

## 1. Einleitung

Nikotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) und dessen phosphorylierte Form  $\text{NADP}^+$  sind als lösliche Elektronenüberträger an nahezu jeder Stoffwechselreaktion beteiligt und daher essentielle Bestandteile jeder lebenden Zelle. Vor mehr als 65 Jahren wurde die Fähigkeit zum reversiblen Elektronentransfer der beiden Coenzyme von Otto Warburg entdeckt. Viel später wurde klar, daß  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  darüber hinaus eine wichtige Rolle bei verschiedenen Signalübertragungsreaktionen spielen:  $\text{NAD}^+$  kann in Form von Adenosindiphosphoribose (ADP-Ribose) auf Proteine übertragen werden und deren Funktion modifizieren (ADP-Ribosylierung). Derivate des  $\text{NAD}^+$  und des  $\text{NADP}^+$ , die cyclische ADP-Ribose (cADP-Ribose) oder die Säureform des  $\text{NADP}^+$  ( $\text{NAADP}^+$ ) können die Freisetzung von Calcium in der Zelle bewirken. In diesem Sinne sind  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  vergleichbar mit dem Energie- und Signalmolekül Adenosintriphosphat (ATP), das ebenso neben seiner Funktion als universeller Energieträger Vorstufe einer kovalenten Proteinmodifikation und eines Signalmoleküls ist.

	ATP	$\text{NAD}^+$
Energieübertragung	Phosphatgruppe(n)	Elektronen, Wasserstoff
Signalübertragung	cAMP	$\text{NAADP}^+$ , cADPR(P)
kovalente Proteinmodifikation	Phosphorylierung, Adenylierung	ADP-Ribosylierung

**Tab. 1.1: ATP und  $\text{NAD(P)}^+$  sind universelle Energie- und Signalmoleküle.**  $\text{NAD(P)}^+$  und ATP galten lange Zeit als reine Energieträger. Die Funktionen des ATP als Substrat der Phosphorylierung und als Vorstufe für cyclisches AMP (cAMP) etablierten dieses Molekül als Signalmolekül. Inzwischen ist bekannt, daß  $\text{NAD(P)}^+$  ebenso als Substrat für kovalente Proteinmodifikationen und als Vorstufe für Signalmoleküle fungiert.

Für die Erfüllung der unterschiedlichen Funktionen von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  sind eine Vielzahl von Enzymaktivitäten notwendig. Zum einen solche, die die Synthese der Signalmoleküle cADP-Ribose(Phosphat) und  $\text{NAADP}^+$  sowie deren Abbau katalysieren, weiterhin solche, die eine ADP-Ribosylierung und die entsprechende Rückreaktion vornehmen und nicht zuletzt Enzymaktivitäten, die die Synthese und den Abbau der beiden Coenzyme selbst kontrollieren. Viele dieser Enzyme sind seit langem bekannt, die meisten sind kloniert und gut charakterisiert. Eine Ausnahme bildeten bislang die essentiellen Enzyme der  $\text{NAD(P)}^+$ -Synthese. Hierbei handelt es sich um die Nikotinamidmononukleotidadenylyltransferase (NMNAT) und die Nikotinamidadenindinukleotidkinase ( $\text{NAD}^+$ -Kinase). Die Aktivitäten dieser beiden Enzyme sind seit mehr als 50 Jahren bekannt, dennoch lagen zum Beginn dieser Arbeit keinerlei Sequenzdaten zu einem der Proteine vor. Die Charakterisierung des  $\text{NAD(P)}^+$ -Stoffwechsels und dessen Regulation, die für das Verständnis der Signalfunktion der beiden Coenzyme von großer Bedeutung sind, war daher bislang ausgeschlossen.

## 1.1 $NAD^+$ und $NADP^+$ im Energiestoffwechsel

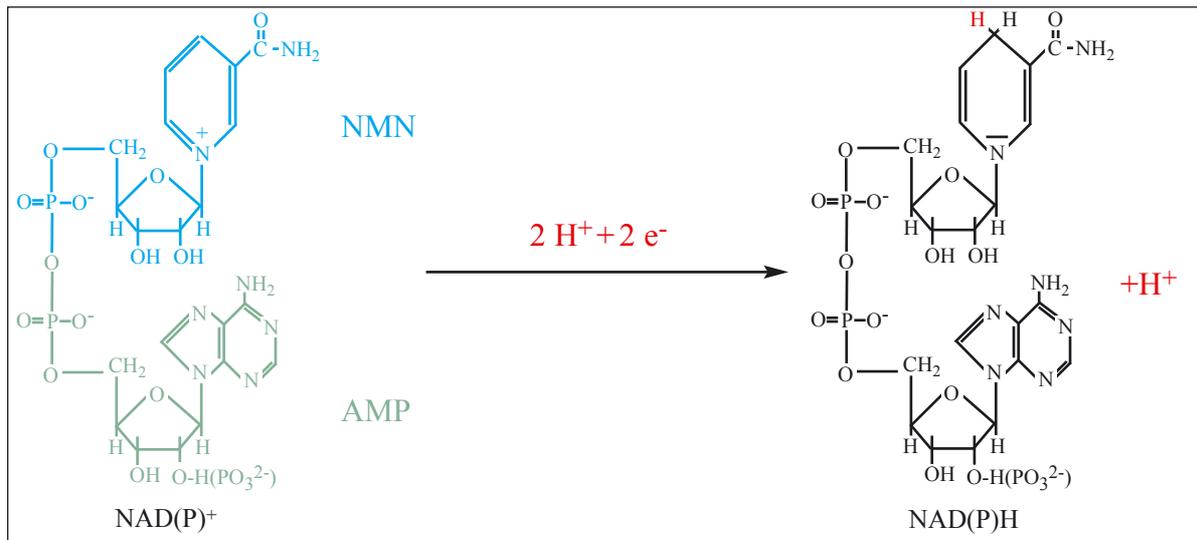
Die Existenz eines Coenzym wurde erstmals 1904 von Arthur Harden im Zuge seiner Untersuchungen zur alkoholischen Gärung in Hefeextrakten beobachtet. Eine Auftrennung dieser Extrakte in eine hochmolekulare, proteinreiche und eine niedermolekulare Fraktion führte zu zwei enzymatisch inaktiven Fraktionen, die ihre Fähigkeit zur alkoholischen Gärung nur dann wiedergewannen, wenn sie vereinigt wurden. Harden schloß daraus auf die Existenz eines *Ferments* in der hochmolekularen Fraktion und eines *Coferments* oder *Cozymase* in der niedermolekularen.

Diese Cozymase wurde innerhalb der darauffolgenden Jahre Gegenstand intensiver Untersuchungen, aber erst in den zwanziger Jahren gelang es Hans Von Euler-Chelpin Cozymase aus Hefeextrakten zu isolieren und ihre chemische Zusammensetzung als Pentosenukleosid zu bestimmen. Zahlreiche Experimente hatten inzwischen gezeigt, daß dasselbe Molekül an Fermentation, Atmung und Glykolyse gleichermaßen beteiligt und sowohl in Hefeextrakten als auch in Säugetiermuskelzellen wirksam ist.

Die tatsächliche Funktion des  $NAD^+$  wurde schließlich 1935 von Otto Warburg entdeckt. Er zeigte anhand der Reduktion des Acetaldehyds zu Ethylalkohol, daß  $NAD^+$  an Elektronenübertragungsreaktionen beteiligt ist, und das ein Bestandteil des  $NAD^+$ , das Pyridin, der Ort der eigentlichen Wasserstoff- und Elektronenübertragung ist (Warburg et al., 1935/1936). Darüber hinaus entdeckte er ein weiteres Coenzym, die Cozymase II, später  $NADP^+$ , das ebenfalls an Elektronenübertragungsreaktionen beteiligt ist.

Hans Von Euler-Chelpin konnte wenig später zeigen, daß sich  $NAD^+$  aus den beiden Mononukleotiden Adenosinmonophosphat (AMP) und Nikotinamidmononukleotid (NMN) mit dem pyridinähnlichen Nikotinamid zusammensetzt. Diese beiden Mononukleotide sind über eine Pyrophosphatbindung miteinander verknüpft (Abb. 1.1, Seite 3) (von Euler et al., 1935/1936). Kornberg entdeckte 1948 die Enzymaktivität, die diese Verknüpfung katalysiert: die NMNAT. Die Enzymaktivität der  $NAD^+$ -Kinase, die eine Überführung des  $NAD^+$  in das  $NADP^+$  katalysiert konnte schon 1937/38 von Vestin und von Euler nachgewiesen werden (Vestin, 1937; von Euler et al., 1938).

Inzwischen sind zahlreiche Enzyme, vor allem Dehydrogenasen, bekannt, die auf  $NAD^+$  und/oder  $NADP^+$  als Coenzym angewiesen sind. Die Verwendung von Coenzymen für Redoxreaktionen ist notwendig, da die Aminosäurereste von Enzymen für einen reversiblen Transfer von Elektronen nicht geeignet sind. Bei einer Redoxreaktionen unter Beteiligung von  $NAD(P)^+$  wird ein Hydridion (ein Proton und zwei Elektronen) von einem reduzierten Substrat auf den Nikotinamidring des  $NAD(P)^+$  übertragen, wobei  $NAD(P)H$  entsteht. Zusätzlich wird ein Proton an die wässrige Lösung abgegeben (siehe Abb. 1.1, Seite 3). Hierbei wird das entsprechende Substrat oxidiert. Umgekehrt kann die reduzierte Form  $NAD(P)H$  zur Reduktion von Substraten verwendet werden. Diese Redoxreaktionen sind in der Regel reversibel, so daß es dabei nicht zu einem Nettoverbrauch der Coenzyme kommt.



**Abb. 1.1: Die Struktur des NAD(P)<sup>+</sup> und seine Funktion im Energiestoffwechsel.** NAD<sup>+</sup> ist aus NMN und AMP zusammengesetzt, die über eine Pyrophosphatbindung verknüpft sind. NADP<sup>+</sup> weist eine zusätzliche 2'-Phosphatgruppe auf. Dehydrogenasen katalysieren Elektronenübertragungsreaktionen mit Hilfe von NAD(P)<sup>+</sup>. Bei diesen Reaktionen werden zwei Elektronen und ein Proton von einem reduzierten Substrat auf den Pyridinring im NAD(P)<sup>+</sup> übertragen. Zusätzlich wird ein Proton in die wässrige Lösung abgegeben, die Reaktion ist reversibel.

Da nahezu jede Stoffwechselreaktion, die in Zellen zum Abbau von Nährstoffen oder zum Aufbau von zelleigenen Stoffen durchgeführt wird, eine Elektronenübertragungsreaktion ist, stehen NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> an einer Schlüsselposition des Energiestoffwechsels. Dabei übernehmen die beiden Coenzyme unterschiedliche Funktionen. In Säugetieren ist NAD<sup>+</sup> für die Aufnahme von Elektronen bei katabolen Stoffwechselwegen zuständig. Die Reduktionsenergie des NADH wird dann für den Aufbau eines Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran genutzt, der an die ATP-Produktion gekoppelt ist. In den meisten Geweben ist das Verhältnis von NAD<sup>+</sup> zu NADH aus diesem Grund groß, so daß eine NAD<sup>+</sup>-Reduktion begünstigt wird.

Im Gegensatz dazu wird NADP<sup>+</sup> in seiner reduzierten Form für reduktive Biosynthesewege gebraucht, beispielsweise für die Synthese von Fettsäuren. Das dabei entstehende NADPH wird dann unter Energieverbrauch wieder zu NADP<sup>+</sup> regeneriert. Dies geschieht im Pentosephosphatcyclus, wobei NADPH durch die Oxidation von Glukose-6-Phosphat und 6-Phosphoglukonat entsteht. Aus diesem Grund wird im Fettgewebe ein beträchtlicher Teil des Glukose-6-Phosphat-Vorrates im Pentosephosphatweg für die NADPH-Synthese verwendet, während diese Reaktionsfolge in den Muskelzellen fast völlig fehlt. Das Verhältnis von NADP<sup>+</sup> zu NADPH ist in den meisten Geweben klein, so daß eine NADPH-Oxidation begünstigt wird.

## 1.2 NADP<sup>+</sup> und oxidativer Stress

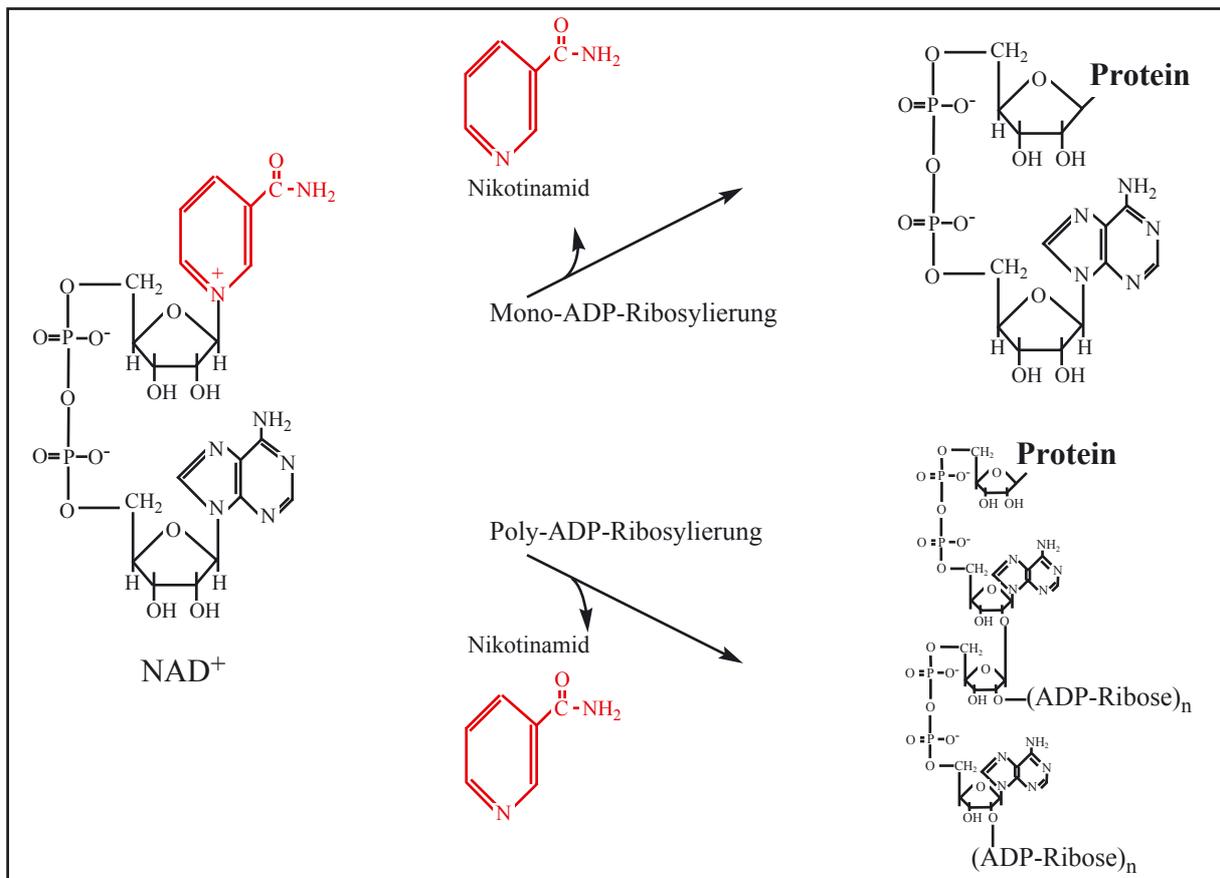
Endogen produzierte freie Radikale können Proteine, DNA oder Membranlipide zerstören und Zellen dadurch nachhaltig schädigen. Diese Schädigung ist im Zuge zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen, Entzündungsreaktionen, Krebs, Herzinfarkt und Schlaganfall zu beobachten und ist offenbar auch an Alterungsprozessen beteiligt (Perry et al., 2002). Um die Konzentration an freien Radikalen in der Zelle gering zu halten oder eine Reparatur der geschädigten Biomoleküle zu ermöglichen, haben Zellen verschiedene antioxidative Abwehrmechanismen entwickelt. Letztlich stützen sich diese Mechanismen auf das gemeinsame Reduktionsäquivalent NADPH. Ein Beispiel hierfür ist das Glutathion, ein in hohen Konzentrationen vorhandenes Tripeptid, das Elektronen beispielsweise auf Lipidperoxide überträgt und dabei oxidiert wird. Seine Re-Reduktion wird durch die Glutathion-Reduktase katalysiert, die dabei NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert (Zusammenfassung: Kehrer et al., 1994). Ein weiteres Beispiel ist Thioredoxin, ein hochkonserviertes Protein das dafür sorgt, daß die Sulfhydrylgruppen zahlreicher Proteine im reduzierten Zustand verbleiben und die Bildung von Disulfiden verhindert, die meist mit einer Hemmung der Proteine einhergehen. Die Regeneration des Thioredoxins wird durch die Thioredoxin-Reduktase katalysiert, die wiederum NADPH als Elektronendonator nutzt (Zusammenfassung: Arnér et al., 2000). Hierbei und bei zahlreichen anderen Mechanismen wirkt NADPH indirekt als Antioxidant. Offenbar kann NADPH aber auch als direktes Antioxidant wirken und freie Radikale abfangen, sowie durch freie Radikale geschädigte Biomoleküle regenerieren (Kirsch et al., 2001).

Insbesondere in Zeiten des oxidativen Stress muß daher die zelluläre NADPH-Konzentration auf einem bestimmten Niveau gehalten werden. Zu diesem Zweck gibt es verschiedene NADPH-Regenerationssysteme, von denen im Cytosol der Pentosephosphatweg und insbesondere die Reaktion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase eine wichtige Rolle spielt. Für Menschen, die einen erblich bedingten Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel aufweisen, kann eine starke oxidative Belastung daher letal verlaufen. Hierbei werden die Membranen der Erythrozyten durch Lipidperoxidation und Oxidation der Proteine stark geschädigt. Erythrozyten sind nicht in der Lage Membranen neu zu synthetisieren und durch den NADPH-Mangel ist eine Reparatur ebenfalls nicht möglich. Die Zellen sterben ab und es kommt zu einer lebensbedrohlichen hämolytischen Anämie (Jollow et al., 2001).

In den Mitochondrien, in denen ein Großteil der endogen produzierten freien Radikale entsteht, sind ebenfalls Thioredoxin und Glutathion sowie deren Regenerationssysteme wirksam. Der Pentosephosphatcyclus fehlt dagegen in den Mitochondrien völlig. Hier sind andere Mechanismen, wie die kürzlich charakterisierte mitochondriale Isoform der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase (IDPm) für die Regeneration des NADPH zuständig. Dieses Enzym ist wahrscheinlich maßgeblich an der NADPH-Produktion in den Mitochondrien beteiligt. Der Einsatz von *antisense*-RNA gegen die IDPm hatte eine massive DNA-Fragmentierung und Lipid-Peroxidation in den Mitochondrien und eine starke Erniedrigung des gesamtzellulären ATP-Gehalts zur Folge (Jo et al., 2001).

### 1.3 $NAD^+$ und $NADP^+$ bei kovalenten Proteinmodifikationen

Neben seiner Funktion im Energiestoffwechsel kann  $NAD^+$  als Substrat für eine kovalente Proteinmodifikation, die sogenannte ADP-Ribosylierung, fungieren. Diese Modifikation wirkt sich vergleichbar mit einer Phosphorylierung auf die Aktivität des Akzeptorproteins aus. Hierbei wird zwischen der Mono-ADP-Ribosylierung, bei der eine ADP-Ribose-Einheit auf ein Akzeptorprotein übertragen wird, und der Poly-ADP-Ribosylierung, bei der bis zu 200 ADP-Ribose-Reste auf ein Protein übertragen werden, unterschieden.



**Abb. 1.2:  $NAD^+$  als Substrat für kovalente Proteinmodifikationen; Mono-ADP-Ribosylierung und Poly-ADP-Ribosylierung.** Bei der ADP-Ribosylierung wird die ADP-Ribose aus  $NAD^+$  auf eine bestimmte Aminosäure in einem Akzeptorprotein übertragen, wobei Nikotinamid freigesetzt wird. Bei der Mono-ADP-Ribosylierung wird eine ADP-Ribose-Einheit meist auf Arginin- oder Cysteinreste von Proteinen übertragen. Bei der Poly-ADP-Ribosylierung werden bis zu 200 ADP-Ribose-Einheiten miteinander verknüpft und anschließend auf Glutamat-Reste eines Proteins übertragen.

Neben diesen schon seit einiger Zeit bekannten Reaktionen wurde kürzlich eine neue Modifikationsreaktion entdeckt, an der  $NAD^+$  beteiligt ist: die  $NAD^+$ -abhängige Proteindeacetylierung. Bei dieser Reaktion wird  $NAD^+$  als Akzeptor für die Acetylgruppe verwendet, wobei ein völlig neues Molekül, die O-Acetyl-ADP-Ribose, entsteht.

Auch  $NADP^+$  kann als Substrat für kovalente Proteinmodifikationen fungieren. Diese 2'-Phospho-Adenylierungen oder 2'-Phospho-ADP-Ribosylierungen sind jedoch wenig untersucht und die physiologische Relevanz der Modifikationen ist weitgehend unbekannt.

### 1.3.1 Poly-ADP-Ribosylierung

Bei der Poly-ADP-Ribosylierung handelt es sich um den Hauptabbauweg für  $\text{NAD}^+$  in eukaryotischen Zellen, das Maß an Poly-ADP-Ribosylierungsreaktionen steht daher in einem direkten Verhältnis zum  $\text{NAD}^+$ -Spiegel (Hillyard et al., 1981). Die Poly-ADP-Ribosylierung wird von Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARPs) katalysiert. Der bislang am besten untersuchte Vertreter dieser Proteinfamilie, die PARP-1, ist im Kern lokalisiert. Das Protein wird durch Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA aktiviert und katalysiert daraufhin die Synthese von verzweigten Poly-ADP-Ribose-Ketten mit bis zu 200 ADP-Ribose-Einheiten aus  $\text{NAD}^+$ , wobei Nikotinamid freigesetzt wird. Die Poly-ADP-Ribose-Ketten werden dann auf nukleäre Zielproteinen übertragen, deren Funktion auf Grund der starken negativen Ladung der Poly-ADP-Ribose-Ketten moduliert wird. Das Haupt-Akzeptor-Protein der Poly-ADP-Ribosylierung ist PARP-1 selber, die durch eine solche Automodifikation inhibiert wird. Weiterhin werden vor allem Histone modifiziert, die dann aufgrund der negativen Ladung nicht mehr an die ebenfalls negativ geladene DNA binden. Die DNA-Struktur wird auf diese Weise gelockert, so daß beispielsweise Replikation, DNA-Reparatur und Transkription stattfinden können. Durch die Modifikation mit Poly-ADP-Ribose können außerdem Protein-Protein-Wechselwirkungen hervorgerufen werden, wodurch die Bildung bestimmter im Kern wirksamer Proteinkomplexe ermöglicht wird. Seit langem ist beispielsweise bekannt, daß PARP-1 ein Bestandteil des *base-excision-repair*- und des *multiprotein replication complex* ist und einige Bestandteile dieser Komplexe poly-ADP-ribosyliert werden (Zusammenfassung: D'Amours et al., 1999; Virag et al., 2002).

Ein hohes Maß an DNA-Schäden, wie sie beispielsweise durch oxidativen Stress verursacht werden können, kann zu einem Verbrauch des gesamten  $\text{NAD}^+$ -Vorrates einer Zelle innerhalb von wenigen Minuten durch Poly-ADP-Ribosylierung führen (Goodwin et al., 1978; Wielkens et al., 1982). Offenbar wird daraufhin mit der Resynthese des  $\text{NAD}^+$  begonnen, wofür ATP benötigt wird, dessen Konzentration bei einer hohen Poly-ADP-Ribosylierungsrate ebenfalls innerhalb kürzester Zeit rapide sinkt (Sims et al., 1980). Die Poly-ADP-Ribosylierung fungiert daher möglicherweise als eine Art Sensor für den Energiegehalt einer Zelle und reguliert die Stoffwechselfvorgänge im Kern entsprechend der Verfügbarkeit an Energie. In diesem Sinne ist PARP-1 offenbar auch an der Regulation des Zelltodes beteiligt. Bei einem irreparablen DNA-Schaden wird die Apoptose eingeleitet und die Reparatur der DNA verhindert, indem PARP-1 von den Caspasen 3 und 7 gespalten und dadurch inaktiviert wird (Tewari et al., 1995; Germain et al., 1999). Die Energie, die für den Ablauf der Apoptose notwendig ist bleibt durch diese PARP-1-Inaktivierung erhalten. Bei einem sehr starken DNA-Schaden allerdings, wie er durch oxidativen Stress nach einem Herzinfarkt oder Schlaganfall entstehen kann, kommt es zu einer Überaktivierung der PARP-1, wobei der  $\text{NAD}^+$ - und der ATP-Vorrat der Zelle schneller aufgebraucht werden, als die Apoptose eingeleitet werden kann. In diesem Fall kommt es zu einem nekrotischen Zelltod, bei dem umliegendes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird (Schreiber et al., 1995; Virag et al., 1998-A). PARP-1-Inhibitoren sind aus diesem Grund vielversprechende Therapeutika, die nach einer DNA-Schädigung den  $\text{NAD}^+$ - und ATP-Level einer Zelle erhalten und so einen nekrotischen Zelltod verhindern können (Palomba et al., 1996; Virag et al., 1998-B).

### 1.3.2 Mono-ADP-Ribosylierung

Die zweite Form der NAD<sup>+</sup>-abhängigen Proteinmodifikation, die Mono-ADP-Ribosylierung wurde ursprünglich als Modifikationsreaktion bakterieller Krankheitserreger entdeckt. Beispielsweise überträgt das Toxin des Diphtheriebakteriums ADP-Ribose aus NAD<sup>+</sup> auf den Elongationsfaktor II der Wirtszelle, deren Translation hierbei zum Erliegen kommt (Honjo et al., 1968). Inzwischen ist klar, daß die Mono-ADP-Ribosylierung auch ein endogener Regulationsmechanismus sowohl in Prokaryoten als auch in Eukarioten ist, durch den so essentielle zelluläre Funktionen, wie Immunantwort, Zelladhäsion, Signal- und Energiestoffwechsel reguliert werden (Zusammenfassung: Corda et al., 2002).

Die Enzyme, die diese Modifikationsreaktionen katalysieren, sind die sogenannten Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs). Nachdem die erste eukaryotische ART kloniert war (Zolkiewska et al., 1992), konnte eine ganze Familie von ARTs durch Sequenzabgleiche ermittelt werden. Fünf humane Proteine, ART1-5, wurden kloniert, von denen ART1-4 GPI verankert vorliegen und ART-5 sezerniert wird (Koch et al., 1990; Koch-Nolte et al., 1997, Glowacki et al., 2001). Diese extrazelluläre Lokalisation war eine Überraschung, da alle bis dahin identifizierten Akzeptorproteine sowie die ADP-Ribosyl-Hydrolasen, Enzyme die die ADP-Ribose-Protein-Bindung spalten, intrazellulär lokalisiert waren (Moss et al., 1997).

Die Rolle der ARTs als Ektoenzyme ist daher bislang nicht völlig geklärt. Das spezifische Expressionsmuster von ART-1 und -2 und deren bisher identifizierte Akzeptorproteine weisen auf eine Funktion der Enzyme bei der Regulation der Immunantwort hin (Zolkiewska et al., 1993; Liu et al., 1999). Kürzlich wurde die durch ART-1 katalysierte ADP-Ribosylierung von  $\alpha$ -Defensin-1 (HPN-1), ein antimikrobielles Peptid, das an der adaptierten Immunantwort und an Entzündungsreaktionen beteiligt ist, entdeckt. Seine antimikrobielle Wirkung geht durch diese Modifikation verloren (Paone et al., 2002). Ein weiteres Zielprotein der ARTs ist CD38, ein Zelloberflächenprotein, das an der Regulation des intrazellulären Calciumhaushaltes beteiligt ist und durch ADP-Ribosylierung gehemmt wird (Han et al., 2000). Spezifische Zielproteine von ART 3-5 sind dagegen bislang unbekannt.

Eine Reihe von intrazellulären Proteinen wurden *in vitro* als Akzeptor für eine ADP-Ribosylierung identifiziert. *In vivo* konnten bisher nur die ADP-Ribosylierung des *glucose regulatory protein 78* im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Leno et al., 1989), der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins an der Plasmamembran (Lupi et al., 2000) und der Glutamat-Dehydrogenase in den Mitochondrien (Herrero-Yraola et al., 2001) nachgewiesen werden. Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo*-Modifikationen führen meist zu einer Hemmung des Akzeptorproteins, die durch intrazelluläre ADP-Ribosyl-Hydrolasen reversibel ist. Bislang konnte allerdings noch keine intrazelluläre ART identifiziert werden, die eine dieser Modifikationen katalysiert. Inzwischen wurden aber eukaryotische intrazelluläre Proteine kloniert, darunter Piersin 1 und 2 in Insektenzellen, die mono-ADP-Ribosylierungen von DNA katalysieren (Watanabe et al., 1999) und das *silent information regulator* Protein 2 (Sir2p) in der Hefe (s.u.; Frye et al., 1999), das eine Protein-ADP-Ribosylierungsaktivität aufweist. Bei diesen Proteinen handelt es sich möglicherweise um Repräsentanten einer völlig neuen Proteinfamilie von intrazellulären ARTs.

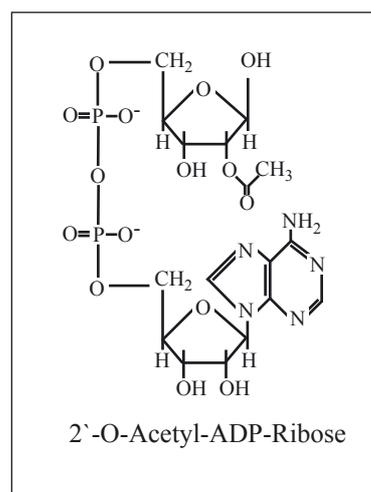
### 1.3.3 NAD<sup>+</sup>-abhängige Protein-Deacetylierung

Vor kurzem wurde eine weitere Reaktion entdeckt, die die Funktion von Proteinen NAD<sup>+</sup>-abhängig reguliert: Die NAD<sup>+</sup>-abhängige Histon-Deacetylierung. Durch diese Reaktion wird das sogenannte *gene-silencing* gesteuert. Dabei handelt es sich um einen Transkriptions-Regulationsmechanismus in Hefen und höheren Eukaryoten. Ein prominentes Beispiel beim Menschen ist die X-Chromosom-Inaktivierung. Das *gene-silencing* in Hefe geht mit der Ausbildung einer Chromatinstruktur mit hypoacetylierten Histonen einher, dem sogenannten *silent chromatin*. An diesen Stellen der DNA wird die Transkription unterbunden (Zusammenfassung: Huang, 2002).

An der Ausbildung dieser Struktur sind zahlreiche Proteine beteiligt, wovon eines, das Sir2p an allen bisher bekannten *silencing* Prozessen in *S. cerevisiae* beteiligt ist (Rine et al., 1987; Gottschling et al., 1990; Bryk et al., 1997; Smith et al., 1997). Es handelt sich hierbei um ein hochkonserviertes Protein, das sowohl in Bakterien als auch im Menschen in ähnlicher Form vorkommt.

Die Wirkungsweise dieses Proteins war lange Zeit unbekannt. Zunächst wurde eine Mono-ADP-Ribosyl-Transferase-Aktivität bei rekombinantem Sir2p und seinen bakteriellen und humanen Homologen detektiert, wobei eine Automodifikation sowie die ADP-Ribosylierung bestimmter Histone beobachtet wurde (Frye, 1999; Tanny et al., 1999). Die eigentliche Aktivität dieses Proteins scheint jedoch die einer Histon-Deacetylase zu sein, die im Gegensatz zu der Mono-ADP-Ribosyl-Transferase-Aktivität essentiell für das *silencing* ist, wie anhand von Mutationsstudien festgestellt werden konnte (Imai et al., 2000, Landry et al., 2000 A).

Diese Histon-Deacetylierungs-Reaktion ist strikt NAD<sup>+</sup>-abhängig, wobei zunächst unklar war, welche Rolle das NAD<sup>+</sup> spielt. Stöchiometrische Untersuchungen haben gezeigt, daß pro Mol deacetyliertem Produkt ein Mol ADP-Ribose und ein Mol Nikotinamid freigesetzt werden (Landry et al., 2000 B). Wenig später wurde klar, das es sich nicht wirklich um ADP-Ribose sondern um deren acetyliertes Derivat 1'-O-Acetyl-ADP-Ribose handelte (Tanner et al., 2000, Tanny et al., 2001). Inzwischen wurde durch NMR-Strukturanalysen ermittelt, daß 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose das tatsächliche Produkt der enzymatischen Reaktion ist (Jackson et al., 2002).



**Abb. 1.3: Struktur der 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose.** Das *gene-silencing*-Protein Sir2p katalysiert eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Proteindeacetylierung, bei der die glykosidische Bindung des NAD<sup>+</sup> gespalten und die Acetylgruppe auf die ADP-Ribose übertragen wird. Neben dem deacetylierten Produkt entstehen so Nikotinamid und 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose.

Bislang ist die Funktion der Übertragung der Acetylgruppe auf ADP-Ribose unklar, denn Sir2p ist die einzige bisher bekannte Deacetylase, die  $\text{NAD}^+$  als Akzeptor für die Acetylgruppe verwendet. Es wurde die Vermutung geäußert, daß es sich bei O-Acetyl-ADP-Ribose um ein neues Signalmolekül handeln könnte das möglicherweise Prozesse steuert, die mit dem *gene-silencing* assoziiert sind. Tatsächlich konnte nach der Mikroinjektion von O-Acetyl-ADP-Ribose in Eizellen eine Verzögerung deren Reifung und in Blastomeren eine Verzögerung der Zellteilung beobachtet werden (Borra et al., 2002).

Die Notwendigkeit von  $\text{NAD}^+$  für das *gene-silencing in vivo* wurde kürzlich anhand von Hefestämmen demonstriert, denen die Nikotinat-Phosphoribosyltransferase (Nikotinat-PRT) fehlt. Dieses Protein generiert eine Vorstufe der  $\text{NAD}^+$ -Synthese (s. u.). In diesen Stämmen war der  $\text{NAD}^+$ -Spiegel erheblich reduziert, wodurch auch das *gene-silencing* beeinträchtigt wurde (Smith et al., 2000). Seit langem ist außerdem bekannt, daß zahlreiche Organismen bei verminderter Nahrungsaufnahme eine verlängerte Lebensdauer aufweisen. Dieser Effekt ist in solchen Zellen nicht zu beobachten in denen entweder Sir2p oder Nikotinat-PRT fehlt (Lin et al., 2000). Eine Erhöhung des Nikotinat-PRT-Spiegels in Hefezellen hatte dagegen ein vermehrtes Sir2p-abhängiges *silencing* zur Folge und erhöhte die Lebensdauer der Zellen um 60 Prozent, obwohl diese Zellen keine Erhöhung des  $\text{NAD}^+$ -Spiegels oder eine Veränderung des  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Verhältnisses aufweisen (Anderson et al., 2002).

### 1.3.4 $\text{NADP}^+$ als Substrat für kovalente Proteinmodifikationen

Für die bislang bekannten ADP-Ribosylierungsreaktionen sowie die Histon-Deacetylierung wird ausschließlich  $\text{NAD}^+$  als Substrat verwendet. Über  $\text{NADP}^+$  als Vorstufe für kovalente Proteinmodifikationen wurde nur vereinzelt berichtet. Ende der 1970er Jahre wurde erstmals eine 2'-Phospho-ADP-Ribosylierung nachgewiesen (Skala et al., 1979). Hierbei war Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase das Akzeptorprotein, das durch diese Modifikation labiler gegenüber Proteasen wurde und eine niedrigere spezifische Aktivität aufwies als das nicht modifizierte Protein. Die Autoren vermuteten, daß  $\text{NADP}^+$  durch die  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolase zunächst hydrolysiert wird, wobei ADP-Ribose-2'-Phosphat entsteht, die dann nicht-enzymatisch auf das Akzeptorprotein übertragen wird.

Darüber hinaus konnte eine zweite Art der kovalenten Modifikation beobachtet werden, bei der  $\text{NADP}^+$  als Substrat dient. Hierbei wird 2'-Phospho-AMP spezifisch auf ein bislang unbekanntes Protein in Rattenlebermikrosomen übertragen. Wiederum gibt es Hinweise auf eine Beteiligung der  $\text{NAD}^+$ -Glycohydrolase, die zunächst  $\text{NADP}^+$  zu 2'-Phospho-ADP-Ribose umsetzt, wobei es sich anscheinend um das Substrat der nun folgenden 2'-Phosphoadenylierung handelt, die im Gegensatz zu der 2'-Phospho-ADP-Ribosylierung enzymatisch verläuft (Hilz et al., 1986).

Insgesamt ist wenig über die Akzeptorproteine und die Enzyme, die solche Modifikationen katalysieren, bekannt. Da diese Ergebnisse weder weiterverfolgt wurden, noch von anderen Gruppen bestätigt werden konnten, ist die Bedeutung solcher Modifikationsreaktionen bislang unklar.

## 1.4 $NAD^+$ und $NADP^+$ als Vorstufen für Calcium freisetzende Signalmoleküle

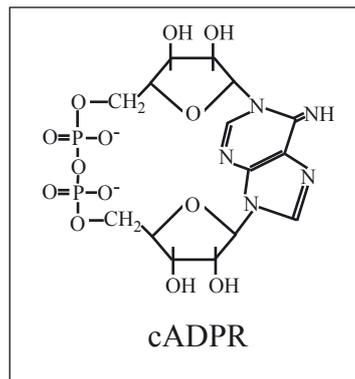
Neben ihrer Rolle im Energiestoffwechsel und als Substrat für kovalente Proteinmodifikationen können  $NAD^+$  und  $NADP^+$  als Vorstufen für Signalmoleküle dienen. Dies wurde 1987 anhand von Experimenten an Seeigeleiern gezeigt, bei denen beobachtet wurde, daß die beiden Coenzyme eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern in das Cytosol bewirken können (Clapper et al., 1987). Inzwischen ist klar, daß nicht  $NAD^+$  oder  $NADP^+$  selber für dieses Signal verantwortlich waren, sondern ihre Derivate, die cyclische ADP-Ribose (cADPR) und Nikotinatenindinukleotidphosphat (NAADP<sup>+</sup>).

Die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration ist einer der wichtigsten Mechanismen der Signalweiterleitung in eukaryotischen Zellen. Essentielle Funktionen wie Fertilisation, Zellteilung, Morphogenese aber auch Muskelkontraktion oder die Transmission von Nervenimpulsen werden durch diesen Mechanismus reguliert (Zusammenfassung: Berridge et al., 1993). Calcium wirkt ebenso wie andere Signalmoleküle durch einen plötzlichen Konzentrationsanstieg. Da seine Konzentration aber nicht über Synthese und Abbau reguliert werden kann, sind hierbei verschiedene Ionenkanäle entscheidend. Diese Kanäle können durch ständiges Herauspumpen von Calciumionen aus dem Cytosol eine konstante cytosolische Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  aufrecht erhalten, oder einen plötzlichen Einstrom von Calcium in das Cytosol bewerkstelligen. Die wahrscheinlich wichtigste Rolle bei einer plötzlichen Calciumkonzentrationserhöhung im Cytosol spielen der Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ )-Rezeptor des ER und der Ryanodinrezeptor (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Der RyR, der für die Muskelkontraktion in Herz- und Skelettmuskelzellen verantwortlich ist, wird durch einen kurzfristigen Calciumeinstrom durch die spannungsgesteuerten  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran stimuliert. Calcium selber ist der Ligand des Rezeptors, weswegen dieser Mechanismus als *calcium-induced calcium release* (CICR) bezeichnet wird, durch den nun Calcium vom SR in das Cytosol entlassen wird.

Der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor wird dagegen durch eine hormonelle Signalkaskade stimuliert. Die Bindung des Hormons an einen Rezeptor in der Plasmamembran initiiert die Synthese von  $\text{IP}_3$ , das zur ER-Membran diffundiert und an seinen Rezeptor bindet. Calcium selber ist ein Co-Agonist des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors, weswegen der nun folgende Calciumeinstrom vom ER in das Cytosol ebenfalls als CICR bezeichnet wird. Lange Zeit galt  $\text{IP}_3$  als der einzige Stoff, der eine Calciumfreisetzung bewirken kann. Seit der Entdeckung der beiden calciumfreisetzenden  $\text{NAD(P)}^+$ -Derivate hat sich dieses Bild jedoch grundlegend verändert.

### 1.4.1. Cyclische ADP-Ribose (cADP-Ribose)

Bei der Inkubation von  $\text{NAD}^+$  mit Seeigeleierhomogenaten konnte zwar eine Calciumfreisetzung beobachtet werden, diese erfolgte aber mit einer Zeitverzögerung von etwa ein bis vier Minuten. Es lag daher nahe, daß nicht  $\text{NAD}^+$  selber sondern ein  $\text{NAD}^+$ -Derivat für diese Signalwirkung verantwortlich war und die Zeitverzögerung durch den Syntheseschritt dieser Substanz zustande kam (Clapper et al., 1987). Die Struktur dieser Substanz konnte kurze Zeit später durch HNMR- und massenspektroskopische Methoden ermittelt werden. Es handelte sich um ein völlig neues Molekül, nämlich cyclische ADP-Ribose (siehe Abb. 1.4, Seite 11; Lee et al., 1989).



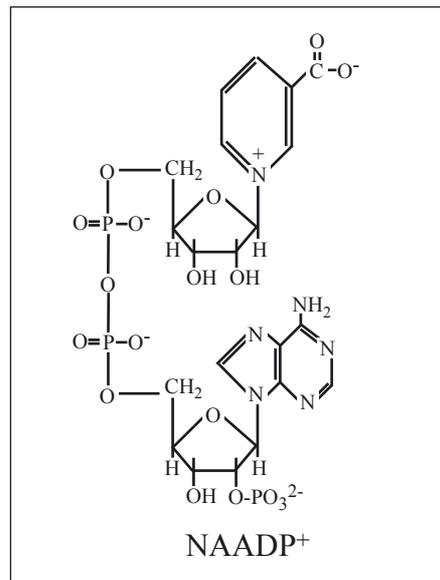
**Abb 1.4: Struktur des Calcium-Mediators cyclische ADP-Ribose.** Cyclische ADP-Ribose ist ein neues Calcium freisetzendes Agenz, das ähnlich wie  $IP_3$ , Calcium aus mikrosomalen Speichern freisetzen kann. Die Struktur wurde durch HNMR- und massenspektroskopische Methoden ermittelt.

Mit Hilfe von Zellfraktionierungsstudien konnte gezeigt werden, daß die cADP-Ribose Calcium aus den gleichen mikrosomalen Speichern entläßt wie  $IP_3$  (Clapper et al., 1987; Dargie et al., 1990). Die beiden *second messenger* wirken jedoch auf unterschiedliche Rezeptoren. Dies wurde durch Desensibilisierungsexperimente (Clapper et al., 1987) und durch Experimente, bei denen der  $IP_3$ -Rezeptor mit seinem spezifischen Antagonisten Heparin gehemmt wurde, nachgewiesen. Die Hemmung des  $IP_3$ -Rezeptors hatte keine Auswirkung auf die durch cADP-Ribose vermittelte Calciumfreisetzung (Rakow et al., 1990; Crossley et al., 1991).

Inzwischen wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die Hinweise darauf geben, daß es sich bei der cADP-Ribose um den physiologischen Liganden des RyR handelt. Coffein und Ryanodin sind Agonisten des RyR, eine Desensibilisierung durch diese Substanzen verhindert eine nachfolgende Calciumfreisetzung bei einer Stimulation durch cADP-Ribose. Der  $IP_3$ -Rezeptor bleibt dabei aber aktiv. Umgekehrt führt eine Desensibilisierung mit cADP-Ribose zu dem Verlust der Wirkung von Ryanodin und Coffein (Galione et al., 1991). Weiterhin verhindert die Hemmung des RyR durch seine spezifischen Antagonisten Ruthenium Rot und Procarin die Wirkung der cADP-Ribose, wohingegen die Wirkung von  $IP_3$  dadurch nicht eingeschränkt wird (Walseth et al., 1993; Currie et al., 1992).

#### 1.4.2 Nikotinadenindinukleotidphosphat (NAADP<sup>+</sup>)

Die calciumfreisetzende Wirkung des  $NADP^+$ , die bei einer Inkubation mit Seeigeleierhomogenaten nachgewiesen werden konnte, erfolgte ohne Zeitverzögerung (Clapper et al., 1987). Daher wurde erst viel später klar, daß nicht  $NADP^+$  selber für diesen Effekt verantwortlich war sondern eine Verunreinigung in dem kommerziell erhältlichen  $NADP^+$ . Die tatsächliche calciumfreisetzende Substanz wurde mit Hilfe von HNMR- und massenspektroskopischen Methoden als  $NADP^+$ -Säureform, NAADP<sup>+</sup>, identifiziert (Lee et al., 1995). Bei NAADP<sup>+</sup> handelt es sich um den effektivsten Calciummediator, der bislang bekannt ist. Mit Konzentrationen von etwa 30 nM kann eine halbmaximale Calciumfreisetzung ausgelöst werden (Lee et al., 1995). Die Wirkung von NAADP<sup>+</sup> wurde inzwischen in zahlreichen Säugetieren und Geweben nachgewiesen (Yusufi et al., 2001)



**Abb. 1.5: Struktur des Calcium-Mediators NAADP<sup>+</sup>.** NAADP<sup>+</sup> ist neben IP<sub>3</sub> und cADP-Ribose die dritte bislang bekannte Calcium freisetzende Substanz. Es stimuliert die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, die sich von denen unterscheiden, die durch cADP-Ribose und IP<sub>3</sub> mobilisiert werden.

Die durch NAADP<sup>+</sup> ausgelöste Calciumfreisetzung wird durch einen Rezeptor vermittelt, der unabhängig von dem IP<sub>3</sub>- und dem Ryanodinrezeptor ist. Dies wurde mit Hilfe von Desensibilisierungsexperimenten und Experimenten mit spezifischen Hemmstoffen gezeigt. Durch eine Vorbehandlung von Seeigeleiern mit geringen Konzentrationen von NAADP<sup>+</sup> (0,25-1 nM) oder mit Konzentrationen, die zu einem maximalen Calciumausstoß führen (100 nM), wurde eine nachfolgende Calciummobilisierung durch NAADP<sup>+</sup> gehemmt (Aarhus et al., 1996). Eine solche Desensibilisierung des NAADP<sup>+</sup>-Rezeptors hatte keine Auswirkungen auf die calciumfreisetzende Wirkung von IP<sub>3</sub> und cADP-Ribose. Weder Heparin noch die Hemmstoffe des RyR, Procain, Ruthenium Rot oder 8-amino-cADP-Ribose, haben einen Einfluß auf die Calcium freisetzende Wirkung des NAADP<sup>+</sup>. Ebenso wenig hat der NAADP<sup>+</sup>-Antagonist Thionikotinamid-NADP<sup>+</sup> eine Wirkung auf die Calciumfreisetzung durch cADP-Ribose oder IP<sub>3</sub> (Genazzani et al., 1996). Kürzlich konnte erstmals eine Anreicherungsmethode für den NAADP<sup>+</sup>-Rezeptor aus Seeigeleiern entwickelt werden, die eine biochemische Charakterisierung dieses Proteins in Zukunft ermöglichen wird (Berridge et al., 2002).

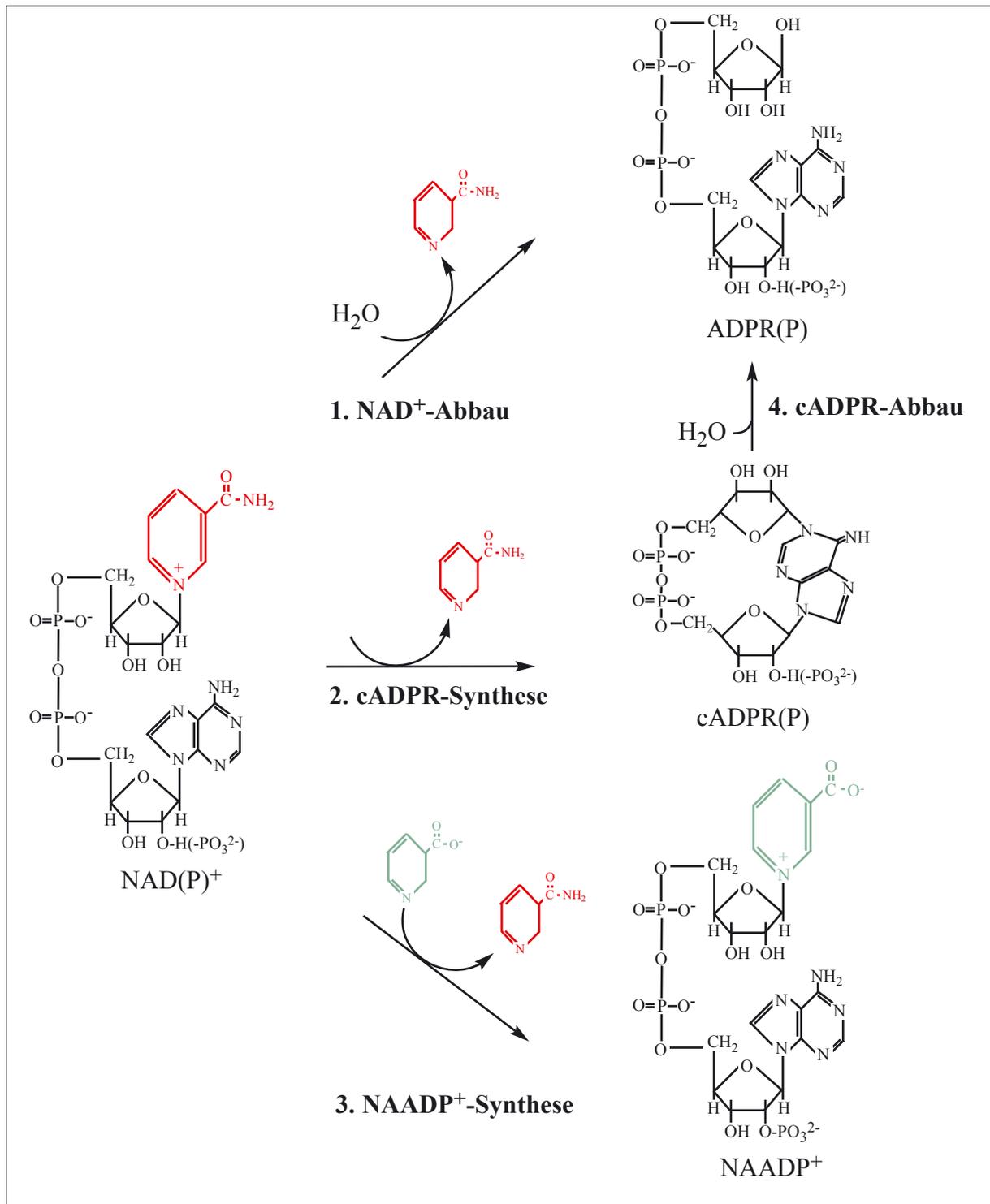
Besonders interessant ist die Tatsache, daß NAADP<sup>+</sup> vermutlich einen anderen Calciumspeicher mobilisiert als IP<sub>3</sub> und cADP-Ribose. Einen Hinweis hierauf gab eine Dichtegradientenzentrifugation von Seeigeleier-Homogenaten. Während die Aktivität von IP<sub>3</sub> und cADP-Ribose in angereicherten ER/SR-Fractionen gezeigt werden konnte, entfaltete NAADP<sup>+</sup> seine Wirkung in einer Fraktion, die sich von der ER/SR-Fraktion unterschied und eine höhere Dichte aufwies (Clapper et al., 1987, Lee et al., 1995). Kürzlich konnte diese Fraktion als lysosomal identifiziert werden. Es wurde dabei festgestellt, daß die NAADP<sup>+</sup> vermittelte Calciumfreisetzung auf einen Protonengradienten angewiesen ist, der von einer ATP-abhängigen Protonenpumpe generiert wird (Churchill et al., 2002). Es handelt sich dabei um den ersten Hinweis auf eine Rolle der Lysosomen bei der Regulation der zellulären Calciumkonzentration.

### 1.4.3 Synthese und Abbau von cADP-Ribose und NAADP<sup>+</sup>

Die Enzyme, die die Synthese und den Abbau von cADP-Ribose und NAADP<sup>+</sup> katalysieren, wurden seit der Entdeckung der beiden NAD(P)<sup>+</sup>-Derivate intensiv untersucht. Clapper et al. (1987) detektierten gleichzeitig mit der Entdeckung der calciumfreisetzenden Wirkung des NAD<sup>+</sup> ein lösliches Protein in Seeigeleiern, das NAD<sup>+</sup> in cADP-Ribose umsetzen konnte. Wenig später konnte ein solches Protein bis zur Homogenität aus der Meeresschnecke *Aplysia californica* gereinigt werden (Hellmich et al., 1991). Es handelte sich dabei um die NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase. Neben der schon seit langem bekannten Hydrolase-Aktivität des Enzyms, durch die die N-glykosidische Bindung zwischen der ADP-Ribose und dem Nikotinamid gespalten wird (Handler et al., 1942), katalysiert es offenbar auch die Cyclisierung der ADP-Ribose (Lee et al., 1991; siehe Abb. 1.6, Seite 14). Später wurde ein entsprechendes humanes Protein identifiziert, das ebenfalls sowohl die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung des NAD<sup>+</sup> als auch die Cyclisierung der ADP-Ribose als auch den Abbau der cADP-Ribose in ADP-Ribose katalysiert (Kim et al., 1993; Lee et al., 1993; siehe Abb. 1.6, Seite 14). Hierbei handelt es sich um das Zelloberflächenprotein CD38 (Jackson et al., 1990; Kim et al., 1993; Howard et al., 1993).

Bislang ist unklar, wie die Synthese der cADP-Ribose auf der Zelloberfläche eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern bewirkt. Um so überraschender war die Entdeckung, daß dasselbe Zelloberflächenprotein auch die Synthese des zweiten Calcium freisetzende Nukleotid-Derivats, NAADP<sup>+</sup>, katalysiert. Bei dieser Reaktion wird der Nikotinamidring des NADP<sup>+</sup> gegen Nikotinat ausgetauscht, wobei NAADP<sup>+</sup> entsteht (Aarhus et al., 1995; siehe Abb. 1.6, Seite 14). Diese Austauschreaktion ist vor allem bei einem sauren pH-Wert und relativ hohen Nikotinat-Konzentrationen begünstigt, wohingegen bei einem neutralen pH-Wert die Hydrolyse des NADP<sup>+</sup> zu ADP-Ribose-2'-Phosphat oder die Cyclisierung zu cADP-Ribose-2'-Phosphat begünstigt ist (Chini et al., 1995; Aarhus et al., 1995).

Sowohl die Tatsache, daß es sich bei CD38 um ein Oberflächenprotein handelt und bisher kein intrazelluläres Protein mit einer Sequenzähnlichkeit entdeckt wurde, als auch die Tatsache, daß NAADP<sup>+</sup> nur unter relativ unphysiologischen Bedingungen synthetisiert wird, verleitet immer wieder zu Spekulationen über ein bislang noch unentdecktes Enzym, das tatsächlich für die Synthese von NAADP<sup>+</sup> verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang wurde häufig die Vermutung geäußert, die NAD<sup>+</sup>-Kinase könnte durch die Phosphorylierung des NAD<sup>+</sup>-Synthese-Intermediats NAAD<sup>+</sup> eine NAADP<sup>+</sup>-Synthese katalysieren (Chini et al., 1995, Lee et al., 1995, Genazzani et al., 1997). Der Abbau des NAADP<sup>+</sup> funktioniert offenbar tatsächlich auf diesem Weg. Kürzlich wurde die enzymatische Aktivität einer NAADP<sup>+</sup>-2'-Phosphatase entdeckt, die NAADP<sup>+</sup> spezifisch und calciumabhängig zu NAAD<sup>+</sup> abbaut, wobei es sich offenbar um den Hauptabbauweg dieses Calcium-Mediators handelt (Berridge et al., 2002). Eine Phosphorylierung von NAAD<sup>+</sup> konnte dagegen bislang nicht nachgewiesen werden.



**Abb 1.6: Die Synthese von cADP-Ribose und NAADP<sup>+</sup> durch die NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase.** Die N-glykosidische Bindung zwischen der ADP-Ribose und dem Nikotinamid in NAD(P)<sup>+</sup> wird von der NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase bzw. CD38 gespalten. Hierbei entsteht ein ADP-Ribosyl-Oxocarbeniumion als enzymgebundenes Zwischenprodukt. Als nachfolgende Schritte können erfolgen: Ein nukleophiler Angriff durch Wasser, wobei ADP-Ribose entsteht (1.), durch das N<sup>1</sup> des Adeninrings, wobei das cyclische Produkt cADP-Ribose entsteht (2.) oder durch Nikotinat, wobei NAADP<sup>+</sup> entsteht (3.). cADP-Ribose kann außerdem von der NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase zu ADP-Ribose hydrolysiert werden (4.).

## 1.5 Der NAD(P)<sup>+</sup>-Stoffwechsel

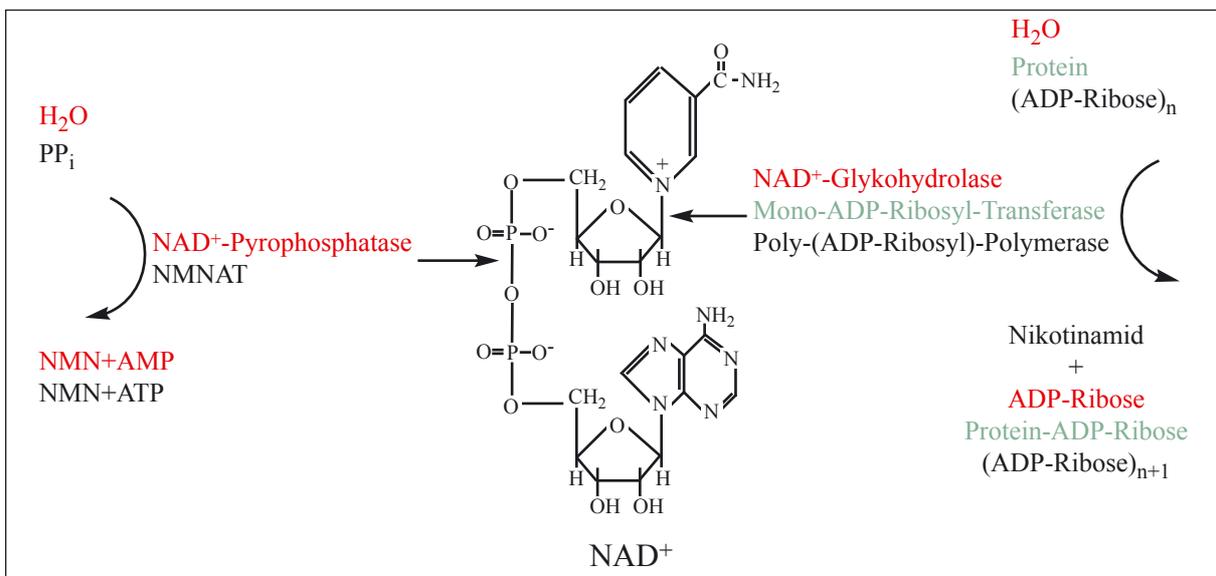
Im Zuge der zahlreichen Elektronenübertragungsreaktionen, an denen NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> beteiligt sind, kommt es nicht zu einem Nettoverbrauch der beiden Coenzyme. Eine Resynthese wird also nur dann notwendig, wenn eine ADP-Ribosylierung oder eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylierung vorgenommen wird oder wenn es zu einer Synthese der Calcium freisetzenden Signalmoleküle NAADP<sup>+</sup> und cADP-Ribose(Phosphat) kommt. Neben diesen bereits näher beschriebenen Reaktionen gibt es in Zellen bzw. auf deren Oberfläche weitere Enzymaktivitäten, die zu einem Abbau von NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> führen, deren Bedeutung teilweise noch ungeklärt ist. Infolge dieser Prozesse aber auch nach jeder Zellteilung, wird die Synthese von NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> erforderlich.

Bislang ist nur ein Synthese-Weg für die beiden Nucleotid-Coenzyme bekannt. Die Aktivität der NMNAT ist dabei ebenso essentiell für die Synthese des NAD<sup>+</sup> wie die Aktivität der NAD<sup>+</sup>-Kinase für die Synthese des NADP<sup>+</sup>.

### 1.5.1 Der NAD(P)<sup>+</sup>-Abbau

#### 1.5.1.1 NAD<sup>+</sup>-Abbau

NAD<sup>+</sup> wird in eukaryotischen Zellen prinzipiell auf zwei Wegen abgebaut: Zum einen wird die N-glykosidische Bindung zwischen dem Nikotinamid und der ADP-Ribose, zum anderen die Pyrophosphatbindung zwischen den beiden Nucleotiden Nikotinamidmononucleotid (NMN) und Adenosinmononucleotid (AMP) gespalten (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7: Der NAD<sup>+</sup>-Abbau.** NAD<sup>+</sup> kann durch die Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Nikotinamid und ADP-Ribose abgebaut werden. Die ADP-Ribose kann dabei entweder auf Wasser (NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase), auf die Aminosäureseitenkette eines Akzeptorproteins (Mono-ADP-Ribosyltransferasen) oder auf ADP-Ribose (Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase) übertragen werden. NAD<sup>+</sup> kann außerdem durch die Spaltung der Pyrophosphatbindung abgebaut werden. NAD<sup>+</sup>-Pyrophosphatase hydrolysiert die Bindung, wobei NMN und AMP entstehen. NMNAT setzt unter Verbrauch von Pyrophosphat NMN und ATP frei.

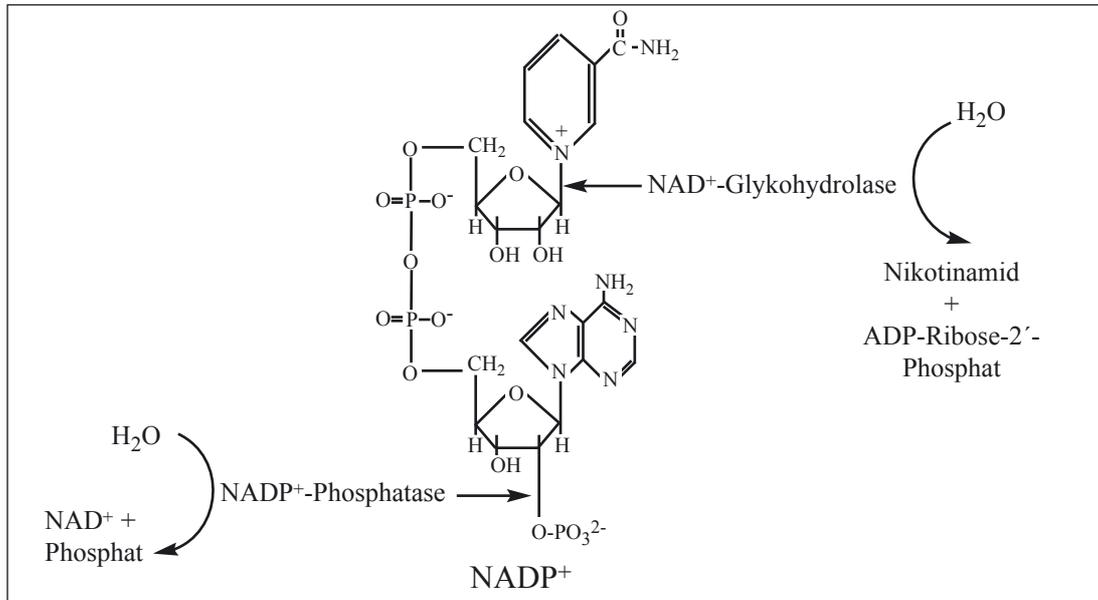
Die Spaltung der N-glykosidischen Bindung wird durch drei unterschiedliche Enzymklassen katalysiert, die oben bereits näher beschrieben wurden: Die NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolasen (NADasen) katalysieren eine Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung, wobei ADP-Ribose frei wird (Handler et al., 1942). Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) übertragen dagegen die ADP-Ribose aus NAD<sup>+</sup> auf Aminosäureseitenketten von Proteinen (Honjo et al., 1968), und Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerasen (PARPs) übertragen die ADP-Ribose auf die Aminosäureseitenketten von Proteinen und katalysieren weiterhin eine Polymerisierung der ADP-Ribose-Ketten zu Poly-ADP-Ribose (Chambon et al., 1966, 1963). In allen drei Fällen wird Nikotinamid freigesetzt (siehe Abb. 1.7, Seite 15).

Eine Hydrolyse der Pyrophosphatbindung des NAD<sup>+</sup> kann durch NAD<sup>+</sup>-Pyrophosphatasen erfolgen, wobei AMP und NMN freigesetzt werden. Diese Enzymaktivität wurde in eukaryotischen Zellen erstmals durch Lansing 1967 in der Zellmembran von Leberzellen detektiert. Weiterhin konnte NAD<sup>+</sup>-Pyrophosphatase-Aktivität auf der Oberfläche von Nieren- sowie Immunzellen nachgewiesen werden (Johnson, 1984; Goding et al., 1998). Die Funktion dieser Enzymaktivität ist noch unklar. Möglicherweise wird extrazelluläres NAD<sup>+</sup> durch Pyrophosphatasen abgebaut um die Bestandteile NMN und AMP für einen Transport in die Zelle zu präparieren, wie es bei prokaryotischen Zellen der Fall ist (Foster et al., 1979). Weiterhin konnte ein regulatorischer Einfluß von NAD<sup>+</sup> sowie von dessen Abbauprodukten auf die Proliferation von T-Zellen beobachtet werden (Bortell et al., 2001). Demnach haben NAD<sup>+</sup>-Pyrophosphatasen und andere NAD<sup>+</sup>-abbauende Enzyme auf den Oberflächen von Immunzellen eine regulatorische Funktion.

Die Spaltung der Pyrophosphatbindung des NAD<sup>+</sup> ist weiterhin durch die Rückreaktion der schon erwähnten NMNAT möglich. Dieses Enzym, das an einer Schlüsselstelle der NAD<sup>+</sup>-Synthese steht, katalysiert auf diese Weise auch den Abbau des NAD<sup>+</sup>. Hierbei entsteht ebenfalls NMN. Das AMP wird aber nicht auf Wasser, sondern auf Pyrophosphat übertragen, wobei ATP entsteht (Kornberg, 1948). Die NMNAT ist damit das einzige Enzym, das ATP direkt aus NAD<sup>+</sup> synthetisieren kann. Die Funktion eines solchen NAD<sup>+</sup>-Abbaus ist bislang allerdings noch unklar.

### **1.5.1.2 NADP<sup>+</sup>-Abbau**

NADP<sup>+</sup> wird von den oben beschriebenen Enzymen praktisch nicht als Substrat akzeptiert. Eine Ausnahme bildet dabei die NADase, die NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> gleichermaßen hydrolysiert. Die Aktivität dieses Enzyms hat dabei die Bildung des ADP-Ribose-2'-Phosphats zur Folge, wobei ebenfalls Nikotinamid freigesetzt wird (siehe Abb. 1.8, Seite 17). Bei dieser Reaktion handelt es sich wahrscheinlich um den Hauptabbauweg von NADP<sup>+</sup> (Berridge et al., 2002). Weiterhin kann NADP<sup>+</sup> durch die Hydrolyse der 2'-Phosphatbindung zu NAD<sup>+</sup> abgebaut werden. Eine solche NADP<sup>+</sup>-Phosphatase-Aktivität konnte im Golgi-Apparat (Novas et al., 1986) und in der mitochondrialen Matrix (Richter, 1987) detektiert werden. Vor kurzem wurde eine 2'-spezifische Phosphatase in der Membran von Hirnzellen nachgewiesen, die bevorzugt NAADP<sup>+</sup> zu NAAD<sup>+</sup> hydrolysiert aber auch NADP<sup>+</sup> als Substrat akzeptiert. Dieses Enzym wird durch Calcium stimuliert (Berridge et al., 2002).



**Abb. 1.8: Der NADP<sup>+</sup>-Abbau.** NADP<sup>+</sup> kann durch die Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Nikotinamid und ADP-Ribose-Phosphat durch die NADase abgebaut werden, wobei Nikotinamid und ADP-Ribose-2'-Phosphat entstehen. NADP<sup>+</sup> kann außerdem durch die Hydrolyse der 2'-Phosphatgruppe durch die NADP<sup>+</sup>-Phosphatase zu NAD<sup>+</sup> abgebaut werden.

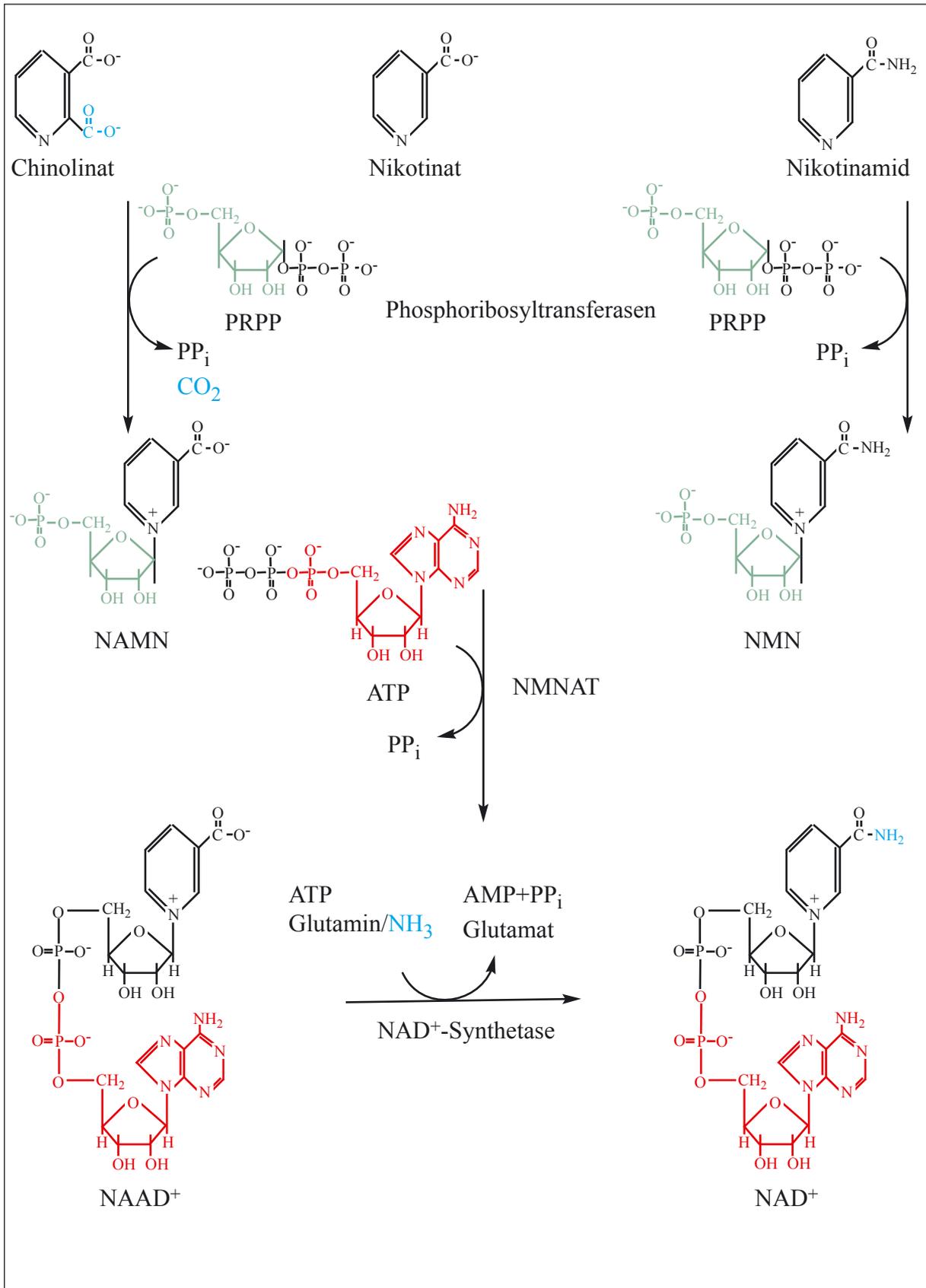
### 1.5.2 NAD(P)<sup>+</sup>-Synthese

Säugetiere sind nicht in der Lage, NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> *de novo* zu synthetisieren. Die Nikotinamid-Vorstufen für eine NAD<sup>+</sup>-Synthese in Säugetierzellen sind Chinolinat, Nikotinat und Nikotinamid. Diese Stoffe können in Mikroorganismen und Pflanzen *de novo* synthetisiert werden und müssen von Säugetieren täglich mit der Nahrung aufgenommen werden um die Mangelkrankung Pellagra, die sich in Form von Diarrhöe, Dermatitis und Schwachsinn äußert, zu verhindern.

Chinolinat entsteht in Säugetierzellen als Zwischenprodukt des Abbaus der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Nikotinamid entsteht in Säugetieren durch den Abbau von NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> durch die enzymatischen Aktivitäten der NADasen, ARTs und PARPs (s. o.). Nikotinat kann durch die Hydrolyse der Amidfunktion des Nikotinamids durch die Nikotinamid-Deamidase synthetisiert werden. Dieses Enzym konnte allerdings bislang ausschließlich in Prokaryoten nachgewiesen werden. Nikotinat wird daher vermutlich ausschließlich mit der Nahrung aufgenommen.

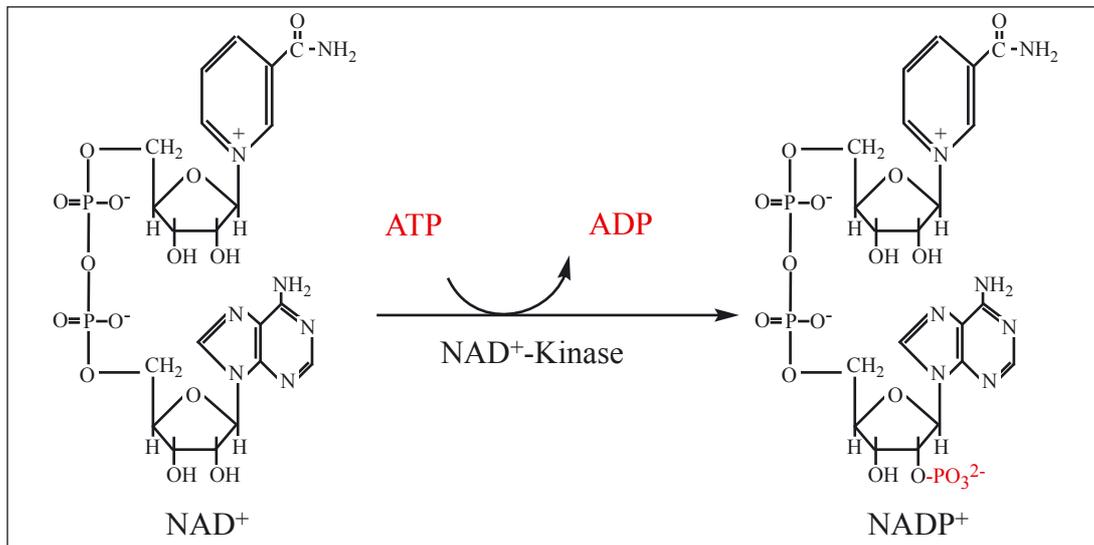
Die drei Vorstufen werden im ersten Schritt der NAD<sup>+</sup>-Synthese auf 5-Phosphoribosyl- $\alpha$ -Pyrophosphat (PRPP) übertragen, das durch die Phosphorylierung von Ribose-5-Phosphat durch die Ribosephosphat-Pyrophosphokinase entsteht. Die Phosphoribosylierung von Chinolinat, Nikotinat und Nikotinamid wird jeweils durch eine spezifische Phosphoribosyltransferase katalysiert, wobei aus Chinolinat und Nikotinat Nikotinatmononukleotid (NAMN) und aus Nikotinamid NMN (siehe Abb. 1.9, Seite 18) entstehen.

Diese beiden Mononukleotide (NAMN und NMN) werden im nächsten Schritt der NAD<sup>+</sup>-Synthese jeweils mit AMP verknüpft, wobei NAMN zu der NAD<sup>+</sup>-Säureform Nikotinatadenindinukleotid (NAAD<sup>+</sup>) und NMN zu NAD<sup>+</sup> umgesetzt wird. Beide Reaktionen werden von der NMNAT katalysiert (Abb. 1.9). Das hierbei entstandene NAAD<sup>+</sup> kann durch die Wirkung der NAD<sup>+</sup>-Synthetase zu NAD<sup>+</sup> amidiert werden (Abb.1.9).



**Abb. 1.9: NAD<sup>+</sup>-Synthese.** NAD<sup>+</sup> wird in Säugetierzellen aus den drei Vorstufen Chinolinat, Nikotinat und Nikotinamid synthetisiert, die durch spezifische Phosphoribosyltransferasen auf PRPP übertragen werden, wobei die Mononukleotide NMN oder NAMN entstehen. Diese werden von der NMNAT auf AMP übertragen, wobei NAD<sup>+</sup> oder NAAD<sup>+</sup> entstehen. NAAD<sup>+</sup> kann durch die NAD<sup>+</sup>-Synthetase unter ATP-Verbrauch zu NAD<sup>+</sup> amidiert werden.

$\text{NAD}^+$  kann in einem weiteren Reaktionsschritt zu  $\text{NADP}^+$  phosphoryliert werden. Diese Reaktion wird von der  $\text{NAD}^+$ -Kinase katalysiert, ATP fungiert dabei als Phosphatgruppendonator.



**Abb. 1.10:  $\text{NADP}^+$ -Synthese.**  $\text{NADP}^+$  entsteht durch die Phosphorylierung von  $\text{NAD}^+$  an der 2'-OH-Gruppe der Ribose des AMP. Die Reaktion wird von der  $\text{NAD}^+$ -Kinase katalysiert, die Phosphatgruppe stammt aus dem ATP.

### 1.5.3 Die Enzyme der $\text{NAD(P)}^+$ -Synthese

#### 1.5.3.1 Chinolinat-Phosphoribosyltransferase (Chinolinat-PRT)

Die Chinolinat-PRT (Nikotinat-Nukleotid:Diphosphat phospho- $\alpha$ -D-Ribosyltransferase (carboxylierend), EC 2.4.2.19) ist eine von drei Phosphoribosyltransferasen, die den jeweils ersten Schritt der  $\text{NAD}^+$ -Synthese katalysieren. Sie katalysiert die Decarboxylierung von Chinolinat und die Übertragung des Nikotinats auf PRPP. Bei dieser Reaktion wird Pyrophosphat und  $\text{CO}_2$  freigesetzt, es entsteht NAMN. Das Enzym ist spezifisch für Chinolinat und akzeptiert weder Nikotinat noch Nikotinamid als Substrat. Seine Aktivität wurde erstmals 1963 (Nishizuka et al.) nachgewiesen. Es konnte aus verschiedenen Mikroorganismen gereinigt, sequenziert und kristallisiert werden (Hughes et al., 1993; Eads et al., 1997). Auch die Sequenz des humanen Enzyms ist inzwischen bekannt (Fukuoka et al., 1998).

Da die Chinolinat-PRT die einzige bekannte Reaktion katalysiert, die zu einer Verminderung der Chinolinat-Konzentration führen kann, ist sie für das Gehirn von Säugetieren äußerst wichtig. Chinolinat, das als Zwischenprodukt des Tryptophanabbauweges entsteht, hat eine neurotoxische Wirkung durch die Hyperstimulation des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (Stone et al., 1981). Eine verminderte Aktivität des Enzyms steht in Zusammenhang mit neuronalen Erkrankungen wie Epilepsie (Feldblum et al., 1988) oder Chorea Huntington (Young et al., 1988).

Die subzelluläre Lokalisation des Proteins ist bisher nicht geklärt. Am N-Terminus befindet sich eine hydrophobe Signalsequenz, die eine Sekretion des Proteins zur Folge haben könnte (Fukuoka et al., 1998). Das Enzym konnte aber im Extrazellulärraum nicht nachgewiesen werden und wurde aus Hirn-, Leber- und Nierenzellen als lösliches Protein, ohne den Zusatz von Detergentien gereinigt (Okuno et al., 1988; Shibata et al., 1980), so daß es sich möglicherweise um ein cytosolisches Protein handelt.

### 1.5.3.2 Nikotinat-Phosphoribosyltransferase (Nikotinat-PRT)

Die Nikotinat-PRT (Nikotinat-Nukleotid:Diphosphat Phospho- $\alpha$ -D-Ribosyltransferase, EC 2.4.2.11, Preiss und Handler, 1958) katalysiert analog zur Chinolinat-PRT die Übertragung von Nikotinat auf PRPP. Bei dieser Reaktion entsteht ebenfalls Pyrophosphat und NAMN. Das Enzym ist spezifisch für Nikotinat. Die Primärstrukturen der Nikotinat-PRT aus verschiedenen Bakterien (Wubbolts et al., 1990, Vinitzky et al., 1991) und *S. cerevisiae* (Rajavel et al., 1998) sind bekannt. Die Aminosäuresequenz des humanen Proteins ist allerdings bislang noch nicht ermittelt worden.

Der Reaktionsmechanismus des Enzyms beinhaltet eine seltene Form der Energiekopplung: Prinzipiell kann die Reaktion in Abwesenheit von ATP ablaufen. In Gegenwart von ATP bindet das Enzym die Substrate allerdings mit einer um 2000fach erhöhten Affinität. Diese veränderte Substrataffinität kommt durch eine Autophosphorylierung zustande, wobei ATP als Phosphatdonator fungiert und stöchiometrisch hydrolysiert wird. (Vinitzky und Grubmeyer, 1993; Rajavel et al., 1998).

Die humane Nikotinat-PRT wurde hauptsächlich in Erythrozyten und Lymphozyten untersucht. Das Enzym ist löslich, seine subzelluläre Lokalisation ist aber bislang unbekannt. In Hefezellen konnte es in hohen Konzentrationen im Kern detektiert werden (Anderson et al., 2002).

Kürzlich wurde die Nikotinat-PRT mit dem durch die NAD<sup>+</sup>-abhängige Histondeacetylase Sir2p kontrollierten *gene-silencing* in Zusammenhang gebracht (s. o.). Hefestämme ohne Nikotinat-PRT wiesen ein gestörtes *gene-silencing* auf, was mit einer Verkürzung der Lebensdauer einherging. Umgekehrt hatte eine Erhöhung des Nikotinat-PRT-Spiegels in Hefezellen ein vermehrtes Sir2p-abhängiges *gene-silencing* zur Folge und erhöhte die Lebensdauer der Zellen.

### 1.5.3.3 Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase (Nikotinamid-PRT)

Die Nikotinamid-PRT (Nikotinamid-Nukleotid:Diphosphat Phospho- $\alpha$ -D-Ribosyltransferase, EC 2.4.2.12, Preiss und Handler, 1957) katalysiert die Übertragung von Nikotinamid auf PRPP. Bei dieser Reaktion entstehen Pyrophosphat und NMN. Das Enzym ist spezifisch für Nikotinamid und akzeptiert weder Nikotinat noch Chinolinat als Substrat. Das Protein hat wahrscheinlich eine cytosolische Lokalisation (Dietrich et al., 1966) und wird ähnlich der Nikotinat-PRT durch ATP stimuliert. Bisher ist keine Aminosäuresequenz des Proteins bekannt, die enzymatische Aktivität konnte aber in zahlreichen Organismen und verschiedenen Säugetiergeweben (Leber, Erythrozyten) nachgewiesen werden.

Die Aktivität des Enzyms in Säugetiergeweben ist äußerst gering (Rocchigiani et al., 1992), was seine Reinigung bisher erschwert hat. Auch ist unklar welchen Anteil die NAD<sup>+</sup>-Synthese aus Nikotinamid an der Gesamt-NAD<sup>+</sup>-Synthese hat. Chinolinat-PRT- und Nikotinat-PRT-defiziente Hefezellen sind letal (Panozzo et al., 2002). Ohne diese beiden Enzyme ist demnach eine Aufrechterhaltung des Mononukleotid-Spiegels für die NAD<sup>+</sup>-Synthese allein durch die Nikotinamid-PRT nicht möglich.

### 1.5.3.4 NMNAT

Die NMNAT (ATP:Nikotinamid-Nukleotid Adenylyltransferase, EC 2.7.7.1; oder ATP:Nikotinat-Ribonukleotid Adenylyltransferase, EC 2.7.7.18) katalysiert die Übertragung einer Adenyl-Einheit von ATP auf eines der beiden Mononukleotide NMN oder NAMN, wobei Pyrophosphat freigesetzt wird. Je nach Mononukleotid entstehen bei dieser Reaktion  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NAAD}^+$ , das in einem weiteren Reaktionsschritt ebenfalls zu  $\text{NAD}^+$  umgesetzt werden kann. Die NMNAT ist damit an der Synthese von  $\text{NAD}^+$  aus allen drei Vorstufen beteiligt und daher essentiell für jeden Organismus. Die Reaktion ist vollständig reversibel. NMNAT kann daher in Gegenwart von Pyrophosphat und  $\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{NAAD}^+$  ATP synthetisieren. Das Enzym wird aus diesem Grund auch als  $\text{NA(A)D}^+$ -Pyrophosphorylase bezeichnet.

Der erste Nachweis einer solchen Enzymaktivität gelang Arthur Kornberg 1948, der NMNAT in Hefehomogenaten nachwies und anreicherte (Kornberg, 1948, 1950). Beinahe 50 Jahre später konnte schließlich erstmals die Primärstruktur einer NMNAT aus *M. jannaschii* bestimmt werden (Raffaelli et al. 1999). Seitdem wurde das Enzym intensiv untersucht, und es konnten die Aminosäuresequenzen des Proteins aus zahlreichen Mikroorganismen (Raffaelli et al., 1999, 2001; Emanuelli et al., 1999; Mehl et al., 2000) und des humanen Enzyms (Schweiger et al., 2001; Emanuelli et al., 2001) ermittelt werden. Von den Proteinen aus *M. jannaschii* (D'Angelo et al., 2000), *M. thermoautotrophicum* (Saridakis et al., 2000), *E. coli* (Zhang et al., 2002) *H. influenzae* (Singh et al., 2002) und *H. sapiens* (Werner et al., 2002; Garavaglia et al., 2002, Zhou et al., 2002) wurden inzwischen Kristallstrukturen bestimmt.

Die NMNAT befindet sich hauptsächlich im Kern. Erstmals wurde diese Lokalisation anhand von Aktivitätsmessungen an isolierten Leberzellkernen nachgewiesen (Hogeboom et al., 1952). Im Kern befindet sich auch der Hauptabbauweg des  $\text{NAD}^+$  durch die Poly-ADP-Ribosylierung. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, daß die Aktivität der PARP und der NMNAT wechselseitig reguliert sind. Eine Assoziation der beiden Enzyme untereinander und mit dem Chromatin konnte beobachtet werden (Uhr et al., 1982). Weiterhin wurde in *in vitro*-Experimenten eine Inhibition der PARP aus Rinderhoden durch die NMNAT aus Hefe beobachtet. Eine ADP-Ribosylierung der NMNAT konnte dabei nicht nachgewiesen werden (Ruggieri et al., 1990). Neben der im Kern lokalisierten NMNAT konnte eine entsprechende  $\text{NAD}^+$ -synthetisierende Enzymaktivität in Leberzellmitochondrien detektiert werden (Barile et al., 1996). Kürzlich konnten tatsächlich zwei weitere NMNAT-Isoformen (NMNAT-2, Raffaelli et al., 2002 und NMNAT-3, Zhang et al., 2003) kloniert werden, von denen NMNAT-3 zumindest teilweise mit Mitochondrien colokalisierte.

Mit Hilfe der Sequenzdaten der humanen NMNAT konnte kürzlich ein genetischer Defekt in Mäusen aufgeklärt werden, der seit langem als Modell zur Untersuchung von Vorgängen des Axonsterbens nach einer Verletzung genutzt wird. Das Durchtrennen eines Axons führt zum Abbau der Myelinschicht und des verletzten Axons innerhalb weniger Stunden durch einen Prozeß, der als "Waller-Degeneration" bekannt ist (Waller, 1850). Bei der "*slow wallerian degeneration mouse*" (*Wlds*)-Maus dagegen überlebt das Axon noch bis zu 14 Tage nach einer Verletzung (Perry et al., 1990). Dies ist auf eine genetische Umorganisation in einem Bereich auf dem Chromosom 4 der Maus zurückzuführen, bei der ein neues Gen entsteht. Das Genprodukt ist, wie kürzlich bekannt wurde, aus der vollständigen Sequenz der NMNAT und 18 Aminosäuren des ubiquitinylierenden Proteins Ufd2 zusammengesetzt (Conforti et al., 2000; Gillingwater et al., 2001). Dieses Fusionsprotein wird stark in Axonen der *Wlds*-Maus exprimiert und kann alleine den *Wlds*-Phänotyp auslösen, wie anhand von Experimenten mit transgenen Mäusen gezeigt wurde (Mack et al., 2001). Die Aktivität der NMNAT in den

Gehirnzellen von *Wlds*-Mäusen bzw. transgenen Mäusen ist stark erhöht, dennoch bleibt der  $\text{NAD}^+$ -Spiegel in diesen Zellen auf ähnlichem Niveau wie in Zellen, die das Fusionsprotein nicht exprimieren (Mack et al., 2001).

Die NMNAT ist essentiell für die Wirksamkeit verschiedener Chemotherapeutika. Tiazofurin, Selenazofurin oder Benzamidribosid werden von der NMNAT zu den cytotoxischen Dinukleotiden Tiazofurin-, Selenazofurin- oder Benzamidadenindinukleotid umgesetzt (Cooney et al., 1983). Diese Stoffe sind starke Inhibitoren der IMP-Dehydrogenase und unterbinden letztlich die GTP-Synthese, was sich tödlich vor allem auf schnellwachsende Zellen auswirkt (Cooney et al. 1982). Diese Stoffe wurden bislang mit Erfolg an Leukämiepatienten getestet, ein mehrmaliger Einsatz führte jedoch zu einer Resistenz. Der Grund hierfür ist u. a. eine Verminderung der NMNAT-Aktivität von bis zu 95 Prozent in resistenten Zellen (Jayaram, 1985). Umgekehrt weisen tiazofurinsensitive Leukämiezellen eine erhöhte NMNAT-Aktivität auf (Yalowitz et al., 2002). Es wäre aus diesem Grund vielversprechend, einen Test zu entwickeln, mit dem die NMNAT-Expression einer Zelllinie vor Einsatz dieser Chemotherapeutika getestet werden kann.

#### 1.5.3.5 $\text{NAD}^+$ -Synthetase

Die  $\text{NAD}^+$ -Synthetase (Deamido- $\text{NAD}$ :Ammonium Ligase, EC 6.3.1.5 oder Deamido- $\text{NAD}$ :L-Glutamin Amido-Ligase, EC 6.3.5.1) katalysiert die Amidierung von  $\text{NAAD}^+$ , wobei  $\text{NAD}^+$  entsteht. Bei dieser Reaktion wird ATP hydrolysiert und zu AMP und  $\text{PPi}$  umgesetzt. Als Aminogruppendonator fungiert entweder Ammonium oder Glutamin, das zu Glutamat umgesetzt wird.

Das Protein wurde bislang aus verschiedenen Mikroorganismen rekombinant hergestellt (Alibertini et al., 1987) und kristallisiert (Rizzi et al., 1996). Kürzlich konnten erstmals die Primärstrukturen von zwei humanen  $\text{NAD}^+$ -Synthetasen identifiziert werden, wovon eine Glutamin und Ammonium als Aminogruppendonator verwendet und die andere ausschließlich Ammonium akzeptiert. Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Enzyme durch ihre gewebespezifische Expression. Bislang wird davon ausgegangen, daß das Enzym cytosolisch lokalisiert ist (Preiss und Handler, 1958).

#### 1.5.3.6 $\text{NAD}^+$ -Kinase

Die  $\text{NAD}^+$ -Kinase (ATP: $\text{NAD}$  2'-phosphoribosyltransferase, EC 2.7.1.23) katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von  $\text{NAD}^+$ , wobei  $\text{NADP}^+$  und ADP entstehen. Sie katalysiert die einzige bekannte Reaktion, die zu einer Nettosynthese des löslichen Elektronenüberträgers  $\text{NADP}^+$  führt. Die Aktivität dieses Enzyms konnte erstmals von Vestin (1937) und von Euler (1938) in Hefehomogenaten nachgewiesen werden. Die erste partielle Reinigung wurde 1950 von Kornberg ebenfalls aus Hefe erzielt. Die  $\text{NAD}^+$ -Kinase konnte in einer Vielzahl von Organismen und Geweben nachgewiesen werden. Kürzlich gelang es erstmals eine Primärstruktur der  $\text{NAD}^+$ -Kinase aus *M. tuberculosis* zu ermitteln (Kawai et al., 2000). Inzwischen sind die Aminosäuresequenzen der Proteine aus *E. coli* (Kawai et al., 2001-A), Hefe (Kawai et al., 2001-B) und die des humanen Enzyms (Lerner et al., 2001) bekannt.

Bei der  $\text{NAD}^+$ -Kinase handelt es sich um ein überwiegend cytosolisches, lösliches Protein (Wang et al., 1954, Nemchinskaya, 1963). In Hefe-Mitochondrien wurde aber ebenfalls eine  $\text{NAD}^+$ -Kinase-Aktivität detektiert (Bernofski et al., 1968). Dieses Enzym bevorzugt im Unterschied zu der cytosolischen Form  $\text{NADH}$  als Substrat und wird daher als  $\text{NADH}$ -Kinase

bezeichnet. Es wird angenommen, daß die mitochondriale Form etwa fünf Prozent der gesamten NAD<sup>+</sup>-Kinase-Aktivität in Zellen ausmacht (Griffiths et al., 1972).

Eine Charakterisierung der NAD<sup>+</sup>-Kinase aus verschiedenen Organismen und Geweben wurde bereits durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, daß die von ihr katalysierte Reaktion reversibel ist (Apps et al., 1977). Sie weist eine hohe Spezifität für ihren Phosphatgruppendonator auf; ATP kann ausschließlich durch dATP ersetzt werden (Yero et al., 1968). Für ihr Substrat NAD<sup>+</sup> konnte dagegen eine gewisse Variabilität gezeigt werden. Das Substratanalogon 3-Acetyl-Pyridin-Adenin-Dinukleotid wird ebenso phosphoryliert wie  $\alpha$ -NAD<sup>+</sup> (Suzuki et al., 1967). Dies ist besonders aus dem Grund interessant, da öfter die Vermutung geäußert wurde, daß die NAD<sup>+</sup>-Kinase NAAD<sup>+</sup> phosphorylieren könnte und somit für die Synthese des Calcium freisetzenden Stoffes NAADP<sup>+</sup> in Frage käme (Chini et al., 1995, Lee et al., 1995, Genazzani et al., 1997).

Die Aktivität der NAD<sup>+</sup>-Kinase wird wahrscheinlich durch den Redoxstatus der Zelle reguliert. Darauf weist ihre Inhibition durch NADPH hin (Yamamoto, 1966; Oka et al., 1968). Ein entsprechender Regulationsmechanismus der NADH-Kinase ist bislang nicht bekannt.

Außerdem konnte eine Stimulation durch Calcium/Calmodulin bei der NAD<sup>+</sup>-Kinase aus Seeigeleiern (Epel et al., 1981), grünen Pflanzen (Corimer et al., 1981; Anderson et al., 1978) und humanen Neutrophilen (Williams et al., 1984) gezeigt werden. In Seeigeleiern korrespondiert der Anstieg der Aktivität der NAD<sup>+</sup>-Kinase mit dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration während der Fertilisation.

#### 1.5.4 Die Regulation der NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>-Synthese

Bei Untersuchungen an menschlichen Erythrozyten konnte eine direkte Abhängigkeit des ATP-Gehalts einer Zelle und deren NAD<sup>+</sup>- bzw. NADP<sup>+</sup>-Spiegel beobachtet werden (Pescarmona et al., 1977). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch an isolierten Leberzellen gezeigt werden. Zwischen dem cytosolischen NAD<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup>-Gehalt dieser Zellen und dem cytosolischen ATP-Spiegel bestand eine lineare Abhängigkeit (Devin et al., 1997). Dies ist insofern nicht überraschend, da die NAD(P)<sup>+</sup>-Synthese relativ energieaufwendig ist. Für ein Molekül NAD<sup>+</sup> wird -abhängig davon, welche Vorstufen verwendet werden- die Energie von zwei bis sechs Phosphoanhydridbindungen benötigt und eine weitere für die Synthese des NADP<sup>+</sup>. Da praktisch jeder Schritt der NAD(P)<sup>+</sup>-Synthese ATP-abhängig ist, ist dennoch nicht klar, welches der Proteine das Schrittmacherenzym ist.

Die NMNAT ist als einziges Enzym an der Synthese von NAD<sup>+</sup> aus allen bekannten Vorstufen beteiligt. Daher ist es wahrscheinlich, daß die Regulation der NAD<sup>+</sup>-Synthese mit einer Regulation dieses Enzyms einhergeht. Bislang konnte aber lediglich eine nicht-kompetitive Hemmung der NMNAT durch hohe Konzentrationen von ADP-Ribose (10 mM) beobachtet werden (Emmanuelli et al., 1992). Interessant sind die Erkenntnisse, die aus Experimenten mit Zellen von *Wlds*-Mäusen gezogen werden konnten. Diese Zellen weisen eine stark erhöhte NMNAT-Aktivität auf. Der NAD<sup>+</sup>-Spiegel in diesen Zellen ist aber vergleichbar mit den Zellen des Wildtyps (Mack et al., 2001).

Die Regulation der NADP<sup>+</sup>-Synthese wird wahrscheinlich mit einer Regulation der NAD<sup>+</sup>-Kinase einhergehen. Deren Aktivität wird durch das reduzierte Nikotinamid-Coenzym NADPH inhibiert (Yamamoto, 1966; Oka et al., 1968). In Erythrozyten von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase defizienten Zellen, die einen niedrigen NADPH-Spiegel aufweisen, konnte tatsächlich eine Verschiebung des NAD/NADP-Verhältnis zu Gunsten von NADP beobachtet werden (Pescarmona et al., 1977). Eine Erklärung für diese Beobachtung ist die

niedrige Konzentration des Inhibitors der NAD<sup>+</sup>-Kinase, NADPH, in diesen Zellen, die eine Hemmung des Enzyms verhindert. Diese Beobachtung korreliert mit der Funktion des NADP<sup>+</sup>. Wenn die Zelle ausreichend mit Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH für reduktive Biosynthesewege und Schutzmechanismen versorgt ist, ist eine Neusynthese von NADP<sup>+</sup> nicht nötig und wird gehemmt. Fällt dagegen der NADPH-Spiegel einer Zelle unterhalb eines kritischen Wertes wird die Synthese der NADPH-Vorstufe NADP<sup>+</sup> nicht mehr gehemmt. NADP<sup>+</sup> kann dann nachfolgend von der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu NADPH umgesetzt werden. Ein weiterer Regulationsmechanismus der NAD<sup>+</sup>-Kinase konnte in Seeigeleiern, grünen Pflanzen und humanen Neutrophilen beobachtet werden, deren NAD<sup>+</sup>-Kinasen eine Sensitivität gegenüber Calcium/Calmodulin zeigten und dadurch aktiviert wurden (Anderson et al., 1978; Corimer et al., 1981; Epel et al., 1981; Williams et al., 1984).

Durch die Entdeckung immer neuer Funktionen der beiden Nukleotide NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup>, sind die Reaktionsschritte der Synthese und des Abbaus sowie deren Regulation immer mehr in den Mittelpunkt des allgemeinen Interesses gerückt. Aus diesem Grund werden zukünftige Studien die bisherigen Erkenntnisse zum NAD(P)<sup>+</sup>-Stoffwechsel sicherlich schon bald vervollständigen.

## 1.6 Zielsetzung

NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> stehen als Redoxcoenzyme an einer Schlüsselposition des Energiestoffwechsels jedes bekannten Organismus. Darüber hinaus sind sie als Vorstufen für Signalmoleküle und Substrate für kovalente Proteinmodifikationen wichtige Bestandteile des Signalstoffwechsels in eukaryotischen Zellen. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit die essentiellen Enzyme der Synthese dieser beiden Moleküle zu untersuchen.

Eine Reinigung der NAD<sup>+</sup>-Kinase war seit Ende der 1960er Jahre das Ziel zahlreicher Arbeiten gewesen und wurde vor allem aus Taubenleber, Ratte, Kaninchen und der Hefe *S. cerevisiae* vorgenommen. Einige Male wurde von homogenen Proteinpräparationen berichtet, eine Anreicherung des Enzyms um mehr als das 4000fache konnte allerdings nie erreicht werden. Daher lagen zu Beginn dieser Arbeit auch keinerlei Sequenzdaten zu einer NAD<sup>+</sup>-Kinase vor, so daß eine Klonierung des Enzyms nicht möglich war.

Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Arbeit ein Reinigungsschema zu entwickeln mit dem es möglich werden sollte die NAD<sup>+</sup>-Kinase bis zur Homogenität zu reinigen und eine Sequenzierung des Proteins zu ermöglichen. Mit diesen Sequenzen sollte möglichst eine humane cDNA-Sequenz ermittelt und kloniert werden. Das korrespondierende Protein sollte in Bakterienzellen überexprimiert werden, um die enzymatische Aktivität zu bestätigen und eine Reinigung größerer Mengen des Proteins zu erlauben. Mit Hilfe von Antikörpern gegen das rekombinante Protein sollte die humane NAD<sup>+</sup>-Kinase einer zellbiologischen Untersuchung zugänglich gemacht werden.

Im Laufe der letzten Jahre ist die NAD<sup>+</sup>-Kinase vor allen Dingen deshalb in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da vermutet wurde, daß sie die Synthese des Calcium freisetzenden Stoffs NAADP<sup>+</sup> bzw. dessen Vorstufe synthetisiert. In Vorversuchen war es bereits möglich gewesen, eine schwache Phosphorylierung von NAAD<sup>+</sup> in angereicherten Fraktionen der NAD<sup>+</sup>-Kinase aus Rinderleber zu messen. Da diese Aktivität labil und äußerst gering war, wurde für die Charakterisierung einer möglichen NAAD<sup>+</sup>-Kinase-Aktivität der NAD<sup>+</sup>-Kinase ebenfalls die Überexpression der NAD<sup>+</sup>-Kinase angestrebt.

Die NMNAT ist das essentielle Enzym der NAD<sup>+</sup>-Synthese und synthetisiert daher das Coenzym zahlreicher Stoffwechselreaktionen, die Vorstufe der Mono- und Poly-ADP-Ribosylierung und der cADP-Ribose. Das Enzym wurde seit seiner Entdeckung intensiv charakterisiert und es lagen zu Beginn der Arbeit zahlreiche Berichte über seine Reinigung und Charakterisierung vor, mit deren Hilfe es in unserem Labor möglich war, die NMNAT aus humaner Plazenta zu reinigen und erstmals zu klonieren. Es war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die NMNAT zellbiologisch zu charakterisieren. Darüber hinaus war es von großem Interesse mögliche Regulationsmechanismen des Enzyms zu finden.

Da die NMNAT offenbar als einziges Enzym des NAD<sup>+</sup>-Stoffwechsels im Kern lokalisiert ist, wurde vermutet, daß das Enzym neben der NAD<sup>+</sup>-Synthese eine weitere Funktion erfüllt, die ihre Anwesenheit im Kern erfordert, beispielsweise im Zusammenhang mit der Poly-ADP-Ribosylierung. Es erschien daher interessant den Zusammenhang von NMNAT und PARP zu untersuchen oder einen alternativen Grund für die Kernlokalisation des Enzyms zu finden.