

4. Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine molekular- und zellbiologische Untersuchung der beiden essentiellen Enzyme der NAD(P)⁺-Synthese, der NMNAT und der NAD⁺-Kinase, durchgeführt. In den letzten Jahren ist mit den zunehmenden Erkenntnissen über die vielfältige Funktion von NAD⁺ und NADP⁺ das Interesse an deren Synthese und Abbau erheblich gestiegen. Die beiden Nukleotid-Coenzyme sind neben ihrer seit langem bekannten Funktion als lösliche Elektronenüberträger Substrate für kovalente Proteinmodifikationen und Vorstufen zur Synthese von Signalmolekülen. NAD⁺ ist außerdem ein essentieller Bestandteil des *gene-silencing*.

Obwohl die Enzyme der NAD(P)⁺-Synthese seit mehr als 50 Jahren bekannt sind, war zum Beginn dieser Arbeit keine Sequenz einer NAD⁺-Kinase oder einer NMNAT bekannt. In den letzten Jahren kam es dann zu einer stürmischen Entwicklung, die zur Identifikation der Primärstrukturen der NMNATs aus verschiedenen Einzellern (Raffaelli et al., 1999, 2001; Emanuelli et al., 1999; Mehl et al., 2000) und schließlich der humanen NMNAT (Schweiger et al., 2001; Emanuelli et al., 2001) führte. Als nächstes konnten erstmals Primärstrukturen prokaryotischer NAD⁺-Kinasen (Kawai 2000, 2001) und schließlich innerhalb dieser Arbeit der humanen NAD⁺-Kinase (Lerner et al., 2001) identifiziert werden. Kürzlich wurden darüber hinaus die Primärstrukturen zweier weiterer humaner NMNATs (NMNAT-2, Raffaelli et al., 2002; NMNAT-3, Zhang et al., 2003) und erstmals zwei humane NAD⁺-Synthetasen (Hara et al., 2003) identifiziert.

Diese Entdeckungen stellen für die Analyse der NAD⁺-Synthese und der damit verbundenen zellulären Prozesse einen großen Fortschritt dar. Zum ersten Mal wird die gesamte NAD⁺-Synthese in eukaryotischen Zellen für Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* zugänglich sein.

4.1 Die Struktur der humanen NAD⁺-Kinase

Die Struktur der NAD⁺-Kinase war zum Beginn dieser Arbeit völlig ungeklärt. Im Laufe der 1970er Jahre wurden Untersuchungen des Enzyms vor allem an Tauben-, Ratten- oder Kaninchenleber durchgeführt. Hierbei ergaben sich sehr widersprüchliche Aussagen zu der molekularen Masse der NAD⁺-Kinase. Das Enzym wurde als Komplex beschrieben, der sich wahrscheinlich aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt, von denen zumindest eine die molekulare Masse von 30-35 kDa aufweisen sollte. Durch Ultrazentrifugation und Gelfiltration wurden die nativen Enzyme auf 270-290 kDa abgeschätzt (Apps, 1975; Nemchinskava et al., 1970; Van Thiet et al., 1981).

Gelfiltrationsexperimente, die innerhalb dieser Arbeit mit dem Enzym aus Rinderleber durchgeführt wurden, ließen dagegen auf eine molekulare Masse von 200 kDa für das native Enzym schließen. Dies konnte schließlich durch Experimente mit gereinigter rekombinanter NAD⁺-Kinase bestätigt werden. Durch Western Blot-Analyse konnte zusätzlich die molekulare Masse einer Untereinheit des endogenen Proteins ermittelt werden, die 50 kDa betrug und damit mit dem theoretischen Wert des rekombinanten Proteins übereinstimmte. Offenbar bildet die NAD⁺-Kinase tatsächlich einen Komplex, allerdings aus vier gleichen Untereinheiten. Die Vermutung der Beteiligung anderer Proteine an diesem Komplex konnte nicht bestätigt werden.

Die Primärstruktur der NAD⁺-Kinase ist stark konserviert. Ein Vergleich der Proteinsequenz der hier klonierten humanen NAD⁺-Kinase mit Sequenz-Daten anderer Organismen zeigte eine Übereinstimmung mit etwa 100 bislang uncharakterisierten Proteinen mit Sequenzhomologien zwischen 91 (*M. musculus*) und 41 Prozent (*M. tuberculosis*). Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den uncharakterisierten Proteinen um NAD⁺-Kinasen des jeweiligen Organismus handelt. All diesen Proteinen ist eine konservierte Proteindomäne ("pfam01513") gemeinsam, die sich bei der humanen NAD⁺-Kinase am C-Terminus (Aminosäuren 169-408) des Proteins befindet. Verglichen mit den anderen inzwischen klonierten NAD⁺-Kinasen aus *S. cerevisiae*, *M. tuberculosis* und *E. coli* fanden sich in dieser Domäne 38 konservierte Reste, die vermutlich essentiell für die katalytische Aktivität der NAD⁺-Kinase sind.

Unklar ist, welche Rolle die nicht konservierten Bereiche der Proteine spielen. Im Falle der humanen NAD⁺-Kinase hatte eine N-terminale Verkürzung um 64 Aminosäuren keine Auswirkung auf die enzymatische Aktivität des Proteins. N-terminal um 115 oder 168 Aminosäuren verkürzte Fragmente oder die Expression der konservierten Domäne resultierten allerdings in der Expression unlöslicher Proteine. Eine Vermutung ist daher, daß der nicht-konservierte Bereich für die Löslichkeit der konservierten Domäne sorgt. Ein Hydrophobizitätsprofil der humanen NAD⁺-Kinase zeigte allerdings sowohl im C- als auch im N-terminalen Bereich hydrophobe Regionen. Eine weitere Möglichkeit ist ein regulatorischer Einfluß des N-terminalen Bereichs auf die katalytische Aktivität der konservierten Domäne. Die Aminosäuren 15-55 der humanen NAD⁺-Kinase weisen fünf potenzielle Phosphorylierungsstellen mit hohen Wahrscheinlichkeiten (> 0,98) auf. Eine Regulation der enzymatischen Aktivität durch eine Phosphorylierung in der nicht-konservierten Region wäre daher möglich.

In Zukunft wird die Kristallstruktur der humanen NAD⁺-Kinase einen tieferen Einblick in die räumliche Anordnung des Enzyms und den Reaktionsmechanismus liefern. Ein Vergleich der NAD⁺-Kinase-Kristallstrukturen verschiedener Organismen wird möglicherweise die Bedeutung des nicht konservierten Bereichs aufklären.

4.2 Die Struktur der humanen NMNAT

Die humane NMNAT konnte schon 1991 aus Plazenta bis zur Homogenität gereinigt werden (Emanuelli et al.). Dennoch wurde die Primärstruktur erst 2001 durch zwei verschiedene Gruppen identifiziert und es wurde eine Klonierung und Überexpression des Proteins in *E. coli* vorgenommen (Schweiger et al., 2001; Emanuelli et al., 2001). Das gereinigte endogene sowie das rekombinante Enzym wiesen eine molekulare Masse von 34 kDa auf. Die Analyse des gereinigten Proteins durch Gelfiltration und Ultrazentrifugation zeigte allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits konnte eine molekulare Masse von 139 kDa für das endogene und das rekombinante Enzym gemessen werden, was auf die Bildung eines Tetramers hinweist (Emanuelli et al., 1992; 2001). Andererseits ergab eine innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Gelfiltration eine molekulare Masse von etwa 155 kDa, die durch eine analytische Ultrazentrifugation des Enzyms in einer Konzentration von 0,3 mg/ml bestätigt werden konnte (Zhou et al., 2001). Es ist bislang völlig unklar, welche Struktur sich hinter dieser molekularen Masse verbirgt. Bei hohen Proteinkonzentrationen (5mg/ml) konnte dagegen die Bildung eines Hexamers mit einer molekularen Masse von 197 kDa beobachtet werden (Zhou et al., 2001).

Schließlich konnte die Kristallstruktur der humanen NMNAT durch unsere, sowie zwei andere Gruppen aufgeklärt werden, die das Enzym im Komplex mit NMN (Werner et al., 2002), NAD⁺ und NAAD⁺ (Zhou et al., 2002) oder ohne Substrat (Garavaglia et al., 2002) kristallisierten. In allen drei Fällen zeigte sich die Bildung eines symmetrischen Hexamers, das sich aus einem Trimer aus Dimeren zusammensetzt.

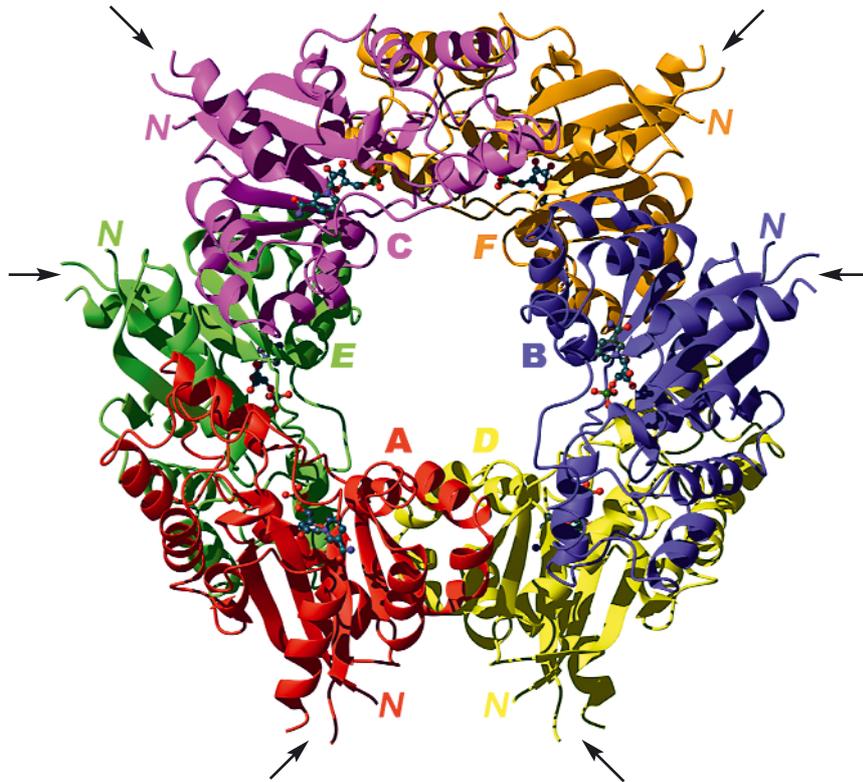


Abb. 4.1: Die Kristallstruktur der humanen NMNAT. Die Struktur der humanen NMNAT wurde im Komplex mit NMN in einer Auflösung von 2.9 Å aufgeklärt (Werner et al., 2002). Eine Untereinheit besteht aus einem sechssträngigen parallelen β -Faltblatt mit Helices auf beiden Seiten, die biologische Einheit des Proteins ist ein Hexamer (Untereinheiten A-F). Auffällig ist ein 37 Aminosäuren langer Bereich im Monomer des Proteins, der die NLS und die Phosphorylierungsstelle Serin 136 enthält. Dieser Bereich konnte fristallographisch nicht aufgelöst werden (Pfeile).

Das Monomer der humanen NMNAT bildet in den Aminosäuren 5-216 eine klassische Dinukleotid-Bindedomäne der Nukleotidyltransferase- α/β -Phosphodiesterase-Superfamilie. Dies sind Proteine, die Nukleotid-Monophosphat auf verschiedene Substrate übertragen. Die Domäne zeichnet sich durch ein zentrales sechssträngiges β -Faltblatt aus, das auf beiden Seiten von mehreren α -Helices flankiert wird. Die humane NMNAT bildet neben dieser Struktur zwei weitere α -Helices am C-terminalen Teil des Proteins (Aminosäuren 217-258) aus (Werner et al., 2002; Zhou et al., 2002; Garavaglia et al., 2002). Jedes Monomer der humanen NMNAT bindet zunächst NMN und nachfolgend ATP im Komplex mit Magnesium. Es erfolgt ein nukleophiler Angriff des 5'-Phosphates des NMN auf das α -Phosphat des ATP (Garavaglia et al., 2002). Bei der Substratbindung konnten keine tiefgreifenden Konformationsänderungen beobachtet werden. Ebenso gibt es keinen Hinweis auf eine kooperative Bindung innerhalb des Hexamers.

Besonders interessant im Hinblick auf eine mögliche Regulation oder die Interaktion der NMNAT mit anderen Proteinen ist die Tatsache, daß in allen drei Kristallstrukturen der humanen NMNAT ein Bereich von 37 Aminosäuren (109-146) fehlt. Offenbar handelt es sich hierbei um einen flexiblen und daher strukturell ungeordneten Teil des Proteins, der aus der Hexamerstruktur herausragt (Abb. 4.1). Einen Hinweis darauf lieferte auch die Beobachtung, daß die Inkubation von NMNAT mit geringen Mengen Trypsin eine spezifische Spaltung des Enzyms am Lysin 146 zur Folge hatte, welches innerhalb des flexiblen Bereichs lokalisiert ist. Es ist vorstellbar, daß dieser exponierte Proteinteil eine Interaktionsfläche für Protein-Protein-Wechselwirkungen darstellt.

Weiterhin konnte innerhalb dieser Sequenz durch computergestützte Analyse eine NLS (Aminosäuren 122-128) vorhergesagt werden. In der Tat konnte im Rahmen dieser Arbeit durch immunocytochemische Experimente nachgewiesen werden, daß sich die NMNAT-1 ausschließlich im Kern befindet. Möglicherweise binden Proteine der nukleären Transportmaschinerie an diesen exponierten Proteinteil und sorgen für den Transport der NMNAT in den Kern. Andererseits wurde innerhalb dieser Arbeit eine Interaktion der NMNAT mit dem nukleären Enzym PARP-1 beobachtet, die durch Poly-ADP-Ribose vermittelt wird und in diesem Proteinteil stattfinden könnte.

Eine weitere Beobachtung macht diese exponierte Proteinschleife zu einem interessanten Ziel zukünftiger Forschung. Die NMNAT wird *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert. Die Phosphorylierungsstelle befindet sich ebenfalls in diesem Bereich, am Serin 136, wie anhand von massenspektrometrischen Untersuchungen festgestellt und durch Mutagenese-Studien bestätigt werden konnte. Dies läßt die Vermutung zu, daß Proteininteraktionen der NMNAT durch eine Phosphorylierung reguliert werden.

4.3 Neue Enzyme der $NAD(P)^+$ -Synthese

Kürzlich konnten die Primärstrukturen von zwei humanen Proteinen identifiziert werden, die neben dem hier untersuchten Protein ebenfalls eine NMNAT-Aktivität aufweisen und als NMNAT-2 (Raffaelli et al., 2002) und NMNAT-3 (Zhang et al., 2003) bezeichnet werden. Diese Entdeckungen weisen erstmalig darauf hin, daß die seit langer Zeit bekannten Reaktionen der NAD^+ -Synthese nicht zwangsläufig von einzelnen Proteine katalysiert werden.

Die beiden neuen Proteine weisen einige Unterschiede zu der hier untersuchten NMNAT-1 auf. NMNAT-2 wird beispielsweise stark in Hirngewebe und relativ schwach in anderen Geweben exprimiert. Das Enzym hat eine wesentlich schwächere Affinität zu ATP und Gelfiltrationsexperimente deuten auf eine monomerische Struktur des Proteins hin (Raffaelli et al., 2002). NMNAT-3, deren Expression hauptsächlich in Lunge und Milz gezeigt werden konnte, zeigt dagegen in der Kristallstruktur eine Zusammensetzung aus vier gleichen Untereinheiten und weist starke strukturelle Ähnlichkeiten zur NMNAT-1 auf (Zhang et al., 2003).

Besonders interessant ist aber die Tatsache, daß diese drei Proteine unterschiedliche zelluläre Lokalisationen aufweisen. Während NMNAT-1 im Kern lokalisiert ist, wie innerhalb dieser Arbeit durch immunocytochemische Experimente nachgewiesen wurde, scheint NMNAT-2 cytosolisch lokalisiert zu sein (Raffaelli et al., 2002). Durch die Expression der NMNAT-2 und der NMNAT-3 als GFP-Fusionsproteine in humanen Zellen konnte tatsächlich ihre Lokalisation außerhalb des Kerns nachgewiesen werden. Die NMNAT-3 konnte außerdem partiell mit einem mitochondrialen Marker colokalisiert werden (Zhang et al., 2003).

Damit war erstmals bewiesen, daß der essentielle Schritt der NAD^+ -Synthese nicht, wie zunächst vermutet wurde, auf den Kern beschränkt ist. Hierbei wird sogar die Möglichkeit einer mitochondrialen NAD^+ -Synthese aufgezeigt, die besonders deshalb interessant ist, da bislang völlig unklar ist, auf welchem Weg NAD^+ in das Mitochondrium gelangt.

Die Primärstruktur der humanen NAD^+ -Synthetase wurde ebenfalls erst kürzlich identifiziert. Auch hier konnten zwei verschiedene Formen "NADsyn1 und NADsyn2" des Enzyms gefunden werden (Hara et al., 2003). Die beiden Proteine unterscheiden sich in ihrer gewebespezifischen Expression und ihrer Substratspezifität. Während NADsyn1 hauptsächlich im Dünndarm, Leber, Niere und Hoden nachgewiesen wurde und sowohl Glutamin als auch Ammonium als Aminogruppendonor akzeptiert, ist NADsyn2 spezifisch für Ammonium und konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Über die zelluläre Lokalisation der beiden Proteine ist bislang nichts bekannt, aber eine Analyse der Aminosäuresequenz mit dem Vorhersageprogramm PSORT ergab den Hinweis auf eine Lokalisation von NADsyn2 im Cytosol und auf eine Lokalisation von NADsyn1 im ER oder den Lysosomen.

Die durch dieser neuen Ergebnisse gezeigte Redundanz von enzymatischen Schritten der NAD^+ -Synthese legte die Vermutung nahe, daß neben der hier identifizierten NAD^+ -Kinase weiterer Proteine mit der gleichen enzymatischen Aktivität existieren. Um Hinweise auf solche Proteine zu erhalten, wurde die Protein- und cDNA-Sequenz der hier klonierten humanen NAD^+ -Kinase mit anderen humanen Sequenzen abgeglichen. Dabei fand sich lediglich eine cDNA-Sequenz, die eine signifikante Sequenzähnlichkeit aufwies und offenbar eine alternative Spleißform der NAD^+ -Kinase darstellte. Eine Amplifikation dieser um zwei Sequenzabschnitte verlängerten NAD^+ -Kinase-cDNA aus humanen Nieren- und Lungenzellen war allerdings nicht möglich.

Interessanterweise konnte in allen bislang charakterisierten NAD^+ -Kinasen eine stark konservierte Proteindomäne gefunden werden. Bei einem Vergleich dieser konservierten Domäne wurde eine Übereinstimmung mit einem bislang uncharakterisierten humanen Protein, "hypothetisches Protein FLJ 30596 (GenBank Zugangsnr.: NP_694558)" gefunden. Erstaunlicherweise weist dieses Protein jedoch keine signifikanten Ähnlichkeiten zu der hier klonierten NAD^+ -Kinase auf. Ähnliche Proteine konnten auch in Maus, Ratte und verschiedenen Prokaryoten gefunden werden. Die konservierte Domäne befindet sich am N-Terminus (Aminosäuren 1-161) des Proteins (Abb. 4.2).

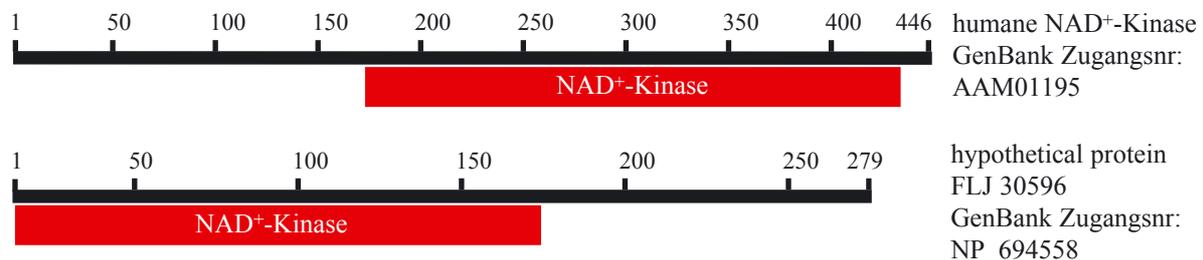


Abb. 4.2: Struktur der humanen NAD^+ -Kinase und eines humanen bislang uncharakterisierten humanen Proteins mit konservierter NAD^+ -Kinase-Domäne. Die bislang charakterisierten NAD^+ -Kinasen sowie etwa 100 weitere bislang uncharakterisierte Proteine weisen eine konservierte Proteindomäne auf. Diese Domäne befindet sich am C-Terminus der hier klonierten NAD^+ -Kinase (oben). Kürzlich wurde die cDNA eines zweiten humanen Proteins (hypothetical protein FLJ 30596, GenBank Zugangsnr.: NP_694558) mit einer solchen konservierten Proteindomäne ermittelt. Die Sequenz dieses Proteins weicht stark von der Sequenz der hier klonierten NAD^+ -Kinase ab, die konservierte Domäne befindet sich am N-Terminus des Proteins (unten).

Auf Grund der Tatsache, daß dieses Protein jedoch eine bisher in allen NAD⁺-Kinasen gefundene konservierte Domäne enthält, ist es durchaus möglich, daß es sich hierbei um eine zweite humane NAD⁺-Kinase handelt. Dies wäre eine Erklärung für verschiedene Beobachtungen, die im Laufe dieser Arbeit gemacht wurden. Zum einen zeigte eine Analyse der Expression der NAD⁺-Kinase auf mRNA-Ebene keinerlei Expression in Muskelzellen und im Dünndarm. Es ist nur schwer vorstellbar, daß diese Gewebe gänzlich ohne NADP⁺-Synthese auskommen, möglicherweise wird in diesen Geweben eine andere Form der NAD⁺-Kinase exprimiert. Zum anderen konnten verschiedene in der Literatur beschriebene Regulationsmechanismen für die innerhalb dieser Arbeit charakterisierte NAD⁺-Kinase nicht bestätigt werden (s.u.) und beziehen sich daher möglicherweise auf eine andere NAD⁺-Kinase.

Interessant an diesem putativen neuen Protein ist auch seine vorhergesagte zelluläre Lokalisation, die mit gleicher Wahrscheinlichkeit cytosolisch wie mitochondrial ist. Die hier klonierte NAD⁺-Kinase konnte durch immunocytochemische Analysen ausschließlich im Cytosol nachgewiesen werden. Es wäre daher vorstellbar, daß eine zweite, mitochondriale Form der NAD⁺-Kinase analog zu einer mitochondrialen NMNAT existiert. Dies ist bemerkenswert, da Mitochondrien demnach über eigene NAD(P)⁺-Synthesewege verfügen würden. Bisher war vollkommen unklar ob es Transportmechanismen für Pyridinnukleotide gibt, die Mitochondrien mit NAD⁺ und NADP⁺ versorgen, oder ob intramitochondriale Synthesewege existieren.

4.4 Die Regulation der NAD(P)⁺-Synthese

Die Regulation der NAD(P)⁺-Synthese ist bislang weitgehend ungeklärt. Es wurde lediglich berichtet, daß eine Abhängigkeit des zellulären NAD(P)⁺-Spiegels vom ATP-Gehalt einer Zelle besteht, die wahrscheinlich auf den starken Energieaufwand der NAD(P)⁺-Synthese und auf die Regulation der Nikotinamid- und Nikotinat-PRT durch ATP zurückzuführen ist. Die beiden innerhalb dieser Arbeit charakterisierten Enzyme, NMNAT und NAD⁺-Kinase, sind die essentiellen Enzyme der Synthese des NAD⁺ und NADP⁺. Es wurde daher vermutet, daß eine Regulation der NAD(P)⁺-Synthese mit der Regulation dieser beiden Enzyme einhergeht.

Für die NAD⁺-Kinase sind zwei Regulationsmechanismen bekannt. Zum einen konnte eine Inhibition des Enzyms aus Rattenleber durch NADPH beobachtet werden (Oka et al., 1968), zum anderen wurde eine Aktivierung der NAD⁺-Kinase aus grünen Pflanzen, Seeigelleiern und humanen Neutrophilen durch Calcium/Calmodulin nachgewiesen (Epel et al., 1981; Corimer et al., 1981; Anderson et al., 1978; Williams et al., 1984). Keiner dieser beiden Regulationsmechanismen gilt offenbar für die innerhalb dieser Arbeit klonierte NAD⁺-Kinase. Das rekombinante Enzym konnte in *E. coli* ohne den Zusatz von Calmodulin katalytisch aktiv exprimiert werden. Auch eine Zugabe von Calcium/Calmodulin zu dem gereinigten Enzym hatte keine Aktivierung zur Folge. Eine Erklärung hierfür ist die mögliche Existenz einer weiteren NAD⁺-Kinase-Isoform, die diesen Regulationsmechanismen unterliegt.

Die Hemmung der NAD⁺-Kinase durch NADPH wurde als Erklärung für die Verschiebung des NAD/NADP-Verhältnisses zu Gunsten von NADP in Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-defizienten Zellen herangezogen. In diesen Zellen ist die NADPH-Synthese vermindert. Durch das Fehlen dieses NAD⁺-Kinase-Hemmstoffs, so die Vermutung, kommt es zu einer vermehrten NAD⁺-Phosphorylierung (Pescarmona et al., 1977). Eine andere Erklärung hierfür wäre das Fehlen des Antioxidants NADPH. Dies könnte zu einer Akkumulation von Radikalen führen, die die Expression verschiedener Proteine induziert, die eine Rolle bei der Bekämpfung des oxidativen Streß spielen. Da NAD⁺-Kinase die einzige

Möglichkeit darstellt die Vorstufe dieses Antioxidant zu produzieren, wäre es möglich, daß dieses Protein durch oxidativen Streß induziert wird und hier der Grund für einer verstärkte NAD⁺-Phosphorylierung in Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-defizienten Zellen liegt.

Für die NMNAT konnte bisher lediglich eine Hemmung des Enzyms durch hohe Konzentrationen (10 mM) an ADP-Ribose gezeigt werden (Emanuelli et al., 1992), die innerhalb dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Einen Hinweis sollte daher eine Analyse der NMNAT-Primärstruktur mit Hilfe von Vorhersageprogrammen für posttranslationale Modifikationen liefern. Es konnten dabei drei Serinreste ermittelt werden, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (> 98 Prozent) phosphoryliert werden. Dieser theoretische Befund konnte experimentell durch einen Nachweis der Phosphorylierung *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden.

Mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen konnte der genaue Ort der Phosphorylierung, das Serin 136, ermittelt werden. Daraufhin wurde eine potenziell nicht-phosphorylierbare NMNAT-Mutante hergestellt, bei der das Serin 136 durch ein Alanin ausgetauscht wurde. Diese Mutante ließ sich durch Kernextrakte tatsächlich nicht mehr phosphorylieren, wodurch die Phosphorylierungsstelle bestätigt wurde.

Das Serin 136 liegt innerhalb einer Konsensussequenz der Proteinkinase C (PKC):S/TXK/R. Tatsächlich konnte die Phosphorylierung der rekombinanten NMNAT durch PKC aus Rattenhirn und durch rekombinante humane PKC α beobachtet werden. Weiterhin war es möglich eine Stimulation bzw. Hemmung der Phosphorylierung in Gegenwart der PKC-Effektoren PMA bzw. BIM nachzuweisen.

Eine Phosphorylierung der kernlokalisierten NMNAT durch die cytoskelett- bzw. plasmamembranassoziierte PKC (Kraft et al., 1982) erscheint zunächst unwahrscheinlich. Nach dem Modell des "PKC-targetings" sind allerdings inzwischen PKC-Isoformen bekannt, die auf bestimmte Stimulatoren mit einer Translokation in den Kern reagieren. PKC α transloziert beispielsweise nach einer Stimulation durch α -Trombin in den Kern, ebenso wie PKC ζ - durch Arachidonsäuren. PKC δ transloziert nach Aktivierung durch verschiedene Phorbolester zur Kernmembran (Zusammenfassung: Shirai et al., 2002). Auch die Kernlokalisierung einiger PKC-Isoformen, wie der PKC α , ohne vorherige Aktivierung konnte beobachtet werden (Neri et al., 2002).

Spezifische nukleäre Substrate der PKC und die Auswirkungen der Phosphorylierung auf solche Substrat sind bislang weitgehend unbekannt. Auch im Falle der NMNAT bleibt ungeklärt, welchen Einfluß eine Phosphorylierung auf das Protein hat.

Da das Serin 136 in unmittelbarer Nähe der NLS liegt, wurde zunächst vermutet, die Modifikation könnte eine Rolle bei der Kernlokalisierung des Proteins spielen. Denkbar war die Abschirmung der basischen Reste der NLS durch eine saure Phosphatgruppe, so daß eine Phosphorylierung das Verbleiben der NMNAT im Cytoplasma zur Folge hätte. Zellen, in denen die Phosphorylierung der NMNAT durch PMA stimuliert wurde, zeigten aber immer noch eine rein nukleäre Lokalisation der endogenen NMNAT. Auch die nicht-phosphorylierbare NMNAT-Mutante wurden im Kern lokalisiert.

Ein Einfluß der Phosphorylierung auf die katalytische Aktivität der NMNAT konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Eine bislang nicht untersuchte Möglichkeit ist die Regulation des NMNAT-Abbaus durch eine Phosphorylierung des Proteins. Kürzlich wurde ein solcher Regulationsmechanismus für ein anderes nukleäres Protein, p21, gezeigt, dessen Abbau durch seine Phosphorylierung durch PKC ζ stimuliert wird (Scott et al., 2002)

Inzwischen gibt es Hinweise darauf, daß die NMNAT nicht alleine für die Regulation des zellulären NAD⁺-Spiegels verantwortlich ist. Kürzlich wurde im Zuge einer Untersuchung zum NAD⁺-abhängigen *gene-silencing* eine Überexpression verschiedener Enzyme des

NAD⁺-Stoffwechsels in Hefezellen vorgenommen. Weder die Überexpression der Nikotinat-PRT noch die Überexpression der NMNAT in Hefezellen hatte einen Einfluß auf den NAD⁺-Spiegel. Dennoch konnten in beiden Fällen verstärkte NAD⁺-abhängige Prozesse gemessen werden (Anderson et al., 2002). Eine Erklärung hierfür ist, daß die NAD⁺-Synthese durch eine Überexpression der NMNAT oder der Nikotinat-PRT zwar gesteigert ist, durch den erhöhten Verbrauch aber dennoch ein konstanter NAD⁺-Spiegel erhalten bleibt. Da dieser sowohl bei einer Überexpression der NMNAT als auch der Nikotinat-PRT gemessen wurde, scheint die Konzentration mehrerer Enzyme, darunter auch die der NMNAT limitierend für die NAD⁺-Synthese zu sein.

4.5 Synthesewege des Calciummediators NAADP⁺

Eines der wichtigsten Ziele dieser Arbeit bestand darin, die Frage zu klären, ob die NAD⁺-Kinase die Synthese des Calcium freisetzenden Nukleotid-Derivates NAADP⁺ katalysiert. Dieses Nukleotid ist nach neusten Erkenntnissen der potenteste Calcium freisetzende Stoff der bislang bekannt ist. Er bewirkt eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, die sich von denen unterscheiden, auf die IP₃ oder cADP-Ribose wirken und kürzlich als Lysosomen identifiziert werden konnten (Churchill et al., 2002).

Das bisherige Modell der NAADP⁺-Synthese geht von NADP⁺ als Substrat aus. Es erfolgt ein Austausch des Nikotinamidrings gegen Nikotinat, der von der ADP-Ribosyl-Cyclase katalysiert wird (Aarhus et al., 1995). Dieses Modell hat mehrere Schwachstellen: Zum einen läuft die Austauschreaktion bei einem pH-Wert von 5 ab. Bei einem neutralem pH-Wert wird NADP⁺ stattdessen zu (c)ADP-Ribose-Phosphat abgebaut. Zum anderen erfolgt die Reaktion nur in Gegenwart großer Mengen Nikotinat (5-10 mM), dessen Synthese bislang in Säugetierzellen nicht nachgewiesen werden konnte. Die bislang charakterisierten ADP-Ribosyl-Cyclasen sind darüber hinaus auf der Zelloberfläche lokalisiert, während NAADP⁺ auf intrazelluläre Calciumspeicher wirkt. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß NAADP⁺ *in vivo* auf einem anderen Weg synthetisiert wird.

Häufig wurde die Vermutung geäußert, daß NAADP⁺ durch die Phosphorylierung von NAAD⁺, einem Zwischenprodukt der NAD⁺-Synthese, entsteht, möglicherweise durch die Aktivität der NAD⁺-Kinase. Im Zuge der Reinigung der NAD⁺-Kinase aus Rinderleber war es möglich in angereicherten Fraktionen der NAD⁺-Kinase die Phosphorylierung von NAAD⁺ zu messen. Diese Reaktion war außerordentlich schwach und schwer zu reproduzieren. Daher sollte die rekombinante NAD⁺-Kinase auf eine NAAD⁺-Kinase-Aktivität hin überprüft werden. Diese konnte jedoch unter verschiedenen Bedingungen (Variation der Inkubationszeit, pH-Wert, Substratkonzentration, Zugabe von Calcium und Calmodulin) nicht nachgewiesen werden.

Da eine NAAD⁺-Kinase-Aktivität in Rinderleber jedoch detektiert wurde, erscheint es wahrscheinlich, daß eine bislang unbekannte NAAD⁺-spezifische Kinase existiert. Einerseits könnte das oben erwähnte zweite Protein mit einer NAD⁺-Kinase-Domäne eine solche Aktivität aufweisen, da anzunehmen ist, daß eine NAAD⁺-Kinase strukturelle Ähnlichkeiten zur NAD⁺-Kinase aufweist. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daß die hier klonierte NAD⁺-Kinase unter physiologischen Bedingungen eine NAAD⁺-Phosphorylierung katalysiert.

4.6 Mögliche Funktionen der NMNAT im Kern

Im Vergleich zu anderen an der NAD⁺-Synthese beteiligten Proteinen ist die Kernlokalisation der NMNAT eine Besonderheit. Die NAD⁺-Kinase ist im Cytosol lokalisiert, und von den drei Phosphoribosyltransferasen sowie der NAD⁺-Synthase wurde bislang ebenfalls eine cytosolische Lokalisation angenommen. Außerdem konnten inzwischen weitere Proteine mit einer NMNAT-Aktivität identifiziert werden, die außerhalb des Kerns lokalisiert sind. Es liegt daher nahe, daß die NMNAT-1 neben der NAD⁺-Synthese eine weitere Funktion erfüllt, für die ihre Lokalisation im Kern erforderlich ist.

Der Hauptabbauweg des NAD⁺, die Poly-ADP-Ribosylierung, ist ebenfalls im Kern lokalisiert. Diese Reaktion wird vornehmlich von der PARP-1 katalysiert, einem Enzym, das nach seiner Aktivierung durch DNA-Strangbrüche für den Abbau des gesamten NAD⁺-Gehalts einer Zelle sorgen kann. Eine mögliche Erklärung der Kernlokalisation der NMNAT ist daher ein regulatorischer Einfluß des Proteins auf die Poly-ADP-Ribosylierung. In *in vitro*-Experimenten konnte tatsächlich die Inhibition der humanen rekombinanten PARP-1 durch die humane rekombinante NMNAT beobachtet werden (Schweiger et al., 2001), die schon einmal anhand von Untersuchungen der PARP aus Rinderhoden mit der NMNAT aus Hefe gezeigt wurde (Uhr et al., 1982). Innerhalb dieser Arbeit wurden *in vitro*-Studien durchgeführt, die zeigten, daß die Bindung der beiden Proteine durch die von der PARP-1 gebildeten Poly-ADP-Ribose-Ketten vermittelt wird. Ein umgekehrter Einfluß der Interaktion auf die Aktivität der NMNAT konnte dagegen nicht registriert werden.

Eine wechselseitige Regulation der beiden Enzyme erscheint sinnvoll, da es im Laufe einer DNA-Schädigung zu einem Verbrauch des NAD⁺ durch PARP-1 kommt und durch eine NAD⁺-Resynthese, die von der NMNAT katalysiert wird, ebensoviel ATP depletiert wird (Sims et al., 1980). Früher oder später würde so der gesamte ATP-Gehalt einer Zelle verbraucht werden. Unter normalen Umständen wird dieser Kurzschluß durch eine Hemmung der PARP-1 durch Automodifikation mit Poly-ADP-Ribose-Ketten unterbunden. Diese Automodifikation hat nach dem oben beschriebenen *in vitro*-Modell die Bindung der NMNAT zur Folge, die eine Hemmung der PARP-1 bewirkt.

Dennoch kann es im Verlauf einer massiven DNA-Schädigung zu einer derart starken Senkung des ATP-Spiegels durch Poly-ADP-Ribosylierung kommen, daß die verbleibende Energie nicht mehr für einen programmierten Zelltod ausreicht und es zur Nekrose kommt (Schreiber et al., 1995; Virag et al., 1998-A). Möglicherweise ist hier ein Regelkreis, der zu einer rechtzeitigen Hemmung der PARP-1 durch die NMNAT führt, unterbrochen.

Ein weiterer NAD⁺-abhängiger nukleärer Prozeß ist das sogenannte *gene-silencing*, ein Transkriptionsregulations-Mechanismus durch den bestimmte Gene stillgelegt werden. Ein essentielles Enzym dieses Vorgangs ist das *silent information regulator* Protein 2 (Sir2p), eine Proteindeacetylase, die Acetylgruppen von Histonen auf NAD⁺ überträgt und dadurch die Ausbildung von Chromatinstrukturen mit deacetylierten Histonen schafft, die transkriptionsinaktiv sind. Dieser Vorgang führt in Hefezellen offenbar zu einer Verlangsamung des Alterungsprozesses. Eine Überexpression von Sir2p oder eine Überexpression der Nikotinat-Phosphoribosyltransferase, ein Enzym, das eine Vorstufe der NAD⁺-Synthese generiert, oder eine Überexpression der NMNAT in Hefezellen führt zu einer signifikanten Verlängerung ihrer Lebensdauer (Kaeberlein et al., 1999, Anderson et al., 2002). Dieser verlangsamte Alterungsprozeß ist vermutlich auf ein vermehrtes Sir2p-abhängiges *gene-silencing* zurückzuführen, das in diesen Zellen gemessen werden konnte, während der NAD⁺-Spiegel und das NAD⁺/NADH-Verhältnis unverändert blieben (Anderson et al., 2002).

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß die Verfügbarkeit von NAD^+ der limitierende Faktor des NAD^+ -abhängigen *gene-silencing* ist und eine vermehrte NAD^+ -Synthese zu einem vermehrten Sir2p-abhängigen *gene-silencing* führt, letztlich also ein erhöhter NAD^+ -Durchsatz erfolgt. Interessant ist, was letztlich den Effekt auf die Lebensdauer der Zellen bewirkt. Eine Möglichkeit ist die Stilllegung bestimmter Gene durch Sir2p, eine andere die Akkumulation des Produkts der Sir2p-katalysierten Deacetylierung, der O-Acetyl-ADP-Ribose, deren Funktion bislang noch unklar ist.

In einem völlig anderen Zusammenhang wurde eine ähnliche Reaktion auf die Überexpression der NMNAT beobachtet. Bei der "slow wallerian degeneration mouse" (*Wlds*)-Maus, die auf Grund eines genetischen Defekts eine N-terminal um 18 Aminosäuren verlängerte NMNAT überexprimiert, überlebt ein Axon noch bis zu 14 Tage nach einer Verletzung, wohingegen das Axon einer Wildtyp-Maus innerhalb weniger Stunden abstirbt (Perry et al., 1990). Die Aktivität der NMNAT in diesen *Wlds*-Mäusen bzw. in transgenen Mäusen, die die verlängerte NMNAT exprimieren ist stark erhöht, trotzdem bleibt der NAD^+ -Spiegel, ähnlich wie in Hefezellen mit überexprimierter NMNAT, unverändert (Mack et al., 2001). Es ist vorstellbar, daß der Grund für ein verlangsamtes Axonsterben in *Wlds*-Mäusen ebenso auf ein vermehrtes NAD^+ -abhängiges *gene-silencing* zurückzuführen ist, wie der oben beschriebene verlangsamte Alterungsprozeß in Hefezellen.