

NAD⁺-abhängige Signalwege in Mitochondrien

ADP-Ribosyltransferase und NAD⁺-Glycohydrolase

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Chemie
an der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Dierk Jorcke
aus Berlin**

1998

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 1995 bis November 1998 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt zu haben.

1. Gutachter : Prof. Dr. Dr. M. Schweiger

2. Gutachter : Prof. Dr. F. Hucho

Tag der Disputation : 11.02.1999

Für
Meike,
Frederic und Tabea

Prophet 16f., Von den Kindern.
Eure Kinder sind nicht eure Kinder.
Sie sind die Söhne und Töchter der Sehnsucht des Lebens nach sich selber.
Sie kommen durch euch, aber nicht von euch,
Und obwohl sie mit euch sind, gehören sie euch doch nicht.
Ihr dürft ihnen eure Liebe geben, aber nicht eure Gedanken,
Denn sie haben ihre eigenen Gedanken.
Ihr dürft ihren Körpern ein Haus geben, aber nicht ihren Seelen,
Denn ihre Seelen wohnen im Haus von morgen,
das ihr nicht besuchen könnt, nicht einmal in euren Träumen.
Ihr dürft euch bemühen, wie sie zu sein,
aber versucht nicht, sie euch ähnlich zu machen.
Denn das Leben läuft nicht rückwärts, noch verweilt es im Gestern.
Ihr seid die Bogen, von denen eure Kinder als lebende Pfeile ausgeschickt werden.
Der Schütze sieht das Ziel auf dem Pfad der Unendlichkeit, und Er spannt euch mit
Seiner Macht, damit seine Pfeile schnell und weit fliegen.
Laßt euren Bogen von der Hand des Schützen auf Freude gerichtet sein;
Denn so wie Er den Pfeil liebt, der fliegt, so liebt Er auch den Bogen, der fest ist.

Khalil Gibran

1. EINLEITUNG	1
1.1 NAD⁺-METABOLISIERENDE ENZYMAKTIVITÄTEN	2
1.1.1 ADP-RIBOSYLTRANSFERASEN	2
1.1.2 NAD ⁺ -GLYCOHYDROLASEN	6
1.2 REGULATION DER ZELLULÄREN CALCIUM-HOMÖOSTASE	10
1.2.1 BEDEUTUNG DER MITOCHONDRIEN FÜR DIE ZELLULÄRE CALCIUM-HOMÖOSTASE	11
1.2.2 REGULATION MITOCHONDRIALER CALCIUM-FLUXE DURCH PYRIDINNUKLEOTIDE	12
2. ZIELSETZUNG	15
3. ERGEBNISSE	16
3.1 ADP-RIBOSYLIERUNG IN RINDERLEBERMITOCHONDRIEN	16
3.1.1 DIE KOVALENTE MODIFIZIERUNG MITOCHONDRIALER PROTEINE MIT ADP-RIBOSE IST EINE ENZYMATISCHE REAKTION	17
3.1.2 IDENTIFIZIERUNG DER MODIFIZIERENDEN GRUPPE ALS ADP-RIBOSE	19
3.1.3 DIE ADP-RIBOSYLIERUNG MITOCHONDRIALER PROTEINE ERFOLGT ÜBERWIEGEND AN CYSTEINRESTEN	20
3.1.4 DIE ALDEHYD-DEHYDROGENASE AUS HEFE WIRD DURCH DIE MITOCHONDRIALE ADPRT MODIFIZIERT	21
3.1.5 KONSEQUENZEN FÜR DIE MITOCHONDRIALE ADP-RIBOSYLIERUNG	23
3.2 DIE MITOCHONDRIALE NAD⁺-GLYCOHYDROLASE - EIN BIFUNKTIONELLES ENZYM	24
3.2.1 ADP-RIBOSYL CYCLASE-AKTIVITÄT DER MITOCHONDRIALEN NADASE	25
3.2.2 DIE MITOCHONDRIALE NADASE KATALYSIERT DIE HYDROLYSE VON CADP-RIBOSE	29
3.2.3 REVERSIBILITÄT DER ADP-RIBOSYL CYCLASE-REAKTION - TRANSGLYKOSYLIERUNG	30
3.2.4 MODELL DER PROOXIDANS-INDUZIERTEN CALCIUM-FREISETZUNG AUS MITOCHONDRIEN	31
4. DISKUSSION	33
5. ZUSAMMENFASSUNG	38
6. MATERIAL UND METHODEN	40
6.1 ZELLFRAKTIONIERUNG DER RINDERLEBER	40
6.1.1 ISOLIERUNG VON MITOCHONDRIEN	40
6.1.2 HERSTELLUNG VON SUBMITOCHONDRIALEN PARTIKELN (SMPs)	40
6.1.3 GEWINNUNG VON MIKROSOMEN	41
6.1.4 BESTIMMUNG VON MARKERENZYM-AKTIVITÄTEN MEMBRANÄRER ZELLBESTANDTEILE	41
6.1.4.1 SUCCINAT-DEHYDROGENASE	41
6.1.4.2 GLUCOSE-6-PHOSPHATASE	42
6.1.4.3 ATPASEN	42

6.2 ISOLIERUNG DER NAD⁺-GLYCOHYDROLASE	43
6.2.1 DETERGENZSOLUBILISIERUNG	43
6.2.2 CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN	44
6.2.3 FLUORESCENZPHOTOMETRISCHER NACHWEIS ENZYMATISCHER AKTIVITÄTEN DER NADASE	45
I. VERWENDUNG VON 1,N ⁶ -ETHENO-NAD ⁺ (ε-NAD ⁺)	46
II. VERWENDUNG VON NIKOTINAMIDGUANINDINUKLEOTID (NGD ⁺) UND NIKOTINAMIDHYPOXANTHINDINUKLEOTID (NHD ⁺)	46
6.2.4 IDENTIFIZIERUNG DER NADASE IN DER SDS-PAGE DURCH FLUORESCENZFÄRBUNG	47
I. VERWENDUNG VON 1,N ⁶ -ETHENO-NAD ⁺ (ε-NAD ⁺)	47
II. VERWENDUNG VON NIKOTINAMIDHYPOXANTHINDINUKLEOTID (NHD ⁺)	47
6.2.5 IDENTIFIZIERUNG DER REAKTIONSPRODUKTE DER ISOLIERTEN NADASE	48
6.2.5.1 DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE	48
6.2.5.2 HOCHAUFLÖSENDE FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE (HPLC)	49
6.3 ADP-RIBOSYLIERUNG	50
6.3.1 MITOCHONDRIALE ADP-RIBOSYLIERUNG	50
6.3.2 CHEMISCHE STABILITÄT DER ADP-RIBOSE-BINDUNGEN MITOCHONDRIALER PROTEINE	51
6.3.3 ADP-RIBOSYLIERUNG DER ALDEHYD-DEHYDROGENASE (ALDH) AUS HEFE	51
6.3.4 MODIFIZIERUNG VON THIOLGRUPPEN DER ALDH	52
6.4 PROTEINANALYTIK	52
6.4.1 PROTEINBESTIMMUNG	52
6.4.1.1 BIURET-METHODE	52
6.4.1.2 BCA-METHODE	53
6.4.2 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	53
6.4.3 COOMASSIE-FÄRBUNG	54
6.4.4 SILBERFÄRBUNG	55
6.4.5 AUTORADIOGRAPHIE	55
7. LITERATUR	56
7.1 ZITIERTER LITERATUR ANDERER AUTOREN	56
7.2 ZITIERTER EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	65
8. ANHANG	66
8.1 FLUORESZENTE ANALOGA CYCLISCHER ADP-RIBOSE	66
8.2 KURZFASSUNG DER ERGEBNISSE	67
ABSTRACT	68
8.3 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	69
8.4 ABKÜRZUNGEN	70
8.5 LEBENS LAUF	71
8.6 DANKSAGUNG	73