

1. Einleitung	1
1.1 NAD⁺ und NADP⁺ im Energiestoffwechsel	2
1.2 NADP⁺ und oxidativer Stress	4
1.3 NAD⁺ und NADP⁺ bei kovalenten Proteinmodifikationen	5
1.3.1 Poly-ADP-Ribosylierung	6
1.3.2 Mono-ADP-Ribosylierung	7
1.3.3 NAD ⁺ -abhängige Protein-Deacetylierung	8
1.3.4 NADP ⁺ als Substrat für kovalente Proteinmodifikationen	9
1.4 NAD⁺ und NADP⁺ als Vorstufen für Calcium freisetzende Signalmoleküle	10
1.4.1 Cyclische ADP-Ribose (cADP-Ribose)	10
1.4.2 Nikotinatenindinukleotidphosphat (NAADP ⁺)	11
1.4.3 Synthese und Abbau von cADP-Ribose und NAADP ⁺	13
1.5 Der NAD(P)⁺-Stoffwechsel	15
1.5.1 Der NAD(P) ⁺ -Abbau	15
1.5.1.1 NAD ⁺ -Abbau	15
1.5.1.2 NADP ⁺ -Abbau	16
1.5.2 Die NAD(P) ⁺ -Synthese	17
1.5.3 Die Enzyme der NAD(P) ⁺ -Synthese	19
1.5.3.1 Chinolinat-Phosphoribosyltransferase (Chinolinat-PRT)	19
1.5.3.2 Nikotinat-Phosphoribosyltransferase (Nikotinat-PRT)	20
1.5.3.3 Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase (Nikotinamid-PRT)	20
1.5.3.4 NMNAT	21
1.5.3.5 NAD ⁺ -Synthetase	22
1.5.3.6 NAD ⁺ -Kinase	22
1.5.4 Die Regulation der NAD ⁺ /NADP ⁺ -Synthese	23
1.6 Zielsetzung	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Molekulargenetische Methoden	26
2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	26
2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	27
2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	27
2.1.4 Reinigung von Nukleinsäuren	27
2.1.4.1 Reinigung von DNA mit Glasmilch	27
2.1.4.2 Ethanol-Fällung von DNA	27
2.1.4.3 Reinigung von Plasmid-DNA nach der Boil-Präp-Methode	28
2.1.4.4 Reinigung von Plasmid-DNA (Mini-, Maxi-Präparation)	28
2.1.4.5 RNA-Präparation	28
2.1.4.6 cDNA-Präparation	28
2.1.4.7 Präparation genomischer DNA	29
2.1.5 Modifikation von Nukleinsäuren	29
2.1.5.1 Phosphorylierung von DNA	29
2.1.5.2 Restriktionsverdauung von DNA	29
2.1.5.3 TOPO-Klonierung	30
2.1.5.4 Ligation	30
2.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	30
2.1.6.1 Herstellung von Kulturmedium und -platten	30
2.1.6.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen	31
2.1.6.3 Transformation mittels Hitzeschock	31
2.1.7 Analyse von Nukleinsäuren	31
2.1.7.1 DNA-Sequenzierung	31

2.1.7.2 Southern Blot.....	32
2.1.7.3 Nachweis von immobilisierten Nukleinsäuren durch radioaktiv markierte Sonden.....	32
2.1.8 Klonierung der humanen NAD ⁺ -Kinase-cDNA.....	33
2.1.8.1 Klonierung der humanen NAD ⁺ -Kinase-cDNA in den TOPO-Vektor.....	33
2.1.8.2 Klonierung der humanen NAD ⁺ -Kinase-cDNA in den pQE-30 Vektor.....	33
2.1.8.3 Klonierung der humanen NAD ⁺ -Kinase-cDNA in den in den FLAG-Vektor.....	34
2.1.9 Gerichtete Mutagenese und Klonierung der humanen NMNAT-cDNA.....	35
2.1.9.1 Gerichtete Mutagenese der humanen NMNAT-cDNA.....	35
2.1.9.2 Klonierung der mutierten humanen NMNAT-cDNA in den TOPO-Vektor.....	35
2.1.9.3 Klonierung der mutierten humanen NMNAT-cDNA in den pQE-30 Vektor.....	36
2.1.9.4 Klonierung der humanen NMNAT-cDNA in den in den FLAG-Vektor.....	36
2.2 Proteinchemische Methoden.....	37
2.2.1 Überexpression von Proteinen in Bakterienzellen.....	37
2.2.2 Proteinextraktion.....	37
2.2.2.1 Gewebeaufschluß und Präparation cytosolischer Fraktionen aus Geweben.....	37
2.2.2.2 Aufschluß von Bakterienzellen.....	38
2.2.2.3 Aufschluß von humanen kultivierten Zellen.....	38
2.2.2.4 Extraktion von Kernproteinen aus humanen kultivierten Zellen.....	38
2.2.3 Proteinreinigung.....	38
2.2.3.1 Hitzedenaturierung.....	38
2.2.3.2 Ammoniumsulfatfällung.....	39
2.2.3.3 Anionenaustauscher-Chromatographie.....	39
2.2.3.4 Cibacron Blue-Affinitäts-Chromatographie.....	39
2.2.3.5 Nickel-NTA-Chromatographie.....	40
2.2.3.6 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC).....	40
2.2.3.7 Größenausschluß-Chromatographie.....	41
2.2.3.8 Native Gelelektrophorese.....	41
2.2.3.9 Immobilisierung von Proteinen auf Cyanogenbromid aktivierter Agarose und Reinigung von polyklonalen Antikörpern aus Serum.....	41
2.2.3.10 Immunpräzipitation.....	42
2.2.4 Protein- und Peptidanalyse.....	42
2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.2.4.2 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	43
2.2.4.3 Western Blot und Nachweis von immobilisierten Proteinen durch spezifische Antikörper.....	43
2.2.4.4 Blot- <i>overlay</i>	44
2.2.4.5 Herstellung von Poly-ADP-Ribose.....	44
2.2.4.6 Coomassie Blue-Färbung.....	44
2.2.4.7 Ponceau S-Färbung.....	44
2.2.4.8 Proteinbestimmung.....	44
2.2.4.9 Auftrennung von Peptidgemischen durch <i>reverse-phase</i> -Chromatographie.....	45
2.2.4.10 Massenspektrometrische Analyse von Peptiden.....	45
2.2.5 Nachweis von Enzymen.....	45
2.2.5.1 Gekoppelter optischer Test zum Nachweis der NAD ⁺ -Kinase.....	45
2.2.5.2 Gekoppelter optischer Test zum Nachweis der NMNAT.....	45
2.2.5.3 Aktivitätsnachweis der NAD ⁺ -Kinase im nativen Gel.....	46
2.2.5.4 Aktivitätsnachweis durch Nukleotidtrennung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie.....	46
2.2.6 Reinigung der NAD ⁺ -Kinase.....	47
2.2.6.1 Reinigung der endogenen NAD ⁺ -Kinase aus Rinderleber.....	47
2.2.6.2 Reinigung der humanen rekombinanten NAD ⁺ -Kinase.....	48
2.2.7 Reinigung der humanen rekombinanten NMNAT.....	48
2.2.8 <i>In vitro</i> -Phosphorylierung der NMNAT.....	49
2.2.9 Verdauung der NMNAT.....	49

2.3 Zellbiologische Methoden	51
2.3.1 Zellkultur	51
2.3.1.1 Zelllinien, Medien, Kulturgefäße	51
2.3.1.2 Auftauen von Zellen	51
2.3.1.3 Passagieren von Zellen	51
2.3.1.4 Zellernte	52
2.3.2 Zelltransfektion	52
2.3.3 Immunfluoreszenz	52
2.3.4 <i>In vivo</i> -Phosphorylierung der NMNAT	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Molekular- und zellbiologische Charakterisierung der NAD⁺-Kinase	54
3.1.1 Reinigung der NAD ⁺ -Kinase aus Rinderleber	54
3.1.2 Klonierung und Expression der humanen NAD ⁺ -Kinase	57
3.1.3 Analyse der humanen NAD ⁺ -Kinase-cDNA	59
3.1.4 Gewebespezifische Expression der humanen NAD ⁺ -Kinase-mRNA	61
3.1.5 Die genomischen DNA der humanen NAD ⁺ -Kinase	61
3.1.6 Reinigung der humanen rekombinanten NAD ⁺ -Kinase	63
3.1.7 Nachweis der humanen NAD ⁺ -Kinase durch spezifische Antikörper (Western-Blot)	65
3.1.8 Zelluläre Lokalisation der humanen NAD ⁺ -Kinase	66
3.1.9 Molekulargewichtsbestimmung der nativen NAD ⁺ -Kinase mittels Gelfiltration	67
3.1.10 Proteinchemische und enzymkinetische Charakterisierung der NAD ⁺ -Kinase	68
3.1.11 Substratspezifität der NAD ⁺ -Kinase	70
3.2 Molekular- und zellbiologische Charakterisierung der NMNAT	72
3.2.1 Nachweis der NMNAT durch spezifische Antikörper, zelluläre Lokalisation	72
3.2.2 Die Phosphorylierung der NMNAT	74
3.2.2.1 Phosphorylierung der NMNAT <i>in vitro</i>	74
3.2.2.2 Phosphorylierung der NMNAT <i>in vivo</i>	77
3.2.3 Identifizierung einer Phosphorylierungsstelle der NMNAT	78
3.2.3.1 Partielle Verdauung der phosphorylierten NMNAT	78
3.2.3.2 Identifizierung eines Phosphopeptids	80
3.2.3.3 <i>In vitro</i> -Phosphorylierung von NMNAT-Mutanten	82
3.2.4 Analyse möglicher Auswirkungen der Phosphorylierung auf die NMNAT	84
4. Diskussion und Ausblick	87
4.1 Die Struktur der humanen NAD ⁺ -Kinase	87
4.2 Die Struktur der humanen NMNAT	88
4.3 Neue Enzyme der NAD(P) ⁺ -Synthese	90
4.4 Die Regulation der NAD(P) ⁺ -Synthese	92
4.5 Synthesewege des Calciummediators NAADP ⁺	94
4.6 Mögliche Funktionen der NMNAT im Kern	95
5. Zusammenfassung	97
6. Abstract	98
7. Literatur	99
8. Abkürzungen	111
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	113
10. Lebenslauf	115

Danksagung