA- und Aminosäure-Sequenz der humanen NAD⁺-Kinase. Die durch Überexpression und Aktivitätsmessungen bestätigte kodierende Sequenz der humanen NAD⁺-Kinase umfaßt 1341 bp bzw. 446 Aminosäuren. Die für den Southern Blot (s. u.) verwendete Sonde ist blau, die für den Northern Blot (s. u.) verwendete Sonde gelb markiert. Die durch einen Sequenzabgleich mit den entsprechenden Proteinen aus anderen Organismen ermittelten konservierten Aminosäure-Reste (s. u.) sind rot hervorgehoben, die konservierte Domäne (s. u.) ist grün markiert.

Die Aminosäure-Sequenz der NAD⁺-Kinase ergibt ein Protein mit einer theoretischen molekularen Masse von 49228 Da und einem theoretischen pI von 6,03. Die Sequenz wurde mit Vorhersageprogrammen für posttranslationale Modifikationen und zelluläre Lokalisation analysiert. Hierbei ergab sich eine 60 prozentige Wahrscheinlichkeit für eine cytosolische Lokalisation des Proteins (PSORT II; www.expasy.ch). Einen Hinweis auf posttranslationale Modifikationen durch Kohlenhydrate oder Lipide gab es nicht (NetOGlyc, big-PI-Predictor; www.expasy.ch). Es wurden fünf potentielle Phosphorylierungsstellen in der N-terminalen Region des Proteins (Serin 15, 44, 46, 48 und 55) mit Wahrscheinlichkeiten von > 0,98 gefunden (NetPhos 2.0; www.expasy.ch).

Die vollständige cDNA inklusive nicht-kodierender Region besitzt laut Datenbank eine Länge von 3140 bp. In einem BLAST-Abgleich zeigte weder die cDNA noch die entsprechende Aminosäure-Sequenz Ähnlichkeiten zu anderen humanen Proteinen oder cDNAs, ausgenommen der Übereinstimmung mit der oben erwähnten längeren cDNA. Die Aminosäure-Sequenz enthält aber eine stark konservierte Domäne, deren Funktion bis dato ungeklärt war. Sie weist eine hohe Ähnlichkeit zu den drei anderen inzwischen klonierten NAD⁺-Kinasen aus *M. tuberculosis*, *E. coli*, *S. cerevisiae* und zu etwa 100 weiteren, bislang nicht charakterisierten Proteinen aus zahlreichen Organismen auf. Diese Domäne erstreckt sich über 240 Aminosäuren (169-408, Abb. 3.5, Seite 59) und befindet sich am C-Terminus der humanen NAD⁺-Kinase.

In Abbildung 3.6 ist ein Vergleich der vier bislang charakterisierten NAD⁺-Kinasen innerhalb der konservierten Domäne dargestellt. Außerhalb der konservierten Domäne gab es keine Ähnlichkeit zwischen den Proteinen.

<i>H. sapiens</i>	169	DDISNQIDFIICL GGDG T L L YASSLFQGSVPP V MAFHL G S L GFL T P F
<i>S. cerevisiae</i>	198	REHDVFFDLVVTL GGDG T V L FVSSIFQRHVPP V MSFSL G S L GFL TNF
<i>M. tuberculosis</i>	70	QHAADGCELVLVL GGDG T F L RAAELARNASIP V LGVNL G R I GFL AEA
<i>E. coli</i>	59	AEIGQLADLAVVV GGDG NM L GAARTLARYDIK V I G I N R G NL GFL TDL
<i>H. sapiens</i>	216	SFENFQSQVTQVIEGNAAVVLRSL L KVRVVKELRGKKTAVHNLGGEKGS
<i>S. cerevisiae</i>	245	KFEHFREDLPRIMNHKIKTNLRLR L ECTIYRRHRPE - - - VDPNTGKK- -
<i>M. tuberculosis</i>	117	EAEAIDAVLEHVVAQDYRVEDRLT L DVVVRQGGRIVNRGWA- - - - -
<i>E. coli</i>	105	DPDNAQQQLADVLEGHYISEKRFL L EAQVCQQDCQKRISTA - - - - -
<i>H. sapiens</i>	265	QAAGLDMDVGKQAMQYQVL NEV VIDR G PSSYLSNVDVYL D GHLITTV
<i>S. cerevisiae</i>	289	- - - - - ICVVEKLSTHHIL NEV TIDR G PSPFLSMLLEYG D GSLMTVA
<i>M. tuberculosis</i>	158	- - - - - L NEV SLEK G PRLGVLGVVVEI D GRPVSAF
<i>E. coli</i>	146	- - - - - I NEV VLHP G KVAHMIEFEVYI D EIFAFSQ
<i>H. sapiens</i>	312	QG DG VIVS TPTGSTAY AAA AG ASMIH P NVP AI MIT P I C PHS L SF
<i>S. cerevisiae</i>	330	QA DG LIAA TPTGSTAY S L S AG GSLVC P TVN AI ALT P I C PHA L SF
<i>M. tuberculosis</i>	187	GC DG VLVS TPTGSTAY A F S AG GPVLW P DLE AI LVV P NNA HA L FG
<i>E. coli</i>	175	R S DG L I I S TPTGSTAY S L S AG GPILT P SLD AI TLV P MFP H T L SA
<i>H. sapiens</i>	356	RP IVVPAGVELKIMLSPEARNTAVVSF D GRKRQEIRH G DSISITTSCYPLPSI
<i>S. cerevisiae</i>	374	RP IILPESINLKVKVSMKSRAPAWAAF D GKDRIELQK G DFITICASPYAFPT-
<i>M. tuberculosis</i>	231	RP MVTSPPEATIAIEIEADGHD - ALVFC D GRREMLIPA G SRLEVTRCVTSVK
<i>E. coli</i>	219	RP LVINSSSTIRLRF S - HRRNDLEISC D SQIALPIQE G EDVLIRRCDYHLN-

Abb. 3.6: Homologie der humanen NAD⁺-Kinase zu den anderen inzwischen klonierten NAD⁺-Kinasen.

Die Aminosäure-Sequenz der humanen NAD⁺-Kinase wurde jeweils mit den Aminosäure-Sequenzen der anderen bislang charakterisierten NAD⁺-Kinasen (*S. cerevisiae*/GenBank Zugangs-Nr.: BAB83863, *M. tuberculosis*/GenBank Zugangs-Nr.: O33196, *E. coli*/GenBank Zugangs-Nr.: BAB83864) mit Hilfe des Programms SIM (www.expasy.ch) abgeglichen. Konservierte Reste sind rot dargestellt.

3.1.4 Gewebespezifische Expression der humanen NAD⁺-Kinase-mRNA

Die spezifische Expression der humanen NAD⁺-Kinase in menschlichen Geweben wurde durch eine Northern Blot-Analyse ermittelt. Für die Detektion der NAD⁺-Kinase-mRNA wurde ein 500 bp langer Bereich (463-962, Abb. 3.5, Seite 59) der kodierenden Sequenz der NAD⁺-Kinase-cDNA als radioaktiv markierte Sonde verwendet. Diese Sonde wurde mit Gesamt-RNA aus unterschiedlichen menschlichen Geweben hybridisiert, die auf einer Membran immobilisiert war.

Die NAD⁺-Kinase-mRNA konnte in allen getesteten Geweben bis auf Dünndarm und Skelettmuskel detektiert werden (Abb. 3.7). Die nachgewiesene Bande entsprach der erwarteten Größe von etwa 3000 bp. Eine größere mRNA, die der in der Datenbank eingetragenen cDNA von 3676 bp Länge entsprechen würde, konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Statt dessen war in einigen Geweben zusätzlich eine etwa 1800 bp große mRNA zu detektieren, deren Ursprung unbekannt ist.

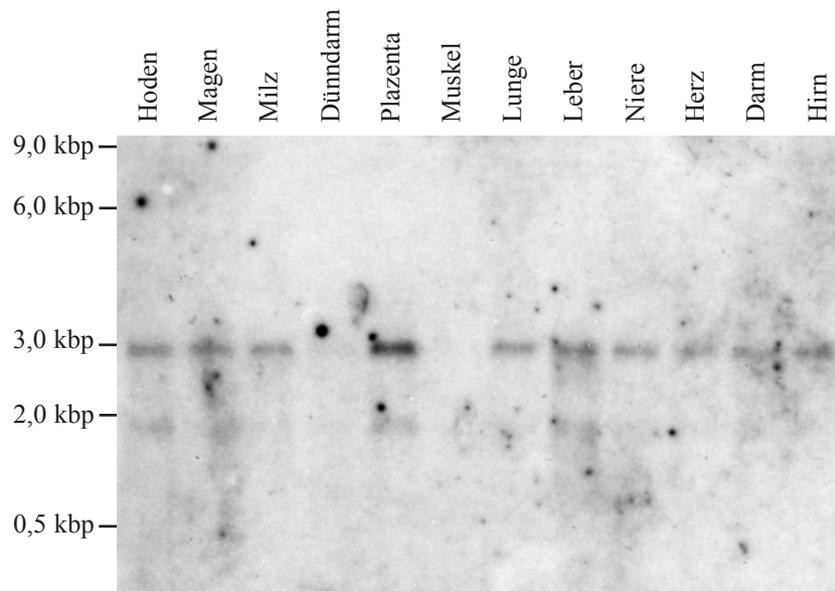


Abb. 3.7: Gewebespezifische Expression der humanen NAD⁺-Kinase-mRNA. Ein Northern Blot mit jeweils 30 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen menschlichen Geweben wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde aus der kodierenden Sequenz der cDNA der humanen NAD⁺-Kinase (Abb. 3.5) hybridisiert. Der Blot wurde gewaschen und autoradiographiert.

3.1.5 Die genomische DNA der humanen NAD⁺-Kinase

Die in der Datenbank angegebene 3140 bp umfassende cDNA der humanen NAD⁺-Kinase wurde mit bekannten Sequenzen des menschlichen Genoms abgeglichen. Hierbei konnte eine Gensequenz ermittelt werden, die zu 100 Prozent mit der eingegebenen Sequenz übereinstimmte. Diese Sequenz ist auf Chromosom 1 in dem Bereich p36.21-36.33 lokalisiert (GenBank Zugangs-Nr: ALO31282).

Für eine experimentelle Bestätigung dieses Befundes wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Es wurde genomische DNA aus Wi-38 Zellen isoliert und mit solchen Restriktionsenzymen verdaut, die in der Sequenz der verwendeten Sonde keine Schnittstelle aufwiesen. Die verdaute DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert.

Zunächst wurde hierfür ebenfalls die 500 bp lange Sonde verwendet, die schon beim Northern Blot verwendet worden war (463-962, Abb. 3.5, Seite 59). Es war jedoch mit dieser Sonde nicht möglich eine radioaktiv markierte Bande zu detektieren. Alternativ dazu wurden die ersten 180 bp der kodierenden Sequenz der NAD⁺-Kinase-cDNA (Abb. 3.5, Seite 59) als Sonde für eine Hybridisierung verwendet.

Das Autoradiogramm des Southern Blots (Abb. 3.8) zeigte in jeder Verdauung die Markierung eines einzelnen DNA-Fragmentes. Darüber hinaus stimmten die Größen der markierten DNA-Fragmente in den verschiedenen Verdauungen mit den theoretisch ermittelten Werten aus dem Verdau der genomischen DNA auf Chromosom 1 p36.21-36.33 überein (Bam HI: 1645 bp, EcoRI: 1440 bp, Bam/EcoRI: 1440 bp, HindIII: 3212 bp).

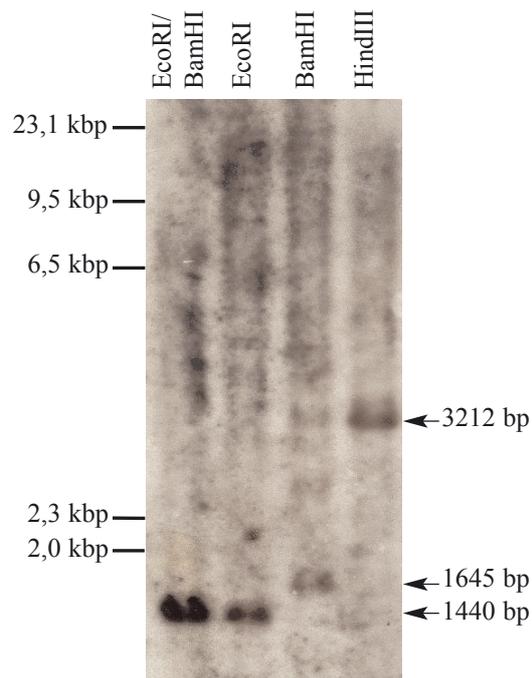


Abb. 3.8: Nachweis der genomischen DNA der humanen NAD⁺-Kinase. Genomische DNA aus Wi-38-Zellen wurde mit verschiedenen Endonukleasen verdaut und auf einem 0,8 prozentigen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Sonde hybridisiert, die die ersten 180 bp der kodierenden Sequenz der NAD⁺-Kinase umfaßte. Der Blot wurde gewaschen und autoradiographiert.

Das hier durch einen Sequenzabgleich und den experimentellen Befund ermittelte Gen auf Chromosom 1 umfaßt einen Bereich von insgesamt 27,558 kbp, der sich in zwölf Exons und elf Introns unterteilt. Von diesen zwölf Exons kodieren elf für die Aminosäuresequenz der NAD⁺-Kinase innerhalb eines Abschnitts von etwa 14 kb (Abb. 3.9, oben).

Ein Abgleich der oben erwähnten längeren cDNA-Sequenz, ergab ebenfalls eine 100 prozentige Übereinstimmung in diesem Bereich des menschlichen Genoms. Die korrespondierende genomische DNA dieser cDNA weist gegenüber der kürzeren zwei zusätzliche Exons innerhalb der für das Protein kodierenden Sequenz auf. Darüber hinaus hat sie ein von der hier untersuchten NAD⁺-Kinase-cDNA abweichendes Exon 1, das für den 5'-nichttranslatierten Bereich der cDNA kodiert (Abb. 3.9, Mitte).

Kürzlich wurde eine weitere cDNA sequenziert, die von dem selben Gen kodiert wird. Sie entspricht der kurzen NAD⁺-Kinase-cDNA hat aber ebenfalls ein davon abweichendes Exon 1 (Abb. 3.9, unten).

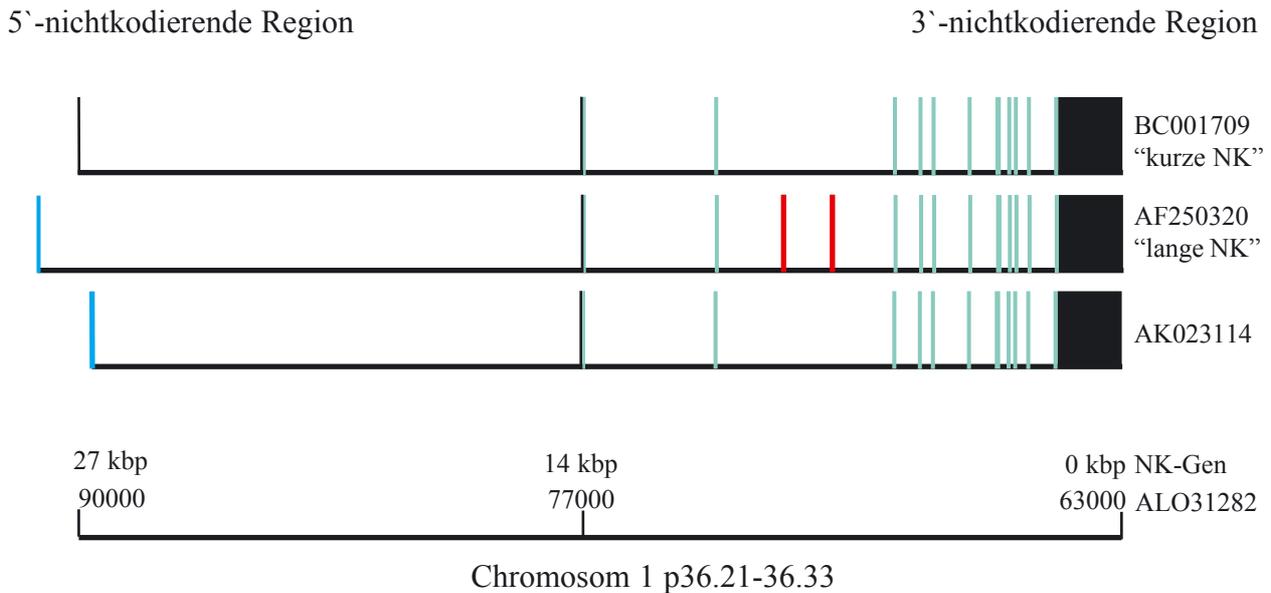


Abb. 3.9: Intron-Exon-Struktur des Gens der humanen NAD⁺-Kinase.

Oben: Intron-Exon-Struktur der hier charakterisierten humanen NAD⁺-Kinase. Exons sind als vertikale Striche dargestellt (grün: Exons in der kodierenden Region der cDNA, schwarz: Exons im nichttranslatierten Bereich).

Mitte: Intron-Exon-Struktur der längeren cDNA, mit Ähnlichkeiten zu der hier charakterisierten NAD⁺-Kinase-cDNA. Abweichend sind zwei zusätzliche Exons im translatierten Bereich (rot) und das Exon 1 im nicht-translatierten Bereich (blau).

Unten: Kürzlich sequenzierte cDNA mit Ähnlichkeiten zu der hier charakterisierten NAD⁺-Kinase-cDNA mit einem abweichenden Exon 1 im nicht-translatierten Bereich (blau).

3.1.6 Reinigung der humanen rekombinanten NAD⁺-Kinase

Für eine kinetische und strukturelle Charakterisierung der NAD⁺-Kinase und zur Generierung von Antikörpern sollte eine Reinigung der rekombinanten NAD⁺-Kinase möglichst bis zur Homogenität und in großen Mengen ermöglicht werden.

Zu diesem Zweck wurde die cDNA der humanen NAD⁺-Kinase in den pQE-30-Vektor kloniert, der die Expression des Proteins mit einem N-terminalen 6 x Histidin-Tag erlaubt. Ursprünglich war eine Ein-Schritt-Reinigung des Proteins durch eine Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA-Agarose vorgesehen. Eine solche Reinigung war allerdings nicht möglich, da die NAD⁺-Kinase nur schwach an das Säulenmaterial band und zusammen mit einigen bakteriellen Proteinen schon bei einer Imidazol-Konzentration von 5 mM eluierte.

Nach einer solchen Reinigung lag die Hauptproteinbande des Eluats in einem SDS-PAG bei etwa 45 kDa. Eine N-terminale Sequenzierung dieses Proteins mittels Edman-Abbau ergab, daß es sich dabei zwar um NAD⁺-Kinase handelte, diese aber N-terminal um 64 Aminosäuren verkürzt vorlag. Vermutlich war es im Laufe der Expression zu einer proteolytischen Spaltung der NAD⁺-Kinase gekommen, wobei der N-Terminus inklusive 6 x Histidin-Tag abgespalten worden war. Eine effiziente Reinigung durch Nickel-NTA-Chromatographie war demnach nicht möglich.

Die Fragmentierung der NAD⁺-Kinase konnte bei einer Expression in *E. coli* JM109, *E. coli* M15 und *E. coli* NM522 beobachtet werden. In *E. coli* M15 war allerdings die beste Expressionsrate der NAD⁺-Kinase zu detektieren. Etwa 10 mg NAD⁺-Kinase (abgeschätzt aus dem SDS-Gel) pro Liter Bakterienkultur konnten exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde dieser Stamm zur Überexpression bei der weiteren Reinigung der NAD⁺-Kinase verwendet.

Alternativ zu der Nickel-NTA-Chromatographie wurde ein Schema zur Reinigung des rekombinanten Enzyms entwickelt, das sich an der Reinigungsmethode des endogenen Enzyms aus Rinderleber orientierte. Mit diesem Schema konnten etwa 0,6 mg NAD⁺-Kinase pro Liter Bakterienkultur gereinigt werden, wobei eine Ausbeute von etwa 10 Prozent erreicht wurde (Tab. 3.2).

Fraktion	Volumen (ml)	Protein Konz. (mg/ml)	Protein (mg)	spez. Akt. (U/mg)	Aktivität (U)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Zellysat	60	5	300	0,32	96	1	100
60°C-ÜS	58	2,5	145	0,65	94	2	98
DEAE	35	0,5	17,5	3,5	61	11	64
Ni-NTA	20	0,4	8	7	56	22	58
HA	15	0,1	1,5	7,5	11	23,5	11,5

Tab. 3.2: Reinigung der rekombinanten humanen NAD⁺-Kinase. NAD⁺-Kinase wurde in *E. coli* M15 durch vierstündige IPTG-Induktion überexprimiert. 2,5 l einer solchen Bakterienkultur wurden abzentrifugiert, mit der *French Press* aufgeschlossen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand (Zellysat) wurde einer Hitzedenaturierung (60 °C-ÜS), einer Anionenaustauscher-Chromatographie (DEAE), einer Nickel-NTA-Chromatographie (Ni-NTA) und einer Hydroxylapatit-Chromatographie (HA, FPLC), unterzogen. Units sind definiert als μmol synthetisiertes NADP⁺ pro Minute und mg Protein.

Wie schon bei der Reinigung des endogenen Enzyms aus Rinderleber traten auch bei der Reinigung des humanen rekombinanten Enzyms Schwierigkeiten bei dem Versuch auf, homogenes Material zu erhalten. Im SDS-PAG konnten Verunreinigungen detektiert werden (Abb. 3.10), was besonders für die Produktion von Antikörpern und deren Reinigung problematisch war. Darüber hinaus waren nach einer Hydroxylapatit-Chromatographie starke Verluste (etwa 4/5 der Aktivität) zu verzeichnen.

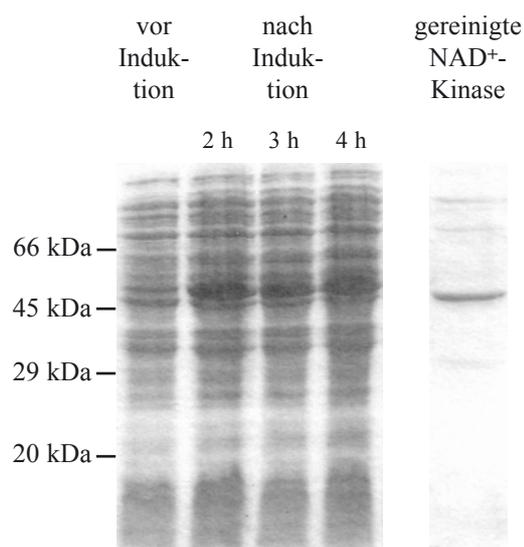


Abb. 3.10: Reinigung der rekombinanten humanen NAD⁺-Kinase. NAD⁺-Kinase wurde in *E. coli* M15 durch IPTG-Induktion überexprimiert und nacheinander über eine DEAE-, Nickel-NTA und Hydroxylapatitsäule gereinigt. Die Fraktionen vor und nach Induktion und die gereinigte NAD⁺-Kinase wurden auf ein SDS-PAG aufgetragen und mit Coomassie Blue gefärbt.

Zur alternativen Reinigung der NAD⁺-Kinase wurden Konstrukte hergestellt, die das rekombinante Enzym mit einem C-terminalen *Tag* ausstatten sollten. Außerdem wurden N-terminal verkürzte Fragmente der NAD⁺-Kinase in den pQE-30-Vektor kloniert, um so einer Fragmentierung zu entgehen und den 6 x Histidin-*Tag* am Protein zu erhalten. Hierbei wurde zunächst die konservierte Domäne der NAD⁺-Kinase (Aminosäure 169-408, Abb. 3.4) kloniert. Weiterhin wurden NAD⁺-Kinase-Fragmente, die N-terminal um 64, 115 und 168 Aminosäuren verkürzt waren, in den pQE-30-Vektor kloniert.

Die Expression der NAD⁺-Kinase mit einem C-terminalen *Tag* war nicht möglich. Weder ließ sich die Überexpression eines entsprechenden Proteins im SDS-PAG nachweisen, noch war eine Aktivität zu detektieren.

Die verschiedenen Verkürzungskonstrukte ließen dagegen eine starke Expression des jeweiligen Proteins zu, wie sich anhand einer SDS-PAGE feststellen ließ (Abb. 3.11). Eine enzymatische Aktivität war allerdings nur im Falle der N-terminal um 64 Aminosäuren verkürzten NAD⁺-Kinase detektierbar. Die konservierte Domäne und die N-terminal um 115 bzw. um 168 Aminosäuren verkürzten NAD⁺-Kinase-Fragmente waren vermutlich unlöslich.

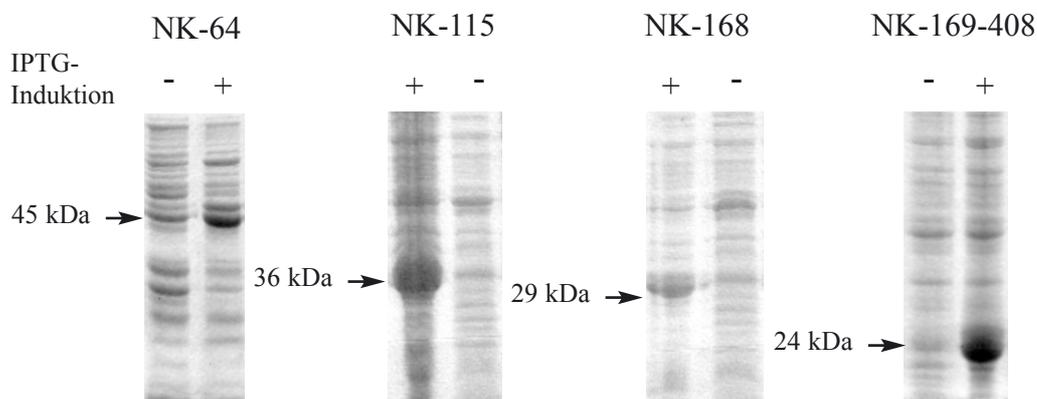


Abb. 3.11: Überexpression der NAD⁺-Kinase-Verkürzungskonstrukte in *E. coli*. Die cDNA der N-terminal um 64 (43 kDa), 115 (38 kDa) und 168 (32 kDa) verkürzten NAD⁺-Kinase und die cDNA der konservierten Domäne (Aminosäuren 169-408, 27 kDa) wurden in den pQE 30-Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* JM109 transformiert. Durch IPTG-Zugabe (2 mM Endkonzentration) wurde die Überexpression der Proteine induziert. Vor Induktion sowie 4 h nach Induktion wurden Bakterienzellen abgenommen, in SDS-Probenpuffer lysiert und auf ein SDS-PAG aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt.

Die um 64 Aminosäuren verkürzte NAD⁺-Kinase ließ sich schließlich in einem Schritt über eine Nickel-NTA-Chromatographie bis zur Homogenität reinigen. Die Ausbeute lag bei etwa 10 mg gereinigtem Protein pro Liter Bakterienkultur. Dieses Protein konnte für die Reinigung von Antikörpern verwendet werden.

3.1.7 Nachweis der humanen NAD⁺-Kinase durch spezifische Antikörper (Western-Blot)

Zur Generierung von Antikörpern in Kaninchen wurde angereicherte rekombinante Vollängen-NAD⁺-Kinase verwendet. Den Kaninchen wurden zweimal im Abstand von 30 Tagen jeweils 200 µg des angereicherten Proteins intravenös verabreicht. 100 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die Kaninchen ausgeblutet, und das Serum wurde gegen gereinigte immobilisierte N-terminal um 64 Aminosäuren verkürzte NAD⁺-Kinase gereinigt.

Für einen Western Blot wurden 100 µg Protein aus HeLa-S3-Gesamtzellextrakt pro Spur eines SDS-PAG aufgetragen, die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und mit den gereinigten Antikörpern hybridisiert (Abb. 3.12).

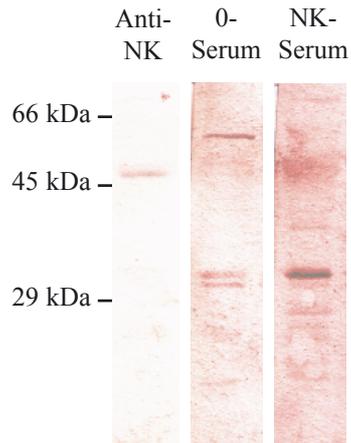


Abb. 3.12: Nachweis der humanen endogenen NAD⁺-Kinase im Western Blot. HeLa-S3-Gesamtzellextrakt (100µg pro Spur) wurde nach Auftrennung auf einem SDS-PAG auf Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Blot wurde mit Magermilch blockiert und dann entweder mit dem Serum der mit humaner NAD⁺-Kinase immunisierten Kaninchen (NK-Serum) oder mit dem Serum nicht-immunisierten Kaninchen (0-Serum) oder mit gereinigtem NAD⁺-Kinase-Antikörper aus Kaninchenserum (Anti-NK) inkubiert, anschließend mit Anti-Kaninchen-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase inkubiert und dann wie unter Material und Methoden beschrieben entwickelt.

Mit Hilfe des Serums der immunisierten Kaninchen konnte bereits ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 50 kDa nachgewiesen werden, das mit Serum nicht-immunisierter Tiere nicht zu detektieren war. Dieses Protein war mit den gegen die humane NAD⁺-Kinase gereinigten Antikörpern noch deutlicher zu detektieren.

3.1.8 Zelluläre Lokalisation der humanen NAD⁺-Kinase

Um die zelluläre Lokalisation der humanen NAD⁺-Kinase zu ermitteln wurden die gereinigten Antikörper gegen die humane NAD⁺-Kinase aus Kaninchen für einen immunocytochemischen Nachweis verwendet. Humane Zellen (Hek-293, HeLa-S3, Wi-38) wurden zu diesem Zweck fixiert und mit dem gereinigten NAD⁺-Kinase-Antikörper hybridisiert. Alle untersuchten Zellen wiesen eine cytosolische Anfärbung durch den NAD⁺-Kinase-Antikörper auf. Die Färbung der Zellen erwies sich allerdings als so schwach, daß eine Dokumentation nicht möglich war.

Für einen eindeutigeren Nachweis wurde daher eine Überexpression der NAD⁺-Kinase in humanen Zellen vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde die NAD⁺-Kinase-cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert, der das Enzym mit einem N-terminalen "FLAG-Tag", ausstattete. HeLa-S3-Zellen wurden mit diesem Konstrukt transfiziert und für einen Immunfluoreszenznachweis mit einem Antikörper hybridisiert, der spezifisch gegen das FLAG-Epitop gerichtet war (Abb. 3.13).

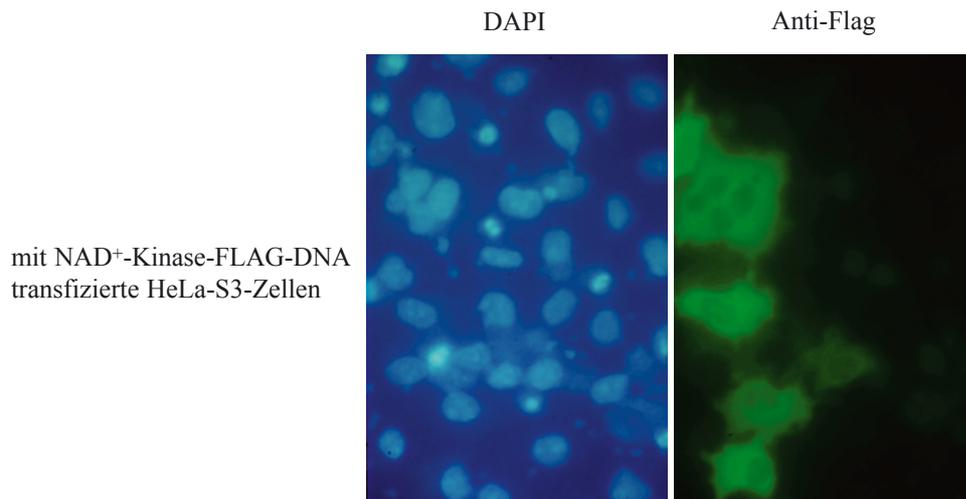


Abb. 3.13: Zelluläre Lokalisation der eukaryotisch exprimierten, FLAG-markierten NAD⁺-Kinase in HeLa-S3-Zellen. HeLa-S3-Zellen wurden mit dem FLAG-NAD⁺-Kinase-Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden nach einer Expressionszeit von 16 h mit Methanol fixiert und mit 10 Prozent FCS blockiert. Die Zellen wurden nacheinander mit einem Antikörper gegen das Flag-Epitop, mit FITC gekoppeltem sekundärem Antikörper gegen Maus und mit DAPI inkubiert. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

Die mit der NAD⁺-Kinase-FLAG-cDNA transfizierten Zellen wiesen eine cytosolische Färbung durch den Antikörper gegen das Flag-Epitop auf. Solche Zellen, die mit dem leeren Flag-Vektor transfiziert wurden, wiesen unter den gleichen Bedingungen keinerlei Färbung auf.

3.1.9 Molekulargewichtsbestimmung der nativen NAD⁺-Kinase mittels Gelfiltration

Bevor eine Klonierung der humanen NAD⁺-Kinase möglich war, wurde das Molekulargewicht der endogenen NAD⁺-Kinase aus Rinderleber durch Größenausschlusschromatographie abgeschätzt. Eine durch DEAE-Anionenaustauscherchromatographie (Tab.3.1) angereicherte NAD⁺-Kinase-Fraktion wurde zu diesem Zweck mittels Ammoniumsulfatfällung konzentriert, auf eine zuvor geeichte Sephadex G-200-Gelfiltrationssäule aufgetragen und eluiert. Enzymatisch aktive Fraktionen wurden in einem Größenbereich von 200-220 kDa detektiert. Hierbei war jedoch nicht klar, aus wievielen Untereinheiten sich dieses Enzym zusammensetzt, da die molekulare Masse einer einzelnen Untereinheit nicht bekannt war.

Um einen Vergleich der hier untersuchten rekombinanten humanen NAD⁺-Kinase mit dem endogenen Enzym aus Rinderleber vorzunehmen und um die Zusammensetzung des nativen humanen Proteins zu ermitteln, wurde erneut eine Gelfiltration durchgeführt. Zur besseren Reproduzierbarkeit wurde hierfür eine Superdex-200 HR 10/30-Säule verwendet, die an eine FPLC-Anlage angeschlossen war. Das gereinigte rekombinante Enzym (Tab. 3.2) und das endogene Enzym aus Rinderleber (s. o.) wurden auf die zuvor geeichte Säule aufgetragen.

Das rekombinante Enzym wies eine molekulare Masse von etwa 190 kDa auf, was eine Zusammensetzung des aktiven Enzyms aus vier Untereinheiten nahelegt. Die Analyse des Enzyms aus Rinderleber auf der gleichen Säule zeigte eine Elution im nahezu gleichen Elutionsvolumen wie das rekombinante Enzym (Abb.3.14).

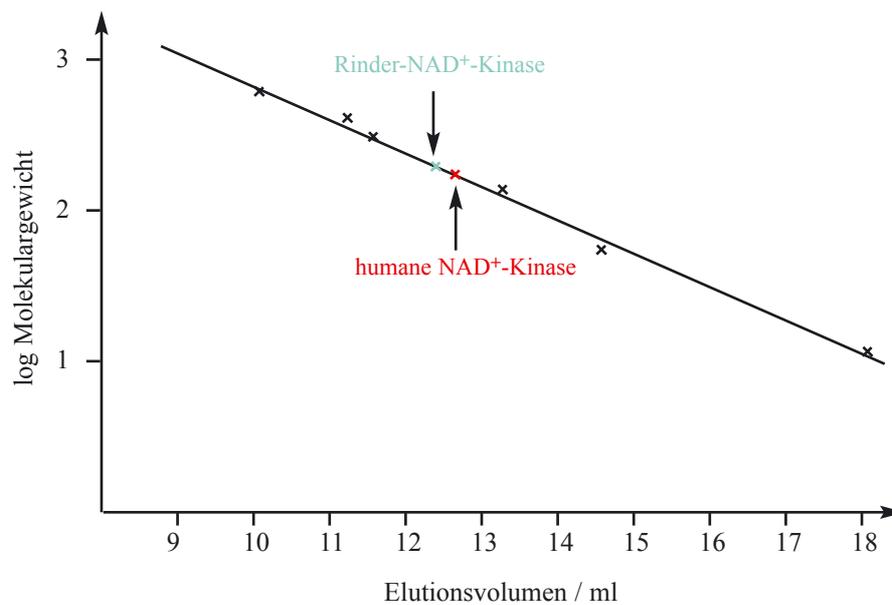


Abb. 3.14: Molekulargewichtsbestimmung der NAD⁺-Kinase durch Größenausschlußchromatographie. Eine Superdex-200 HR 10/30-Säule wurde mit Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Glutamat-Dehydrogenase (336 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa), BSA (67 kDa) und Cytochrom C (12,3 kDa) geeicht. Humane rekombinante NAD⁺-Kinase (Nickel-NTA-Fraktion, 0,4 mg/3 U, Tab. 3.2) und endogene Rinder-NAD⁺-Kinase (DEAE-Fraktion 3,5 mg/0,1 U, Tab. 3.1) wurden auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Das Elutionsvolumen wurden durch die Messung der NAD⁺-Kinase-Aktivität bestimmt.

Zu keinem anderen Elutionszeitpunkt konnte eine NAD⁺-Kinase-Aktivität im Eluat gemessen werden. Das galt sowohl unter Niedrigsalzbedingungen (10-150 mM NaCl) als auch unter Hochsalzbedingungen (1 M NaCl) sowie unabhängig von der Anwesenheit von DTT (5 mM).

3.1.10 Proteinchemische und enzymkinetische Charakterisierung der NAD⁺-Kinase

Um eine Charakterisierung der NAD⁺-Kinase, insbesondere des endogenen oder transfizierten Enzyms, aus humanen Zellen zu ermöglichen, wurde eine systematische Optimierung der Reaktionsbedingungen vorgenommen. Hierfür wurde das Enzym, wie unter 3.1.6 (Tab. 3.2) beschrieben gereinigt und die Aktivität der NAD⁺-Kinase mit Hilfe des photometrischen Assays detektiert und quantifiziert, wobei folgende Eigenschaften des Enzyms beobachtet wurden:

Die NAD⁺-Kinase ist in ihrer Aktivität auf die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen angewiesen. Die optimale Konzentration an Magnesiumionen liegt bei 10 mM im Reaktionsansatz. Das Magnesium kann durch andere zweiwertige Ionen wie Zink, Mangan, Calcium oder Kobalt ersetzt werden. Zink und Mangan stimulieren das Enzym, während Kobalt und Calcium eine verminderte Aktivität hervorrufen (Tab. 3.4). Kupfer und Nickel können das Magnesium dagegen nicht ersetzen.

Kation	Relative Aktivität (%)
Mg ²⁺	100
Zn ²⁺	350
Mn ²⁺	290
Co ²⁺	70
Ca ²⁺	28

Tab. 3.3: Einfluß zweiwertiger Kationen auf die Aktivität der NAD⁺-Kinase. Die Aktivität der NAD⁺-Kinase wurde mit einem photometrischen Test in Gegenwart von 1 mM des jeweiligen Kations gemessen. Die angegebene relative Aktivität bezieht sich auf die Aktivität der NAD⁺-Kinase in Gegenwart von 1 mM Magnesium.

Die NAD⁺-Kinase erwies sich als relativ stabil gegen Hitze. Das Temperaturoptimum des Enzyms lag bei 55 °C. Ein signifikanter Aktivitätsverlust (50 Prozent) konnte erst nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei 80 °C detektiert werden.

Das pH-Optimum der NAD⁺-Kinase lag bei 7,5 (7,0-7,7), wobei sich das Enzym als relativ stabil gegenüber basischen und relativ labil gegenüber sauren pH-Werten erwies. Bezogen auf die bei einem pH-Wert von 7,5 gemessene Aktivität der NAD⁺-Kinase waren bei einem pH-Wert von 10,3 noch 60 Prozent der Aktivität, bei einem pH-Wert von 6,0 nur noch 30 Prozent der Aktivität meßbar.

Die Aktivität der NAD⁺-Kinase ist weitgehend unabhängig von der Salzkonzentration. Sowohl unter Niedrigsalz-Bedingungen (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) als auch in konzentrierten Salzlösungen (60 Prozent Ammoniumsulfat-Sättigung, 4 M KCl) war die NAD⁺-Kinase ohne Aktivitätsverlust meßbar verglichen mit der Aktivität des Enzyms bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM.

Weiterhin wurden die Substrataffinitäten der NAD⁺-Kinase gegenüber NAD⁺ und ATP bestimmt. Hierbei ergab sich ein K_M für ATP von 3,3 mM und ein K_M für NAD⁺ von 0,54 mM. Die spezifische Aktivität (V_{max}) des Enzyms betrug 7,5 µmol/ min x mg Protein (Tab. 3.4).

K _{M(ATP)}	3,3 mM
K _{M(NAD)}	0,54 mM
V _{max}	7,5 µmol/min x mg
T.-Optimum	55 °C
pH-Optimum	7,5
optim. Mg-Konz.	10 mM

Tab. 3.4: Eigenschaften der humanen NAD⁺-Kinase. Zur Messung und Quantifizierung der NAD⁺-Kinase-Aktivität wurde der photometrische Test angewendet. Das pH-Optimum wurde im pH-Bereich von 5-7,5 mit 100 mM Mes/HCl, und im pH-Bereich von 7,0-10,5 mit 100 mM Tris/HCl bestimmt. Die K_M-Werte wurden bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C ermittelt.

3.1.11 Substratspezifität der NAD⁺-Kinase

Wie einleitend beschrieben bestand eines der wichtigsten Ziele dieser Arbeit darin zu klären, ob NAD⁺-Kinase neben ihrem bekannten Substrat NAD⁺ auch das Stoffwechselintermediat NAAD⁺ als Phosphatgruppenakzeptor toleriert und somit als Synthesenzym des Calcium-Mediators NAADP⁺ in Frage kommt. Daher wurde die rekombinante humane NAD⁺-Kinase mit NAAD⁺ und ATP inkubiert, eine mögliche Phosphorylierung des NAAD⁺ wurde durch eine Nukleotidtrennung mittels HPLC-Anionenaustauscherchromatographie untersucht.

Durch die Verwendung von Standardnukleotiden wurden die Elutionszeiten von NAD⁺, NAAD⁺, NADP⁺, NAADP⁺ und ATP ermittelt, die als Nachweis für diese Nukleotide dienen. Zunächst wurde NAD⁺-Kinase mit NAD⁺, ATP und Magnesium inkubiert. Das hierbei entstehende NADP⁺ konnte nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Als nächstes wurde NAD⁺-Kinase mit NAAD⁺ und ATP ebenfalls für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Synthese von NAADP⁺ konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit oder eine Variation der Substratkonzentration führte nicht zu einer NAADP⁺-Synthese durch rekombinante humane NAD⁺-Kinase.

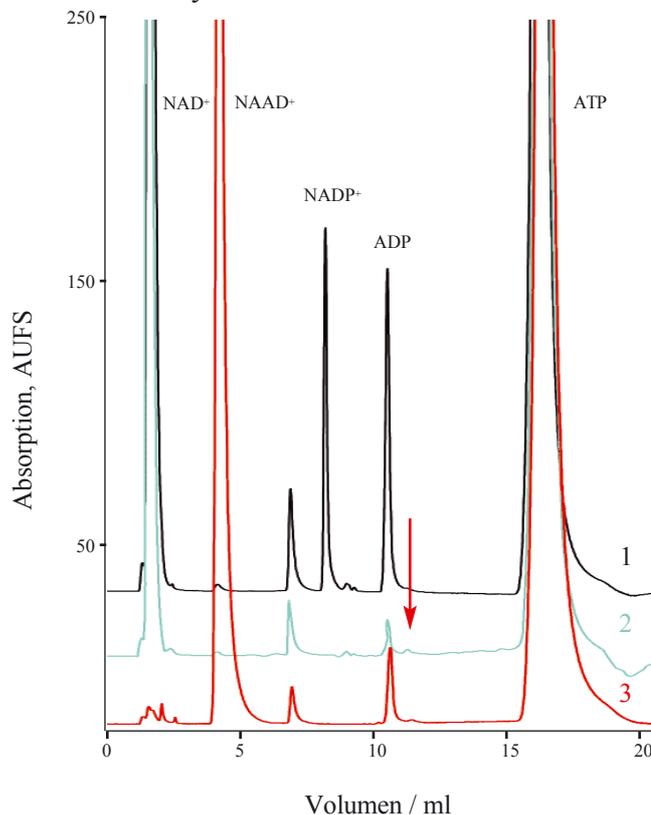


Abb. 3.15: Humane rekombinante NAD⁺-Kinase weist keine NAAD⁺-Kinase-Aktivität auf. 0,03 U rekombinante NAD⁺-Kinase wurden in Gegenwart von 5 mM ATP und 1 mM NAD⁺ bzw. 1 mM NAAD⁺ 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Graph 1 (schwarz) zeigt die Reaktion mit NAD⁺, Graph 3 (rot) die mit NAAD⁺, Graph 2 (grün) zeigt die Reaktion mit NAD⁺ zum Zeitpunkt Null. Der Pfeil zeigt die Standardelutionszeit von NAADP⁺.

Neben NAAD⁺ wurden weitere NAD⁺-Analoga zusammen mit NAD⁺-Kinase, ATP und Magnesium inkubiert. Die Ansätze wurden mittels HPLC-Anionenaustauscher-Chromatographie untersucht. Es konnte mit keinem der angebotenen NAD⁺-Analoga eine Phosphorylierungsreaktion detektiert werden (Tab. 3.5). Weiterhin wurde mit Hilfe eines photometrischen Assays getestet, ob eines der Substratanaloga eine hemmende Wirkung auf die NAD⁺-Kinase-Aktivität hat, und es wurde die Phosphorylierung von NAD⁺ durch dATP bzw. GTP untersucht (Tab.3.5). dATP wurde dabei im Gegensatz zu GTP als Phosphatgruppendonor akzeptiert.

Nukleotid	Relative Aktivität	Inhibition (%)
GTP	7	0
dATP	103	0
3-Acetylpyridin-adeninukleotid	n. d.	30
3-Aldehydpyridin-adeninukleotid	n. d.	32
NAAD ⁺	n. d.	37
Nicotinamid-guaninukleotid	n. d.	23
Nicotinamidhypoxanthinukleotid	n. d.	24
ADP-Ribose	n. d.	0

Tab. 3.5: Substratspezifität der humanen rekombinanten NAD⁺-Kinase. Humane NAD⁺-Kinase wurde mit verschiedenen NAD⁺- und ATP Substratanaloga inkubiert. Die Aktivität wurde im Fall von NAD⁺-Analoga (1 mM) mittels HPLC und im Fall von ATP-Analoga (5 mM) mit dem photometrischen Aktivitätstest untersucht. Die Hemmung der NAD⁺-Kinase-Aktivität in Gegenwart von NAD⁺-Analoga (1 mM) wurde ebenfalls mit dem photometrischen Test untersucht. *n.d.* = nicht detektierbar

3.2 Molekular- und zellbiologische Charakterisierung der NMNAT

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der NMNAT. Dieses Protein war in unserer Arbeitsgruppe aus humaner Plazenta bis zur Homogenität gereinigt worden. Durch eine massenspektroskopische Analyse von tryptischen Peptiden des gereinigten Proteins war es erstmals möglich gewesen Aminosäuresequenzen des humanen Proteins zu erhalten. Mit Hilfe dieser Daten konnte eine vollständige cDNA-Sequenz ermittelt werden. Diese cDNA wurde in unserer Arbeitsgruppe in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-30 kloniert und die humane NMNAT in *E. coli* funktionell überexprimiert. Ebenso wurde die Reinigung des rekombinanten Enzyms bis zur Homogenität durch eine Nickel-NTA-Chromatographie über den N-terminalen 6 x Histidin-Tag in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Schweiger et al., 2001). Das gereinigte Protein wurde zur Herstellung von Antikörpern verwendet. Außerdem wurde gereinigte NMNAT verwendet um das Protein zu kristallisieren und Kristallstrukturdaten zu erhalten.

3.2.1 Nachweis der NMNAT durch spezifische Antikörper, zelluläre Lokalisation

Für einen Nachweis der humanen NMNAT im Western Blot und um eine zellbiologische Untersuchung des Enzyms zu ermöglichen, wurden die Seren der mit humaner rekombinanter NMNAT immunisierten Kaninchen gegen das gereinigte, immobilisierte Antigen mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Spezifität der Antikörper wurde im Western Blot überprüft. Hierfür wurden Gesamtzellextrakte aus verschiedenen humanen Zelllinien (Hek-293, HeLa-S3) hergestellt. Die Proteine wurden nach einer SDS-PAGE auf Nitrozellulose transferiert und mit den gereinigten Antikörpern hybridisiert (Abb. 3.16). In humanen Gesamtzellextrakten wurde ein Protein spezifisch angefärbt, das im SDS-Gel ebenso wie das rekombinante Protein eine molekulare Masse von etwa 33 kDa aufwies.

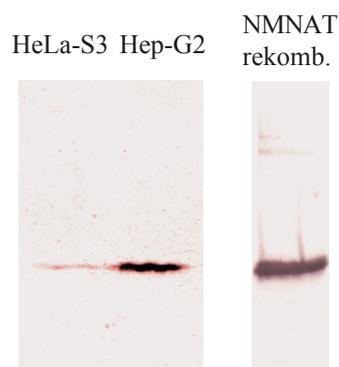


Abb. 3.16: Nachweis der endogenen humanen NMNAT durch spezifische Antikörper. Gesamtzellextrakte aus HeLa-S3- und Hep-G2-Zellen wurden nach Auftrennung auf einem SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Blot wurde mit Magermilch blockiert, nacheinander mit gereinigtem NMNAT-Antikörper aus Kaninchenserum und Anti-Kaninchen-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase inkubiert und anschließend wie unter Material und Methoden beschrieben entwickelt.

Eine Hybridisierung mit den gereinigten Antikörpern wurde darüber hinaus mit Kernextrakten aus humanen Zellen durchgeführt. Aus der Literatur gab es Hinweise auf eine Kernlokalisierung der NMNAT. Die Analyse der Primärstruktur des humanen Proteins mit dem Programm PSORT zeigte ein mögliches Kernlokalisierungssignal (NLS) in dem Bereich der Aminosäuren 122-129 an. Um die subzelluläre Lokalisation der humanen NMNAT zu überprüfen, wurde daher zunächst eine Kernextraktion aus verschiedenen humanen Zelllinien (Wi-38, HeLa-S3) durchgeführt. Die Proteine der Kernextrakte und die Proteine der Überstände der Kernextraktion wurden einer SDS-PAGE unterzogen, nachfolgend auf Nitrozellulose transferiert und mit dem gereinigten Antikörper gegen humane NMNAT aus Kaninchen hybridisiert (Abb. 3.17 A). Die humane NMNAT war ausschließlich in den Kernextrakten detektierbar. Einen weiteren Hinweis für die zelluläre Lokalisation der NMNAT lieferte eine Immunocytochemische Analyse. Humane Zellen (Hep-G2, Wi-38) wurden fixiert und anschließend mit dem gereinigten NMNAT-Antikörper und einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper hybridisiert. Alle getesteten Zellen zeigten eine alleinige Anfärbung des Kerns, die mit der DAPI-Färbung übereinstimmte.

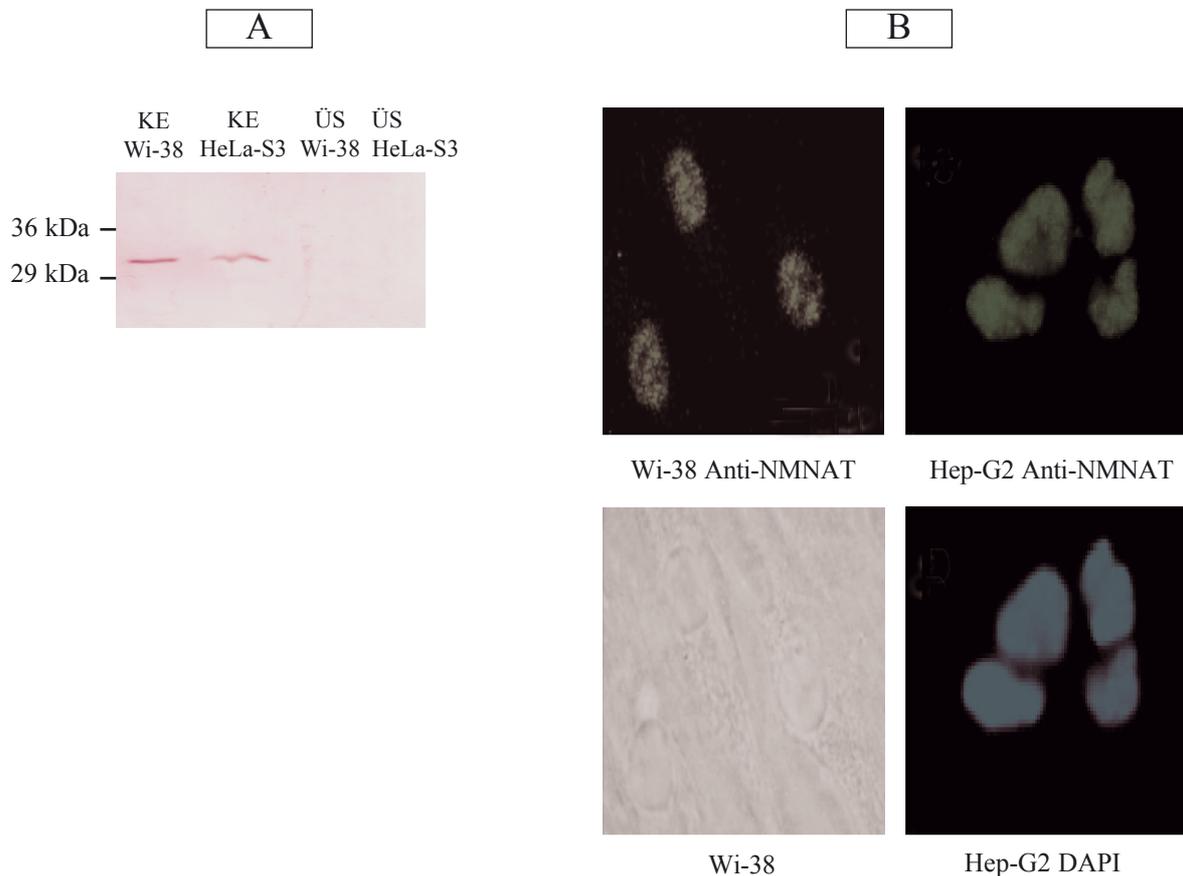


Abb. 3.17: Zelluläre Lokalisation der humanen NMNAT.

A: Aus Wi-38 und HeLa-S3-Zellen wurden Kernextrakte präpariert. Jeweils 100 µg Kernextrakt (KE) und 100 µg des Überstands aus der Kernextraktion (ÜS) wurden nach einer SDS-PAGE auf Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Blot wurde mit Magermilch blockiert, nacheinander mit gereinigtem NMNAT-Antikörper aus Kaninchenserum und Anti-Kaninchen-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase inkubiert und anschließend wie unter Material und Methoden beschrieben entwickelt.

B: Humane Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit 10 Prozent FCS blockiert. Die Zellen wurden nacheinander mit gereinigtem NMNAT-Antikörper aus Kaninchenserum, mit FITC gekoppeltem sekundärem Antikörper gegen Kaninchen und mit DAPI inkubiert. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

3.2.2 Die Phosphorylierung der NMNAT

Um Hinweise auf einen Regulationsmechanismus der NMNAT zu erhalten, wurde die Aminosäuresequenz des Proteins mit einem Vorhersageprogramm für Phosphorylierungsstellen (NetPhos) untersucht. Es wurden drei Serinreste mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ($> 0,98$) für eine Phosphorylierung angezeigt. Zwei dieser drei Serinreste befanden sich in unmittelbarer Nähe der NLS der NMNAT.

Die Sequenz wurde außerdem auf Konsensussequenzen verschiedener Kinasen hin untersucht. Hierbei ergab sich, daß eine der drei potentiellen Phosphorylierungsstellen innerhalb einer Konsensussequenz für die Proteinkinase C (PKC) lag und zwei innerhalb einer Konsensussequenz für die Caseinkinase II (CK II) (Abb. 3.18).

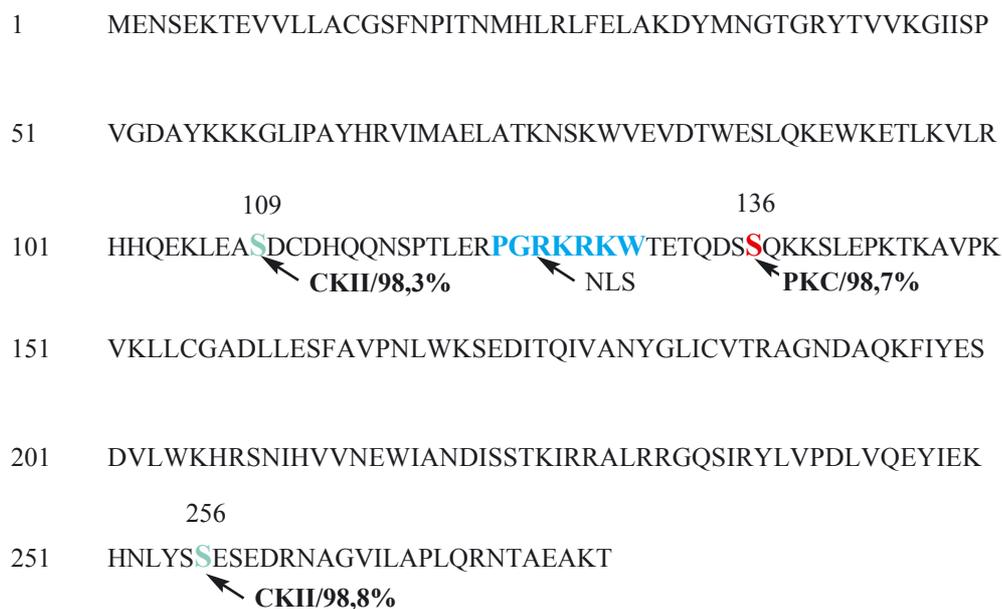


Abb. 3.18: Computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz der humanen NMNAT. Ein Abgleich der Aminosäure-Sequenz der humanen NMNAT mit den Programmen PSORT und NetPhos ergab eine NLS (Aminosäuren 122-128) und drei potentielle Phosphorylierungsstellen mit hoher (> 98 Prozent) Wahrscheinlichkeit. Die Serinreste an den Positionen 109 und 256 (grün) sind potentielle Phosphorylierungsstellen der CK II. Der Serinrest 136 ist eine potentielle Phosphorylierungsstelle der PKC. Die putative NLS ist blau unterlegt.

Insgesamt wurden bei der Analyse der Primärstruktur der NMNAT mit dem Vorhersageprogramm NetPhos zehn Serin- (Wahrscheinlichkeit: 0,59-0,988), fünf Threonin- (0,59-0,898) und zwei Tyrosinreste (0,56-0,86) als mögliche Phosphorylierungsstellen angegeben.

3.2.2.1 Phosphorylierung der NMNAT *in vitro*

Um eine Phosphorylierung experimentell zu bestätigen, wurde zunächst eine *in vitro*-Phosphorylierung durchgeführt. Rekombinante NMNAT wurde hierfür mit Kernextrakten aus humanen Zellen und radioaktiv markiertem γ [^{32}P]-ATP inkubiert. Der Ansatz wurde einer SDS-PAGE unterzogen und autoradiographiert (Abb. 3.19). Im Autoradiogramm konnte eine radioaktiv markierte Bande der NMNAT-Proteinbande zugeordnet werden.

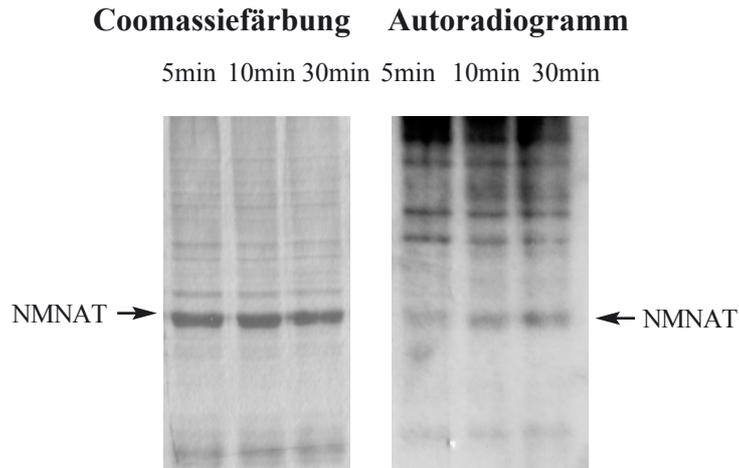


Abb. 3.19: *In vitro*-Phosphorylierung der rekombinanten NMNAT mit Kernextrakten. Humane rekombinante NMNAT (2 µg) wurde mit Kernextrakten aus Wi-38-Zellen (4 µg) und 1 µCi γ [32 P]-ATP in Gegenwart von 100 µM ATP für 5, 10 und 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Ansätze wurden einer SDS-PAGE unterzogen, mit Coomassie Blue gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

Als nächstes sollte diese Phosphorylierung am endogenen Protein nachgewiesen werden. Hierfür wurden Kernextrakte mit γ [32 P]-ATP inkubiert. Die endogene NMNAT wurde nachfolgend durch eine Immunpräzipitation mit dem gereinigten Antikörper gegen humane NMNAT aus Kaninchen von den restlichen Kernproteinen abgetrennt. Das Präzipitat und der Überstand der Immunpräzipitation wurde einer SDS-PAGE unterzogen und autoradiographiert (Abb. 3.20).

Um zu bestätigen, daß es sich bei der beobachteten Modifikation um eine Phosphorylierung handelte, wurden in Kontrollansätzen die Kernextrakte nach der Phosphorylierungsreaktion mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Daraufhin wurde ebenfalls eine Immunpräzipitation durchgeführt, das Präzipitat wurde einer SDS-PAGE unterzogen und autoradiographiert (Abb. 3.20).

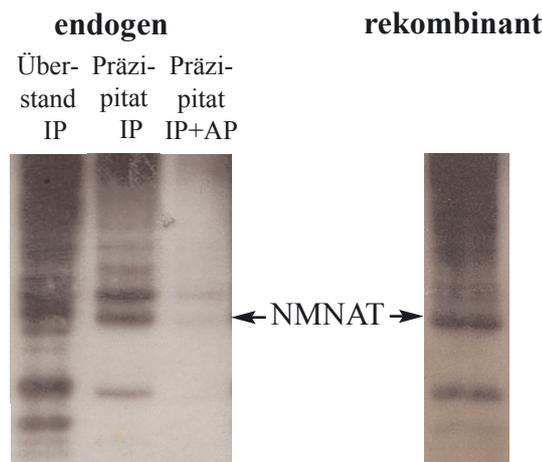


Abb. 3.20: *In vitro*-Phosphorylierung der endogenen NMNAT mit Kernextrakten. Linke Seite: Kernextrakte aus Wi-38-Zellen (50 µg) wurden mit 3 µCi γ [32 P]-ATP in Gegenwart von 100 µM ATP für 30 min bei 30 °C inkubiert. Ein Ansatz wurde nachfolgend für 30 min bei 37 °C mit alkalischer Phosphatase (AP) inkubiert. Die Ansätze wurden immunpräzipitiert. Der Überstand und das Pellet der Immunpräzipitation (IP) und das Pellet der Immunpräzipitation nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase (IP+AP) wurden einer SDS-PAGE unterzogen, mit Coomassie Blue gefärbt, getrocknet und autoradiographiert. Rechte Seite: Phosphorylierung der humanen rekombinanten NMNAT (Abb. 3.19)

Die Ansätze ohne alkalische Phosphatase zeigten im Autoradiogramm eine radioaktiv markierte Proteinbande, deren Lage mit der Bande der rekombinanten NMNAT übereinstimmte. Nach einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase war die radioaktive Markierung kaum noch detektierbar.

Als nächstes sollte untersucht werden, durch welche Proteinkinase eine solche Phosphorylierung der NMNAT katalysiert wird. Die Analyse der Konsensussequenzen der potentiellen Phosphorylierungsstellen wies, wie oben erwähnt, auf die Phosphorylierung der NMNAT durch PKC und CK II hin (Abb. 3.18). Um zu überprüfen, ob die NMNAT durch eine dieser beiden Kinasen phosphoryliert wird, wurde eine *in vitro*-Phosphorylierung der NMNAT mit humaner rekombinanter CK II bzw. PKC aus Rattenhirn vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde NMNAT mit γ [^{32}P]-ATP und jeweils einer der beiden Kinasen inkubiert. Die Ansätze wurden einer SDS-PAGE unterzogen und autoradiographiert (Abb. 3.21). Hierbei konnte eine starke Phosphorylierung der NMNAT durch die PKC aus Rattenhirn im Autoradiogramm detektiert werden. Eine Phosphorylierung der NMNAT durch rekombinante CK II war dagegen nur in sehr geringem Maße detektierbar.

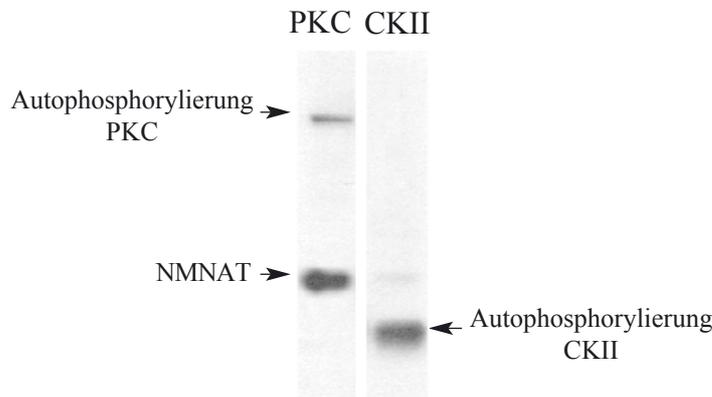


Abb. 3.21: *In vitro*-Phosphorylierung der rekombinanten NMNAT durch PKC und CKII. Humane rekombinante NMNAT (2 μg) wurde mit PKC (20 U, Rattenhirn) bzw. CK II (20 U, human, rekombinant) in Gegenwart von je 1 μCi γ [^{32}P]-ATP und 100 μM ATP für 10 min bei 30 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Ansätze wurden einer SDS-PAGE unterzogen, mit Coomassie Blue gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

Diese Beobachtungen deuteten daraufhin, daß NMNAT durch PKC phosphoryliert wird. Eine Phosphorylierung der NMNAT durch Kernextrakte in Gegenwart des PKC-Inhibitors BIM (Bisindolylmaleimid) oder der PKC-Stimulatoren PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und CaCl_2 sollte diese Vermutung bestätigen.

Rekombinante NMNAT wurde mit Kernextrakten bzw. mit PKC in Gegenwart von γ [^{32}P]-ATP phosphoryliert. Die Phosphorylierung wurde einerseits in Gegenwart von CaCl_2 und PMA und andererseits in Gegenwart von BIM durchgeführt. Die Ansätze wurden einer SDS-PAGE unterzogen und autoradiographiert (Abb. 3.22). Die Abbildung zeigt, daß eine Stimulation der Phosphorylierung der NMNAT durch Kernextrakte bei Zugabe von CaCl_2 und PMA zu beobachten ist. Ebenso konnte eine Hemmung der Phosphorylierung bei Zugabe von BIM beobachtet werden.

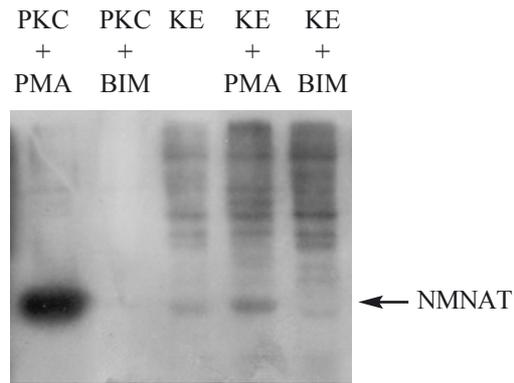


Abb. 3.22: Einfluß von Effektoren auf die *in vitro*-Phosphorylierung der rekombinanten NMNAT mit Kernextrakten. Humane rekombinante NMNAT (2 µg) wurde mit Kernextrakten (KE) aus Wi-38-Zellen (4 µg) und 1 µCi γ [32 P]-ATP in Gegenwart von 100 µM ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Den Ansätzen wurden entweder 2 mM CaCl_2 und 1 µM PMA oder 1 µM BIM zugegeben. Die Ansätze wurden einer SDS-PAGE unterzogen, mit Coomassie Blue gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

3.2.2.2 Phosphorylierung der NMNAT *in vivo*

Um die Relevanz dieser Ergebnisse unter physiologischen Bedingungen zu überprüfen, wurde eine *in vivo*-Phosphorylierung in Gegenwart des spezifischen PKC-Inhibitors BIM durchgeführt. Hierfür wurden Wi-38-Zellen mit [32 P]-Orthophosphat über acht Stunden in phosphatfreiem Medium inkubiert. Das radioaktiv markierte Phosphat sollte dabei in den Zellen zu radioaktiv markiertem ATP umgesetzt und von endogenen Kinasen für eine Phosphorylierung verwendet werden. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit aufgeschlossen, und es wurde eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen humane NMNAT durchgeführt. Das Präzipitat wurde auf ein SDS-PAGE aufgetragen und das Gel wurde autoradiographiert (Abb. 3.23).

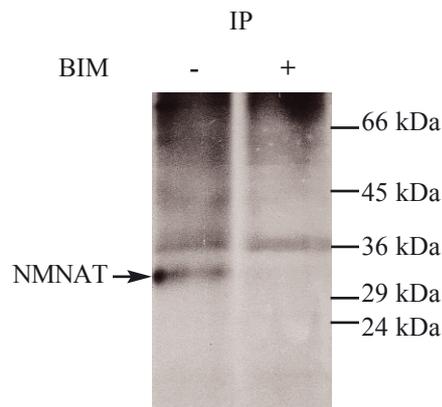


Abb. 3.23: *In vivo*-Phosphorylierung der NMNAT. Wi-38-Zellen wurden in phosphatfreiem Medium mit [32 P]-Orthophosphat inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde 30 min vor Zellyse mit BIM (Endkonzentration 1 µM) behandelt. Die Zellen wurden lysiert und immunpräzipitiert. Die Pellets der Immunpräzipitation (IP) wurden einer SDS-PAGE unterzogen, das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert.

Im Autoradiogramm konnte eine radioaktiv markierte Bande detektiert werden, deren Lage mit der Bande der rekombinanten NMNAT übereinstimmte. Die *in vivo*-Phosphorylierung in Gegenwart des PKC-Inhibitors BIM führte zu einer Inhibition der Phosphorylierung der endogenen NMNAT.

3.2.3 Identifizierung einer Phosphorylierungsstelle der NMNAT

Für die weitere Untersuchung der Phosphorylierung der NMNAT wurde die Identifikation der Phosphorylierungsstelle(n) angestrebt. Hierbei wurde auf Grund der bisher beschriebenen Experimente davon ausgegangen, daß es sich dabei um ein Serin oder Threonin innerhalb einer Konsensussequenz der PKC handelte. Neben der potentiellen PKC-Phosphorylierungsstelle Serin 136 (Abb. 3.18), die als Phosphorylierungsstelle mit hoher Wahrscheinlichkeit angegeben war, wurden in der Aminosäuresequenz der NMNAT noch folgende weitere Phosphorylierungsstellen innerhalb einer Konsensussequenz der PKC (S/T-X-R/K) gefunden: S4, T38, T95, S223, S235.

3.2.3.1 Partielle Verdauung der phosphorylierten NMNAT

Um erste Erkenntnisse über die Lokalisation der Phosphorylierungsstelle zu erhalten, wurde die NMNAT zunächst radioaktiv mit rekombinanter humaner PKC phosphoryliert und dann mit verschiedenen Proteasen verdaut. Hierbei wurden die Bedingungen so gewählt, daß die Konzentration der Proteasen nur für eine partielle Verdauung der NMNAT in große Peptide ausreichte, die sich auf einem SDS-PAG noch auftrennen und mit Coomassie Blue anfärben ließen.

Die Verdauung der zuvor phosphorylierten NMNAT mit den Proteasen AspN, LysC und GluC führte zu einer Spaltung der NMNAT in jeweils ein bis zwei große Proteinfragmente mit einer molekularen Masse von 10-20 kDa. In jedem der Ansätze konnte wies zumindest ein Fragment im Autoradiogramm eine radioaktive Markierung auf (Abb. 3.24). Die partielle Verdauung der NMNAT mit Trypsin zeigte im SDS-PAG ebenfalls die Spaltung der NMNAT in mindestens zwei große Fragmente, die eine molekulare Masse von etwa 15 und 17 kDa aufwiesen. Das Autoradiogramm dieses Gels zeigte, daß nur das etwa 17 kDa große Fragment eine radioaktive Markierung aufwies (Abb. 3.24).

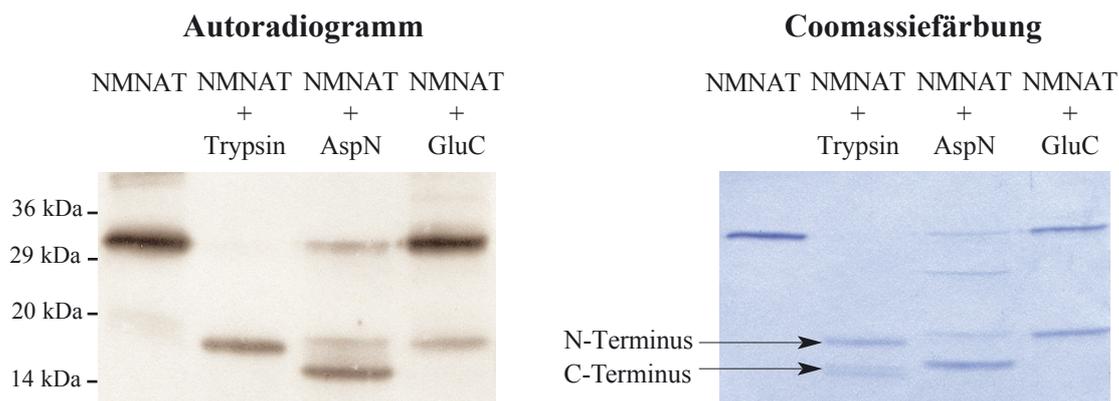


Abb. 3.24: Partielle Verdauung phosphorylierter NMNAT durch verschiedene Proteasen. Rekombinante NMNAT (2 µg) wurde mit PKC (20 U, Rattenhirn) und 1 µCi γ [³²P]-ATP in Gegenwart von 100 µM ATP für 30 min bei 30 °C phosphoryliert und nachfolgend mit Trypsin in einem Verhältnis von 1:100 oder mit AspN in einem Verhältnis von 1:5 oder mit GluC in einem Verhältnis von 1:20 für 1 h bei 37 °C verdaut. Die Proben wurden im SDS-PAG aufgetrennt und autoradiographiert.

Eine N-terminale Sequenzierung der Fragmente nach der partiellen tryptischen Verdauung der NMNAT durch Edmanabbau ergab, daß es sich bei dem radioaktiv markierten Fragment (etwa 17 kDa) um den N-Terminus des Proteins handelte.

Die Sequenzierung des kleineren Fragments (etwa 15 kDa), in dem keine radioaktive Markierung detektierbar war, ergab folgende N-terminale Sequenz: TKAVPKVKLLC. Hierbei handelte es sich um eine interne Sequenz der NMNAT ab Aminosäure 145 (Abb. 3.18).

Da dieses Fragment eine molekulare Masse von > 14 kDa im Vergleich zu dem *Low Molecular weight*-Marker aufwies, handelte es sich hierbei vermutlich um den gesamten C-Terminus der NMNAT ab Aminosäure 145. Innerhalb dieses Teils der NMNAT war demnach keine Phosphorylierung durch die PKC zu detektieren.

Um zu bestätigen, daß sich bei einer Phosphorylierung der NMNAT durch Kernextrakte das gleiche Muster ergibt, wurde rekombinante NMNAT mit Kernextrakten in Gegenwart von γ [³²P]-ATP phosphoryliert und ebenfalls partiell mit Trypsin verdaut. Der Ansatz wurde einer SDS-PAGE unterzogen, das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt, wobei wiederum zwei Peptide von etwa 15 und 17 kDa angefärbt wurden. Im Autoradiogramm war auch diesmal eine radioaktive Markierung ausschließlich in dem größeren Peptid detektierbar (Abb. 3.25).

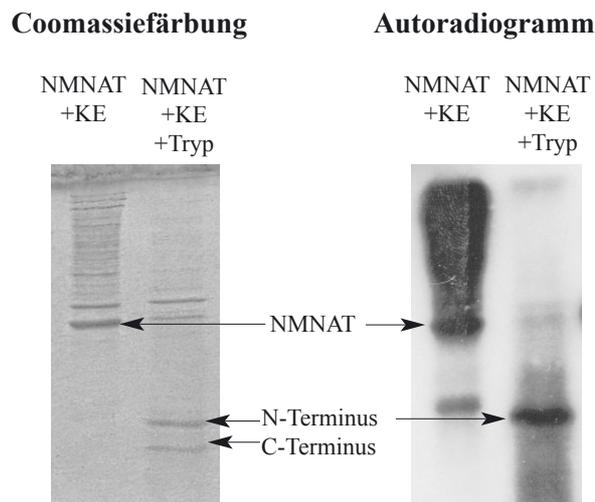


Abb. 3.25: Phosphorylierung der rekombinanten NMNAT mit Kernextrakten und nachfolgende partielle tryptische Verdauung. Humane rekombinante NMNAT (2 μ g) wurde mit Kernextrakten aus HeLa-S3-Zellen (4 μ g) und 1 μ Ci γ [³²P]-ATP in Gegenwart von 100 μ M ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden mit Trypsin (20 ng) für 1 h bei 37 °C verdaut und dann mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Ansätze wurden einer SDS-PAGE unterzogen, mit Coomassie Blue gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

Mit Hilfe dieser Experimente war es möglich die *in vitro*-Phosphorylierung der NMNAT dem N-terminalen Teil des Proteins bis Aminosäure 145 zuzuordnen. Damit konnten zwei potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen (S223 und S235), die sich am C-Terminus des Proteins befinden ausgeschlossen werden.

3.2.3.2 Identifizierung eines Phosphopeptids

Um eine endgültige Identifizierung der Phosphorylierungsstelle(n) der NMNAT zu ermöglichen, wurde das rekombinante Protein mit PKC α in Gegenwart von γ [32 P]-ATP phosphoryliert und anschließend vollständig mit Trypsin verdaut.

Die Peptide dieses Verdaus wurden durch *reverse-phase*-HPLC aufgetrennt und fraktioniert eluiert. Die Elution der Peptide wurde einerseits durch eine Absorptionsmessung bei 214 nm dokumentiert. Andererseits wurden die Fraktionen auf ihre Radioaktivität hin überprüft (Abb. 3.26). Lediglich in zwei aufeinander folgenden Elutionsfraktionen konnte eine signifikante Anreicherung von Radioaktivität nachgewiesen werden.

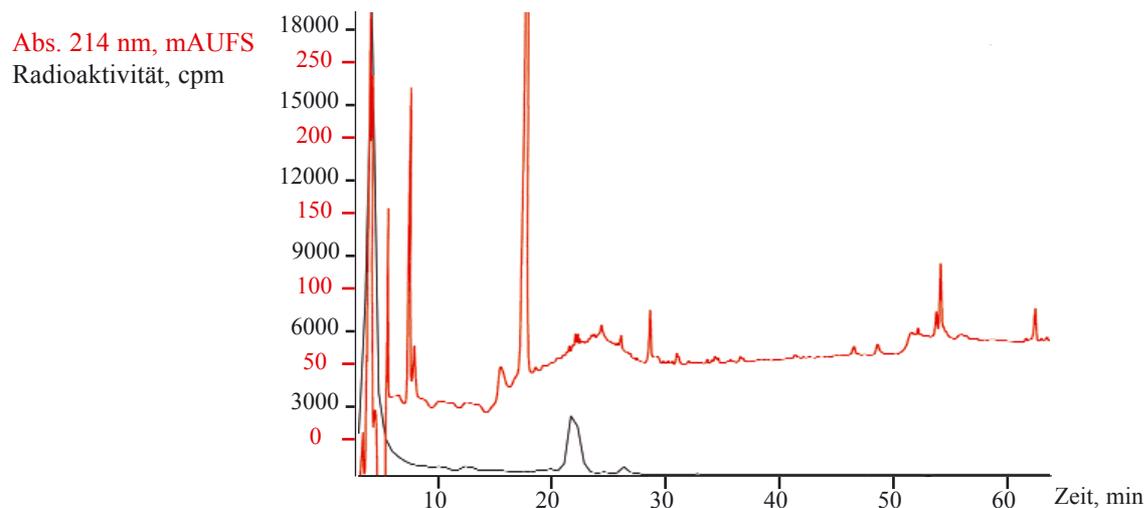


Abb. 3.26: Auftrennung tryptischer NMNAT-Peptide nach Phosphorylierung mit PKC. Humane rekombinante NMNAT (25 μ g) wurde mit PKC α (1 μ g, human, rekombinant) und 20 μ Ci γ [32 P]-ATP in Gegenwart von 250 μ M ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert. NMNAT wurde mit Wasser gefällt und mit Trypsin (2 μ g) für 3 h bei 37 °C verdaut. Die Peptide wurden durch *reverse-phase*-HPLC aufgetrennt. Die Absorption bei 214 nm und die Radioaktivität der Fraktionen wurde im Laufe der Elution gemessen und dokumentiert.

Die beiden Fraktionen, die Radioaktivität enthielten wurden vereinigt, lyophilisiert und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Hierbei konnte eine Masse detektiert werden die der theoretischen Masse eines tryptischen NMNAT-Peptids entsprach. Außerdem wurden zwei Massen detektiert, die den theoretischen Massen tryptischer NMNAT-Peptide mit einer zusätzlichen Masse von 80 entsprachen (Abb. 3.27).

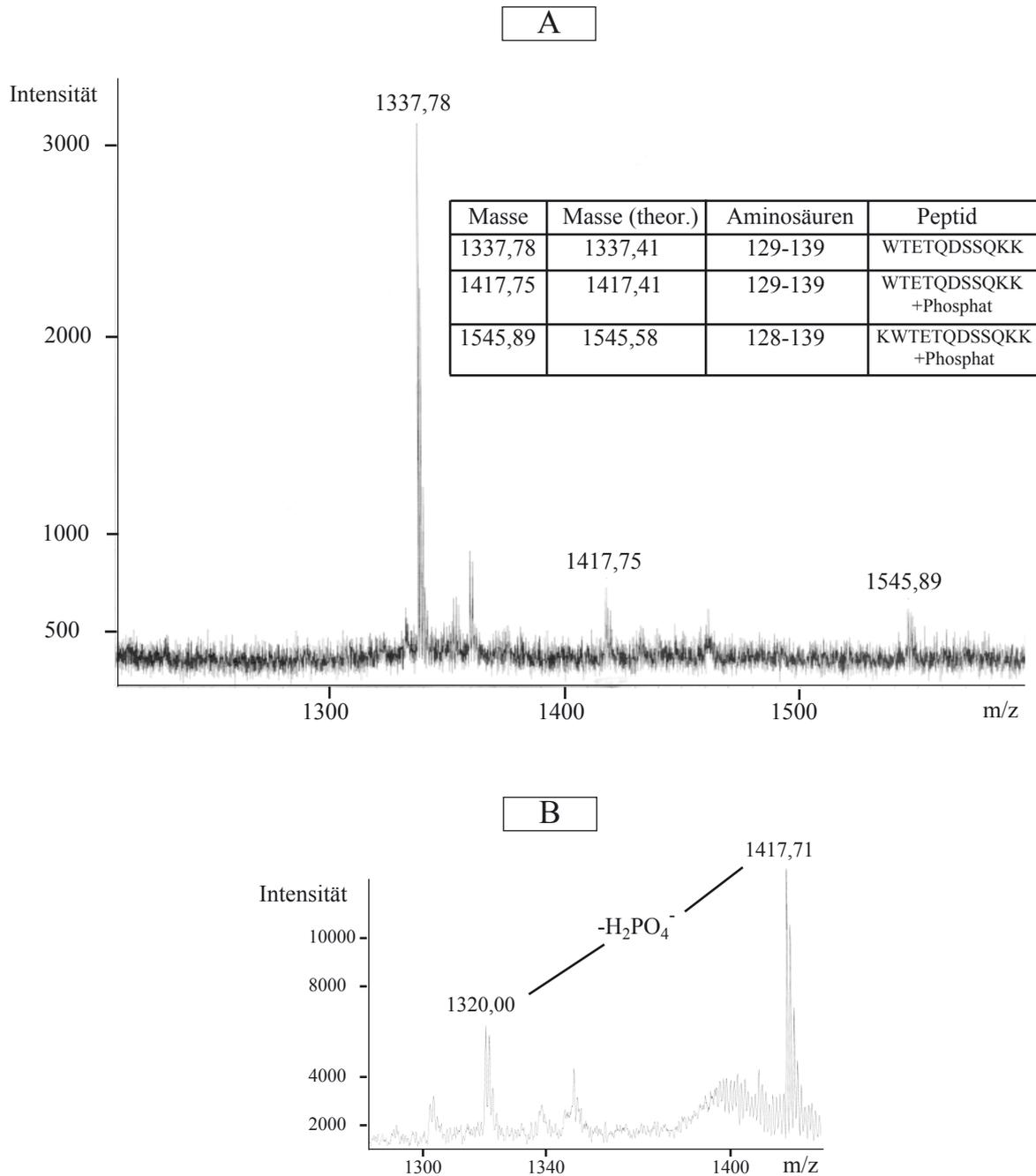


Abb. 3.27: Identifizierung eines NMNAT-Phosphopeptids durch massenspektrometrische Analyse.
A: Humane rekombinante NMNAT wurde mit PKC phosphoryliert und mit Trypsin vollständig verdaut. Die Peptide wurden mittels HPLC aufgetrennt. Radioaktive Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen, wobei die Massen von drei tryptischen NMNAT-Peptiden bzw. NMNAT-Phosphopeptiden detektiert wurden (Tabelle).

B: Das putative Phosphopeptid mit der Masse 1417,75 wurde einer PSD-Analyse unterzogen. Hierbei konnte die für Phosphopeptide charakteristische Abspaltung von Phosphorsäure beobachtet werden.

Die bei der massenspektrometrischen Analyse detektierte Masse von 1337,78 entsprach der theoretisch ermittelten Masse des tryptischen NMNAT-Peptids WTETQDSSQKK (Aminosäuren 129-139). Die Masse 1417,75 entsprach dem gleichen tryptischen NMNAT-Peptid mit einer zusätzlichen Masse von 80. Eine weitere detektierte Masse von 1545,89 entsprach der Masse des NMNAT-Peptids KWTETQDSSQKK (Aminosäuren 128-139) ebenfalls mit der zusätzlichen Masse von 80. Es lag daher nahe, daß es sich bei diesen beiden Peaks um NMNAT-Phosphopeptide handelte.

Es wurde eine Post source decay (PSD)-Analyse mit dem Peak der Masse 1417,75 durchgeführt. Das erhaltene Spektrum war allerdings zu schwach um eine eindeutige Sequenzierung zu ermöglichen (nicht gezeigt). Es war lediglich ein Vergleich mit der vermuteten Sequenz möglich, der einen weiteren Hinweis auf das Peptid WTETQDSSQKK (Aminosäuren 129-139) lieferte.

In dem PSD-Spektrum konnte aber ein Peak der Masse 1320 detektiert werden, der der Masse 1417 abzüglich 97 entspricht (Abb. 3.27 B). Dies entspricht der für Phosphopeptide charakteristischen Abspaltung von Phosphorsäure. Von dem Peak der Masse 1545,89 war eine PSD-Analyse dagegen nicht möglich. Die beiden detektierten Phosphopeptide enthielten die potenzielle PKC-Phosphorylierungsstelle Serin 136.

3.2.3.3 *In vitro*-Phosphorylierung von NMNAT-Mutanten

Auf Grund der beschriebenen Ergebnisse wurde durch gerichtete Mutagenese eine NMNAT-Mutante hergestellt, die an der Position 136 einen Austausch des Serins durch ein Alanin aufwies (NMNAT-S136A). Um eine mögliche Phosphorylierung dieser Region des Proteins vollständig zu unterbinden wurde eine zusätzliche Mutante hergestellt, die sowohl an der Position 136 als auch an der Position 135, an der sich im Wildtyp des Proteins ebenfalls ein Serin befindet, einen Austausch durch ein Alanin aufwies (NMNAT-S135A/S136A). Diese beiden NMNAT-Mutanten wurden in Bakterien überexprimiert und durch eine Nickel-NTA-Chromatographie gereinigt.

Um einen Einfluß des Basenaustauschs an der Position 136 bzw. 135 und 136 auf die Aktivität der NMNAT zu untersuchen wurden die bakteriell überexprimierten Mutanten mit dem photometrischen Test zum Nachweis der NMNAT untersucht. Der Wildtyp und die Mutanten wiesen dabei vergleichbare spezifische Aktivitäten von 28,5 $\mu\text{mol NAD}^+$ pro min x mg (WT) und 27 $\mu\text{mol NAD}^+$ pro min x mg (NMNAT S136A und NMNAT S136/135A) auf. Es wurden daher erhebliche Einflüsse der Mutationen auf die Struktur der Proteine ausgeschlossen.

Mit diesen beiden Mutanten wurde eine *in vitro*-Phosphorylierung sowohl mit rekombinanter humaner PKC als auch mit Kernextrakten aus HeLa-Zellen vorgenommen (Abb. 3.28). Es war eine deutlich verminderte Phosphorylierung der beiden NMNAT-Mutanten sowohl mit rekombinanter PKC als auch mit Kernextrakten zu detektieren.

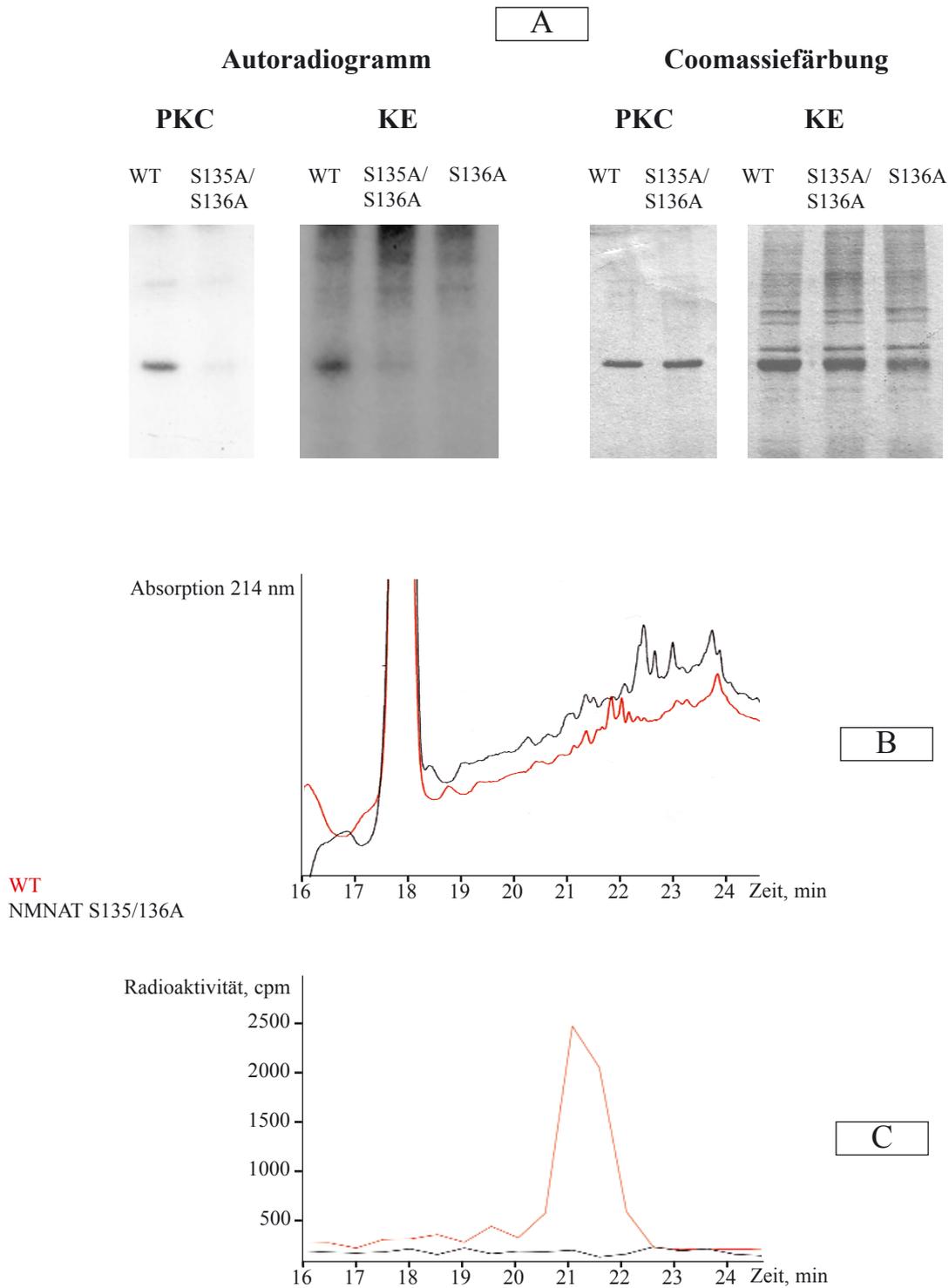


Abb. 3.28: In vitro-Phosphorylierung der NMNAT-Mutanten S136A und S135A/S136A im Vergleich zum Wildtyp.

A: Jeweils 1 µg des NMNAT-Wildtypproteins (WT) und der beiden NMNAT-Mutanten S136A und S135/136A wurden entweder mit rekombinanter PKCα (20 U) oder mit Kernextrakten (KE, 2 µg) aus HeLa-S3-Zellen und 1 µCi γ [³²P]-ATP in Gegenwart von 100 µM ATP für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden einer SDS-PAGE unterzogen, mit Coomassie Blue gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

B und C: 25 µg des NMNAT-Wildtypproteins (WT) und der NMNAT-Mutante S135/136A wurden mit rekombinanter PKCα (500 U) in Gegenwart von 250 µM ATP für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden mit Wasser gefällt und mit Trypsin vollständig verdaut. Die Peptide wurden durch *reverse-phase*-HPLC aufgetrennt. Die Absorption bei 214 nm (**B**) und die Radioaktivität der Fraktionen (**C**) wurde im Laufe der Elution gemessen und dokumentiert.

3.2.4 Analyse möglicher Auswirkungen der Phosphorylierung auf die NMNAT

Auf Grund der Position der Phosphorylierungsstelle in unmittelbarer Nähe der NLS wurde zunächst ein Einfluß der Phosphorylierung auf die Kernlokalisierung der NMNAT vermutet. Um dies zu untersuchen wurden die cDNAs der beiden nicht-phosphorylierbaren Mutanten und die cDNA des Wildtyps in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert, der die Proteine mit einem N-terminalen "FLAG-Tag", ausstattete. HeLa-S3-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert und zur Überprüfung der zellulären Lokalisation mit einem Antikörper hybridisiert, der spezifisch gegen das FLAG-Epitop gerichtet ist (Abb. 3.29).

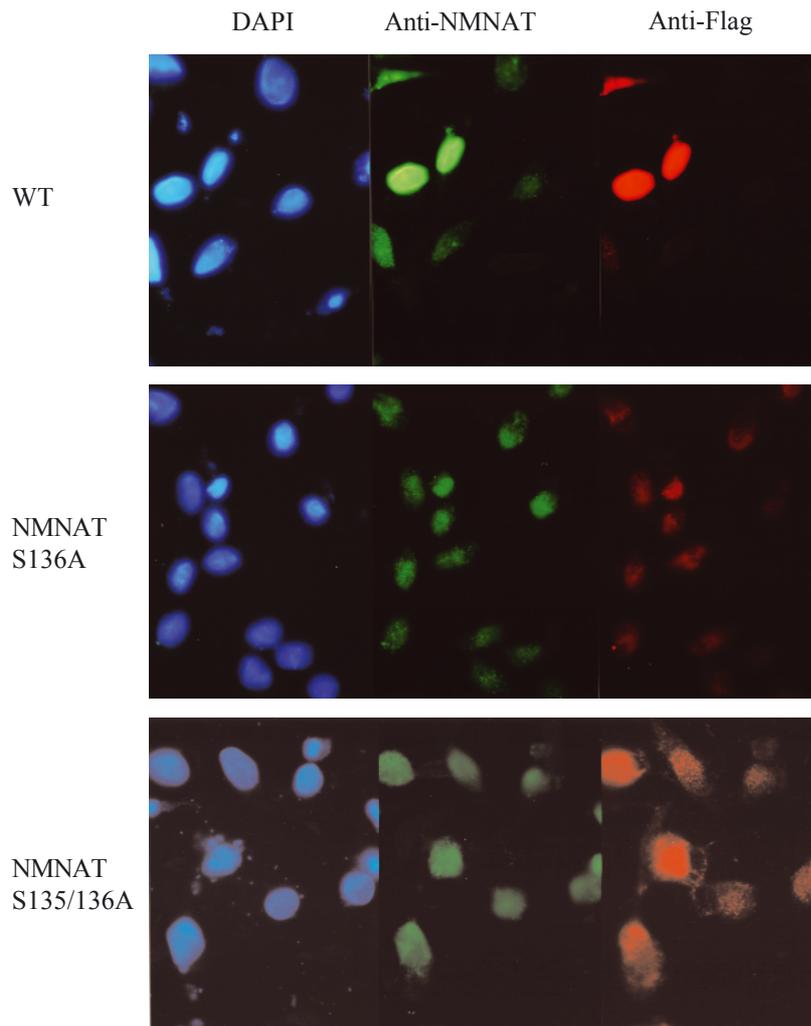


Abb. 3.29: Zelluläre Lokalisation der eukaryotisch exprimierten NMNAT, NMNAT-S136A und NMNAT-S135/136A. HeLa-S3-Zellen wurden mit dem FLAG-NMNAT-Konstrukt oder mit dem FLAG-NMNAT S136A-Konstrukt oder mit dem FLAG-NMNAT-S135/136A-Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden nach einer Expressionszeit von 24 h mit Methanol fixiert und mit 10 Prozent FCS blockiert. Die Zellen wurden nacheinander mit einem Antikörper gegen das Flag-Epitop, mit FITC gekoppeltem sekundärem Antikörper gegen Maus und mit DAPI inkubiert. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

Bei diesem Experiment konnte kein Unterschied der zellulären Lokalisation der NMNAT und der beiden nicht-phosphorylierbaren Mutanten registriert werden.

In einem zweiten Experiment wurden nicht-transfizierte HeLa-S3-Zellen 5 min, 10 min bzw. 1 h mit 1 μ M PMA inkubiert. Hierbei sollte eine verstärkte Phosphorylierung der NMNAT ausgelöst werden. Die Zellen wurden nach einer solchen Inkubation ebenfalls fixiert, blockiert und mit einem Antikörper gegen NMNAT hybridisiert. In der Immunfluoreszenz war hierbei ebenfalls kein Unterschied der zellulären Lokalisation der NMNAT in PMA-stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu erkennen (nicht gezeigt).

Als nächstes wurde überprüft, ob die Phosphorylierung einen Einfluß auf die enzymatische Aktivität der NMNAT hat. Zu diesem Zweck wurde die rekombinante NMNAT mit PKC in Gegenwart von γ [³²P]-ATP quantitativ phosphoryliert. Zuvor wurde die Radioaktivität des Phosphorylierungsansatzes quantifiziert. Der eine Teil dieses Phosphorylierungsansatzes wurde einer SDS-PAGE unterzogen und mit Coomassie Blue gefärbt. Die Proteinbande, die mit der NMNAT korrespondierte wurde ausgeschnitten. Die Radioaktivität dieser Proteinbande wurde quantifiziert und auf die Proteinmenge bezogen. Hierbei ergab sich eine 25 prozentige Phosphorylierung der NMNAT. Der andere Teil des Ansatzes wurde einer Aktivitätsmessung unterzogen. Hierbei konnte kein Unterschied der spezifischen Aktivität des zu 25 Prozent phosphorylierten Enzyms im Vergleich zu dem unbehandeltem Protein detektiert werden.

Die NMNAT hat offenbar einen inhibitorischen Einfluß auf das ebenfalls im Kern lokalisierte NAD⁺-abbauende Enzym PARP-1 (Schweiger et al., 2001). Es konnte festgestellt werden, daß die von der PARP-1 katalysierte Poly-ADP-Ribosylierung in Gegenwart der NMNAT erheblich eingeschränkt ist. Es wurde aus diesem Grund eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen vermutet. Eine solche Interaktion wurde hier in *in vitro*-Experimenten überprüft. Insbesondere sollte ein eventueller Einfluß der Phosphorylierung auf die Bindung der beiden Proteine untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden NMNAT oder phosphorylierte NMNAT auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert. Diese Membran wurde mit PARP-1, die zuvor in Gegenwart von [³²P]-NAD⁺ poly-ADP-ribosyliert wurde, mit PARP-1, die zuvor in Gegenwart von [³²P]-NAD⁺ oligo-ADP-ribosyliert wurde oder mit in Gegenwart von [³²P]-NAD⁺ synthetisierten Poly-ADP-Ribose-Ketten inkubiert, gewaschen und autoradiographiert (Abb. 3.30).

Oligo-ADP-ribosylierte PARP-1 band unter diesen Bedingungen nicht an die auf der Membran immobilisierten NMNAT. Es konnte aber eine Bindung der Poly-ADP-Ribose-Ketten und der Poly-ADP-ribosylierten PARP-1 beobachtet werden. Das Autoradiogramm einer Membran, die mit TBST gewaschen worden war (Abb. 3.30 A), zeigte eine etwa gleichstarke Bindung der NMNAT an die Ketten wie an die poly-ADP-ribosylierte PARP-1. In diesem Autoradiogramm zeigte sich außerdem, daß eine Phosphorylierung der NMNAT eine verminderte Bindung der Ketten sowie der poly-ADP-ribosylierten PARP-1 zur Folge hatte.

In einem zweiten Experiment wurde die Membran stringenter gewaschen. Der Unterschied zwischen phosphorylierter und nicht-phosphorylierter NMNAT war in dem Autoradiogramm dieser Membran nicht mehr zu registrieren. Insgesamt war eine stärkere Bindung der NMNAT an die poly-ADP-ribosylierte PARP-1 als an die isolierten Ketten zu beobachten (Abb. 30.3 B).

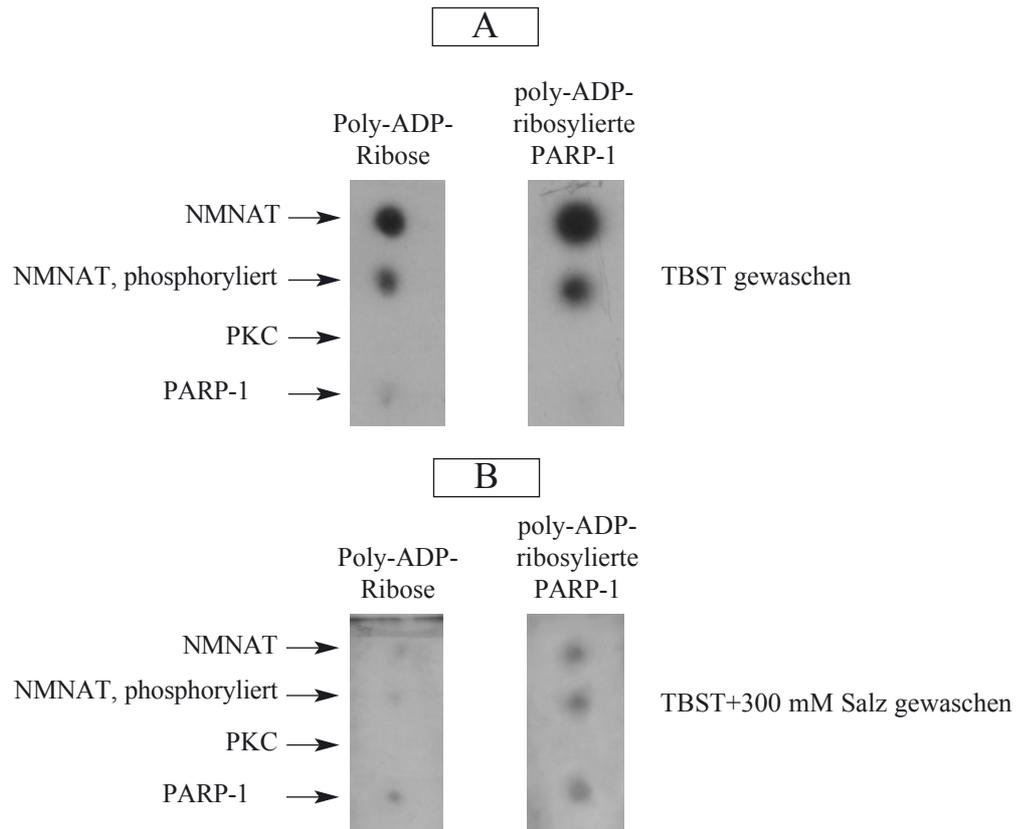


Abb. 3.30: *In vitro*-Interaktion von NMNAT und PARP-1. 0,5 µg NMNAT wurden mit 20 U PKC in Gegenwart von 250 µM ATP, 1 µM PMA und 2 mM CaCl₂ 30 min bei 37 °C phosphoryliert. Auf Nitrozellulose-Membranen wurden untereinander 0,5 µg NMNAT, 0,5 µg phosphorylierte NMNAT, 20 U PKC oder 0,5 µg PARP-1 und getüpfelt. Die Membran wurde mit 0,5 % BSA in TBST blockiert. Die Membranen wurden für 1 h entweder mit [³²P]-poly-ADP-ribosylierter PARP-1 oder mit [³²P]-Poly-ADP-Ribose (jeweils 40000 cpm) inkubiert. Die Membranen wurden **A:** Mit TBST und **B:** mit TBST + 300 mM Salz gewaschen, getrocknet und autoradiographiert.

