

**Untersuchungen zu ADP-Ribosylcyclasen
in humanen
immunkompetenten Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katrin Schweitzer

aus Hamburg

2002

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg wurde in der Zeit vom 1.10.1998 bis zum 31.01. 2002 unter der Leitung von Herrn Prof. A.H. Guse (Fachbereich Medizin der Universität Hamburg) in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Martinstraße 52, 20246 Hamburg) durchgeführt.

Erstgutachter: Herr Prof. A.H. Guse
 (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie)

Zweitgutachter: Herr Prof. L. Renwrantz
 (Zoologisches Institut der Biologischen Fakultät)

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. A. H. GUSE

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ

Tag der Disputation: 22. November 2002

Hamburg, den 08. November 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1 Ca ²⁺ -Homöostase und Aktivierung von T-Lymphozyten.....	1
1.2 Molekulare Grundlagen der Modulation der [Ca ²⁺] _i	4
1.3 Intrazelluläre Signalwege zur Modulation der [Ca ²⁺] _i	10
1.3.1 Der IP ₃ -vermittelte Signalweg zur Freisetzung von Ca ²⁺	12
1.3.2 Der cADPR-vermittelte Signalweg zur Freisetzung von Ca ²⁺	14
1.4 ADP-Ribosylcyclasen/NAD-Glykohydrolasen.....	21
1.4.1 Lösliche ADPRCs/NASDGHs.....	27
1.4.2 Membranständige ADPRCs/NADGHs.....	30
1.4.2.1 CD157/BST-1 (bone marrow stromal tissue antigen).....	30
1.4.2.2 CD38 und mit diesem verwandte, membranständige ADPRCs/NADGHs.....	32
1.5 Bedeutung unterschiedlicher Second-Messenger-Systeme im Rahmen der Aktivierung von T-Lymphozyten.....	38
2. Problemstellung	40
3. Material und Methoden	42
3.1 Materialien und Geräte.....	42
3.1.1 Chemikalien und Lösungen.....	42
3.1.2 Molekulargewichtsmarker für die SDS Gelelektrophorese.....	44
3.1.3 Nukleotide und Nukleotidanaloga.....	44
3.1.4 Potentielle Cyclaseinhibitoren.....	44
3.1.5 Monoklonale Antikörper.....	45
3.1.6 Polyklonale Antikörper.....	46
3.1.7 Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper.....	46
3.1.8 Verwendete Zelltypen und Zell-Linien.....	46
3.1.9 Puffer, Stammlösungen und Medien.....	46
3.1.10 Geräte.....	51
3.1.10.1 Allgemeine Labor- und Zellkulturgeräte.....	51
3.1.10.2 Spezielle Geräte und Materialien.....	52
3.2 Methoden.....	54
3.2.1 Kultivierung von Jurkat T-Lymphozyten.....	54
3.2.2 Gewinnung von Wildtyp und CD38 (-/-)-T-Lymphozyten aus Milzen der Maus.....	55
3.2.3 Subzelluläre Fraktionierung von Zellen.....	56
3.2.4 Entsalzung und/oder Umpufferung der S100-Fraktion über Sephadex G-25 superfine HiTrap-Säulen.....	58
3.2.5 Proteingehaltsbestimmung nach der Bradford-Methode in subzellulären Fraktionen.....	60

3.2.6	HPLC-Enzymassay auf ADPRC-Aktivität unter Verwendung des Substrates β -NAD und UV-Detektion zum Nachweis der Nukleotide.....	60
3.2.6.1	Vorbereitung von Proben für den HPLC-Enzymassay.....	60
3.2.6.2	HPLC-Analyse.....	61
3.2.7	Fluorimetrische Assays auf ADPRC- und NADGH-Aktivität.....	61
3.2.7.1	Kontinuierlicher ϵ -NAD-Enzymassay (NADase-Assay)	61
	<u>A:</u> Basisprotokoll.....	61
	<u>B:</u> Protokoll zur Evaluierung potentieller Inhibitoren der ADPRC- und/oder NADGH-Aktivität.....	62
3.2.7.2	Fluorimetrischer Enzymassay auf ADPRC-/NADGH-Aktivität im Photometriemodus.....	63
3.2.7.3	GDP-Ribosylcyclase(GDPRC)-Assay mit intakten Zellen am Fluorimeter.....	64
	<u>A:</u> Basisprotokoll.....	64
	<u>B:</u> Protokoll zur Validierung von Inhibitoren der ADPRC-/GDPRC-Aktivität.....	65
3.2.8	HPLC- ϵ -NAD-Enzymassay mit Fluoreszenzdetektion.....	65
3.2.8.1	Reversed-Phase-Ionenpaar-HPLC mit Fluoreszenzdetektion.....	65
3.2.8.2	Synthese von 1,N ⁶ -etheno-Adeninnukleotid-Standards für die HPLC.....	67
3.2.9	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ an Populationen intakter, mit Fura-2-beladener Zellen.....	67
3.2.9.1	Basisprotokoll.....	67
3.2.9.2	Protokoll zur vorherigen Inhibition des Ektoenzym CD38 intakter Zellen.....	68
3.2.10	Proliferationsassay von Jurkat T-Lymphozyten.....	69
3.2.11	Solubilisierung subzellulärer Fraktionen mit Detergenz.....	69
3.2.11.1	Solubilisierung von Protein für die CD38-Immunpräzipitation.....	69
3.2.11.2	Solubilisierung von Protein für die säulenchromatographische Aufreinigung von ADPRCs/NADGHs.....	70
3.2.12	Immunpräzipitation von CD38.....	70
3.2.13	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	73
3.2.13.1	Gießen von Gelen.....	73
3.2.13.2	Probenaufbereitung und Durchführung der Elektrophorese.....	74
	<u>A:</u> Grundprotokoll zur Probenaufbereitung.....	74
	<u>B:</u> Vorbereitung Detergenz-haltiger Proben für die Elektrophorese.....	74
	<u>C:</u> Vorbereitung von IP-Beads für die Elektrophorese.....	75
	<u>D:</u> Aufkonzentrierung von Protein aus verdünnten Proben durch Phenol-Ether-Präzipitation.....	75
	<u>E:</u> Durchführung der Elektrophorese.....	75
3.2.14	„In-Gel“- ϵ -NAD-Enzymassay.....	75
3.2.15	Nachweis von CD38 durch Western Blot im Tank-Blotverfahren.....	77
3.2.16	Vorbereitung von Proteinen für die Sequenzierung.....	78
3.2.16.1	Vorbereitung von Proteinen für die N-terminale Sequenzierung.....	78

3.2.16.2	Vorbereitung von Proteinen für die Sequenzierung durch Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS).....	79
3.2.17	Coomassie-Färbung von Gelen und Western Blots.....	79
3.2.17.1	Coomassie-Färbung von Gelen.....	79
	<u>A</u> : Standard-Protokoll der Coomassie-Färbung.....	79
	<u>B</u> : Coomassie-Färbung von Sequenziergelen.....	80
3.2.17.2	Coomassie-Färbung von für die N-terminale Sequenzierung von Proteinen bestimmten PVDF-Western Blots.....	80
3.2.18	Molekulargewichtsbestimmung der ADPRCs/NADGHs subzellulärer Fraktionen der Jurkat T-Lymphozyten durch Photoaffinitätsmarkierung mit [³² P]8-N ₃ -NAD.....	80
3.2.19	Säulenchromatographische Aufreinigung von ADPRCs/NADGHs.....	80
3.2.19.1	Hydroxylapatit(HA)-Chromatographie der cytosolischen S100-Fraktion der Jurkat T-Lymphozyten.....	80
3.2.19.2	Vorversuche an Minisäulen zur weiteren Aufreinigung der ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion der Jurkat-T-Lymphozyten.....	81
3.2.19.3	SP-Sepharose-Chromatographie von ADPRCs/NADGHs.....	83
3.2.20	Statistische Auswertung von Daten.....	85
4.	Ergebnisse	86
4.1	Etablierung eines sensitiven HPLC-Enzymassays zum Nachweis von ADPRC-Aktivität.....	86
4.1.1	Versuch zur Optimierung einer etablierten Zweischritt-HPLC-Methode zur Bestimmung von cADPR als Enzymassay auf ADPRC-Aktivität.....	86
4.1.2	Entwicklung eines auf Fluoreszenzdetektion basierenden HPLC-Enzymassays auf ADPRC- und NADGH-Aktivität unter Nutzung des Ersatzsubstrates 1,N ⁶ -ethenonad (ε-NAD).....	87
4.2	Untersuchung der Bedeutung der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 für die TCR/CD3-Komplex-vermittelte Erhöhung von [Ca ²⁺] _i	100
4.2.1	Inhibition der ADPRC-/NADGH-Aktivität des Ektoenzym CD38.....	101
4.2.2	FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CD38 unter Kontroll- und für die katalytische Aktivität von CD38 inhibitorischen Bedingungen.....	104
4.2.3	Bedeutung der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 für die intrazelluläre, über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Erhöhung von [Ca ²⁺] _i	107
4.3	Charakterisierung der ADPRCs/NADGHs subzellulärer Fraktionen der Lymphozyten im Vergleich zum Ektoenzym CD38.....	110
4.3.1	Analyse der Expression und subzellulären Verteilung von CD38 in Jurkat T-Lymphozyten im Western Blot.....	110
4.3.2	Pharmakologische Charakterisierung intrazellulärer ADPRCs/NADGHs der Jurkat T-Lymphozyten und der ADPRC aus <i>Aplysia californica</i> im Vergleich zum Ektoenzym CD38.....	120
4.3.3	ADPRC- und NADGH-Aktivität in CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten <i>versus</i> Wildtyp-T-Lymphoblasten der Maus.....	136
4.3.4	Immunpräzipitation von CD38 aus subzellulären Fraktionen von Jurkat-Lymphozyten.....	141

4.3.5	Versuche zur Identifizierung der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) durch Photoaffinitätsmarkierung mit [³² P]8-N ₃ -NAD.....	156
4.4	Versuch einer proteinbiochemischen Aufreinigung der löslichen ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion.....	159
4.4.1	Anreicherung der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion durch Chromatographie an Hydroxylapatit (HA).....	159
4.4.2	Ergebnisse der Vorversuche zur weiteren chromatographischen Aufreinigung der löslichen ADPRC/NADGH der S100-Fraktion an Minisäulen.....	162
4.4.3	Anreicherung unterschiedlicher ADPRCs/NADGHs durch Chromatographie an SP-Sepharose HP und Charakterisierung (partiell) aufgereinigter Enzyme.....	165
4.4.3.1	SP-Sepharose-Chromatographie von ADPRCs/NADGHs.....	165
4.4.3.2	Charakterisierung der Proteinzusammensetzung von Fraktionen, der SP-Sepharose-Chromatographie, in denen die an die Matrix bindende Form der ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion enthalten war.....	168
4.4.3.3	Versuch einer Identifizierung der an die SP-Sepharose-Matrix bindenden Form der ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion durch den Nachweis der katalytischen Aktivität im Gel.....	172
4.4.3.4	Untersuchung von durch HA- und SP-Sepharose-Chromatographie gereinigten Präparationen der ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion im Western Blot zum Nachweis von CD38 und Identifizierung von Proteinen durch MS/MS-Sequenzierung.....	175
4.4.3.5	Untersuchung und Charakterisierung der ADPRCs/NADGHs der Membranfraktion P100 der Jurkat T-Lymphozyten.....	180
4.4.3.6	Immunpräzipitation von ADPRCs/NADGHs mit anti-CD38 mAKs aus SP-Sepharose-gereinigten Enzympräparationen und Analyse von IP-Fractionen und durch Chromatographie gereinigten Enzympräparationen im anti-CD38 Western Blot.....	189
5.	Diskussion	197
5.1	Methoden zum Nachweis und einer quantitativen Bestimmung von cADPR und ADPRC-Aktivität.....	197
5.2	Subzelluläre Verteilung von ADPRCs/NADGHs in Jurkat T-Lymphozyten und anderen Zellen.....	200
5.3	Pharmakologische und funktionelle Charakterisierung der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) der T-Lymphozyten.....	204
5.3.1	Pharmakologische Charakterisierung der ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion im Vergleich zum Ektoenzym CD38 und dem membranständigen CD38 der P10-Fraktion.....	204
5.3.2	Untersuchung der Bedeutung des Ektoenzym, bzw. intrazellulär lokalisierter ADPRCs/NADGHs für die TCR/CD3-Komplex-vermittelte Erhöhung der [Ca ²⁺] _i und die Proliferation von T-Lymphozyten.....	208
5.3.3	Modelle der funktionellen Bedeutung intrazellulärer ADPRCs/NADGHs, bzw. des Ektoenzym CD38.....	212
5.4	Versuch einer proteinbiochemischen Aufreinigung der löslichen cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) der Jurkat T-Lymphozyten.....	215
5.5	L-Plastin und andere Kandidaten einer cytosolischen, löslichen oder membranassoziierten ADPRC/NADGH in T-Lymphozyten.....	220

5.6	Erweitertes Modell des cADPR-vermittelten Signalweges zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in T-Lymphozyten	228
5.7	Schlußbetrachtungen und Auslick	232
6.	Zusammenfassung	234
7.	Abstrakt	236
8.	Literaturverzeichnis	238
9.	Danksagung	259
10.	Anhang	260
10.1	Publikationen und Abstracts	260
10.1.1	Publikationen	260
10.1.2	Abstracts und/oder Posterpräsentationen	260
10.2	Eidesstattliche Versicherung	261
10.3	Lebenslauf	262

Abkürzungen

3-ABA	3-Aminobenzamid
<i>A. californica</i>	<i>Aplysia californica</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosin-5'-Diphosphat-Ribose
ADPRC	ADP-Ribosylcyclase
AP-1	Transkriptionsfaktor (activator protein-1)
Ap ₂ A	bis-Adenindinukleotid
APS	Ammoniumpersulfat
ART	Mono-ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
ATRA	all- <i>trans</i> -Retinsäure
β-ME	β-Mercaptoethanol / 2-Merkaptoethanol
β-NMN	β-Nicotinamidmononukleotid
BSA	bovines Serumalbumin
Bp ₂ A	C1'-m-Benzamidadenindinukleotid
cADPR	cyclische Adenosin-5'-Diphosphatribose
CAM(-Kinase)	Calmodulin / Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	3',5'-cyclisches Adenosin-Monophosphat
CD	Zelloberflächenmarker (<u>cl</u> uster of <u>d</u> ifferentiation)
[Ca ²⁺] _i	freie cytosolische Ca ²⁺ -Ionenkonzentration
[cADPR] _i	cytosolische cADPR-Konzentration
CD38 (-/-)-Zellen	CD38-Knockout-Zellen
cGDPR	cyclische Guanosin-5'-Diphosphatribose
cGMP	3',5'-cyclisches Guanosinmonophosphat
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung (<u>C</u> a ²⁺ - <u>i</u> nduced <u>C</u> a ²⁺ - <u>r</u> elease)
CRAC(C)	durch Ca ²⁺ -Freisetzung aktivierter Ca ²⁺ -Einstrom(kanal)
DAG	1,2-Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ε	1,N ⁶ -etheno-
EGTA	Ethylenglycol-bis-(Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure

ER/SR	Endoplasmatisches/Sarkoplasmatisches Retikulum
EZR	Extrazellularraum
FACS	fluoreszenzaktivierter Cell Sorter
FF	Fast Flow
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDPRC-Aktivität	GDP-Ribosylcyclase-Aktivität
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hydroxylapatit
hCD38rec	eine rekombinante, lösliche Variante von humanem CD38
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HP	High Performance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	horsereddish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IP	Immunpräzipitation
Ip ₂ I	bis-Inosindinukleotid
IP ₃ / IP ₃ R	Inositol-1,4,5-Trisphosphat / IP ₃ -Rezeptor
Iso-Nic	Isonicotinamid
kDa	Kilodalton
LOC(C)	durch Bindung eines Liganden aktivierter Ca ²⁺ -Einstrom(kanal)
mAK	monoklonaler Antikörper
MW	Molekulargewicht
NAAD	Nicotinsäureadenindinukleotid
NAADP/NAADPR	Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat(-Rezeptor)
NAD(P)	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NADGH	NAD-Glykohydrolase
n.b.	nicht bestimmt
NCS	Serum neonataler Kälber
n.d.	nicht detektierbar
NF- κ B	Transkriptionsfaktor κ B
NF-AT	Transkriptionsfaktor aktivierter T-Zellen (nicht T-Zell-spezifisch)

NGD	Nicotinamidguanindinukleotid
NHD	Nicotinamidhypoxanthindinukleotid
Nic	Nicotinamid
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Nonidet P-40
mAK	monoklonaler Antikörper
OKT3	anti-CD3 mAK
P2	2000•g-Membranen
P10	10.000•g-Membranen
P100	100.000•g-Membranen
pAK	polyklonaler Antikörper
PARP	Poly-ADP-Ribosylpolymerase / -transferase
PCA	Perchlorsäure
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase der Plasmamembran
PPase	Nukleotid-Pyrophosphatase
PS10	P10-Waschfraktion (membranassoziierte, basische, cytosolische Proteine)
PS100	P100-Waschfraktion (membranassoziierte, basische, cytosolische Proteine)
PTP	permeability transition pore
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RaM	schneller Mechanismus zur Ca ²⁺ -Aufnahme in Mitochondrien
(m)RNA	(Messenger-)Ribonukleinsäure
ROC(C)	durch Rezeptorstimulation aktivierter Ca ²⁺ -Einstrom(kanal)
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase

Ry	Ryanodin
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S100	100.000•g-Überstand (cytosolische Fraktion)
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase(n) des ER/SR
SOC(C)	durch Speicherentleerung aktivierter Ca ²⁺ -Einstrom(kanal)
TCR/CD3-Komplex	T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TBAHP	Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat
Tg	Thapsigargin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethanhydrochlorid
TRP-Kanal	zu den TRP-Kanälen von Drosophila homologe Einstromkanäle für Ca ²⁺ (TRP = transient receptor potential)
Tween-20	Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat
VOC(C)	spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Einstrom(kanal)
wt-	Wildtyp-

1. Einleitung

1.1 Ca^{2+} -Homöostase und Aktivierung von T-Lymphozyten

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist eine funktionelle und pharmakologische Charakterisierung von ADP-Ribosylcyclasen (ADPRCs)/NAD-Glykohydrolasen (NADGHs) in T-Lymphozyten sowie weiterhin die proteinbiochemische Anreicherung/Aufreinigung eines löslichen, cytosolischen Enzyms dieser Enzymklasse, dessen das cyclische Nukleotid cADPR synthetisierende katalytische Aktivität zuvor in der cytosolischen Fraktion von Jurkat T-Lymphozyten detektiert worden war [Heyer 1998, Guse *et al.* 1999]. Im Gegensatz zu dem an der Zelloberfläche der Lymphozyten exprimierten Leukozytenmarker CD38, von dem gezeigt wurde, daß er katalytische Aktivität als Ektoenzym besitzt [Gelman *et al.* 1993, Howard *et al.* 1993, Kontani *et al.* 1993] und im Falle einer extrazellulären Verfügbarkeit von β -NAD (μ M bis mM) außerhalb der Zelle den Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern mobilisierenden Botenstoff cyclische ADP-Ribose (cADPR) synthetisiert, wurde dieses Enzym als ein plausibler Kandidat für die Katalyse einer über den T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR/CD3-Komplex) stimulierten, intrazellulären Synthese von cADPR angesehen. Eine Modulation der cytosolischen Konzentration an Ca^{2+} , nachstehend als $[Ca^{2+}]_i$ bezeichnet, zu deren Beeinflussung prinzipiell eine Vielzahl von Möglichkeiten offenstehen (s.u.), wird von erregbaren und nicht erregbaren Zellen generell als einer der bedeutsamsten Mechanismen genutzt, um zelluläre Funktionen wie Sekretion, Motilität, Kontraktion, Adhäsion, Differenzierung und Proliferation situationsgerecht zu regulieren. In der frühen Phase der über den TCR/CD3-Komplex vermittelten Aktivierung von T-Lymphozyten (Abb. 1.1) ist eine über mehrere Stunden anhaltende Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ zwingend erforderlich, um die Transkription Ca^{2+} -abhängiger Gene wie beispielsweise die des Interleukin-2(IL-2)-Gens anzuschalten. Die Expression Ca^{2+} -abhängiger Gene in dieser Phase der Lymphozytenaktivierung bildet eine essentielle Voraussetzung für die Aufnahme der Expression weiterer, von der Gegenwart von Ca^{2+} unabhängiger Gene, deren Genprodukte in der späten Phase der Aktivierung für den Erwerb von Effektorfunktionen und eine Steigerung der Proliferation der Zellen benötigt werden (Abb. 1.1). Als ein Zweig des spezifischen, erworbenen Immunsystems der Vertebraten sind $CD8^+$ - cytotoxische T-Lymphozyten im Rahmen der zellvermittelten Immunabwehr für eine Abtötung und Eliminierung viral infizierter, onkogen transfizierter und auf andere Weise entarteter körpereigener Zellen zuständig. Im Kontext der humoralen Immunabwehr sind insbesondere $CD4^+$ -Helfer-T-Lymphozyten mittels der Sekretion von Lymphokinen an der Modulation und Unterstützung der Effektorfunktionen anderer Zellen des Immunsystems wie beispielsweise der B-Lymphozyten beteiligt.

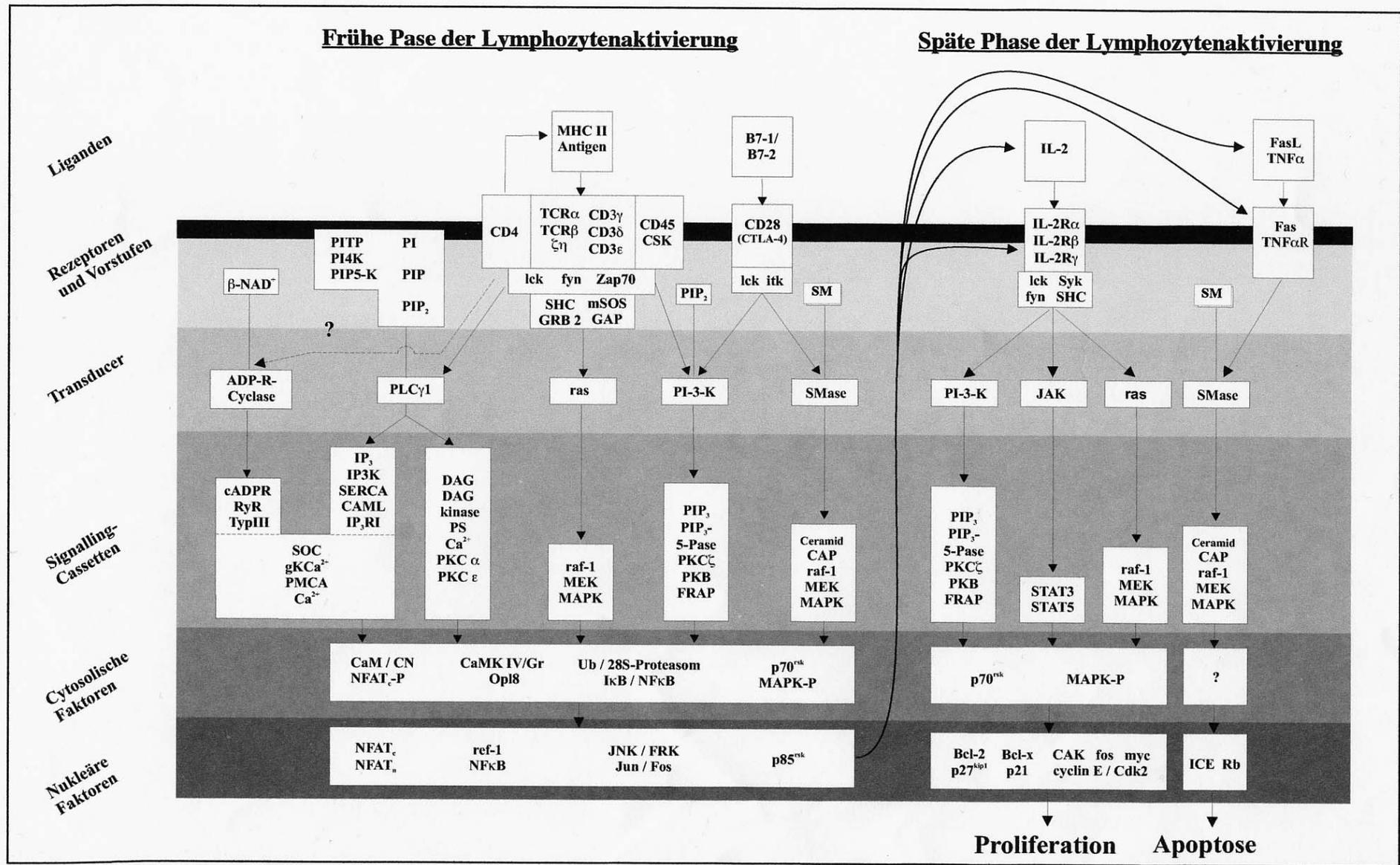


Abb. 1.1 Übersicht der an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligten Signalwege. Legende, siehe folgende Seite.

Legende zu Abb. 1.1

Die spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten beginnt mit der Stimulation der Zellen durch MHC II-gebundenes Antigen, das über den TCR/CD3-Komplex erkannt und gebunden wird (linker oberer Teil der Abb.). Der in seiner Gesamtheit sehr komplexe Aktivierungsprozeß endet viele Stunden nach der Bindung des Antigens mit der Aufnahme von Effektorfunktionen durch die T-Zellen und einer gesteigerten Proliferation oder dem Absterben (der Apoptose) der Lymphozyten (rechter Teil der Abbildung). Während der Aktivierung werden Informationen über den TCR/CD3-Komplex und/oder akzessorische Rezeptoren (CD4, CD28) sowie über den IL-2-Rezeptor und über Fas/TNF-Rezeptoren stimulierte Signalwege weitergeleitet. Letztere setzen sich jeweils aus Rezeptoren, Vorstufen in die Signaltransduktion involvierter Moleküle, Signale vermittelnden/übertragenden Molekülen (Transducern) und Signal-Cassetten sowie aus cytoplasmatischen und nukleären Effektoren zusammen. Zu einer erfolgreichen Stimulation der Lymphozyten sind zwei Signale, d.h. die Erkennung eines Antigens (s.o.) und eine Stimulation akzessorischer Rezeptoren notwendig. Eine alleinige Stimulation durch Antigen führt zur Anergie (nicht Aktivierbarkeit) der Lymphozyten. Zur Erleichterung der Übersicht sind funktionell zusammengehörige Komponenten in Gruppen zusammengefaßt und in Kästen dargestellt. Die Abb. entstammt im Original einem Übersichtsartikel von *Berridge* [1997a] und wurde für die vorliegende Dissertation in erneut leicht abgewandelter Form aus der Diplomarbeit von *R. Fliegert* [1999] übernommen. Abkürzungen: ADP-R-Cyclase, ADP-Ribosylcyclase; CAK, Cdk-aktivierende Kinase; CAML, Ca²⁺-Signal-modulierter Cyclophilin-Ligand; CAP, Ceramid-aktivierte Proteinkinase, Cdk, „cycline dependent kinase“; CSK, C-terminals Src-Kinase; DAG, Diacylglycerol; FRAP, FKBP12-Rapamycin-assoziiertes Protein; FRK, Fos-regulierende Kinase; GAP, GTPase-aktivierendes Protein; gKCa, Ca²⁺-aktivierter Kaliumkanal; GRB-2, an Wachstumsfaktor-Rezeptoren gebundenes Protein 2; ICE, Interleukin-1 β -konvertierendes Enzym; I κ B, inhibitorisches Bindungsprotein von NF κ B; IL-2R, Rezeptor für Interleukin-2; IP₃, Inositol-Trisphosphat; IP₃K, IP₃-Kinase; IP₃RI, IP₃-Rezeptor Typ 1; JAK, Janus-Kinase; JNK, cJun-N-terminale Kinase; MAPK, MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex; Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MEK, MAPK/ERK-Kinase; mSOS, Säuger-Homolog von „Son of Sevenless“; NF κ B, nukleärer Faktor κ B; p70^{sk}, ribosomale S6-Kinase von 70 kDa; p85^{sk}, ribosomale S6-Kinase von 85 kDa; P1TP, Phosphatidylinositol-Transferprotein; PI3-K, Phosphatidylinositid-3-Kinase; PI, Phosphatidylinositol; PIP, Phosphatidylinositol-4-Phosphat; PIP5-K, Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase; PKB; Proteinkinase B; PKC, Proteinkinase C; PMCA, Ca²⁺-ATPase der Plasmamembran; PS, Phosphatidylserin; Rb, Retinoblastomprotein; RyR, Ryanodin-Rezeptor; SERCA, Ca²⁺-ATPasen des Endoplasmatischen/Sarkoplasmatischen Retikulums; SHC, SH2-enthaltendes Protein; SHP, SH2-enthaltende Proteinthyrosin-Phosphatase; SIP, SH2-enthaltende Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase; SM, Shingomyelin; SMase, Shingomyelinase; SOC, „store operated calcium entry“; STAT; „Signal Transducer and Aktivator of Transcription“; TCR, T-Zell-Rezeptorkomplex; TNF, Tumornekrosefaktor; TNFR; TNF-Rezeptor; Ub, Ubiquitin; lck, fyn, Zap70, itk und Syk, Proteintyrosin-Kinasen; ras und raf, kleine G-Proteine.

Die meisten Experimente der vorliegenden Arbeit wurden an Jurkat T-Lymphozyten, einer Zell-Linie humaner CD4⁺-T-Lymphozyten durchgeführt, die ein etabliertes Zellsystem zur Untersuchung der Signaltransduktion in T-Lymphozyten darstellen [Review: *Berry & Nishizuka* 1990]. Obgleich es sich bei diesen Lymphozyten um onkogen entartete, immortalisierte und damit unabhängig von äußeren Stimuli proliferierende Zellen handelt, in denen transformationsbedingte Eigenheiten in der Signaltransduktion vorliegen [*Bröker et al.* 1993], gleichen sie in Morphologie und Aktivierungsansprüchen weitgehend ruhenden T-Lymphozyten [Review: *Berry & Nishizuka* 1990]. Vorteile der Nutzung von T-Zellklonen, Hybridomen oder leukämischen Zell-Linien gegenüber peripheren Lymphozyten liegen in einer größeren Homogenität der Zellpopulation, der leichteren Kultivierbarkeit, die je nach Bedarf eine problemlose Anzucht großer Zellzahlen ($\geq 10^9$ Zellen) ermöglicht, und einem gut charakterisierten Expressionsmuster an Oberflächenrezeptoren [Review: *Weiss* 1989]. Um eine generelle Gültigkeit von Daten, die an Jurkat-Lymphozyten erhoben wurden, in humanen

T-Lymphozyten zu belegen, kann es jedoch sinnvoll sein, die Relevanz dieser Daten durch Vermessung frisch isolierter, peripherer Lymphozyten gesunder Probanden zu überprüfen.

1.2 Molekulare Grundlagen der Modulation der $[Ca^{2+}]_i$

Der Prozeß der Ca^{2+} -abhängigen Signalgebung läßt sich nach *Berridge et al.* [Übersichtsartikel 2000] prinzipiell in vier funktionelle Einheiten gliedern. Zunächst wird die Signalgebung durch einen Stimulus initiiert, der die Synthese oder Freisetzung Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoffe vermittelt. Durch die Wirkung dieser Botenstoffe wird Ca^{2+} ins Cytosol freigesetzt und die $[Ca^{2+}]_i$ damit erhöht. Ca^{2+} fungiert dann selbst als Messenger, indem es Ca^{2+} -sensitive Vorgänge und von der Gegenwart von Ca^{2+} (einer gesteigerten $[Ca^{2+}]_i$) abhängige Signalwege aktiviert. Schließlich wird die Ca^{2+} -abhängige Signalgebung beendet, indem Ca^{2+} durch Ca^{2+} -ATPasen und Ionentransporter aus dem Cytosol entfernt und die $[Ca^{2+}]_i$ wieder auf basale Werte eingestellt wird. Die Tatsache, daß viele molekulare Bausteine (Pumpen, Kanäle, Transporter und Enzyme) in unterschiedlichen Isoformen mit graduell verschiedenen Eigenschaften und divergierendem Expressionsmuster existieren, ermöglicht eine einerseits vom Zelltyp und andererseits von der Art distinkter agonistischer Stimuli abhängige Rekrutierung unterschiedlicher signalgebender Module in einen Signalkomplex und damit die Etablierung eines Netzwerks verschiedener, nebeneinander koexistierender und potentiell miteinander interagierender, Ca^{2+} -sensitiver Signalwege [Review: *Berridge et al.* 2000]. Während unstimulierte Zellen generell eine über die Gesamtzelle oder eine Zellpopulation gemittelte $[Ca^{2+}]_i$ von ca. 100 nM aufweisen [Reviews: *Berridge et al.* 2000, *Rutter & Rizzuto* 2000], wird diese infolge einer agonistischen Stimulation, die sich je nach Zelltyp unterscheidet, vorübergehend auf physiologisch relevante Maximalwerte zwischen 500 nM und ca. 1 μ M gesteigert [Reviews: *Berridge et al.* 2000, *Rutter & Rizzuto* 2000]. Dabei wird die $[Ca^{2+}]_i$ in der Regel nicht tonisch, sondern pulsatil reguliert und für die Zellen bedeutsame Information in einem räumlich-zeitlichen Muster von Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ kodiert, die in ihrer Frequenz, ihrer Amplitude und in ihrer räumlich-zeitlichen Ausdehnung variieren können [Review: *Bootman & Berridge* 1995]. Insgesamt stellt die $[Ca^{2+}]_i$ zu jedem Zeitpunkt ein Fließgleichgewicht dar, das durch multiple Faktoren moduliert und kontrolliert wird und dessen bedarfsgerechte Einstellung jeweils aus einem regulierten Zustrom von Ca^{2+} , der Pufferung von cytosolischem Ca^{2+} und einer regulierten Entsorgung von überschüssigem Ca^{2+} resultiert. Während die Pufferung der $[Ca^{2+}]_i$ auf mitochondrialer Aktivität [Reviews: *Berridge et al.* 2000, *Pozzan & Rizzuto* 2000, *Rutter & Rizzuto*, 2000] sowie auf einer reversiblen Bindung von Ca^{2+} an cytosolische Proteine

basiert [Reviews: *Berridge et al.* 2000, *Niki et al.* 1996], wird die Entfernung von Ca^{2+} aus dem Cytosol teils aktiv durch energieaufwendiges Herauspumpen des Ions über in der Plasmamembran (PM) und im Endoplasmatischen Retikulum/Sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR) angesiedelte Ca^{2+} -ATPasen (PMCA, bzw. SERCA) und teils im Antiport mit Na^{+} -Ionen über die PM bewirkt [Reviews: *Berridge et al.* 2000, *Lewis* 2001]. Die SERCA werden in ihrer Aktivität selektiv durch den Tumorpromotor Thapsigargin (Tg) inhibiert [*Thastrup et al.* 1990]. Als Gegenspieler zu den Ca^{2+} -entsorgenden Pumpen und Transportern stehen den Zellen zur Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als nutzbare Ca^{2+} - Pools sowohl der Extrazellularraum (EZR) mit ca. 1-2 mM Ca^{2+} [*Christensen et al.* 2002, Review: *Berridge et al.* 2000] als auch intrazelluläre, Ca^{2+} -speichernde Kompartimente zur Verfügung. Zu letzteren gehören das ER/SR, inklusive der mit diesem Membransystem in Verbindung stehenden Kernmembran, die mitochondriale Matrix sowie möglicherweise zusätzlich die Lysosomen und das Golgi-Netzwerk. Die aufgrund experimenteller Daten geschätzten Ca^{2+} -Konzentrationen dieser Kompartimente sind in Tab. 1.1 aufgeführt:

Tab. 1.1: Ca^{2+} -Gehalt intrazellulärer, Ca^{2+} -speichernder Kompartimente

Kompartiment	Ca^{2+} -Konzentration	Referenz
ER	100 μM	Review: <i>Berridge et al.</i> [2000]
	10-100 μM	Review: <i>Mattson et al.</i> [2000]
	500 μM bis 1 mM	Review: <i>Pozzan & Rizzuto</i> [2000]
	μM bis 3 mM (ER)	Review: <i>Meldolesi & Pozzan</i> [1998]
	μM bis 5 mM (SR)	Review: <i>Meldolesi & Pozzan</i> [1998]
	400 μM	<i>Pinton et al.</i> [1998]
	1-3 mM Gesamt- Ca^{2+}	Review: <i>Corbett & Michalak</i> [2000]
	1-400 μM freies Ca^{2+} (stimulationsabhängig)	Review: <i>Corbett & Michalak</i> [2000]
Matrix der Mitochondrien	1-100 μM	<i>Rutter & Denton</i> [1998]
	100 nM bis > 10 μM (stimulationsabhängig)	Reviews: <i>Rutter et al.</i> [2000], <i>Rutter & Rizzuto</i> [2000]
	250 nM bis 1 μM (dauerhaft)	Review: <i>Rizzuto et al.</i> [2000]
Lysosomen	400-600 μM	<i>Christensen et al.</i> [2002]
Golgi-Netzwerk	> 10 mM Gesamt- Ca^{2+}	<i>Pezzati et al.</i> [1997]
	300 μM freies Ca^{2+}	<i>Pinton et al.</i> [1998]

Anmerkung: ER, Endoplasmatisches Retikulum; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wird durch Rezeptoren vermittelt, zu denen bezogen auf das ER/SR, das in Hinblick auf eine Funktion in der zellulären Ca^{2+} -Homöostase am intensivsten untersuchte intrazelluläre Kompartiment, als bekannteste und am besten charakterisierte Rezeptoren der IP_3 -Rezeptor (IP_3R) und der Ryanodin-Rezeptor (RyR) gehören. Beide tetrameren Rezeptoren, die sich jeweils aus vier Untereinheiten von je ca. 300 kDa (IP_3R [Harnick et al. 1995]), bzw. ca. 550 kDa (RyR [Review: Williams et al. 2001]) zusammensetzen, existieren in jeweils drei unterschiedlichen Isoformen, die sich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden und in ihrer Funktion multifaktoriell reguliert werden [Review: Mackrill 1999]. Zu ihren wichtigsten Agonisten gehören die Botenstoffe Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3), das auf den IP_3R wirkt [Streb et al. 1983, Reviews: Mikoshiba 1993, Berridge 1993], sowie cADPR, von dem gemeinhin eine agonistische Wirkung auf den RyR angenommen wird [Lee et al. 1993, Reviews: Galione 1993, Guse 2000b]. Namensgebend für den RyR wird die Ca^{2+} -Freisetzung über diesen Rezeptor (pharmakologisch) auch durch das pflanzliche Alkaloid Ryanodin (Ry) moduliert [Review: Williams et al. 2001]. Beide Rezeptoren, sowohl der IP_3R als auch der RyR, sind, bedingt durch eine zusätzliche Modulation ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit durch Ca^{2+} , in einer Vielzahl verschiedener Zellsysteme funktionell mit dem Phänomen der Ca^{2+} -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) assoziiert [Review: Mattson et al. 2000]. CICR wird als eine der kausalen Grundlagen der Entstehung und Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen sowie der Ausweitung örtlich begrenzter (lokaler) Ca^{2+} -Signale zu globalen Ca^{2+} -Signalen angesehen, die stimulierte Zellen insgesamt erfassen [Straub et al. 2000, Cancela et al. 2002, Reviews: Bootman & Berridge 1995, Berridge 1997b]. Während lokal begrenzte Ca^{2+} -Signale an der Regulation zellulärer Vorgänge wie beispielsweise der Sekretion von Vesikeln und Enzymgranula, der Migration, der Relaxation glatter Muskelzellen und der synaptischen Plastizität beteiligt sind, bildet die Ausbildung globaler Ca^{2+} -Signale eine essentielle Voraussetzung der Ausübung anderer Zellfunktionen, zu denen die metabolische Aktivierung befruchteter Oozyten, die Muskelkontraktion, die Transkription Ca^{2+} -abhängiger Gene und die Proliferation gehören [Übersicht in Berridge et al. 1998].

Eine Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER/SR wird außerdem für das Lysosphingolipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) postuliert [Ghosh et al. 1990]. Als ein erster putativer Rezeptor für intrazellulär Ca^{2+} -mobilisierende Mediatoren dieser Lipidklasse wurde das Protein SCAMPER (sphingolipid Ca^{2+} release-mediating protein of the ER) identifiziert [Mao et al. 1996] und sowohl in Abgrenzung zum IP_3R und zum RyR als auch zu anderen intrazellulär oder in der PM exprimierten Ca^{2+} -Kanälen partiell in seinen pharmakologischen

und elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisiert [Kindman *et al.* 1994, Kim *et al.* 1995]. Verglichen mit den als cytosolische Botenstoffe anerkannten Verbindungen IP₃ und cADPR ist die physiologische Relevanz einer Modulation der [Ca²⁺]_i durch S1P jedoch noch weniger gut etabliert.

Eine weitere Verbindung mit hoch effektiver Ca²⁺-freisetzender Wirkung im Cytosol verschiedener eukariotischer Zellen ist Nicotinsäureadenin dinucleotidphosphat (NAADP) [Lee & Aarhus 1995; Reviews: Patel *et al.* 2001, Genazzani & Billington 2002]. Diese Substanz kann unter sauren pH Bedingungen und in Gegenwart von Nikotinsäure in einer Basenaustauschreaktion, deren physiologische Relevanz noch nachzuweisen ist, ausgehend von dem Substrat NADP sowohl durch CD38 als auch durch die ADPRC aus *Aplysia (A.) spec.* synthetisiert werden [Aarhus *et al.* 1995]. Der NAADP-Rezeptor (NAADPR), möglicherweise RyR Typ I [Hohenegger *et al.* 2002], und der NAADP-sensitive Ca²⁺-Speicher, das ER/SR [Hohenegger *et al.* 2002], die Lysosomen [Galione *et al.* 2002] oder ein anderes Kompartiment, wurden allerdings noch nicht zuverlässig identifiziert. Auch darüber, ob es sich beim Golgi-Netzwerk (s.u.) und bei den Lysosomen tatsächlich um physiologisch relevante, Ca²⁺-speichernde Kompartimente vielzelliger Organismen handelt und wie ihr Füllungszustand, falls dies zutrifft, reguliert wird, gibt es zur Zeit noch keine gesicherten Erkenntnisse. Den Golgi-Apparat betreffend wurden allerdings bereits hochaffine Bindungsstellen für Ry und die Expression eines RyR (Typ II) [Cifuentes *et al.* 2001] sowie die Expression von SERCAs und mindestens einer weiteren, Thapsigargin-insensitiven Ca²⁺-ATPase [Pinton *et al.* 1998] immunologisch (Expression von RyR), bzw. funktionell (Bindungsstellen für Ry, Expression von Ca²⁺-ATPasen) nachgewiesen. Zusätzlich konnte eine Ca²⁺-freisetzende Wirkung von IP₃ auf das Golgi-Membransystem aufgezeigt werden [Pinton *et al.* 1998]. Ein direkter Nachweis der Expression von IP₃R ist in diesem Organell bisher allerdings noch nicht gelungen [Review: Pozzan *et al.* 1994; Pinton *et al.* 1998].

Viele Daten legen dagegen inzwischen in überzeugender Weise eine funktionelle Bedeutung der Mitochondrien in der zellulären Ca²⁺-Homöostase nahe, wobei sich diese aus zweierlei Komponenten zusammensetzt. Zum einen nehmen Mitochondrien bei gesteigerter [Ca²⁺]_i, und zwar insbesondere in der Anstiegsphase der [Ca²⁺]_i, vorübergehend Ca²⁺ auf. Dabei erfolgt die Aufnahme von Ca²⁺ bevorzugt in subzellulären Domänen, in denen die Mitochondrien eng (Abstand < 100 nm) mit Ca²⁺-freisetzenden Kanälen des ER/SR oder Ca²⁺-Einstromkanälen der PM in Kontakt stehen [Reviews: Pozzan & Rizzuto 2000, Rizzuto *et al.* 2000]. In diesen Synapsen ähnelnden Kontaktzonen [Review: Berridge *et al.* 2000] werden transient Werte der [Ca²⁺]_i von 20-30 µM erreicht [Review: Pozzan & Rizzuto 2000]. Durch ihre puffernde

Wirkung auf die diffusionsbedingte Ausbreitung von Ca^{2+} im Cytosol einerseits und die Ausbreitung unterschwelliger, lokaler Ca^{2+} -Signale andererseits, tragen die Mitochondrien einesteils zum Schutz vor einer toxischen Überflutung der Zellen mit Ca^{2+} und andernteils zu einer Verhinderung der Inhibition des Einstroms von Ca^{2+} durch Ca^{2+} in einer negativen Rückkopplungsschleife bei. Durch die positive Wirkung auf den Einstrom von Ca^{2+} wird eine effiziente Auffüllung entleerter intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, insbesondere des ER/SR, ermöglicht [Reviews: *Pozzan & Rizzuto 2000, Rizzuto et al. 2000*]. Bei der Ausbildung globaler Ca^{2+} -Signale, unterstützen sie aufgrund einer langsamen Freisetzung von Ca^{2+} und der zuvor beschriebenen Förderung des Ca^{2+} -Einstroms in vielen Zellsystemen außerdem die Aufrechterhaltung einer gesteigerten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über einen langen Zeitraum [Reviews: *Pozzan & Rizzuto 2000, Rizzuto et al. 2000*]. Zum anderen wird infolge eines Anstiegs der Ca^{2+} -Konzentration in der mitochondrialen Matrix ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) mittels einer Aktivierung an der Atmungskette beteiligter Dehydrogenasen die metabolische Aktivität der Mitochondrien gesteigert [Reviews: *Bernardi 1999, Rizzuto et al. 2000*]. Durch eine daraus resultierende Zunahme der ATP-Synthese und die Freisetzung von ATP ins Cytosol kann einem im Zuge der Aktivierung gesteigerten Energiebedarf der Zellen sowohl allgemein als auch im Rahmen spezifisch stimulierter, energieaufwendiger Zellfunktionen Rechnung getragen werden [Reviews: *Bernardi 1999, Rizzuto et al. 2000*]. Auch die Mitochondrien betreffend, sind die molekularen Grundlagen und die Regulation des Ca^{2+} -Transportes in vielerlei Hinsicht noch nicht geklärt. Während die Aufnahme von Ca^{2+} über einen Ca^{2+} -Uniporter niedriger Affinität für Ca^{2+} ($K_d > 10 \mu\text{M}$) sowie möglicherweise zusätzlich über einen schnelleren Aufnahme-mechanismus (rapid uptake mechanism, RaM) erfolgt, wird die physiologische Freisetzung von Ca^{2+} aus den Mitochondrien im Austausch mit Na^+ oder H^+ über vom Membranpotential (-180 mV) abhängige, molekular noch nicht identifizierte Transportmoleküle bewirkt [Reviews: *Bernardi 1999, Pozzan & Rizzuto 2000*]. Aufgrund übereinstimmender pharmakologischer Eigenschaften des Ca^{2+} -Uniporters mit dem RyR und seiner immunologischen Nachweisbarkeit mit einem gegen den RyR gerichteten Antikörper, wurde vor Kurzem für Mitochondrien des Rattenherzens die Identität des Ca^{2+} -Uniporters mit einem RYR-Subtyp postuliert [*Beutner et al. 2001*]. Im Falle einer Überladung der Mitochondrien mit Ca^{2+} , exzessiver Cyclen der Aufnahme und Freisetzung von Ca^{2+} oder der Einwirkung von oxidativem Stress, kommt es zur Öffnung von wahrscheinlich aus mehreren Proteinen aufgebauten, nicht selektiven Poren oder Kanälen (permeability transition pores, PTPs) der inneren Mitochondrienmembran. Über diese wird im vollständig geöffneten Zustand neben anderen Molekülen mit einem MW bis 1,5 kDa auch massiv und in unkontrollierter Weise

Ca²⁺ freigesetzt. Die meist vermutlich pathologische Öffnung der PTPs ist in der Regel mit einem Absterben der Zellen durch Apoptose assoziiert [Reviews: *Bernardi 1999, Berridge et al. 2000*].

Auch die Natur der Ca²⁺-Einstromkanäle und die molekularen Grundlagen der Mechanismen, die den Einstrom von Ca²⁺ in nicht erregbaren Zellen auslösen, sind noch unbekannt. Grundsätzlich postulierte Mechanismen, die einen Einstrom von Ca²⁺ vermitteln können, sind einerseits eine adäquate Stimulation von Zelloberflächenrezeptoren durch Agonisten wie beispielsweise Hormone oder Antigen (receptor operated Ca²⁺-entry, ROC) und andererseits die Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher, insbesondere des ER/SR, infolge einer agonistischen Stimulation (store operated Ca²⁺-entry, SOC oder Ca²⁺-release-activated Ca²⁺-entry, CRAC) [Reviews: *Guse 1998, Barritt 1999, Hofmann et al. 2000*]. Der durch die Entleerung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher vermittelte Ca²⁺-Einstrom wird übergreifend auch als kapazitiver Ca²⁺-Einstrom bezeichnet [Reviews: *Putney 1986 Berridge 1995*]. Mit einer hohen Selektivität für den Transport von Ca²⁺, einer sehr geringen, ins Zellinnere gerichteten Leitfähigkeit, einem charakteristischen Inhibitionsprofil hinsichtlich divalenter Kationen, einer fehlenden Spannungsabhängigkeit [*Fomina et al. 2000*; Reviews: *Parekh & Penner 1997, Grafton & Thwaite 2001, Li et al. 2002*] und einer sowohl positiven als auch negativen Regulation/Modulation seiner Öffnung durch Ca²⁺ [*Zweifach & Lewis 1995, 1996; Christian et al. 1996*], weist insbesondere der zuerst in Mastzellen und T-Lymphozyten beschriebene [*Hoth & Penner 1992, Zweifach & Lewis 1993*] und vor allem in diesen Zellen eingehend (elektrophysiologisch) charakterisierte CRAC-Kanal (s.o.) sehr charakteristische Eigenschaften auf. Beide, sowohl der ROC als auch der SOC/CRAC, könnten theoretisch sowohl auf einer Wirkung löslicher Mediatoren als auch auf einer strukturellen Interaktion des Rezeptors, bzw. des entleerten Ca²⁺-Speichers mit dem Einstromkanal im Sinne einer konformationellen Kopplung basieren [Review: *Putney et al. 2001*]. Im Falle des entleerten ER-Ca²⁺-Speichers wurde als Interaktionspartner des Einstromkanals bislang vor allem der IP₃R diskutiert [Review: *Putney et al. 2001*]. Inzwischen wurde aber auch der RyR funktionell als möglicher Interaktionspartner identifiziert [*Kiselyov et al. 2001*]. In Skelettmuskelzellen ist der RyR (Typ I) strukturell mit dem zu den spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen (VOCCs) vom L-Typ gehörenden Dihydropyridinrezeptor assoziiert [Review: *Mc Pherson & Campbell 1993*]. Eine Untereinheit des Rezeptors fungiert als Sensor einer elektrischen Depolarisation, dem in diesen Zellen adäquaten Stimulus zur Kontraktion (elektromechanische Kopplung). Infolge einer Depolarisation wird durch Konformationsänderung des Sensors CICR-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung über den RyR und als Antwort darauf

eine Kontraktion der Muskelzellen bewirkt [Review: *Berridge et al.* 2000]. Ein drittes Modell des SOC/CRAC sieht als Folge einer Entleerung des ER- Ca^{2+} -Speichers eine durch Sekretion vermittelte Integration vorgeformter, in cytosolischen Vesikeln zwischengelagerter Einstromkanäle in die PM vor [Review: *Putney et al.* 2001]. Als molekulare Kandidaten der Einstromkanäle werden zur Zeit insbesondere Kanäle der Trp(transient receptor potential)-Familie diskutiert [Reviews: *Grafton & Thwaite* 2001, *Lewis* 2001, *Li et al.* 2002]. Diese im Tierreich konservierte Proteinfamilie umfaßt im Proteom des Menschen eine Vielzahl mehr oder weniger selektiver Ionenkanäle mit *in vivo* meist noch unbekannter Funktion, die in vielfältiger Weise reguliert werden. Nachgewiesene Regulationsmechanismen sind die direkte Bindung von Liganden, eine Einwirkung mechanischer oder chemischer Reize und ROC, d.h. eine Regulation von Kanälen durch adäquate Stimulation von Zelloberflächenrezeptoren. Auch für eine Regulation durch SOC/CRAC charakteristische Eigenschaften wurden für einzelne Ionenkanäle dieser Familie *in vitro*, bzw. nach Überexpression der betreffenden Kanäle in einem experimentellen Zellsystem, bereits beschrieben. Die Relevanz dieser Daten *in vivo* ist zur Zeit aber noch umstritten [Review: *Harteneck et al.* 2000] .

Eine Förderung des Ca^{2+} -Einstroms wird in verschiedenen Zellen, darunter Endothelzellen [Review: *Nilius & Droogmans* 2001], und T-Lymphozyten [*Fanger et al.* 2001; Reviews: *Berridge et al.* 2000, *Grafton & Thwaite* 2001], außerdem durch die Öffnung unterschiedlicher, beispielsweise durch Spannung oder durch Ca^{2+} regulierter K^+ -Kanäle bewirkt. Durch Öffnung dieser Kanäle und den daraus resultierenden Ausstrom von K^+ wird die PM der Zellen hyperpolarisiert oder eine Abnahme des Membranpotentials durch bereits erfolgten Einstrom von Ca^{2+} kompensiert. Dadurch wird die Öffnung von VOC-Kanälen (VOCCs), bzw. das Offenbleiben von SOC-/CRAC- oder ROC-Kanälen (SOCCs/CRACCs oder ROCCs) in der PM begünstigt. Eine Übersicht der in diesem Kapitel beschriebenen Werkzeuge und Mechanismen zur Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist in Abb. 1.2 gezeigt.

1. 3 Intrazelluläre Signalwege zur Modulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Zur Gewährleistung einer bedarfsgerechten Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Anpassung an extrazelluläre Reize oder eine gezielte Stimulation, wurden inzwischen mehrere durch Bindung von Liganden an Oberflächenrezeptoren stimulierte und daraufhin in der Zelle mittels einer Synthese oder Freisetzung intrazellulärer Botenstoffe realisierte Signalwege etabliert oder wenigstens postuliert. Zu den etablierten Signalwegen gehören diejenigen, die durch die zuvor bereits eingeführten und entweder allgemein (IP_3) oder zumindest weitgehend (cADPR) als Botenstoffe anerkannten Verbindungen IP_3 und cADPR vermittelt werden.

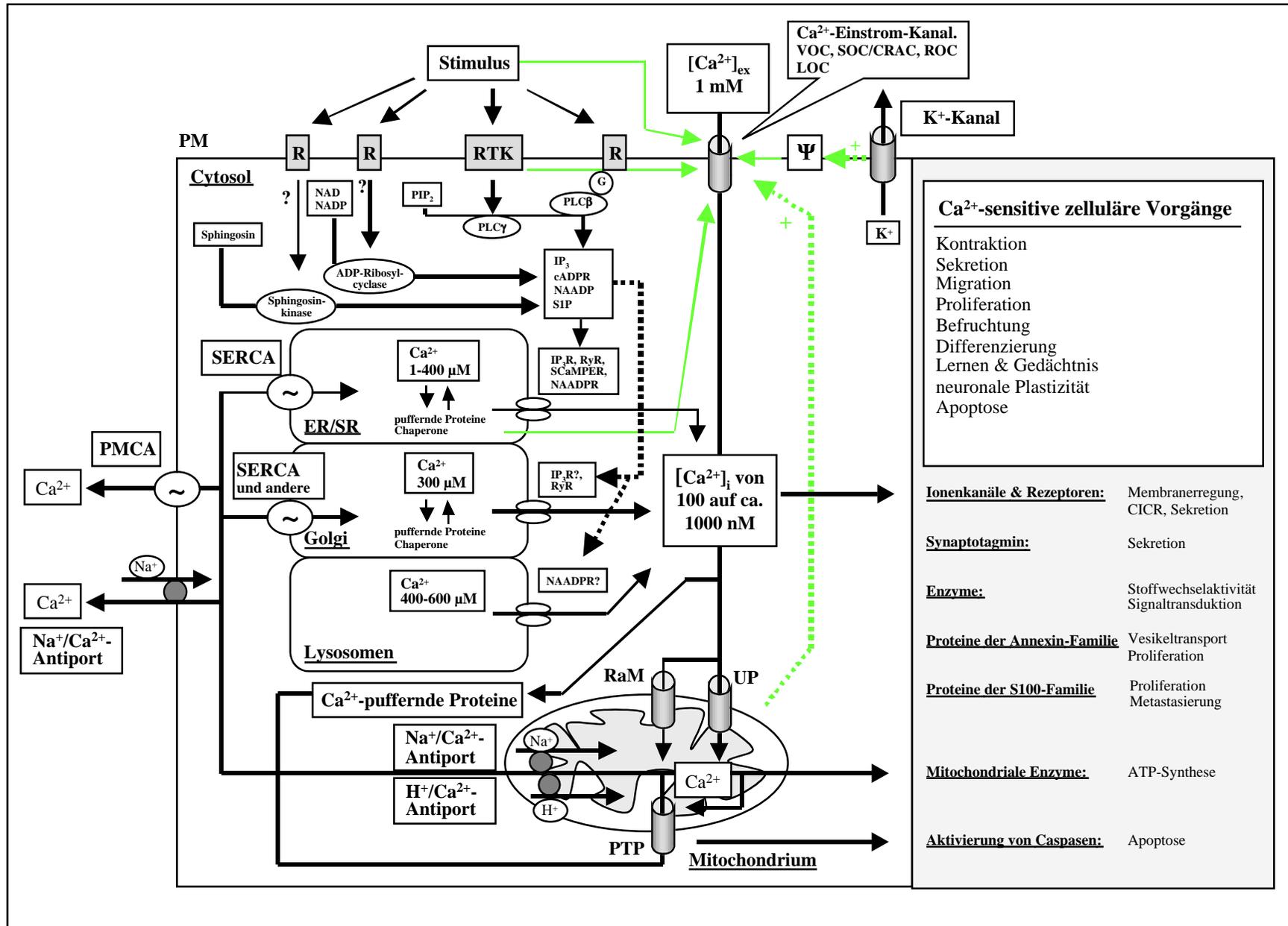


Abb. 1.2: Werkzeuge und Mechanismen zur Regulation der [Ca²⁺]_i. Legende, siehe folgende Seite

Legende zu Abb. 1.2

Zellen haben verschiedene, in unterschiedlicher Weise kombinierbare Werkzeuge und Mechanismen zur Verfügung um ihre $[Ca^{2+}]_i$ situationsgerecht zu modulieren und lokal begrenzte oder globale Ca^{2+} -Signale mit unterschiedlichen Eigenschaften zu generieren. Die Synthese/Freisetzung Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoffe wird durch adäquate Stimulation verschiedener Zelloberflächenrezeptoren (R) ausgelöst, bei denen es sich sowohl um G-Protein(G)-gekoppelte Rezeptoren als auch um Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) handeln kann. Zu den in Zellen vorkommenden Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoffen/Verbindungen gehören IP_3 , cADPR, NAADP und S1P. Die Synthese von IP_3 wird unter Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) durch die Familie der Phospholipase C- (PLC)-Enzyme (darunter $PLC\beta$ und $PLC\gamma$) katalysiert. Die Verbindungen cADPR und NAADP werden ausgehend von den Substraten NAD (cADPR), bzw. NADP (NAADP) beide durch ADPRCs/NADGHs synthetisiert. S1P wird mittels einer Phosphorylierung von Sphingosin durch Sphingosinkinase bereitgestellt. Eine fördernde Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ haben 1. Ca^{2+} -Kanäle der PM, die direkt durch Liganden (ligand operated calcium entry, LOC), durch Depolarisation (voltage operated calcium entry, VOC), durch Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (SOC/CRAC), insbesondere des ER/SR, oder infolge einer Stimulation von Zelloberflächenrezeptoren (ROC) geöffnet werden (grüne durchgehende Pfeile) können. Durch Hyperpolarisierung der PM, bzw. eine Stabilisierung des Membranpotentials, tragen unterschiedlich regulierte K^+ -Kanäle ebenfalls zur Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle bei. Eine ebenfalls steigernde Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ haben 2. intrazelluläre Ca^{2+} -freisetzende Rezeptoren, zu denen der IP_3R , der RyR, der NAADPR und der auf Lysosphingolipide ansprechende Rezeptor SCAMPER (sphingolipid Ca^{2+} release-mediating protein of the ER) gehören. Cytosolische Ca^{2+} -Speicher sind das ER/SR sowie möglicherweise der Golgiapparat und die Lysosomen. Eine gesteigerte $[Ca^{2+}]_i$ ist in Abhängigkeit vom Zelltyp an der Regulation unterschiedlicher zellulärer Funktionen beteiligt, von denen einige im rechten Teil der Abbildung aufgelistet sind. Eine mindernde Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ haben Ca^{2+} -ATPasen und Transporter, die Ca^{2+} aus dem Cytosol heraushchaffen. Zu nennen sind hier PMCAs und SERCAs und ein Na^+/Ca^{2+} -Austauscher in der PM. Der Golgiapparat besitzt ebenfalls SERCAs, zusätzlich aber noch mindestens eine weitere Ca^{2+} -ATPase. Eine puffernde Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ üben zusätzlich Ca^{2+} -bindende, cytosolische Proteine und die Mitochondrien aus. Letztere nehmen Ca^{2+} über einen Uniporter (UP) und einen schnellen Aufnahmemechanismus (RaM) aus dem Cytosol auf und setzen es unter physiologischen Bedingungen langsam über einen Na^+/Ca^{2+} und einen H^+/Ca^{2+} -Austauscher wieder frei. Dadurch und durch Unterdrückung der inhibitorischen Wirkung von Ca^{2+} auf den Ca^{2+} -Einstrom tragen sie zu einer anhaltenden, moderaten Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ und der Auffüllung eines entleerten ER/SR- Ca^{2+} -Speichers bei (grün gestrichelte Linie). Überlastung der Mitochondrien mit Ca^{2+} bewirkt die Öffnung der PTP in der inneren Mitochondrienmembran, über die in unkontrollierter Weise Ca^{2+} und andere Metaboliten ($\leq 1,5$ kDa) freigesetzt werden. Die Abbildung wurde in Anlehnung an eine von *Berridge et al.* [Übersichtsartikel 2000] publizierte Abbildung erstellt.

Noch eher hypothetischen Charakter haben dagegen die Signalwege, an deren Realisierung die Mediatoren NAADP oder S1P beteiligt sind. Die Signalgebung durch IP_3 , und cADPR wird nachstehend ausführlicher beschrieben. Charakteristika der S1P- und NAADP-vermittelten Signalgebung sind der Vollständigkeit halber in Tab. 1.2 (weiter unten) mit aufgeführt. Auf Signalwege weiterer Verbindungen, für die ebenfalls die $[Ca^{2+}]_i$ modulierende Eigenschaften nachgewiesen wurden, beispielsweise Arachidonsäure [*Mignen & Schuttlesworth* 2001, *Siegel et al.* 2001, *Amadou et al.* 2002], Diacylglycerol (DAG) [Reviews: *Harteneck et al.* 2000, *Hofmann et al.* 2000] oder Phosphatidsäure [*Braittmayer et al.* 1991, *Li et al.* 2001], wird in der vorliegenden Arbeit dagegen nicht näher eingegangen.

1.3.1 Der IP_3 -vermittelte Signalweg zur Freisetzung von Ca^{2+}

Als erste physiologische Verbindung mit Ca^{2+} -mobilisierenden Eigenschaften wurde das Inositolphosphatderivat IP_3 beschrieben [*Streb et al.* 1983]. Die Synthese dieses Botenstoffs wird infolge einer Stimulation von Oberflächenrezeptoren, die sowohl den G-Protein-

gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) als auch den Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) angehören können, mittels einer Hydrolyse des Vorläufermoleküls und Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu IP₃ und DAG von Mitgliedern der Phospholipase-C(PLC)-Enzymfamilie katalysiert (Abb. 1.2). Um dieses zu ermöglichen, werden in Abhängigkeit vom Zelltyp, bzw. dem stimulierten Rezeptor, unterschiedliche, im Ruhezustand im Cytosol der Zellen befindliche Isoformen der PLC (α oder β) an die Innenseite der PM transloziert, in sich dort bildende Signalkomplexe integriert und währenddessen in direkter Nähe zu ihrem Substrat aktiviert. Während IP₃ ins Cytosol diffundiert und dort über den IP₃R Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER und möglicherweise weiteren Ca²⁺-Speichern wie dem Golgi-Apparat bewirkt, wird durch kooperative Wirkung von Ca²⁺ und DAG außerdem Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Nach Translokation an die PM werden durch diese Serin-/Threoninkinase zahlreiche cytosolische und membranständige Proteine phosphoryliert. Als eine der wichtigsten Aufgaben einer über einen Zeitraum von mehreren Stunden anhaltenden Steigerung der [Ca²⁺]_i und der katalytischen Aktivität der PKC ist die Bereitstellung funktionell aktiver Transkriptionsfaktoren im Zellkern anzusehen, die dort durch selektive Aktivierung spezifischer Gene eine Umprogrammierung der Zellen und damit im Zuge ihrer Stimulation oder Aktivierung die Aufnahme neuer/anderer Zellfunktionen ermöglichen. In T-Lymphozyten bewirkt die Phosphorylierung einer inhibitorischen Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Dissoziation des funktionell aktiven Kernfaktors von seinem cytosolischen Ankerprotein und infolge der dadurch bedingten Freilegung eines zuvor verdeckten Kernlokalisierungssignals außerdem seinen Import in den Kern. Gleichzeitig wird durch PKC-vermittelte Aktivierung der Ras-MAP-Kinasekaskade die Transkription der Gene c-fos und c-jun induziert und mittels der anschließenden Dimerisierung der Produkte dieser beiden Gene für die Bereitstellung des Kernfaktors AP-1 gesorgt. Weiterhin wird unter Beteiligung von PKC die Neusynthese der nukleären Komponente des Transkriptionsfaktors NF-AT stimuliert. Durch kooperative Wirkung von Ca²⁺ und Calmodulin (CAM) wird parallel die Phosphatase Calcineurin aktiviert, die durch Dephosphorylierung der cytosolischen Untereinheit von NF-AT deren Translokation in den Zellkern bewirkt. Bedingt durch eine dortige Assoziation der cytosolischen Untereinheit mit der nukleären Komponente des Faktors (s.o.) wird NF-AT daraufhin im Kern in seiner transkriptionell aktiven Form bereitgestellt [Übersichtsartikel: *Berridge 1997a*]. Ebenfalls durch Ca²⁺ und CAM wird CAM-Kinase IV aktiviert, die daraufhin Onkoprotein 18 (Op18), einen weiteren in die Regulation der Proliferation von T-Lymphozyten involvierten Transkriptionsfaktor, durch Phosphorylierung aktiviert [Übersichtsartikel: *Berridge 1997a*].

Als eine weitere potentiell wichtige Funktion von PKC im Kontext der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ wurde zumindest in manchen Zellen bereits eine modulatorische Wirkung auf den Einstrom von Ca^{2+} über SOCCs/CRACCs beschrieben [Review: *Parekh & Penner 1997*]. Bei der Steuerung des Ca^{2+} -Einstroms über Trp-Kanäle kommt in manchen Zellen, abhängig vom exprimierten Kanaltyp, möglicherweise auch DAG, dem zweiten Hydrolyseprodukt der PLCs, eine (fördernde) funktionelle Bedeutung als Botenstoff zu [Reviews: *Harteneck et al. 2000, Hofmann et al. 2000*]. Nach Erstbeschreibung der Ca^{2+} -mobilisierenden Wirkung von IP_3 an (permeabilisierten) Azinuszellen des Pankreas [*Streb et al. 1983*], wurden das endogene Vorkommen von IP_3 und seine Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung in verschiedenen Zellsystemen beschrieben [Review: *Berridge 1993*] und die physiologische Funktion von IP_3 als Ca^{2+} -mobilisierender Second Messenger im Zuge der zusätzlichen Entdeckung physiologischer Inaktivierungsmechanismen für IP_3 , [*Takazawa et al. 1990, D'Santos et al. 1994*; Review: *Verjans et al. 1994*; bzw. auch Tab. 1.2] in allgemein anerkannter Weise etabliert. Seitdem wurden IP_3 -vermittelte Signalwege und deren fundamentale Bedeutung zur Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ nahezu ubiquitär beschrieben und wohl in fast jedem eingehend untersuchten Zellsystem, auch in dem der T-Lymphozyten, nachgewiesen [Reviews: *Crabtree & Clipstone 1994, Berridge 1997a, Lewis 2001*]. Die Bedeutung solcher Signalwege bei der Immunantwort der T-Lymphozyten wird in überzeugender Weise auch dadurch unterstrichen, daß ein durch Antisense-Technologie bewirkter Knockout des IP_3R (Typ I) in Jurkat T-Lymphozyten im Unvermögen zur Generierung eines Ca^{2+} -Signals mit den charakteristischen biphasischen Eigenschaften und zur Aufnahme der IL-2-Synthese nach einer Stimulation über den TCR/CD3-Komplex resultiert [*Jayaraman et al. 1995*].

1.3.2 Der cADPR-vermittelte Signalweg zur Freisetzung von Ca^{2+}

Ein weiterer cytosolischer Second Messenger mit von den Verbindungen IP_3 und NAADP unabhängiger, Ca^{2+} -freisetzender Wirkung auf das ER [Reviews: *Lee 1997, Berridge et al. 2000*] und möglicherweise die Golgi-Vesikel [*Cifuentes et al. 2001*] (Abb. 1.2), ist das cyclische Adeninnukleotid cADPR, dessen Wirkungsmechanismus sich in seinen pharmakologischen Eigenschaften von denen der beiden anderen obengenannten Botenstoffe unterscheidet (Tab. 1.2 und dort aufgeführte Referenzen). Struktur und Eigenschaften dieses Nukleotids wurden, wie später diejenigen von NAADP [*Lee & Aarhus 1995*], erstmals von *Lee* und Mitarbeitern beschrieben [*Clapper et al. 1987, Lee et al. 1989*] und die Eigenschaften zunächst ausführlich an Seeigleihomogenat, bzw. im Kontext der Befruchtung des intakten Seeigleis untersucht [Review: *Lee 1996*].

Tab. 1.2: Charakteristische Eigenschaften verschiedener Signalwege zur Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern

Botenstoff	IP ₃	Referenzen	NAADP	Referenzen	cADPR	Referenzen	S1P	Referenzen
synthetisierendes Enzym	PLC-β oder -γ	<i>Berridge</i> [1993]	ADPRCs/NADGHs (CD38?) NADP-Deamidase? NAAD-Kinase?	<i>Aarhus et al.</i> [1995], <i>Chini & Dousa</i> [1995]	ADPRCs/NADGHs (Ektoenzym) CD38?	<i>Lee</i> [1997], <i>Dousa et al.</i> [1996]	Sphingosinkinase	<i>Ghosh et al.</i> [1990, 1994], <i>Olivera & Spiegel</i> [1993]
Aktivierungsmechanismen	trimere G-Proteine, Tyrosinkinase & RTKs	<i>Berridge</i> [1993 & 1997a], <i>Berridge et al.</i> [2000]	unbekannt	keine	trimere G-Proteine Tyrosinkinase NO/cGMP/PKG	<i>Lee</i> [1997], <i>Higashida</i> [1997], <i>Guse</i> [2000a]	trimere G-Proteine, Tyrosinkinase & RTKs	<i>Spiegel</i> [1999], <i>Spiegel & Milstien</i> [2000]
physiologisches Substrat der Botenstoffsynthese	PtdIns(4,5)P ₂ , (PIP ₂)	<i>Berridge</i> [1993]	β-NADP? NAAD?	<i>Lee & Aarhus</i> [1995], <i>Chini & Dousa</i> [1995]	β-NAD(P)	<i>Lee</i> [1997], <i>Dousa et al.</i> [1996], <i>Vu et al.</i> [1996]	(D-erythro-) Sphingosin	<i>Ghosh et al.</i> [1990]
enzymatischer Abbau	IP ₃ -3-Kinase IP ₃ -5-Phosphatase	<i>Takazawa et al.</i> [1990], <i>D'Santos et al.</i> [1994] <i>Verjans et al.</i> [1994]	Monophosphatase Pyrophosphatase [Ca ²⁺] _i -regulierte 2'-Phosphatase	<i>Chini & Dousa</i> [1995], <i>Lee et al.</i> [1997] <i>Berridge et al.</i> [2002a]	cADPR-Hydrolase NADGH/NADase (z.B. CD38)	<i>Lee</i> [1997], <i>Dousa et al.</i> [1996], <i>Guse</i> [2000b]	S1P-Lyase S1P-Phosphohydrolase	<i>Ghosh et al.</i> [1990, 1994] <i>Spiegel & Milstien</i> [2000]
angesprochener Rezeptor	IP ₃ -Rezeptor (IP ₃ R Typen I-III)	<i>Mikoshiha</i> [1993], <i>Mackrill</i> [1999], <i>da Silva & Guse</i> [2000]	nicht identifiziert: 120 kDa-Protein? RyR Typ I? unbekannt	<i>Berridge et al.</i> [2002b] <i>Hohenegger et al.</i> [2002]	Ryanodinrezeptor (RyR Typen I-III)	<i>Meszaros et al.</i> [1993], <i>Lee</i> [1997], <i>da Silva & Guse</i> [2000] <i>Guse</i> [2000b]	nicht identifizierter "S1P-Rezeptor" SCA-MPER?, RyR? 160 pico-Siemens	<i>Mao et al.</i> [1996] <i>Betto et al.</i> [1997]
Leitfähigkeit	0,5 pA				2,0 pA			
angesprochenes Ca²⁺-speicherndes Kompartiment, Tg-Sensitivität	ER/SR; Golgi-Vesikel? ja	<i>Berridge et al.</i> [2000], <i>Pinton et al.</i> [1998], <i>Genazzani & Galione</i> [1996]	unbekannt: ER/SR?, EZR?, Lysosomen? partiell oder nein	<i>Grafton & Thwaite</i> [2001], <i>Galione et al.</i> [2002], <i>Churchill & Galione</i> [2001]	ER/SR; Golgi-Vesikel? ja	<i>Lee</i> [1997], <i>Cifuentes et al.</i> [2001], <i>Genazzani & Galione</i> [1996]	ER/SR ja	<i>Ghosh et al.</i> [1990, 1994] s.o.
effektive Konzentration	EC ₅₀ 5 nM-10 μM	<i>Berridge</i> [1993]	niedrig nanomolar bis mikromolar	<i>Lee</i> [1997], <i>Dousa et al.</i> [1996], <i>Patel et al.</i> [2001] <i>Genazzani & Billington</i> [2002]	3,8 nM –10 μM	<i>da Silva & Guse</i> [2000]	EC ₅₀ 1,6 μM (SPH) EC ₅₀ 2,8 μM (SPC)	<i>Ghosh et al.</i> [1990]
physiologische Aktivatoren	IP ₃ , Ca ²⁺ , ATP, PKC, PKA, CAM-KinaseII, Tyrosinkinase(n)	<i>da Silva & Guse</i> [2000], <i>Dousa et al.</i> [1996], <i>Mackrill</i> [1999]	NAADP (unabhängig von Ca ²⁺ /CAM und CICR; EC ₅₀ -Werte für NAADP zwischen 25 nM und 4 μM)		cADPR, Ca ²⁺ CAM, P _i , PKA, PKG, CAM-Kinase, Palmitoyl-CoA, Lysosphingolipide?	<i>Dousa et al.</i> [1996], <i>Lee</i> [1997], <i>Mackrill</i> [1999], <i>Guse</i> [2000b], <i>da Silva & Guse</i> [2000], <i>Sabbadini et al.</i> [1992]	S1P?, (SPC?)	<i>Ghosh et al.</i> [1990, 1994], <i>Kindman et al.</i> [1994]
physiologische Inhibitoren	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ (>1 μM, IP ₃ R Typ 1)		NAADP (≤1 bis 3 nM), bzw. NAADP (≥ 1 bis 10 μM)		Mg ²⁺ , Spermin, Polyamine PKC, Sphingosin (≤1μM)		unbekannt	keine
pharmakologische Aktivatoren	Adenophostin, Thimerosal		unbekannt, nicht Thimerosal	<i>Dousa et al.</i> [1996]	Ryanodin, Coffein, Thimerosal		unbekannt	keine
pharmakologische Inhibitoren	Heparin, Xestospongin C		L-Typ Ca ²⁺ -Kanal-Blocker, Thio-NADP	<i>da Silva & Guse</i> [2000], <i>Lee</i> [1997], <i>Dousa et al.</i> [1996]	Ruthenium Rot Procain, Dantrolen, 8-NH ₂ -cADPR u.a.		unbekannt	keine

Anmerkung: Die Tabelle wurde in Anlehnung an *da Silva & Guse* [2000] erstellt. CAM, Calmodulin; cGMP, cyclisches 3',5'-Guanosinmonophosphat; CoA, Coenzym A; EZR, Extrazellulärraum NO, Stickstoffmonoxid; P_i, Phosphationen; PKA, C, bzw. G, Proteinkinase A, C, bzw. G; S1P, Shingosin-1-Phosphat; SPC, Sphingosylphosphorylcholin; Tg, Thapsigargin

Die cyclische Natur von cADPR wurde mehrfach bestätigt [Kim et al. 1996, Lee et al. 1994] und seine exakte chemische Struktur (Abb. 1.3, Absatz 1.4) schließlich, die zunächst publizierte Struktur [Lee et al. 1989] geringfügig korrigierend, eindeutig durch Röntgenkristallographie geklärt [Lee et al. 1994]. Als synthetisierende und degradierende Enzyme von cADPR wurden die weiter unten ausführlich beschriebenen, den thematischen Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation bildenden ADPRCs (Synthese) und ADPRCs/NADGHs (Synthese und Abbau), d.h. molekular und/oder funktionell mit den monofunktionellen ADPRCs aus *A. californica* und *A. kurodai*, bzw. den multifunktionellen Ektoenzymen CD38 und CD157 verwandte Proteine identifiziert [Review: Lee 1997]. Das endogene Vorkommen dieser Enzyme, bzw. einer ihnen entsprechenden katalytischen Aktivität, und eine gleichzeitige Sensitivität gegenüber der Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung von cADPR wurden inzwischen nahezu ubiquitär, d.h. in zahlreichen unterschiedlichen Zellen und Geweben aus Organismen des Tier- (hauptsächlich) und Pflanzenreichs (noch vereinzelt) sowie in *Euglena gracilis*, einem Prokarioten, nachgewiesen [Rusinko & Lee 1989, Wu 1997; Review: Lee 1997, bzw. Tab. 1.3 und dort aufgeführte Referenzen]. Obgleich das Vorkommen cADPR ausschließlich degradierender cADPR-Hydrolasen prinzipiell vorstellbar ist, wurden solche Enzyme bislang noch nicht entdeckt. Dies deutet darauf hin, daß die cADPR inaktivierenden Enzyme wahrscheinlich wirklich, zumindest in der Mehrzahl, auch *in vivo* multifunktionelle NADGHs und damit Mitglieder der CD38/CD157-Enzymfamilie sind [Review: Guse 2000b]. Als Sonderfall gehören dieser Familie auch die bislang (m.E., siehe weiter unten) einzigen monofunktionellen ADPRCs aus *Aplysia spec.* an. Von den monofunktionellen, und aufgrund ihrer Monofunktionalität tatsächlich den „klassischen“, auch als NADasen bezeichneten NADGHs zuzurechnenden Enzymen, die, wie z. B. die aus *Neurospora crassa* gewonnene NADase, β -NAD ausschließlich zu dem linearen Produkt Adenosin-5'-Diphosphatbose (ADPR) metabolisieren, wurde bemerkenswerterweise festgestellt, daß sie neben der Fähigkeit zur cADPR-Synthese zusätzlich auch die zum Abbau des cyclischen Nukleotids entbehren [Review: Lee 1997]. Eine weitere Gruppe mit den ADPRCs/NADGHs auf molekularer Ebene nicht verwandter β -NAD-metabolisierender Enzyme/NADasen sind die Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) und Poly-ADP-Ribosylpolymerasen (PARPs). Diese übertragen im Rahmen der ADP-Ribosylierung einzelne bis zahlreiche aus β -NAD abgespaltene ADPR-Reste auf sich selbst oder andere Proteine [Reviews: Ziegler 2000, Okazaki & Moss, 1999, D'Amours et al. 1999].

Tab. 1.3: Zelltypen mit nachgewiesener Sensitivität gegenüber der Ca²⁺-freisetzenden Wirkung von cADPR

Zelle/Gewebe	Präparation	Methode, bzw. experimentelles System	Effektive Konzentration	Referenz	Expression von ADPRs / NADGHs	Referenz
Oozyten						
Seeigelei	Mikrosomen (<i>L. pictus</i>)	Homogenat	EC ₅₀ 15-50 nM	<i>Lee</i> [1997]	membranständig und löslich, molekular nicht identifiziert	<i>Graeff et al.</i> [1998]
	Mikrosomen (<i>S. purpuratus</i>)	Homogenat	EC ₅₀ 90 nM	<i>Lee</i> [1997]		
	intakte Zellen (<i>L. pictus</i>)	Mikroinjektion	EC ₅₀ 37 nM	<i>Lee</i> [1997]		
Ascidieinei	intakte Zellen	Patch Clamp	10 nM	<i>Albrieux et al.</i> [1997]	unbekannt	keine Referenz gefunden
Sternfischei	intakte Zellen	Mikroinjektion	4-8 µM	<i>Nusco et al.</i> [2002]	unbekannt	keine Referenz gefunden
Mausoozyten	intakte Zellen	Mikroinjektion	EC ₅₀ 5 nM	<i>Ayabe et al.</i> [1995]	unbekannt	keine Referenz gefunden
Oozyten des Rindes	intakte Zellen	Mikroinjektion	EC ₅₀ 4-8 µM	<i>Yue et al.</i> [1995]	unbekannt	keine Referenz gefunden
Muskelzellen						
intestinale Longitudinalmuskulatur (Hase)	permeabilisierte Zellen	Saponin	EC ₅₀ 3,8 nM	<i>Kuemmerle & Makhlouf</i> [1995]	molekular nicht identifizierte Aktivität im Zellhomogenat	<i>Kuemmerle & Makhlouf</i> [1995]
Herzmuskel	SR	Lipid Bilayer	1 µM	<i>Meszáros et al.</i> [1993]	membranständig an PM (CD38?) und SR von Hund und Ratte	<i>Meszáros et al.</i> [1997]
Herzmuskel (Ratte)	intakte Zellen	Mikroinjektion	100 nM-3 µM	<i>Prakash et al.</i> [2000]		
Skelettmuskel (Schaf)	SR	Lipid Bilayer	1-10 µM	<i>Sitsapesan & Williams</i> [1995]	unbekannt	keine Referenz gefunden
Sekelettmuskel (Hase)	SR	Lipid Bilayer	1-50 µM	<i>Morissette et al.</i> [1993]	membranständig (SR) und löslich; nicht identifiziert	<i>Hohenegger et al.</i> [2002]
arterielle, glatte Gefäßmuskulatur (Schwein)	permeabilisierte Zellen	β-Escin	2 µM	<i>Kannan et al.</i> [1996]	CD38? (VSMCs der Ratte)	<i>De Toledo et al.</i> [2000]
glatte Muskelzellen der Trachea (Rind & Schwein)	intakte Zellen	extrazelluläres cADPR (Rind)	1-100 µM (Rind)	<i>Franco et al.</i> [2001b] (Rind)	PM-ständiges CD38 (Rind & Schwein)	<i>Franco et al.</i> [2001b] (Rind), <i>White et al.</i> [2000] (Schwein)
Mesangialzellen der Niere (Ratte)	Mirosomen	Homogenat	1-10 µM	<i>Yusufi et al.</i> [2001]	menbranständig (CD38)	<i>Yusufi et al.</i> [2001]
Drüsenzellen						
pankreatische β-Zellen (Ratte)	Mikrosomen	Homogenat	EC ₅₀ 0,1 µM	<i>Takasawa et al.</i> [1993c & 1995]	CD38	<i>Okamoto</i> [1999], <i>Kato et al.</i> [1999]
Azinuszellen des Pankreas (Maus/Ratte)	intakte Zellen	Patch Clamp	0,1-10 µM	<i>Thorn et al.</i> [1994]	membranständig (PM & andere Membranen; wohl CD38) sowie löslich	<i>L. Sternfeld & I. Schulz</i> , persönliche Mitteilung
Speicheldrüsenzellen (Ratte)	permeabilisierte Zellen	Saponin	3 µM	<i>Gromada et al.</i> [1995a]	unbekannt	keine Referenz gefunden
Pankreas (Maus)	Zymogengranula	Homogenat	25 µM	<i>Gerasimenko et al.</i> [1996]	unbekannt	keine Referenz gefunden
Azinuszellen der Submandibulardrüse (Maus)	intakte Zellen	Patch Clamp	1 - >100 µM	<i>Harmer et al.</i> [2001]	unbekannt	keine Referenz gefunden

Fortsetzung der Tabelle, siehe folgende Seite

Zelle/Gewebe	Präparation	Methode, bzw. experimentelles System	Effektive Konzentration	Referenz	Expression von ADPRs / NADGHs	Referenz
neuronale Zellen & neurosekretorische Zellen						
Neurone der dorsalen Hinterwurzel (Ratte)	intakte Zellen	Patch Clamp	10 nM-1 µM	<i>Currie et al.</i> [1992]	CD38?	<i>Yamada et al.</i> [1997]
sympathische Neurone (Frosch)	intakte Zellen	Patch Clamp	1 µM	<i>Hua et al.</i> [1994]	unbekannt	keine Referenz gefunden
CH ₄ C ₁ -Zellen (Ratte)	permeabilisierte Zellen	Digitonin	EC ₅₀ 100 nM	<i>Koshiyama et al.</i> [1991]	Aktivität im Zellhomogenat	<i>Koshiyama et al.</i> [1991]
NG108-15-Neurone (Maus)	intakte Zellen	Patch Clamp	0,2 µM	<i>Higashida et al.</i> [1995]	membranständig	<i>Higashida et al.</i> [1997]
Gehirn (Ratte)	Mikrosomen	Homogenat	EC ₅₀ 90 nM	<i>Takasawa et al.</i> [1993a]	CD38?	<i>Yamada et al.</i> [1997]
Kleinhirn-Zellen (Maus)	intakte Zellen	Patch Clamp	0,5 µM	<i>Linden et al.</i> [1995]	CD38?	<i>Yamada et al.</i> [1997] (Ratte)
Granulazellen des Kleinhirns (Ratte)	intakte Zellen	extrazelluläres cADPR	30-100 µM	<i>De Flora et al.</i> [1996]	CD38	<i>De Flora et al.</i> [1996]
Astrozyten (Ratte)	intakte Zellen	extrazelluläres cADPR	100 µM	<i>Verderio et al.</i> [2001]	CD38	<i>Verderio et al.</i> [2001]
chromaffine Zellen (Rind)	permeabilisierte Zellen	Digitonin	1 nM-100 µM EC ₅₀ ca. 1 µM	<i>Morita et al.</i> [1997]	membranständige Aktivität	<i>Morita et al.</i> [1997]
PC12-Zellen	permeabilisierte Zellen	Digitonin	EC ₅₀ 5 µM	<i>Clementi et al.</i> [1996]	Aktivität nicht identifiziert	<i>Clementi et al.</i> [1996]
sonstige tierische Zellen						
T-Lymphozyten (Jurkat, human)	permeabilisierte Zellen	Saponin	EC ₅₀ 2,25 µM	<i>Guse et al.</i> [1995], <i>Guse et al.</i> [1997]	PM-ständiges CD38 und ein lösliches Enzym	<i>Guse et al.</i> [1999], <i>Gelman et al.</i> [1993]
T-Lymphozyten (Jurkat, human)	intakte Zellen	Mikroinjektion	1-100 µM (inj.) = 20 nM-2 µM [cADPR] _i	<i>Guse et al.</i> [1997]		
T-Lymphom-Zellen (Maus)	Mikrosomen	Homogenat	1 µM	<i>Bourguignon et al.</i> [1995]	PM-ständiges CD38?	keine Referenz gefunden
HPB.ALL T-Lymphozyten (human)	permeabilisierte Zellen	Saponin	nicht exakt bestimmt (ähnlich Jurkat)	<i>Guse et al.</i> [1995]	PM-ständiges CD38	<i>Gelman et al.</i> [1993]
B-Zellen (Maus)	intakte Zellen	extrazelluläres cADPR	0-50 µg/ml	<i>Howard et al.</i> [1993]	PM-ständiges CD38	<i>Howard et al.</i> [1993]
alveolare Makrophagen (Ratte)	intakte Zellen	Patch Clamp	0-10 µM	<i>Ebihara et al.</i> [1997]	CD38	<i>Ebihara et al.</i> [1997]
Neutrophile (Maus)	permeabilisierte Zellen	Digitonin	100 µM	<i>Partida-Sánchez et al.</i> [2001]	CD38	<i>Partida-Sánchez et al.</i> [2001]
hämatogene Vorläuferzellen	intakte Zellen	extrazelluläres cADPR	100 µM-1 mM	<i>Podestà et al.</i> [2000]	CD38	<i>Podestà et al.</i> [2000]
Osteoklasten (Ratte)	intakte Zellen	extrazelluläres cADPR	5 µM	<i>Adebanjo et al.</i> [1996]	PM-ständiges CD38 (Hase)	<i>Sun et al.</i> [1999]
Hepatozyten (Maus)	Zellkerne	Homogenat	10 µM	<i>Gerasimenko et al.</i> [1995]	CD38 (Ratte)	<i>Khoo et al.</i> [2000]
pflanzliche Zellen, Protozoen & Schwämme						
Pflanzenzellen	Mikrosomen (Vakuole)	Homogenat	EC ₅₀ 20-25 nM	<i>Allen et al.</i> [1995], <i>Muir & Sanders</i> [1996]	unbekannt	keine Referenz gefunden
<i>Euglena gracilis</i>	Mikrosomen	Homogenat	EC ₅₀ 0,3 µM	<i>Masuda et al.</i> [1997]	membranständig, nicht identifiziert, reine ADPRC	<i>Masuda et al.</i> [1999]
<i>Axinella poly-poides</i>	permeabilisierte Zellen	Triton X-100 & Digitonin	10 µM	<i>Zocchi et al.</i> [2001b]	PM-ständig und intrazellulär	<i>Zocchi et al.</i> [2001b]

Anmerkung: Bei der zitierten Publikation *Lee* [1997] handelt es sich um einen Übersichtsartikel; inj., injiziert; VSMCs, glatte Gefäßmuskelzellen; PM, Plasmamembran; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum

Auch von diesen, wie Proteinkinasen und Phosphatasen auf regulatorische Weise in intrazelluläre Signalwege involvierten Enzymen, wird gemeinhin angenommen, daß sie zumindest nicht direkt, d.h. selbst aktiv, an metabolischen Synthese- und Abbauwegen von cADPR beteiligt sind [Review: *Lee* 1997].

Funktionell kann die Wirkung von cADPR auf seinen Rezeptor in analoger Weise zu der des Botenstoffs IP₃ auf den IP₃R, sowohl im Seeigeelei als auch in höheren Organismen mit einer Förderung des CICR umschrieben werden [Reviews: *Dousa et al.* 1996, *Lee* 1997, *da Silva & Guse* 2000]. Dabei stimmen die pharmakologischen Eigenschaften der Ca²⁺-Mobilisierung durch cADPR [Review: *Lee* 1997, bzw. Tab. 1.2] recht gut mit denen der Ca²⁺-Freisetzung über den RyR (Subtypen I und II) überein. Dieser Rezeptor wird daher inzwischen allgemein als das molekulare Äquivalent der in ihrer Aktivität, bzw. in ihrem Öffnungsverhalten durch cADPR modulierten, Ca²⁺-transportierenden Rezeptoren/Ca²⁺-Kanäle angesehen [Reviews: *Lee* 1997, *Guse* 1999 & 2000b]. Zu den allgemein bekannten und kennzeichnenden pharmakologischen Eigenschaften des RyR gehören die selektive Aktivierbarkeit der über ihn vermittelten Ca²⁺-Freisetzung durch Ryanodin und Coffein sowie die ebenfalls selektive Inhibierbarkeit der Ca²⁺-Freisetzung durch Ruthenium Rot, Procain und 8-NH₂-cADPR [Reviews: *Dousa et al.* 1996, *da Silva & Guse* 2000]. Die Expression eines oder mehrerer Subtypen des ursprünglich hauptsächlich in erregbaren Zellen und Geweben, insbesondere im Skelettmuskel (Typ I), im Herzmuskel (Typ II) und im Gehirn (Typ III) vorgefundenen RyR, wurde inzwischen auch in einer stetig zunehmenden Zahl nicht erregbarer Zellen [*Ledbetter et al.* 1994, *Giannini et al.* 1995, *Bennett et al.* 1996, *Hosoi et al.* 2001], beispielsweise in Phäochromozytom(PC12)-Zellen [*Clementi et al.* 1996 (Typ 2)] und T-Lymphozyten [*Hakamata et al.* 1994, *Guse et al.* 1999 (Typ III), bzw. *Hosoi et al.* 2001 (Typ I oder II)], nachgewiesen. In PC12-Zellen wurde analog zur Aktivierung der ADPRC im Seeigeelei [*Galione et al.* 1993a, *Willmott et al.* 1996] eine Regulation der Ca²⁺-Freisetzung über den RyR (Typ II) durch Stickstoffmonoxid (NO), cyclisches 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP), Proteinkinase G (PKG) und cADPR gezeigt [*Clementi et al.* 1996]. Noch immer ungeklärt ist jedoch zur Zeit, ob das agonistisch wirksame cADPR die Öffnung des RyR durch direkte Bindung an den Rezeptor oder indirekt über ein zwischengeschaltetes cADPR-bindendes Hilfsprotein moduliert [Reviews: *Lee* 1997, *Guse* 1999 & 2000b]. Zugunsten der letzteren Hypothese wurden in mikrosomalen Präparationen des Seeigeeleis durch Photoaffinitätsmarkierung mit [³²P]8-N₃-cADPR erheblich kleinere Proteine als der RyR mit Molekulargewichten (MWs) von 100 und 140 kDa spezifisch markiert [*Walseth et al.* 1993]. Die Frage, ob diese als niedermolekulare spezifische Bindungsproteine für cADPR anzusehen

sind, oder ob es sich auch um präparationsbedingte (artifizielle) Abbauprodukte eines RyR handeln könnte, wurde allerdings nicht mit Sicherheit geklärt. In aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen Membranfraktionen wurden unter Anwendung der gleichen Methodik keine Proteine vergleichbarer Größe wie in Mikrosomen des Seeigelleis (s.o.) in spezifischer Weise markiert [Review: *Guse* 1999].

In der Lösung des Problems, ob die agonistische Wirkung von cADPR auf den RyR eher als modulatorisch oder aber, besser vereinbar mit einer Funktion als echter Second Messenger, als stimulatorisch aufzufassen ist [Review: *Galione & White* 1994], wurden dagegen Fortschritte erzielt. Präziser ging es hier um die Klärung der Frage, ob entweder eine basale, weitgehend konstante intrazelluläre Konzentrationen an cADPR ($[cADPR]_i$) die Schwelle der Aktivierbarkeit des RyR durch stimulationsbedingte Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ definiert und damit lediglich als Modulator des CICR und der Wirkung von Ca^{2+} als Second Messenger fungiert, oder, ob stimulationsbedingte Änderungen der $[cADPR]_i$ aktiv, d.h. mit cADPR als echtem Second Messenger, die Öffnung des RyR regulieren und auf diese Weise CICR und die Wirkung von Ca^{2+} als drittem Messenger stimulieren. Die Tatsache, daß mittlerweile in einer Reihe von Zellsystemen eine über unterschiedliche Rezeptoren stimulierte Synthese von cADPR und ein daraus resultierender Anstieg der $[cADPR]_i$ nachgewiesen wurde (Tab. 1.4 und Referenzen, Seiten 28 und 29), spricht deutlich zugunsten der an zweiter Stelle genannten Hypothese und legt die Interpretation nahe, daß es sich bei cADPR ebenso wie bei IP_3 tatsächlich um einen endogen in Zellen präsenten, physiologisch relevanten und funktionell aktiven, vollwertigen cytosolischen Botenstoff mit Second Messenger-Funktion handelt.

Insgesamt hat die Tatsache der Koexistenz diverser (mindestens 4, Tab. 1.2) unterschiedlicher Ca^{2+} -mobilisierender Botenstoffe und stellvertretend durch sie verkörperter, anhand charakteristischer Eigenschaften klar voneinander abgrenzbarer Signalwege und Mechanismen zur Regulation/Modulation eines einzigen Faktors, nämlich der $[Ca^{2+}]_i$, die Frage nach dem physiologischen Sinn dieser scheinbaren Redundanz aufgeworfen. Dies vor allem unter dem Aspekt, daß von allen genannten Botenstoffen berichtet wurde, daß sie in die Regulation/Modulation qualitativ auf den ersten Blick identischer, oder zumindest partiell miteinander überlappender zellulärer Vorgänge wie der metabolischen Aktivierung befruchteter Oozyten, der Sekretion von Enzymen, der Motilität *versus* Adhärenz, der Muskelkontraktion, der nervalen Reizleitung, der Regulation der Transkription von Genen und der Proliferation und zahlreicher weiterer zellulärer Funktionen involviert sind [Übersicht beispielsweise in *Berridge et al.* 2000, *da Silva & Guse* 2000, *Patel et al.* 2001, *Genazzani & Billington* 2002, sowie Tab. 1.3 und dort angegebene Referenzen]. Als denkbare, biologisch

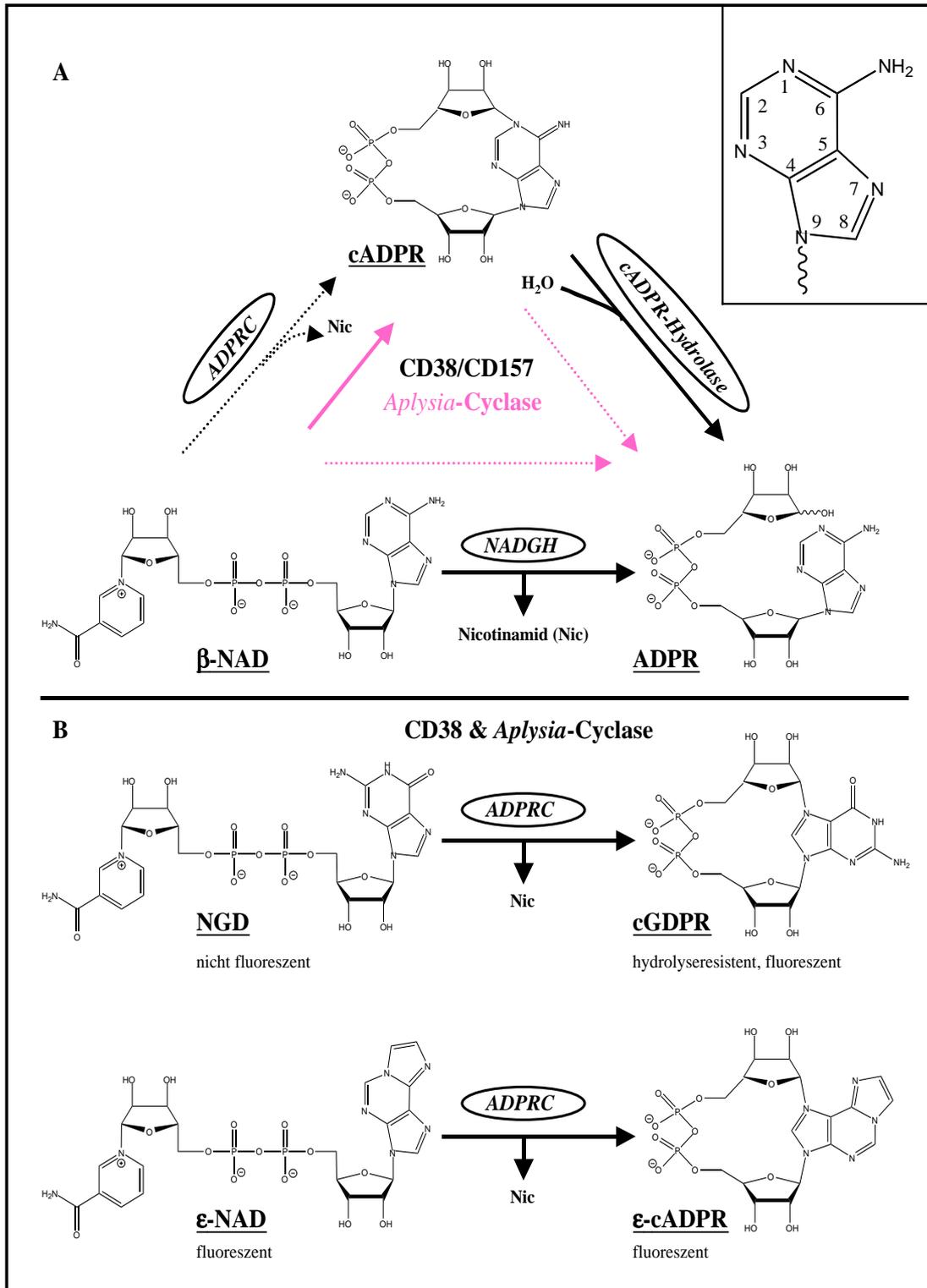
potentiell sinnvolle Erklärungsansätze wurden drei Hypothesen prinzipiellen Charakters formuliert und anhand bislang publizierter Daten hinsichtlich ihrer Validität gegeneinander abgewogen [Review: *da Silva & Guse* 2000]. Die postulierten Gründe für den evolutiven Erhalt unterschiedlicher Second-Messenger-Systeme zur Modulation der $[Ca^{2+}]_i$ umfassen 1. Eine Bereitstellung unterschiedlicher, alternativ nutzbarer Systeme zur Regulation derselben (essentiellen) Zellfunktionen, um deren Ausübung auch bei Ausfall eines oder mehrerer Signalwege sicherzustellen (vollständige Redundanz), 2. Die Ermöglichung einer parallelen Modulation der $[Ca^{2+}]_i$ in unterschiedlichen Zellregionen unter Nutzung verschiedener, in ihrer speziellen, lokalen Funktion nicht austauschbarer Botenstoffe, die zur Ausbildung globaler, die Gesamtzelle erfassender Ca^{2+} -Signale kooperativ zusammenwirken können, aber nicht unbedingt müssen und 3. die Ermöglichung der Steuerung von (komplexen) Zellfunktionen durch ein räumlich-zeitlich koordiniertes, sequentielles Zusammenwirken aller oder wenigstens mehrerer verschiedener Botenstoffe, die in ihrer spezifischen Funktion wiederum nicht austauschbar sind. Wie es scheint, sind alle Postulate bei Betrachtung bestimmter Zellsysteme, bzw. der Regulation distinkter Funktionen ein und derselben Zelle zutreffend und damit in der Natur realisiert [Review: *da Silva & Guse* 2000]. Demzufolge ist ein breites Repertoire an unterschiedlichen, entweder einzeln nutzbaren oder bei Bedarf kombinier- und vernetzbaren Botenstoffen und Signalwegen scheinbar notwendig, um die $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit vom jeweiligen Zellsystem und den auf dieses einwirkenden Stimuli in räumlich-zeitlich unterschiedlicher, hochpräziser Weise modulieren und dadurch die Regulation einer Vielfalt unterschiedlicher und zum Teil komplexer Zellfunktionen über nur einen Faktor, die $[Ca^{2+}]_i$, spezifisch/selektiv regulieren zu können.

1.4 ADP-Ribosylcyclasen/NAD-Glykohydrolasen

Zu der bereits erwähnten Enzymfamilie der ADPRCs/NADGHs, die als Mitglieder NADGHs mit unterschiedlich ausgeprägter, aber per Definition vorhandener ADPRC-Aktivität umfaßt, gehören als Prototypen die löslichen ADPRCs aus der Zwitterdrüse verschiedener Vertreter der den Mollusken angehörenden Seehasen (*Aplysia spec*), sowie die in verschiedenen Säugerzellen exprimierten, membranständigen Ektoenzyme und Zelloberflächenmarker CD38 und CD157/BST-1. Aufgrund ihrer Befähigung zur cADPR-Synthese stellen alle drei Proteine in prototypischer Weise prinzipiell Kandidaten für das noch immer gesuchte, cADPR im Cytosol bereitstellende Second-Messenger-Enzym dar. Neben der kennzeichnenden Eigenschaft ihrer Eignung zur cADPR-Synthese ist allen diesen Enzymen eine im gegensätzlichen Verhältnis zur Ausprägung der Cyclisierungsaktivität stehende, mehr (CD38

und CD157) oder weniger (*Aplysia*-ADPRs) vordergründige Befähigung zur Degradation von β -NAD (NADase-/NADGH-Aktivität) und/oder cADPR (cADPR-Hydrolaseaktivität) zu ADPR gemein (Abb. 1.3 A). Während die Enzyme aus *Aplysia spec.* nahezu ausschließlich [Lee & Aarhus 1991, Hellmich & Strumwasser 1991, Inageda et al. 1995], oder zumindest stark überwiegend (bei RT ca. 70%, eigene Daten), die cADPR-Synthese katalysieren, ist der Anteil letzterer an der Gesamtheit aller Aktivitäten der multifunktionellen Enzyme, darunter CD38 [Howard et al. 1993, Takasawa et al. 1993b, Zocchi et al. 1993] und CD157 [Hirata et al. 1994], unter identischen Versuchsbedingungen wesentlich geringer [Hirata et al. 1994] und beläuft sich auf in der Regel auf nur 1-2% [Zocchi et al. 1993, Augustin et al. 2000 (CD38)]. Gemessen daran ist cADPR bei diesen beiden Enzymen eindeutig als ein hinter dem Hauptprodukt ADPR um Längen zurückstehendes Nebenprodukt anzusehen.

Eine kennzeichnende Eigenschaft aller drei Enzyme ist weiterhin ihre nur schwach ausgeprägte Substratspezifität, die neben dem Umsatz von β -NAD(P) in analoger Weise auch eine Verstoffwechslung zahlreicher Nukleotid-Analoga erlaubt [Review: Lee 1997]. Ausgehend von dieser Eigenschaft wurde die *Aplysia*-ADPRC bereits zur chemoenzymatischen Synthese verschiedener pharmakologisch interessanter, an unterschiedlicher, insbesondere aber an 8-Position der Purinbase substituierter cADPR-Analoga genutzt, zu denen beispielsweise der inzwischen vielfach genutzte RyR-Antagonist 8-NH₂-cADPR gehört [Review: Lee 1997]. Von besonderer Bedeutung im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit sind aber die beiden Ersatzsubstrate Nicotinamidguanidinukleotid (NGD) und 1-N⁶-etheno-NAD (ϵ -NAD; Abb. 1.3 B). Da beide Substrate, sowohl das selbst nicht fluoreszierende NGD als auch das selbst bereits fluoreszierende ϵ -NAD, durch *Aplysia*-ADPRs und CD38 zu fluoreszierenden Produkten (cGDPR, bzw. ϵ -cADPR und ϵ -ADPR) umgesetzt werden, lassen sie sich nutzen, um die katalytische Aktivität der Enzyme indirekt, d.h. anhand der Fluoreszenzentwicklung während ihrer Inkubation mit einem der Substrate nachzuweisen [Graeff et al. 1994 und 1996]. Da cGDPR gegenüber einem Abbau durch cADPR-Hydrolaseaktivität weitgehend resistent ist und direkt aus NGD entstehendes, lineares GDPR ebenso wie NGD nicht fluoresziert, kann unter Verwendung von NGD als Substrat prinzipiell hochselektiv und auf einfache Weise Cyclaseaktivität (fluorimetrisch) gemessen werden [Graeff et al. 1994]. Allerdings ist die Ausbeute an Fluoreszenz relativ gering und zudem anfällig gegenüber einer die Fluoreszenz mindernden Wirkung von Protein, so daß sowohl die Sensitivität als auch die quantitative Aussagekraft des fluorimetrischen Assays limitiert ist, zumindest wenn Zellextrakte hoher Proteinkonzentration (100 μ g/ml-1 mg/ml) vermessen werden.



Bei Nutzung des Substrates ϵ -NAD tritt dieses Problem weniger deutlich in Erscheinung. Hier weisen jedoch sowohl das Substrat selbst als auch alle aus diesem entstehenden, die ϵ -Adeninbase enthaltenden Produkte fluoreszierende Eigenschaften auf [Klebl & Pette 1996]. Um in Proteinextrakten exakt und eindeutig eine bestimmte Enzymaktivität (ADPRC-, NADGH, cADPR-Hydrolase, bzw. Mono- oder Pyrophosphatase-Aktivität) zu messen, ist daher grundsätzlich HPLC-Analytik zur Trennung der verschiedenen potentiell möglichen Reaktionsprodukte notwendig. Bei Einsatz eines Fluoreszenzdetektors ist diese aufgrund eines fehlenden Hintergrundes durch zelluläre Nukleotide und andere bei UV-Detektion potentiell störende Verbindungen dann allerdings mit hoher Empfindlichkeit möglich. Bezüglich der Toleranzbreite der ADPRCs/NADGHs bei Bindung und Umsatz von Substraten sei an dieser Stelle ergänzend angemerkt, daß die Cyclisierung von NGD (Austausch der Adeninbase gegen Guanin) wie auch ϵ -NAD, welches ein zusätzliches Ringsystem aufweist, in bemerkenswert anderer Weise als die von β -NAD, nämlich nicht über die N₁- sondern die N₇-Position der gegenüber β -NAD modifizierten Purinbasen erfolgt, was eine Rotation der Basen erfordert [Zhang *et al.* 1999].

Ein weiterer Ausdruck der gering ausgeprägten Substrat- (und Reaktionsspezifität?) von CD38 und den *Aplysia*-ADPRCs ist ihre zuvor bereits erwähnte, unter sauren pH-Bedingungen (pH 4,5-5) begünstigte Befähigung in Gegenwart von Nicotinat (EC₅₀, 5-10 mM [Aarhus *et al.* 1995, Graeff *et al.* 1998]) NAADP aus β -NADP zu synthetisieren [Aarhus *et al.* 1995]. Obgleich bereits ein vereinheitlichendes Modell für den Synthesemechanismus beider Botenstoffe (cADPR und NAADP) durch identische Enzyme publiziert wurde [Review: Lee 1999], ist die physiologische Relevanz dieses bislang einzig nachgewiesenen, *in vitro* zweifelsfrei funktionierenden NAADP-Syntheseweges aufgrund der für seine Effizienz benötigten Bedingungen (s.o.) noch keineswegs abschließend geklärt. Denkbare, obwohl zur Zeit weder *in vitro* noch *in vivo* bestätigte Alternativen dieses NAADP-Syntheseweges sind, unter physiologischeren Bedingungen (?), z. B. in einer Deamidierung von NADP oder einer Phosphorylierung von Nicotinsäureadeninindinukleotid (NAAD) zu sehen [Lee & Aarhus 1995, Chini & Dousa 1995; Reviews: Ziegler *et al.* 2000, Chini & Toledo 2002]. Ein ebenfalls herauszustellendes, gemeinsames Merkmal von CD38, CD157 und den *Aplysia*-ADPRCs ist ihre nachgewiesene molekulare Homologie auf Gen- und Proteinebene (ca. 30% identische Aminosäuren), die der Annahme einer gemeinsamen Familienzugehörigkeit der drei Proteine zugrundeliegt [Ferrero & Malavasi 1997]. Ein Alignment der Primärsequenzen der Enzyme ist in Abb. 1.4 gezeigt.

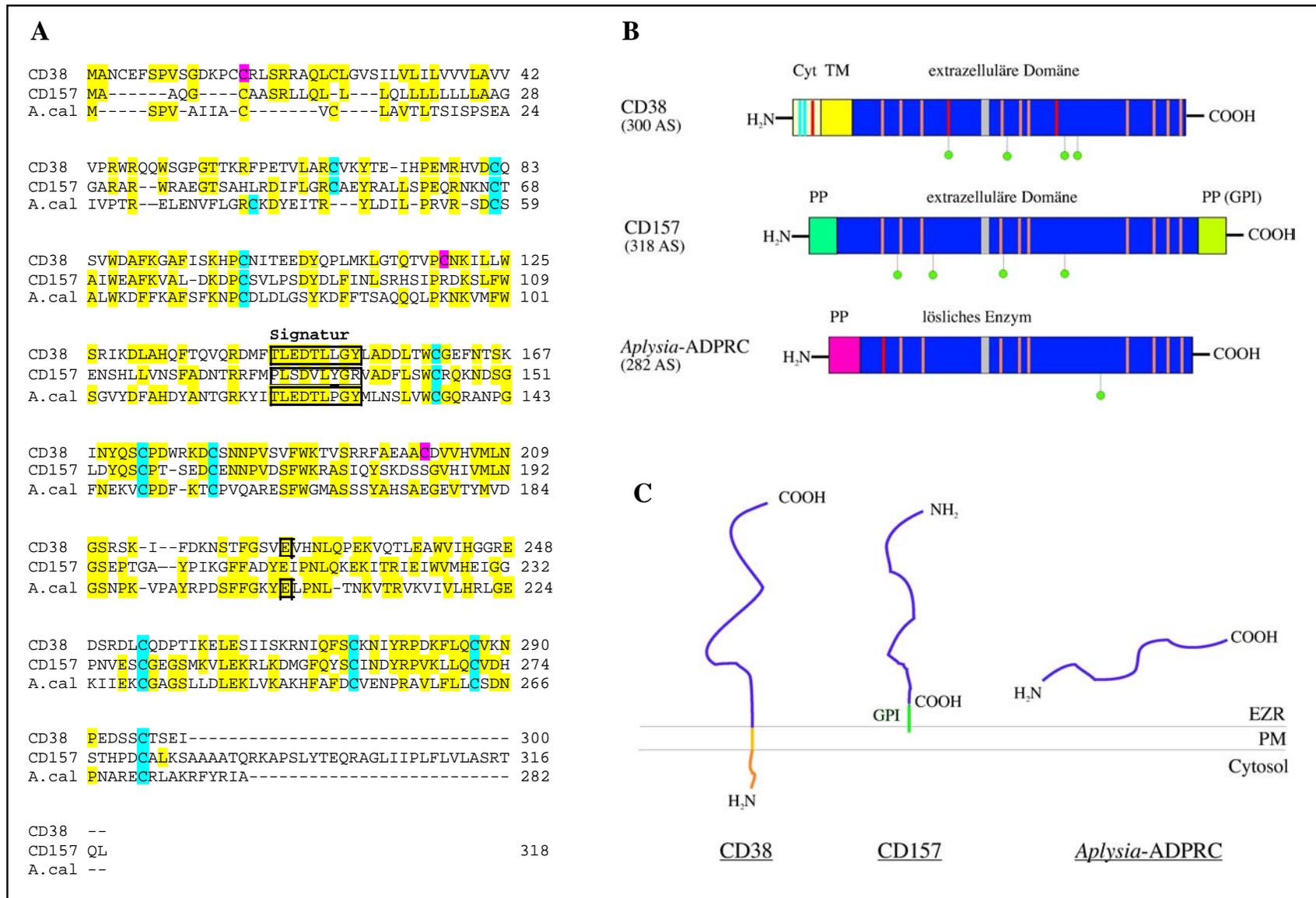


Abb. 1.4: Sequenzvergleich, Struktur und Topologie von CD38, CD157 (beide human) und der ADPRC aus *A. californica*. Legende, siehe folgende Seite.

Legende zu Abb. 1.4

A) zeigt ein Alignment der Aminosäure(AS)sequenzen von humanem CD38, humanem CD157 und der ADPRC aus *A. californica*, das ausgehend von der Publikation von *Kaisho et al.* [1994] erstellt wurde. Die zwischen allen drei Proteinen konservierten 10 Cysteine sind blau markiert. Das erste markierte Cystein der *Aplysia*-ADPRC, das nach dem dargestellten Alignment eine gegenüber dem ersten markierten Cystein der anderen Proteine abweichende Position aufweist, ist anderen publizierten Alignements zufolge ebenfalls konserviert [States et al. 1992, Dong et al. 1994, Tohgo et al. 1994]. Drei weitere, bei Betrachtung der reifen Proteine (s.u.), nur in CD38-Proteinen verschiedener Species konservierte Cysteine, sind rot markiert. Eines dieser Cysteine liegt im cytosolischen Anteil von CD38. Weiterhin ist zum einen das zwischen CD38 und der *Aplysia*-ADPRC nahezu vollständig und zwischen CD157 und den beiden anderen Proteinen partiell konservierte Signaturmotiv von CD38 [Grimaldi et al. 1995] und zum anderen das Glutamat, das in CD38 (E226) und der reifen *Aplysia*-ADPRC (E179) als der katalytische Rest identifiziert wurde [Munshi et al. 1999, Munshi et al. 2000], jeweils durch eine Box hervorgehoben. Auch in CD157 ist der Glutamatre rest konserviert. In B) ist schematisch die Struktur der drei Proteine dargestellt. Während CD38 einen kurzen im Cytosol gelegenen Sequenzanteil (AS 1-21, Cyt), eine Transmembrandomäne (AS 22-44, TM) und einen ausgedehnten extrazellulär gelegenen Sequenzabschnitt (AS 45-300) aufweist, sind CD157 und die *Aplysia*-ADPRC durch den Besitz von Präpeptiden (PP) gekennzeichnet, die N-terminal (AS 1-24, *Aplysia*-ADPRC) oder C- und N-terminal (AS 1-28 und AS 300-318, CD157) angeordnet sind, und im Zuge der Reifung und Sekretion der Proteine abgespalten werden. Das C-terminale Präpeptid von CD157 wird im reifen Protein durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) ersetzt. In allen drei Proteinen konservierte Cysteine sind als orange, nur in CD38-Proteinen konservierte Cysteine als rote Linien und das CD38-Signaturmotiv als grauer Kasten eingezeichnet. Zusätzlich sind Konsensussequenzen für eine potentielle N-Glykosylierung in allen drei Proteinen (grüne Kreise) und zwei potentielle Serinphosphorylierungsstellen im cytosolischen Abschnitt von CD38 (blaue Linien) markiert. In C) ist schematisch die gemeinhin als charakteristisch angenommene Topologie der drei Proteine in ihrem reifen Zustand dargestellt. Neben den bereits genannten, liegen der Abbildung folgende Publikationen zugrunde: Jackson & Bell 1990, Glick et al. 1991, Shubinsky & Schlesinger [Übersichtsartikel 1997] und Augustin et al. [2000]. EZR, Extrazellulärraum; PM, Plasmamembran; ADPRC, ADP-Ribosylcyclase.

Insbesondere 10 Cysteinreste und ein in CD38 identifiziertes Signaturmotiv [Grimaldi et al. 1995] sind in allen drei Proteinen vollständig [States et al. 1992, Toghgo et al. 1994, Itoh et al. 1994, Kaisho et al. 1994, Dong et al. 1994] (Cysteine), oder zumindest teilweise (Signaturmotiv in CD157) konserviert. Von einigen dieser Cysteinreste (C160, C173 und C275), einem Glutamatre rest (E 226) und mehreren AS des Signaturmotivs wurde an CD38 nachgewiesen, daß sie für dessen katalytische Aktivität von maßgeblicher Bedeutung sind [Tohgo et al. 1994, Hoshino et al. 1997, Munshi et al. 2000, Graeff et al. 2001; bzw. Abb. 4.11 im Ergebnisteil]. Zwei weitere Cysteinreste (C119 und C201) sind nur in CD38-Proteinen verschiedener *Species* konserviert und werden in diesen Proteinen für die verglichen mit den monofunktionellen *Aplysia*-Enzymen einerseits, denen diese Cysteine fehlen, und seiner eigenen Gesamtaktivität andererseits nur sehr geringe Cyclase- und stattdessen sehr stark betonte Hydrolaseaktivität (NADase- und cADPR-Hydrolase-, s.o.) verantwortlich gemacht [Tohgo et al. 1994]. In dem wie CD38 multifunktionellen CD157, dem diese Cysteine ebenso wie den *Aplysia*-Enzymen fehlen, wurde diese Tatsache zusammen mit weiteren Abweichungen seiner Aminosäuresequenz hypothetisch mit der insgesamt sowohl gegenüber den *Aplysia*-Enzymen als auch gegenüber CD38 erheblich geringer ausgeprägten katalytischen Aktivität in Verbindung gebracht [Dong et al. 1994, Hirata et al. 1994]

1.4.1 Lösliche ADPRCs/NADGHs

Den Prototyp der löslichen ADPRCs/NADGHs bildet als bislang einziger Vertreter dieser Enzymgruppe, der sowohl proteinbiochemisch aufgereinigt und auf molekularer Ebene identifiziert als auch bereits aus zwei verschiedenen Subspecies kloniert wurde, die innerhalb der Zwitterdrüse von *Aplysia spec* in Oozyten lokalisierte *Aplysia*-ADPRC [Glick *et al.* 1991], deren auffälligstes Kennzeichen neben der Löslichkeit, ihre zuvor bereits erwähnte, die extrem schwach ausgeprägte Hydrolaseaktivität bei weitem übertreffende ADPRC-Aktivität ist, aufgrund derer sie sich klar von den membranständigen Ektoenzymen CD38 und CD157 unterscheidet. Gleichzeitig ist sie allerdings auch die bislang einzige lösliche ADPRC, für die diese Merkmalskombination sicher nachgewiesen wurde. Möglicherweise überwiegende ADPRC-Aktivität wurde (indirekt) außerdem nur für die lösliche ADPRC des Seeigels beschrieben, in dem der Hauptanteil der Hydrolaseaktivität einer Publikation zufolge membranassoziiert ist [Wilson & Galione 1998]. Die biologische Funktion des möglicherweise *in vivo* zur Sekretion bestimmten *Aplysia*-Enzyms, das innerhalb der *Aplysia*-Oozyten mit außergewöhnlich hoher Abundanz in Form eines vesikulär verpackten Präproteins vertreten ist, und N-terminal, wie für sezernierte Proteine üblich, ein abspaltbares Signalpeptid aufweist [Hellmich & Strumwasser 1991, Glick *et al.* 1991], ist bis heute unbekannt.

Ogleich cytosolische ADPRC-Aktivität außer im Seeigeli inzwischen auch in Zellen höherer Organismen (Vertebraten) nachgewiesen wurde (Tab. 1.4), gelang es bislang in keinem Fall, das für die cytosolische Aktivität verantwortliche Enzym in genügend reiner Form und ausreichender Menge für eine Identifikation auf Ebene der Primärsequenz zu gewinnen. Deutliche Hinweise wurden dagegen auf eine spezifische Stimulierbarkeit, d.h. eine durch Bindung spezifischer Liganden an Zelloberflächenrezeptoren oder eine durch membranpermeantes NO vermittelte Steigerung der katalytischen Aktivität einiger löslicher, daneben aber auch einiger membranständiger Enzyme erbracht (Tab. 1.4). Als in der Zelle mobile, potentiell translozierbare und in Signalkomplexe integrierbare Proteine, sind die löslichen Enzyme als Kandidaten von Second Messenger-Enzymen, die im Cytosol in kontrollierter Weise cADPR synthetisieren, besonders interessant.

Die publizierten Mechanismen der Stimulation cADPR-vermittelter Signalwege, darunter eine hormonelle Aktivierung an trimere G-Proteine gekoppelter Rezeptoren und ligandenvermittelte Aktivierung von Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptoren (RTKs), stimmen interessanterweise zum Teil formell mit denen zur Stimulation IP₃-vermittelter Signalwege überein (Tab. 1.4, bzw. Abb. 1.2).

Tab. 1.4: Agonistische Stimulation von cADPR-synthetisierenden Enzymen und der [cADPR]_i in Zellen

Rezeptortyp / Rezeptor	Zelltyp	Agonist	Zellantwort	Anstieg von [cADPR] _i	Aktivierung der ADPRC	Typ der ADPRC (Lokalisation)	Effekt von cADPR-Antagonist auf die Zellantwort	Referenzen
GPCR								
muskarinischer ACh-Rezeptor	NG108-15-Neurone (Maus)	Acetylcholin	Anstieg der [Ca ²⁺] _i	n.b., Abnahme von [β-NAD] _i	2,6-fach CTx-sensitiv	membranständig	n.b.	<i>Higashida et al.</i> [1997]
muskarinischer ACh-Rezeptor	chromaffine Zellen (Rind)	Acetylcholin 8-Br-cAMP Forskolin	anhaltender Anstieg der [Ca ²⁺] _i ; Katecholamin-Sekretion	n.b.	1,4-fach 2,63-fach 2,63-fach PKA- und Ca ²⁺ -abhängig	membranständig	Imperatoxin inhibiert	<i>Morita et al.</i> [1997]
CCK-Rezeptor	intestinale Längsmuskelnzellen (Hase)	Cholezystokinin	Anstieg der [Ca ²⁺] _i ; Kontraktion	n.b.	2,0-fach	löslich	8-NH ₂ -cADPR, Ruthenium Rot, und Dantrolen inhibieren	<i>Kuemmerle & Makhlouf</i> [1995]
β-adrenerger Rezeptor	Astrozyten (Ratte)	Isoproterenol GTP	Anstieg der [Ca ²⁺] _i (nicht gezeigt)	1,51-fach 1,84-fach	1,6-fach nicht quantifiziert CTx-sensitiv	membranständig (PM); extrazelluläre und intrazelluläre Aktivität	n.b.	<i>Hotta et al.</i> [2000]
Angiotensin II-Rezeptor	ventrikuläre Myozyten des Rattenherzens	Angiotensin II Angiotensin I GTP	Anstieg der [Ca ²⁺] _i (nicht gezeigt)	1,86-fach 1,67-fach 1,68-fach	1,43-fach 1,3-fach CTx-sensitiv	membranständig	n.b.	<i>Higashida et al.</i> [2000]
β-adrenerger Rezeptor	ventrikuläre Myozyten des Rattenherzens	Isoproterenol GTP	Anstieg der [Ca ²⁺] _i (nicht gezeigt)	1,66-fach 1,68-fach	1,7-fach CTx-sensitiv	membranständig.	n.b.	<i>Higashida et al.</i> [1999]
muskarinischer ACh-Rezeptor	Pankreasazinuszellen (Maus)	Acetylcholin	Anstieg der [Ca ²⁺] _i	ca. 80-fach	postuliert aber nicht gezeigt	CD38	Ryanodin inhibiert	<i>Fukushi et al.</i> [2001]
α- & β-adrenerge Rezeptoren, Substanz P-Rezeptor	Azinuszellen der Parotis (Ratte)	Phenylephrin, Adrenalin und Substanz P, NO/cGMP/PKG	Anstieg der [Ca ²⁺] _i	n.b.	n.b.	löslich (postuliert aber nicht gezeigt)	Ryanodin. inhibiert	<i>Gromada et al.</i> [1995b], <i>Looms et al.</i> [1998 & 2001]
RTK								
TCR/CD3-Komplex	T-Lymphozyten (Jurkat, human)	OKT3-mAK (anti-CD3)	Anstieg der [Ca ²⁺] _i	3,0-fach (anhaltend)	4,25-fach (mit Dephostatin)	löslich	7-Deaza-8-Br-cADPR inhibiert	<i>Guse et al.</i> [1999]

Fortsetzung der Tabelle, siehe folgende Seite

Rezeptortyp / Rezeptor	Zelltyp	Agonist	Zellantwort	Anstieg von [cADPR] _i	Aktivierung der ADPRC	Typ der ADPRC (Lokalisation)	Effekt von cADPR-Antagonist auf die Zellantwort	Referenzen
NO/cGMP/PKG								
kein OF-Rezeptor	PC12-Zellen (Zell-Linie)	NO	Anstieg der [Ca ²⁺] _i	2,0-fach	n.b..	löslich ? (nicht klar gezeigt)	8-NH ₂ -cADPR.	<i>Clementi et al.</i> [1996]
kein OF-Rezeptor	hippocampale Neurone (Ratte)	NO	Anstieg der [Ca ²⁺] _i ? LTD	1,43-fach (in Gegenwart von Zaprinast und H89)	n.b..	löslich ? (nicht klar gezeigt)	Ryanodin, 8-Br-cADPR, und 7-Deaza-8-Br.-cADPR inhibieren	<i>Reyes-Harde et al.</i> [1999]
kein OF-Rezeptor	Seeigelei	NO	Anstieg der [Ca ²⁺] _i	ca. 3,0-fach	n.b.	löslich (hier nicht gezeigt)	n.b.	<i>Kuroda et al.</i> [2001]
kein OF-Rezeptor	Seeigelei	NO cGMP	Anstieg der [Ca ²⁺] _i	n.b.	2,0-fach	löslich	8-NH ₂ -cADPR, Coffein, Ruthenium Rot, und Ryanodin, inhibieren	<i>Galione et al.</i> [1993a], <i>Galione et al.</i> [1993b], <i>Willmott et al.</i> [1996], <i>Wilson & Galione</i> [1998]
andere Mechanismen								
Glukoseaufnahme	pankreatische β-Zellen (Maus und Ratte)	ATP aus Glukoseabbau	Anstieg der [Ca ²⁺] _i ; Sekretion von Insulin	2,5-fach (Ratte) 35,2-fach (Maus)	n.b.	n.b.	n.b.	<i>Takasawa et al.</i> [1993a & 1998]
Kationenkanal / Thermorezeptor (negativ durch PKA reguliert)	<i>Axinella polyopoides</i> (Desmospongiae)	Temperaturanstieg (14 °C auf 26 °C) Abscisinsäure Arachidonsäure	Anstieg der [Ca ²⁺] _i (andauernd)	7,0-fach 7,0-fach 4,0-fach	3,0-fach 4,0-fach n.b. (pos. PKA-abhängig)	PM-ständig und intrazellulär	8-Br-cADPR inhibiert	<i>Zocchi et al.</i> [2001b]
TNFα-Rezeptor, Retinsäurerezeptor	Mesangialzellen der Niere (Ratte)	TNFα / IL-1 ATRA	Anstieg der [Ca ²⁺] _i	ca. 10-fach.	1,45- & 1,38-fach 1,76-fach	membranständig (CD38)	n.b.	<i>Yusufi et al.</i> [2001]
Hypoxie	glatte Muskelzellen der Pulmonararterie (Hase)	Anstieg von β-NADH	Anstieg der [Ca ²⁺] _i (anhaltend); Vasokonstriktion	ca. 10-fach	2,2-fach	membranständig (intrazellulär)	8-Br-cADPR inhibiert	<i>Wilson et al.</i> [2001]

Anmerkung: ACh, Acetylcholin; ATRA, all-trans-Retinsäure; cAMP, cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat; CCK, Cholecystokinin; cGMP, cyclisches 3',5'-Guanosinmonophosphat; CTx, Cholera toxin; Dephostat, ein Tyrosinphosphatase-Inhibitor; H89, ein PKA-Inhibitor; IL-1, Interleukin-1; LTD, long term depression; n.b., nicht bestimmt; NO, Stickstoffmonoxid; OF, Zelloberfläche; PC12-Zellen, Phäochromozytom-Zellen; PKA & PKG, Proteinkinasen A & G; RTK, Rezeptortyrosinkinase; TNFα, Tumornekrosefaktor α; Zaprinast, ein Phosphodiesterase-Inhibitor

Ein eventuell eher für die Stimulation cADPR-vermittelter Signaltransduktion charakteristischer Aktivierungsmechanismus könnte dagegen derjenige einer NO-vermittelten Stimulation von Guanylatcyclase zur cGMP-Synthese, eine nachfolgende Aktivierung von Proteinkinase G durch cGMP und eine schließlich resultierende Aktivierung der ADPRC durch PKG-katalysierte Serin-/Threonin-Phosphorylierung sein, dessen steigernde Wirkung auf die cADPR-Synthese zuerst im Zusammenhang der metabolischen Aktivierung des befruchteten Seeigels, inzwischen aber auch in neuroendokrinen aktiven Phäochromozytom (PC12)-Zellen und, im Kontext der Modulation der neuronalen Plastizität, in hippocampalen Neuronen von Vertebraten beschrieben wurde (Tab. 1.4). Ein weiterer Aktivierungsmechanismus wurde für die durch Wärmeeinwirkung über das Pflanzenhormon Abscisinsäure stimulierbare ADPRC von Schwämmen nachgewiesen [Zocchi *et al.* 2001b]. In diesen Organismen bewirkt Hitzestress, bzw. die Freisetzung von Arachidonsäure, zunächst eine Öffnung von Kationen(K^+)-Kanälen in der PM und einen Anstieg der intrazellulären Konzentration an Abscisinsäure. Abscisinsäure und einströmendes Ca^{2+} kooperieren dann mittels einer Stimulation von Adenylatcyclase und der resultierenden Synthese von cAMP bei der von einer Serin-/Threoninphosphorylierung durch PKA abhängigen Aktivierung der ADPRC [Zocchi *et al.* 2001b]. Eine lösliche ADPRC/NADGH der Vertebraten mit interessanten Eigenschaften wurde in Rinderhirn entdeckt und aus diesem Gewebe proteinbiochemisch aufgereinigt [Yamauchi & Tanuma 1994, Matsumura & Tanuma 1998]. Dieses in seiner Multifunktionalität eher CD38 als der *Aplysia*-ADPRC ähnelnde Enzym, zeigte Anzeichen einer allosterischen Regulation durch cADPR, indem das Überschreiten einer Schwellenkonzentration des cyclischen Nukleotids (60 μ M) eine starke Aktivierung der cADPR inaktivierenden cADPR-Hydrolaseaktivität des Enzyms bewirkte [Matsumura & Tanuma 1998]. Der Schlußfolgerung der Autoren zufolge könnte das Enzym auf diese Weise auch *in vivo* einen auf der eigenen katalytischen Aktivität basierenden Anstieg der cADPR-Konzentration selbst limitieren [Matsumura & Tanuma 1998]. Um insgesamt eine ausführliche und zuverlässige Charakterisierung löslicher ADPRCs verglichen mit CD38 und CD157 zu ermöglichen, ist eine Identifizierung der ersteren Enzyme auf molekularer Ebene (DNA und Protein) unbedingt erforderlich.

1.4.2 Membranständige ADPRCs/NADGHs

1.4.2.1 CD157/BST-1 (*bone marrow stromal tissue antigen*)

CD157, in der Maus auch als BP-3 bekannt [McNagny *et al.* 1991, Dong *et al.* 1994], ist ein durch einen Glykosylphosphatidylanker (GPI-Anker) in der Plasmamembran verankertes

Zelloberflächenprotein und Ektoenzym, das auf Zellen von Maus, Mensch und Ratte nachgewiesen [Review: *Mehta et al.* 1996] und aus den genannten Organismen auch kloniert wurde [*Kaisho et al.* 1994, *Dong et al.* 1994, *Furuya et al.* 1995]. Obgleich es zunächst als Oberflächenprotein von Stromazellen des Knochenmarks (BM) und einigen hämatopoetischen Zellen beschrieben wurde [*McNagny et al.* 1988; Review: *Mehta et al.* 1996], wobei ihm im Stroma des BM und möglicherweise auch des Thymus eine fördernde Wirkung auf das Wachstum von Prä-B-, bzw. Prä-T-Zellen zukommt [*Kaisho et al.* 1994, *Vicari et al.* 1996], wurde für das Protein inzwischen ein deutlich breiteres, viele Organe, darunter Herz, Lunge, Darm, Milz, Thymus, Plazenta und Niere, nicht aber das Gehirn einschließendes Expressionsmuster nachgewiesen [*McNagny et al.* 1991, *Dong et al.* 1994]. Die Funktion des Enzyms in all den Organen ist allerdings noch unbekannt. Ähnlich wie bei CD38 handelt es sich bei CD157 um ein stark glykosyliertes, vier N-Glykosylierungsstellen aufweisendes Protein von *in vivo* ca. 43 kDa, dessen anhand der Aminosäuresequenz berechnetes MW nur 30,2 kDa beträgt und das im Anschluß an eine Deglykosylierung in der SDS-PAGE ein MW von ca. 31 kDa besitzt [*Hirata et al.* 1994]. Als GPI-verankertes Protein wird es mit einer N-terminalen Präsequenz synthetisiert, die im Verlauf der Sekretion des Proteins und seiner Verankerung in der PM abgespalten wird [*Hirata et al.* 1994, *Dong et al.* 1994]. Da die GPI-Verankerung unter Abspaltung einer C-terminal gelegenen Signalsequenz über den C-Terminus des Proteins erfolgt, weist CD157 an der Zelloberfläche verglichen mit CD38 eine umgekehrte Topologie auf [*Dong et al.* 1994]. In weiterer Abgrenzung zu CD38 und im Einklang mit der GPI-Verankerung, besitzt es im reifen, membranständigen Zustand keinen cytosolisch gelegenen Abschnitt der Aminosäuresequenz [*Dong et al.* 1994]. Damit kann es, im (theoretischen) Gegensatz zu CD38, auch als Oberflächenrezeptor keinesfalls direkt, möglicherweise aber über noch nicht identifizierte Interaktionspartner an cytosolischen Signalkaskaden beteiligt sein [*Okuyama et al.* 1996]. Hinsichtlich der katalytischen Aktivität ist CD157 ein multifunktionelles Enzym, das sowohl ADPRC- als auch NADGH- und cADPR-Hydrolaseaktivität zeigt [*Hirata et al.* 1994], cADPR als Ektoenzym aber nicht im Cytosol, sondern außerhalb der Zelle im EZR synthetisiert. Verglichen mit CD38 ist die Aktivität (Umsatzrate) des Enzyms deutlich schwächer ausgeprägt und in Abwesenheit von divalenten Kationen (Zn^{2+} , Mn^{2+}) lediglich bei saurem pH (Optimum bei pH 4) nachweisbar. Durch Zn^{2+} und Mn^{2+} wird das pH-Optimum in Richtung des physiologischen Bereiches erweitert (pH 4-6,5) und sowohl die ADPRC- (ca. 5-fach) als auch die Hydrolaseaktivität (etwas schwächer) in nennenswertem Umfang aktiviert [*Hirata et al.* 1994]. Im Gegensatz zu Zn^{2+} und Mn^{2+} zeigen Mg^{2+} und Ca^{2+} eine indifferente und Cu^{2+} -Ionen eine inhibitorische

Wirkung auf beide Aktivitäten [Hirata *et al.* 1994]. Eine Fähigkeit von CD157 zur NAADP-Synthese wurde bislang nicht beschrieben. Die biologische Funktion des Proteins [Hirata *et al.* 1994] und möglicherweise weiterer, strukturell mit ihm vergleichbarer (intrazellulärer?/ internalisierter?) Varianten sind inklusive der molekularen Mechanismen seiner Wirkung und der Bedeutung seiner katalytischen Aktivität (cADPR-Synthese) im Rahmen der über es vermittelten intrazellulären Signalgebung bisher noch kaum, bzw nur unvollständig untersucht.

1.4.2.2 CD38 und mit diesem verwandte, membranständige ADPRs/NADGHs

Das Typ II-Transmembranprotein CD38 ist ebenfalls ein stark glykosyliertes Ektoenzym, das ein MW von ca. 46 kDa [Jackson & Bell 1990] aufweist. Wie CD157 wurde es bereits aus verschiedenen Organismen (Maus, Mensch, Ratte, Hase und Rind) kloniert [Review: Mehta *et al.* 1996; Adebajo *et al.* 2000, Augustin *et al.* 2000]. Neben einem kurzen, im Cytosol gelegenen N-Terminus ist es durch einen ausgedehnteren, extrazellulär lokalisierten Hauptanteil ausgezeichnet, in dem neben verschiedenen anderen funktionellen Domänen, darunter zwei Hyaluronatbindungsmotive, auch das katalytische Zentrum des Proteins enthalten ist [Review: Shubinsky & Schlesinger 1997]. Der cytosolische N-Terminus enthält keine bekannten, für intrazelluläre Signalgebung relevanten Struktur motive, jedoch zwei konservierte Serinreste, die in anerkannten Konsensussequenzen für eine cGMP-abhängige PKG-Phosphorylierung liegen. Dem Phosphorylierungsstatus dieser Serinreste könnte damit eine die Funktion(en) von CD38 regulierende Aufgabe zukommen [Review: Shubinsky & Schlesinger 1997].

Auch von CD38, das zunächst als Oberflächenmarker von Lymphozyten beschrieben wurde [Reinherz *et al.* 1980], ist inzwischen bekannt, daß es in Wirklichkeit ein sehr viel breiteres, Zellen aus nahezu allen zentralen Organen und Geweben umfassendes Expressionsmuster aufweist [Reviews: Lee 1997, Shubinsky & Schlesinger 1997, bzw. auch Tab.1.3]. Obgleich auch CD38 ein Ektoenzym ist und somit, wie CD157, den Botenstoff cADPR, außerhalb der Zelle synthetisiert, wurde für dieses Protein mehrfach eine (auch) in seiner katalytischen Aktivität (cADPR-Synthese) begründete Funktion in intrazellulären Signalwegen postuliert, im Rahmen derer es über die extrazelluläre cADPR-Synthese und eine von dieser abhängigen Modulation der $[Ca^{2+}]_i$ (nachgewiesene extrazelluläre Wirkung von cADPR, siehe Tab. 1.3) Zellfunktionen wie die Proliferation und die Kontraktion glatter Muskelzellen reguliert [Review: De Flora *et al.* 2002]. Vorausgesetzt, daß keine Zelloberflächenrezeptoren für cADPR existieren, ergeben sich dabei zwei Hauptprobleme, die die Rekrutierung des im EZR

eigentlich nicht verfügbaren Substrates und den Mechanismus der intrazellulären Wirkung des extrazellulär synthetisierten und nicht membranpermeanten cADPR betreffen ($[\text{NAD}]_{\text{Cytosol}}$ schätzungsweise im Bereich von ca. 100 μM bis niedrig mM [Review: *Dousa et al.* 1996, bzw. berechenbar nach *Guse et al.* 1993 und Review: *Bernofsky* 1990] und $[\text{NAD}]_{\text{EZR}}$ ca. 10 nM [Review: *De Flora et al.* 1998], bzw. 50-60 nM [*Pfister et al.* 2001]). Während das Problem des Zugangs zum Substrat durch das Postulat einer lokal, beispielsweise in Infektionsherden, erfolgenden Freisetzung von β -NAD durch sterbende oder lysierte Zellen relativ eingängig entschärft werden kann, ist die Lösung des zweiten Problems komplizierter. Dementsprechend wird das für dieses Problem vorgeschlagene Lösungsmodell kontrovers diskutiert und bisher nicht generell akzeptiert. Kurz zusammengefaßt, sieht dieses eine aktive, durch lebende Zellen vermittelte Freisetzung von β -NAD über Connexin 43-Halbkanäle in den EZR und/oder in potentiell ebenfalls CD38 enthaltende Vesikel des endozytotischen/exozytotischen Transportweges vor [*Zocchi et al.* 1999, *Bruzzone et al.* 2001a]. Dieses wird durch CD38-ADPRC- und NADGH-Aktivität metabolisiert. Extrazellulär/intravesikulär synthetisiertes cADPR wird dann, im Verlauf der Katalyse, aus dem EZR, bzw. dem diesem entsprechenden Lumen von Vesikeln, über Transportkanäle bildende CD38-Dimere oder -Oligomere ins Cytosol CD38-positiver Zellen transportiert, wo es seine Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung auf intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher ausüben kann [*Franco et al.* 1998, *Zocchi et al.* 1999]. Die potentielle Existenz von CD38-Oligomeren wurde zunächst theoretisch aufgrund der Sequenzhomologien zwischen CD38 und der *Aplysia*-ADPRC vorhergesagt [*Prasad et al.* 1996] und nachfolgend verschiedentlich anhand proteinbiochemischer Daten verifiziert [*Umar et al.* 1996, *Bruzzone et al.* 1998]. Zur Erklärung der Versorgung CD38-negativer, bzw. selbst (gerade) nicht in der extrazellulären cADPR-Synthese aktiver Zellen mit cADPR wurde neben der soeben beschriebenen, autokrinen Schleife von β -NAD-Sekretion, cADPR-Synthese und cADPR-Transport/cADPR-Influx inzwischen auch eine parakrine Schleife nachgewiesen. Diese hat zur Grundlage, daß solche Zellen, unabhängig von einer Zelloberflächenexpression des CD38-Ektoenzym, von Nachbarzellen synthetisiertes cADPR über molekular noch nicht identifizierte cADPR-Transportmoleküle entlang (ausgleichende Transporter) oder auch entgegen eines Konzentrationsgradienten (konzentrierende Transporter) aufnehmen, bzw. befördern können [*Franco et al.* 2001a, *Zocchi et al.* 2001a]. Diese insgesamt von den zitierten Autoren inzwischen an einer Reihe unterschiedlicher Zellen als aktiv postulierten Mechanismen, die in den betreffenden Zellen jeweils unabhängig von einer weiteren, spezifischen Rezeptorstimulation in der Regel in einer (mit < 100 nM geringen) Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowie einer

Förderung der Proliferation und/oder anderer Zellfunktionen, beispielsweise der Kontraktion von Muskelzellen, resultieren [Review: *De Flora et al.* 2002], konnten jedoch von anderen Forschungsgruppen bisher nicht generell bestätigt werden. Beispielsweise in T-Lymphozyten konnte im Anschluß an eine Vorinkubation der (CD38-positiven) Zellen mit β -NAD (1 mM) sowohl basal als auch nach zusätzlicher Stimulation über den TCR/CD3-Komplex keine signifikante Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ gegenüber nicht mit β -NAD vorbehandelten Zellen festgestellt werden [*da Silva et al.* 1998b]. Zusätzlich war in diesen Zellen weder eine Aufnahme von extrazellulär synthetisiertem cADPR ins Zellinnere [*da Silva et al.* 1998b] noch eine steigernde Wirkung von extrazellulär appliziertem cADPR (100 μ M) auf die $[Ca^{2+}]_i$ nachweisbar [*Prof. Guse*, persönliche Mitteilung]. Damit sind zumindest eine generelle Präsenz und Wirksamkeit der autokrinen und parakrinen Transportschleifen und eine ubiquitäre, mit diesen in Zusammenhang stehende, physiologische Bedeutung von der cADPR-Synthese abhängiger, intrazellulärer Signalgebung durch das CD38-Ektoenzym in Frage zu stellen. Eher gegen eine allgemeine und vorherrschenden Bedeutung dieser Mechanismen im Rahmen der cADPR-vermittelten Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ spricht zudem die Tatsache, daß eine Expression von CD38, bzw. membranständiger ADPRcs/NADGHs inzwischen (im Zeitraum der Arbeit an dieser Dissertation) auch wiederholt an intrazellulären Membransystemen und Organellen wie der Kernmembran [*Adebanjo et al.* 1999, *Khoo et al.* 2000, *Khoo & Chang* 2002], den Mitochondrien [*Ziegler et al.* 1997] und dem ER/SR [*Mészáros et al.* 1997], beschrieben wurde. Eine intrazelluläre Präsenz (membranständiger) cADPR-synthetisierender Enzyme, falls gegeben, läßt die insbesondere von *De Flora & Mitarbeitern* postulierten, oben beschriebenen Mechanismen zumindest zur Erklärung der rezeptorstimulierten, Ca^{2+} -mobilisierenden Wirkung von cADPR, einem gegenüber einer kontinuierlichen Regulation der basalen $[Ca^{2+}]_i$ relativ raschen Vorgang, prinzipiell zu umständlich erscheinen. In diese Richtung weisend, wurden in nahe zurückliegender Zeit verschiedene, ursprünglich zu den klassischen NADasen gezählte Enzyme als cADPR-synthetisierende NADGHs und zum Teil eindeutig als CD38 identifiziert. Zu den als CD38 identifizierten Enzymen gehört auch eine der am intensivsten untersuchten klassischen „NADasen“, diejenige aus der Kälbermilz [*Augustin et al.* 2000]. Auch von der noch nicht identifizierten NADase der Hundemilz wurde bereits nachgewiesen, daß sie ADPRc-Aktivität besitzt [*Kim et al.* 1993b]. Da verschiedene ältere Literaturdaten neben der PM-Expression auch eine intrazelluläre Expression von NADasen (ebenfalls CD38?) am ER/SR [*Bock et al.* 1971] sowie in Kern [*Green & Dobrjansky* 1972, *Ueda et al.* 1975] und Mitochondrien [*Moser et al.* 1983, *Boyer et al.* 1993] dokumentieren, war in Anbetracht der

Gesamtdatenlage auch im Kontext der vorliegenden Arbeit (dem experimentellen System humaner T-Lymphozyten) die Möglichkeit einer ursprünglich nicht erwarteten Existenz und funktionellen Bedeutung intrazellulärer membranständiger, CD38 potentiell ähnelnder oder gleichender ADPRCs/(NADGHs) (im Gegensatz zu oder auch neben einer von CD38 verschiedenen, löslichen, cytosolischen ADPRC) nicht mehr prinzipiell auszuschließen. Vielmehr wurden bereits in einer Reihe von Zellen Hinweise auf die Existenz solcher, auf molekularer Ebene meist noch nicht identifizierter und in Hinblick auf ihre exakte Lokalisierung noch nicht charakterisierter Enzyme erbracht, indem eine spezifische Stimulierbarkeit der ADPRC-Aktivität über Oberflächenrezeptoren nachgewiesen und eine Bedeutung der Enzyme in einer für den jeweiligen Zelltyp charakteristischen, physiologischen Funktion aufgezeigt oder nahegelegt wurde (Tab. 1.4). Zumindest in dieser Eigenschaft mit CD38 übereinstimmend, wurden in den meisten Fällen multifunktionelle Enzyme mit stark überwiegender Hydrolaseaktivität anstelle von monofunktionellen mit ausschließlicher oder zumindest überwiegender ADPRC-Aktivität beschrieben. Enzyme des letzteren Typs wurden bislang nur vereinzelt in niederen Organismen, namentlich in *Euglena gracilis*, bei der eine Beteiligung des Enzyms an der Regulation des Zellzyklus vermutet wird [Masuda et al. 1997], und verschiedenen *Species* von Schwämmen entdeckt [Zocchi et al. 2001b]. Die *Euglena*-ADPRC wurde inzwischen proteinbiochemisch gereinigt, allerdings noch nicht kloniert und/oder anhand von Sequenzdaten identifiziert [Masuda et al. 1999]. Dementsprechend ist das stammesgeschichtliche Verhältnis des Enzyms zu CD38, CD157 und den *Aplysia*-ADPRCs noch ungeklärt. Aufgrund der noch ausstehenden (vollständigen) Reinigung beider Enzyme inklusive ihrer Identifikation und Klonierung, ist das starke Überwiegen ihrer ADPRC-Aktivität in jedem Fall noch mit Vorsicht zu werten, da eine Verunreinigung der Enzyme mit ADPR-degradierender Pyrophosphatase-Aktivität nicht mit Sicherheit auszuschließen ist. Obgleich die bislang ausnahmslos hohe NADGH/cADPR-Hydrolaseaktivität der ADPRCs der höheren Organismen in Hinblick auf ihre potentielle Bedeutung als Second-Messenger-Enzyme in mancher Hinsicht befremdlich ist, ist eine solche Funktion der Enzyme dennoch prinzipiell vorstellbar. Viele Daten deuten inzwischen darauf hin, daß das Verhältnis der verschiedenen katalytischen Aktivitäten von CD38/CD38-ähnlichen ADPRCs/NADGHs in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl durch eine Modulation der Transkription des CD38-Gens und der Expression von CD38 als auch direkt, auf der Ebene des bereits exprimierten Enzyms, auf unterschiedliche Weise reguliert werden kann (Tabellen 1.5 und 1.6). Eine direkt das Ratio von ADPRC- zu NADGH-Aktivität modulierende Wirkung wurde beispielsweise für hohe Konzentrationen an ATP, eine unter hypoxischen Bedingungen gesteigerte

Tab. 1.5: Mechanismen zur Regulation der Expression und/oder katalytischen Aktivität von CD38 (eine repräsentative Auswahl)

Effektor	Gewebe / Zelltyp	Wirkung	Referenzen
Östrogen	Myometrium der Ratte	2,7-facher Anstieg der CD38-Expression <i>1,8-facher, selektiver Anstieg der ADPRC-Aktivität</i>	<i>Dogan et al. [2002]</i>
	Uterus der Ratte	4,3-facher Anstieg der ADPRC(GDPRC)-Aktivität 2,5-facher Anstieg der cADPR-Hydrolaseaktivität 1,8-facher Anstieg der NADase-Aktivität (vermutlicher Anstieg der CD38-Expression)	<i>Chini et al. [1997]</i>
TNF α	glomeruläre Mesangialzellen der Ratte	1,4-facher Anstieg der CD38-Expression	<i>Yusufi et al. [2001]</i>
ATRA (all-trans-Retinsäure)	glomeruläre Mesangialzellen der Ratte	1,24-facher Anstieg der CD38-Expression <i>selektiver Anstieg der ADPRC-Aktivität</i>	<i>Yusufi et al. [2001]</i>
	renale LLC-PK ₁ -Epithelzellen (Zell-Linie)	<i>bis zu 6-facher, selektiver Anstieg der ADPRC-Aktivität</i> (vermutlicher Anstieg der CD38-Expression)	<i>Beers et al. [1995]</i>
	glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte	1,89- bis 2-facher Anstieg der ADPRC-Aktivität (vermutlicher Anstieg der Expression des Proteins)	<i>De Toledo et al. [1997 & 2000]</i>
	HL-60-Zellen	11,7-facher Anstieg der CD38-Expression Induktion der Expression und der katalytischen Aktivität von CD38	<i>Drach et al. [1993]</i> <i>Kontani et al. [1993]</i>
Interferon- γ	leukämische B-Zellen	Anstieg der Expression und der katalytischen Aktivität von CD38	<i>Bauvois et al. [1999]</i>
	humane periphere Monozyten	1,83-facher Anstieg der CD38-Expression	<i>Musso et al. [2001]</i>
IL-2	humane periphere Monozyten	1,4-facher Anstieg der CD38-Expression	<i>Musso et al. [2001]</i>
T ₃ (Trijodthyronin)	glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte	1,4- bis 1,89-facher Anstieg der ADPRC(GDPRC)-Aktivität (vermutlicher Anstieg der CD38-Expression)	<i>De Toledo et al. [1997 & 2000]</i>
Vitamin D ₃ (Calciferol)	glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte	1,4-facher Anstieg der ADPRC(GDPRC)-Aktivität (vermutlicher Anstieg der CD38-Expression)	<i>De Toledo et al. [2000]</i>
	HL-60-Zellen und aktivierte humane B- und T-Lymphozyten	Anstieg der CD38-Expression 4-6-facher Anstieg der katalytischen Aktivität von HL-60-Zellen	<i>Stoeckler et al. [1996]</i>
Dibutyryl-cAMP	humane Leukämie-Zellen (THP-1)	Anstieg der CD38-Expression ca. 3,2-facher Anstieg der katalytischen Aktivität (NADase) (keine Wirkung von cAMP in Jurkat- und HL-60-Zellen)	<i>Kontani et al. [1996]</i>
anti CD3 ϵ mAK	T-Lymphozyten der Maus	Anstieg der CD38-Expression an der Zelloberfläche	<i>Han et al. [2000]</i>

Tab. 1.6: Nachgewiesene Möglichkeiten zur Modulation der katalytischen Aktivität (Ratio cADPR-Synthese/ADPR-Synthese) multifunktionaler ADPRCs/NADGHs auf Proteinebene

Regulator/ Modulator	Zellsystem (ADPRC/NADGH)	Wirkung	Referenzen
ATP [1-10 mM]	pankreatische β -Zellen (CD38)	selektive Inhibition der NADGH-Aktivität	<i>Takasawa et al.</i> [1993b]
ADPR [10-30 μ M]	Seeigelei (unbekannt)	Inhibition der cADPR-Hydrolase-Aktivität, dadurch Stimulation der cADPR-Synthese	<i>Genazzani et al.</i> [1996]
(ADPR) ₂	aus humanen Erythrocyten gereinigtes CD38	Verstärkung der ADPRC-Aktivität, bzw. der Ca ²⁺ -freisetzenden Wirkung von cADPR; EC ₅₀ ca. 25-30 μ M	<i>De Flora et al.</i> [1997]
komplexe Ganglioside [0-50 μ M]	rekombinantes CD38, HL-60-Zellen (CD38)	Inhibition der ADPRC- und NADGH-Aktivität, IC ₅₀ ca. 300 nM	<i>Hara-Yokoyama et al.</i> [1996 und 2001]
divalente Kationen [1 mM] (Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , nicht Mg ²⁺ und Ca ²⁺)	rekombinantes CD38, HL-60-Zellen (CD38)	selektive Inhibition der NADGH-Aktivität, Stimulation der ADPRC-Aktivität; EC ₅₀ für Zn ²⁺ , das wirksamste Kation, ist ca. 200 μ M	<i>Kukimoto et al.</i> [1996]
divalente Kationen [keine Angabe] (Zn ²⁺ und Cu ²⁺)	humane Erythrozyten (Ektoenzym CD38)	Stimulation der ADPRC-Aktivität	<i>Zocchi et al.</i> [1993]
divalente Kationen [500 μ M] (Zn ²⁺ , nicht Mg ²⁺)	solubilisierte Form der mitochondrialen ADPRC/NADGH	Stimulation der NADase-Aktivität (keine Differenzierung zwischen ADPRC- und NADGH-Aktivität vorgenommen)	<i>Ziegler et al.</i> [1996 und 1997]
divalente Kationen [100 nM-10 mM] (Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , nicht Mg ²⁺)	glatte Gefäßmuskelnzellen der Ratte (CD38?, oder eine nicht identifizierte ADPRC)	Inhibition der ADPRC-Aktivität; IC ₅₀ für Zn ²⁺ ca. 75 μ M	<i>De Toledo et al.</i> [2000]
divalente Kationen (Mg ²⁺) [10 mM]	cardiale Myozyten der Ratte (nicht identifiziert)	Aktivierung der ADPRC-Aktivität um ca. 29%	<i>Higashida et al.</i> [2000]
divalente Kationen [1 mM] (Zn ²⁺ und Mn ²⁺ , nicht Mg ²⁺)	in CHO-Zellen exprimiertes BST-1 (Ektoenzym CD157)	Stimulation der ADPRC- und NADGH-Aktivität im unteren physiologischen, bzw. im subphysiologischen pH-Bereich	<i>Hirata et al.</i> [1994]
ADP-Ribosylierung (Cystein-spezifisch)	T- und B-Zellen der Maus (CD38)	selektive Inhibition der NADGH-Aktivität	<i>Han et al.</i> [2000]
ADP-Ribosylierung (Arginin-spezifisch)	T- und B-Zellen der Maus (CD38)	Inhibition von ADPRC- und NADGH-Aktivität durch ADP-Ribosylierung von Arginin 269	<i>Han et al.</i> [2000]
β -NADH [0-10 mM] (Redoxstatus)	glatte Muskelzellen der Pulmonararterie (intrazellulär, nicht identifiziert)	selektive Inhibition der NADGH-Aktivität; IC ₅₀ für β -NADH ca. 1 mM	<i>Wilson et al.</i> [2001]
Oligomerisierung von CD38 durch Transglutaminierung	HL-60-Zellen; aus den Membranen der Zellen gereinigte Oligomere (p190; MW 190 kDa)	Aktivierung der Cyclaseaktivität (mindestens 3-fach); Inhibition der cADPR-Hydrolaseaktivität (mindestens 2,5-fach)	<i>Umar et al.</i> [1996]
cADPR (allosterische Rückwirkung auf das synthetisierende Enzym)	Hirn des Rindes (lösliche ADPRC/NADGH)	Aktivierung der cADPR-Hydrolaseaktivität durch cADPR in einer Endkonzentration von $\geq 60 \mu$ M	<i>Matsumura & Tanuma</i> [1998]

Anmerkung: CHO-Zellen = chinese hamster ovary cells; HL-60-Zellen = eine myeloische Zell-Linie

Konzentration an β -NADH, für divalente Kationen, komplexe Ganglioside und ADPR sowie für eine Oligomerisierung von CD38 beschrieben (Tab. 1.6 und dort angegebene Referenzen). Für PM-ständiges CD38 wurden alternativ zu seiner Wirkung als Ektoenzym, deren Bedeutung für die intrazelluläre Signaltransduktion zweifelhaft oder zumindest strittig ist, aufgrund seiner strukturellen Interaktion mit Rezeptorkomplexen der Zelloberfläche auch eine Funktion als kostimulierender Rezeptor [Funaro et al. 1993, Lund et al. 1996, Morra et al. 1998, Mallone et al. 2001, Deaglio et al. 2002] sowie eine Bedeutung als Adhäsionsmolekül (s.u.) und, in Kooperation mit anderen Enzymen, eine potentielle Funktion beim Recycling von in den EZR freigesetzten Nukleotiden [Deterre et al. 1996] beschrieben. Unter physiologischen Gesichtspunkten erscheint es denkbar, daß diese Alternativfunktionen ebenso auch Hauptfunktionen des Oberflächenmoleküls CD38 darstellen könnten. Als mögliche Interaktionspartner von CD38 in seiner Rolle als Adhäsionsmolekül, wurden Hyaluronat [Nishina et al. 1994], ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, und der Ligand CD31, ein auf Endothel- und einigen hämatopoetischen Zellen sowie im Stroma lymphatischer Organe exprimiertes Adhäsionsmolekül, identifiziert [Horenstein et al. 1998, Deaglio et al. 1998, Fernandez et al. 1998]. Im Rahmen seiner Wirkung als Korezeptor ist CD38 (indirekt) über eine Phosphorylierung cytosolischer Proteine an mitogenen/apoptotischen Signalkaskaden in Antwort auf exogene Stimuli beteiligt und gleichzeitig in die Regulation der Sekretion von Cytokinen involviert [Übersichtsartikel: Mehta et al. 1996, Deterre et al. 2000].

1.5. Bedeutung unterschiedlicher Second-Messenger-Systeme im Rahmen der Aktivierung von T-Lymphozyten

In T-Lymphozyten wurde ein in sequentieller Weise kooperatives Zusammenwirken der drei durch IP_3 , cADPR und NAADP repräsentierten Second-Messenger-Systeme bei der spezifischen Aktivierung über den TCR/CD3-Komplex beschrieben [Guse et al. 1999, Berg et al. 2000; Review: da Silva & Guse 2000]. Während der Botenstoff IP_3 innerhalb der ersten 10-20 Min. nach Stimulation einen raschen Anstieg, gefolgt von einer fast vollständigen Rückkehr seiner intrazellulären Konzentration auf basale Werte, zeigt [Review: Guse 1998], ist der Anstieg der cADPR-Konzentration durch eine langsame Kinetik gekennzeichnet, indem eine maximale Konzentration erst nach ca. 30 Min. erreicht, dann jedoch über einen langen Zeitraum (nachgewiesen bis zu einer Stunde) aufrecht erhalten wird [Guse et al. 1999]. Dies ist mit der Vorstellung vereinbar, daß IP_3 mittels seiner Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung vor allem an der Ausbildung der initialen Peakphase des über den TCR/CD3-Komplex stimulierbaren, charakteristischerweise biphasischen Ca^{2+} -Signals beteiligt ist, während

cADPR im Wesentlichen für eine gegenüber dem Basalwert langanhaltende Aufrechterhaltung einer gesteigerten $[Ca^{2+}]_i$, die die Grundlage der Plateauphase des biphasischen Ca^{2+} -Signals bildet, verantwortlich ist. Mit Hilfe pharmakologischer (cADPR), bzw. pharmakologischer und molekularbiologischer (IP_3) Versuchsansätze, konnte diese Modellvorstellung gestützt und beiden Botenstoffen zeitlich versetzt, jedoch in überlappender Weise, eine essentielle Funktion bei der Entstehung des in seinem typischen, biphasischen Verlauf insgesamt für die T-Zellaktivierung unentbehrlichen Ca^{2+} -Signals zugeordnet werden [Guse et al. 1999, Jayaraman et al. 1995]. So hat die Unterdrückung IP_3 -vermittelter Signalgebung eine komplette Inhibition des Ca^{2+} -Signals zur Folge [Jayaraman et al. 1995; Review: Guse 1999], wohingegen die Unterbindung cADPR-vermittelter Signalgebung einen insgesamt verzögerten Eintritt des Ca^{2+} -Signals und insbesondere eine stark ausgeprägte Inhibition seiner langanhaltenden Plateauphase bewirkt [Guse et al. 1999]. Da langanhaltende Ca^{2+} -Signale in T-Lymphozyten hauptsächlich durch Einstrom von Ca^{2+} aus dem EZR getragen werden [Review: Lewis 2001], wird gestützt durch experimentelle Daten angenommen, daß sowohl IP_3 als auch cADPR diesen kapazitativ über einen SOC-Mechanismus regulieren können [Guse et al. 1999]. Da eine vorausgehende Inaktivierung des Systems zur Ca^{2+} -Freisetzung durch NAADP die Stimulierbarkeit eines Ca^{2+} -Signals über den TCR/CD3-Komplex insgesamt inhibiert, ist anzunehmen, daß auch diesem Botenstoff eine essentielle Funktion bei dessen Entstehung zukommt. Diese könnte in einer initialen Bereitstellung von den CICR über IP_3 - und Ry-Rezeptoren förderndem Ca^{2+} aus einem separaten, nicht durch IP_3 - und Ry-Rezeptoren regulierten Ca^{2+} -Pool bestehen [Churchill & Galione 2001]. Als potentiell verantwortlich für die stimulierte cADPR-Synthese, wurde in der cytosolischen Fraktion von Jurkat T-Lymphozyten die basal nur schwache (ca. 20 pMol/mg/Min.) katalytische Aktivität einer löslichen ADPRC detektiert, die im Zuge einer anti-CD3(OKT3 mAK)-Stimulation intakter Zellen eine ca. 3-fache und in zusätzlicher Gegenwart eines Tyrosinphosphatase-Inhibitors (Dephostatin) eine ca. 4,3-fache Steigerung zeigte, durch einen artifiziellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ alleine jedoch nicht positiv beeinflusst wurde [Guse et al. 1999]. Die Charakterisierung dieses möglicherweise durch Tyrosinphosphorylierung aktivierbaren, potentiellen Second-Messenger-Enzyms der T-Lymphozyten im Vergleich zu CD38 sowie der Versuch einer proteinbiochemischen Aufreinigung und molekularen Identifizierung dieses Enzyms waren zentrale Gegenstände der vorliegenden Dissertation.

2. Problemstellung

Seit der Entdeckung von cADPR [Lee *et al.* 1989 und 1994] und seiner Ca^{2+} -mobilisierenden Eigenschaft an Homogenat des Seeigeleis [Clapper *et al.* 1987], die sich in ihrem Mechanismus klar von der des bislang bestcharakterisierten Botenstoffs IP_3 unterscheidet [Reviews: Dousa *et al.* 1996, da Silva & Guse 2000], wurden endogenes Vorkommen von cADPR und Sensitivität gegenüber seiner Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung nahezu ubiquitär in einer Vielzahl von Zellen unterschiedlicher Abstammung beschrieben [Review: Lee 1997]. Mit der Entdeckung und molekularen Charakterisierung cADPR synthetisierender und degradierender Enzyme [Review: Lee 2000], sowie dem Nachweis einer spezifisch (zum Beispiel über Zelloberflächenrezeptoren oder über NO, cGMP und PKG) stimulierbaren Zunahme der cytosolischen cADPR-Konzentration, zumindest in einigen Zellsystemen, wurden zudem wichtige Hinweise auf eine potentielle Second Messenger-Funktion dieses Nukleotids erbracht [Reviews: Guse 1999, da Silva & Guse 2000]. Eine der zentralen ungeklärten Fragen betrifft jedoch die molekulare Identität und subzelluläre Lokalisierung der für die intrazelluläre Bereitstellung/Anreicherung von cADPR verantwortlichen Enzyme inklusive ihres verwandtschaftlichen Verhältnisses zu dem zunächst ausschließlich und noch immer hauptsächlich als Ektoenzym bekannten Zelloberflächenprotein CD38. Obwohl Modelle zur Erklärung einer intrazellulären Wirkung von extrazellulär synthetisiertem, selbst nicht membranpermeantem cADPR vorgeschlagen wurden [Reviews: De Flora *et al.* 1998 und 2002], ist deren physiologische Relevanz und (generelle) Funktionalität in Zellen nach wie vor umstritten. In humanen T-Lymphozyten, das Ektoenzym CD38 exprimierenden Zellen, in denen dem Botenstoff cADPR eine essentielle Bedeutung bei der Ausbildung eines langanhaltenden, globalen Ca^{2+} -Signals im Kontext der spezifischen TCR/CD3-Komplex-vermittelten Aktivierung zugeordnet wurde [Guse *et al.* 1999], konnte weder eine Wirkung von extrazellulär aus β -NAD synthetisiertem cADPR auf die globale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ noch eine Internalisierung dieses Botenstoffs festgestellt werden [da Silva *et al.* 1998b]. Vielmehr wurde in diesen Zellen eine über den TCR/CD3-Komplex stimulierbare, möglicherweise durch Tyrosinphosphorylierung regulierbare, cytosolische Enzymaktivität zur cADPR-Synthese nachgewiesen [Heyer 1998, Guse *et al.* 1999], von der eine funktionelle Bedeutung in der cADPR-vermittelten, intrazellulären Signaltransduktion prinzipiell leichter vorstellbar ist. Das für die cytosolische ADPRC-Aktivität der T-Lymphozyten verantwortliche Enzym wurde jedoch auf Protein- und DNA-Ebene bislang weder identifiziert noch ausführlich charakterisiert. Dies bildete den Ansatzpunkt zu Thema und Zielsetzungen der vorliegenden Dissertation. Wesentliche Teilziele bestanden 1. in der Entwicklung eines zuverlässigen und

sensitiven Assays auf ADPRC-Aktivität, 2. in einer funktionellen, pharmakologischen und molekularen, bzw. immunologischen Charakterisierung subzellulär unterschiedlich lokalisierter ADPRCs/NADGHs in T-Lymphozyten, wobei ein besonderes Interesse der bereits im Cytosol der Lymphozyten detektierten ADPRC-Aktivität galt, und 3. in einer proteinbiochemischen Aufreinigung und molekularen Identifikation der löslichen ADPRC. Eine funktionelle Bedeutung an intrazellulären Membranen oder in Organellen lokalisierter cADPR synthetisierender Enzyme im Zusammenhang der T-Zell-Aktivierung war jedoch ebenfalls nicht auszuschließen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Lösungen

Acrylamid-Lösung (29,22% Acrylamid 4K, 0,78% Bisacrylamid 4K)	<i>AppliChem / Darmstadt</i>
ADP-Ribosylcyclase aus <i>Aplysia californica</i> (100 ng/µl in ddH ₂ O; in Aliquots bei -70 °C)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Bio-Rad / München</i>
Antipain	<i>Biomol / Hamburg</i>
Bio-Rad Protein Assay	<i>Bio-Rad / München</i>
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	<i>Biomol / Hamburg</i>
Bromphenolblau (Natriumsalz)	<i>Serva / Heidelberg</i>
CD38 (human, löslich, rekombinant; 100 µg/ml in ddH ₂ O; Lagerung in Aliquots bei -20 °C)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. P. Deterre / Paris, Frankreich
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva Blue R)	<i>Serva / Heidelberg</i>
Diethylether	<i>Merck / Darmstadt</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Dithiothreitol (DTT)	<i>Biomol / Hamburg</i>
ECL™ Western Blot Detektionsreagenzien	<i>Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg</i>
EGTA	<i>Merck / Darmstadt</i>
Enolase (aus Hasen-Muskel, EC 4.2.1.11; kristalline Lösung, Lagerung bei 4-8 °C)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Essigsäure (Eisessig)	<i>Merck / Darmstadt</i>
Fura-2/AM	<i>Calbiochem / Bad Soden</i>
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aus humanen Erythrocyten (2 mg/ml in ddH ₂ O, Aliquots bei -20 °C)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Glycerol	<i>Biomol, Hamburg</i>
Glycin (Reinheitsgrad für die Elektrophorese)	<i>ICN Biochemicals Inc. / Ohio, USA</i>
HEPES	<i>Biomol / Hamburg</i>
Ionomycin	<i>Calbiochem / Bad Soden</i>
Leupeptin	<i>Biomol / Hamburg</i>

2-Mercaptoethanol (β -ME)	<i>Merck / Darmstadt</i>
Methanol (Reinheitsgrad LiChrosolv [®])	<i>Merck / Darmstadt</i>
Methanol (Reinheitsgrad pro Analyti)	<i>Merck / Darmstadt</i>
MES	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Natriumdesoxycholat	<i>Merck / Darmstadt</i>
Natriumdodecylsulfat	<i>Biomol / Hamburg</i>
Natriumthioglycolat	<i>Fluka / Taufkirchen</i>
Neutol Liquid NE B&W Paper Developer	<i>Agfa / Leverkusen</i>
Nonidet P40 (NP40)	<i>Calbiochem / Bad Soden</i>
Nukleotid-Pyrophosphatase (PPase; 50 U/ml in dd H ₂ O, in Aliquots bei -20 °C)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Penicillin/Streptomycin-Lösung	<i>Life Technologies / Eggenstein</i>
Pefabloc SC	<i>Biomol / Hamburg</i>
Pepstatin	<i>Biomol / Hamburg</i>
Perchlorsäure (PCA)	<i>Merck / Darmstadt</i>
Phenol (wassergesättigte Lösung)	<i>Appligene / Heidelberg</i>
RPMI 1640-Medium mit Glutamax I	<i>Life Technologies / Eggenstein</i>
Salzsäure 30 %ig (Reinheitsgrad suprapur)	<i>Merck / Darmstadt</i>
Serum neonataler Kälber (NCS)	<i>Life Technologies / Eggenstein</i>
TEMED	<i>Bio-Rad / München</i>
Tetenal Superfix Fixierkonzentrat	<i>Tetenal Photowerk / Hamburg</i>
Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat (TBAHP, 1M Lösung in Wasser)	<i>Fluka / Taufkirchen</i>
Thapsigargin	<i>Calbiochem / Bad Soden</i>
Thimerosal USP	<i>Merck / Darmstadt</i>
Tris (Reinheitsgrad ultrapur)	<i>Life Technologies / Eggenstein</i>
Trypanblau-Lösung 0,4% (w/v)	<i>Life Technologies / Eggenstein</i>
Tween-20	<i>Merck / Darmstadt</i>

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Salze wurden von den Firmen *Merck/Darmstadt* oder *Sigma/Deisenhofen* bezogen und hatten mindestens den Reinheitsgrad pro Analyti.

3.1.2 Molekulargewichtsmarker für die SDS Gelelektrophorese

Kaleidoskopmarker (vorgefärbt)	<i>Bio-Rad / München</i>
Novex-Marker (See Blue, vorgefärbt)	<i>Novex / Groningen, Niederlande</i>
Serva Liquid Mix (ungefärbt)	<i>Serva / Heidelberg</i>

3.1.3 Nukleotide und Nukleotidanaloga

1-N ⁶ -etheno-Adenosin (ϵ -Ado)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
1-N ⁶ -etheno-ADP (ϵ -ADP)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
1-N ⁶ -etheno-AMP (ϵ -AMP)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
1-N ⁶ -etheno-NAD (ϵ -NAD)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
1-N ⁶ -etheno-NADP (ϵ -NADP)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
β -NAD	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Nicotinamidguanidinukleotid (NGD)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
araF-NAD	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. N. Oppenheimer / San Francisco, USA</i>

Stammlösungen aller Substanzen außer araF-NAD (letzteres lag in einer Konzentration von 20 μ M in Aqua bidest. vor) wurden in der Konzentration 50 oder 100 mM in Aqua bidest. angesetzt, in Aliquots bei -70 °C gelagert und bei Bedarf weiterverdünnt.

3.1.4 Potentielle Cyclaseinhibitoren

ADPR	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
3-Aminobenzamid (3-ABA)	<i>Alexis Deutschland GMBH / Grünberg</i>
bis-Adenindinukleotid (Ap ₂ A)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. B.V.L. Potter / Bath, UK</i>
ATP	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Benzamidadenindinukleotid (Bp ₂ A)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. B.V.L. Potter / Bath, UK</i>
cADPR	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Inosin	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
Inosin-5'-Phosphat	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
bis-Inosindinukleotid (Ip ₂ I)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. B.V.L. Potter / Bath, UK</i>

Isonicotinamid (Iso-Nic)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
1,5-Isoquinolindiol	<i>Alexis Deutschland GMBH / Grünberg</i>
Nicotinamidhypoxanthindinukleotid (NHD)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
7-Deaza-NHD	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. B.V.L. Potter / Bath, UK</i>
8-Bromo-NHD (8-Br-NHD)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. B.V.L. Potter / Bath, UK</i>
6-Thio-NHD	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. B.V.L. Potter / Bath, UK</i>
Nicotinamid (Nic)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>
β -Nicotinamidmononukleotid (β -NMN)	<i>Sigma / Deisenhofen</i>

Stammlösungen der Substanzen cADPR (50 mM), ADPR (100 mM), ATP (100 mM), Ap₂A (10 mM), Ip₂I (10 mM), Bp₂A (1 mM), NHD (50 mM), 8-Br-NHD (3-5 mM), 6-Thio-NHD (2 mM), 7-Deaza-NHD (1 mM), β -NMN (100 mM) und Inosin-5'-Phosphat (100 mM) wurden in Aqua bidest. und Stammlösungen der Substanzen 3-ABA (100 mM), 1,5-Isoquinolindiol (100 mM), Inosin (100 mM), Nic (100 mM) und Iso-Nic (100 mM) wurden in DMSO angesetzt. Alle Stammlösungen wurden in Aliquots (50 μ l) bei -70 °C gelagert und bei Bedarf in dem genannten Lösungsmittel weiterverdünnt.

3.1.5 Monoklonale Antikörper

AT1 anti-CD38 mAK (200 μ g/ml; 4-8 °C)	<i>Santa Cruz Biotechnology / Heidelberg</i>
HIT-2 anti CD38 mAK (200 μ g/ml, in Aliquots bei -20 °C)	<i>Pharming, Becton Dickinson GMBH / Heidelberg</i>
T16 anti-CD38 mAK (200 μ g/ml; in Aliquots bei -20 °C)	<i>Immunotech / Heidelberg</i>
HB7 anti-CD38 mAK (100 μ g/ml; in Aliquots bei -20 °C)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. P. Deterre / Paris, Frankreich</i>
IB4 anti-CD38 mAK (700 μ g/ml; in Aliquots bei -20 °C)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von <i>Prof. F. Malavasi / Turin, Italien</i>
Anti-CD3 mAK (OKT3, 1 mg/ml), gereinigt an Protein G-Sepharose FF	<i>Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg</i>

3.1.6 Polyklonale Antikörper

C-19 anti-CD38 pAK (200 µg/ml; 4-8 °C)

Santa Cruz Biotechnology / Heidelberg

N-17 anti-CD38 pAK (200 µg/ml; 4-8 °C)

*Santa Cruz Biotechnology / Heidelberg***3.1.7 Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper**

Ziege anti-Maus IgG (human präadsorbiert)

Santa Cruz Biotechnologie / Heidelberg

Hase anti-Ziege IgG (nicht präadsorbiert)

*Dianova / Hamburg (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., USA)***3.1.8 Verwendete Zelltypen und Zell-Linien**Leukämische T-Helfer-Lymphozytenaus der Kultur von *Prof. F. Emmrich / Erlangen, Leipzig*

Jurkat T-Lymphozyten (Subklon JMP)

Primäre T-Lymphoblasten der Mausfreundlicherweise zur Verfügung gestellt von *Dr. F. Lund / Saranac Lake, USA*

Aus Milz isolierte Wildtyp- und CD38-

Knockout (CD38 -/-) T-Lymphoblasten

3.1.9 Puffer, Stammlösungen und MedienCalciummesspuffer (pH 7,4)

NaCl 140 mM

KCl 5 mM

MgSO₄ 1 mMCaCl₂ 1 mM

HEPES 20 mM

NaH₂PO₄ 1 mM

D-Glukose (wasserfrei) 5 mM

in Aqua bidest.; pH Einstellung mit 7M NaOH

Coomassie R-250-Entfärber (Standard-Lösung)Coomasie-Entfärber für PVDF-Blots

Methanol p.A. 40% (v/v)

Methanol p.A. 50% (v/v)

Essigsäure (Eisessig) 10% (v/v)

Essigsäure (Eisessig) keine

Aqua bidest. 50% (v/v)

Aqua bidest. 50% (v/v)

Coomassie R-250-Färbelösung (Standardlösung)

Coomassie R-250	0,1% (w/v)
Methanol p.A.	40% (v/v)
Essigsäure (Eisessig)	10% (v/v)
Aqua bidest.	50% (v/v)

Coomassie R250-Färber für PVDF-Blots

Coomassie R-250	0,25% (w/v)
Methanol p.A.	40% (v/v)
Essigsäure (Eisessig)	keine
Aqua bidest.	60% (v/v)

EGTA-Tris-Lösung (pH 7,4)

EGTA 150 mM

Tris base 1,42 M

in Aqua bidest.; pH Einstellung mit 30 %iger HCl

Filmentwickler

Neutol Liquid NE 1 + 7 in Aqua bidest.; lichtgeschützte Aufbewahrung

Filmfixierer

Tetenal 1 + 7 in Aqua bidest.; lichtgeschützte Aufbewahrung

Fura-2/AM-Stammlösung

1,0019 mg Fura-2/AM/1 ml DMSO

Lagerung lichtgeschützt in 5 µl-Aliquots bei -20 °C

HEPES-Puffer für die Zellkultur (pH 7,4)

HEPES 1 M

in Aqua bidest.; pH Einstellung mit 7 M NaOH; Sterilfiltration in einer Stericup-Filtrationseinheit (*Millipore*)

HA-Äquilibrierungspuffer

Die Komponenten KH_2PO_4 (10 mM) mit KCl (100 mM) in Aqua bidest. und K_2HPO_4 (10 mM) mit KCl (100 mM) in Aqua bidest. wurden so gemischt, daß ein pH-Wert von 6,8 resultierte.

HA-Elutionspuffer

Die Komponenten KH_2PO_4 (500 mM) mit KCl (100 mM) in Aqua bidest. und KH_2PO_4 (500 mM) mit KCl (100 mM) in Aqua bidest. wurden so gemischt, daß ein pH-Wert von 6,8 resultierte.

Immunpräzitationspuffer (IP-Puffer pH 7,4)

HEPES	10 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,9 mM
NaH ₂ CO ₃	12 mM

in Aqua bidest.; pH-Einstellung mit 7 M NaOH

Das für einen Versuch benötigte Volumen des Puffers wurde mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) versetzt und auf Eis gelagert. Ein Teil dieses Puffers (Volumen je nach Bedarf) wurde zusätzlich mit Detergenz (Endkonzentration 2% v/v NP40 und 1% w/v Natriumdesoxycholat) versetzt. Die gebrauchsfertigen Puffer waren bei 4 °C max. 1 Woche haltbar (= Stabilität der Proteaseinhibitoren).

Intrazellulärer Puffer (pH 7,2)

HEPES	20 mM
KCl	110 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	2 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM

in Aqua bidest.; pH-Einstellung mit 7 M KOH

Ionomycin-Stammlösung

1 mg Ionomycin/0,939 ml DMSO mit 0,5% Aqua bidest.

Lagerung in 50 µl-Aliquots bei 4-8 °C

Lysispuffer (pH 7,2)

HEPES	20 mM
NaCl	110 mM

in Aqua bidest.; pH Einstellung mit 7 M NaOH

Membran-Waschpuffer (pH 8,0)

Tris base	150 mM
KCl	500 mM in Aqua bidest.; pH-Einstellung mit 30 %iger HCl

Proteaseinhibitoren-Mix (250x)

Stammlösungen (1000x) der Einzelkomponenten wurden in nachstehender Konzentration angesetzt und anschließend zu gleichen Teilen miteinander vereinigt (Endkonzentration 250x). Aliquots von Stammlösungen und Inhibitorecocktail wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Antipain 10 mM in Aqua bidest.
Leupeptin 20 mM in Aqua bidest.
Pepstatin 1 mM in DMSO
Pefabloc SC 500 mM in Aqua bidest.

Reversed-Phase HPLC-Puffer A

KH_2PO_4 20 mM
TBAHP 5 mM

in Aqua bidest.; Einstellung des pH-Wertes auf pH 6,0 mit 7 M KOH

Reversed-Phase HPLC-Puffer B

Reversed Phase HPLC-Puffer A 1:4 versetzt mit Methanol (Reinheitsgrad LiChrosolv)

RPMI-Komplettmedium

500 ml RPMI 1640-Medium mit Glutamax I (= stabiles L-Glutamin)
7,5% (v/v) NCS
25 mM HEPES pH 7,4 (Endkonzentration; sterilfiltriert)
100 U/ml Penicillin (Endkonzentration; sterilfiltriert)
50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin (Endkonzentration; sterilfiltriert)

SDS-PAGE-Gelkomponenten

Tris base 1,5 M (pH 8,8; eingestellt mit 30 %iger HCl)
Tris base 1,5 M (pH 7,45; eingestellt mit 30 %iger HCl)
Tris base 0,5 M (pH 6,8; eingestellt mit 30 %iger HCl)
SDS 10% (w/v) in Aqua bidest.
APS 10% (w/v) in Aqua bidest.
(täglich frisch angesetzt oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert)

SDS-PAGE-Elektrodenpuffer pH 8,3 (10x)

Tris base	248 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)

Der Puffer ist ohne pH-Kontrolle zu verwenden. Zur Herstellung des 1x-Elektrodenpuffers wurden 100 ml des Konzentrates mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

SDS-Probenpuffer (2x; 8 ml Ansatz)

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,0 ml
Glycerol	1,6 ml
SDS 10 %ig	3,2 ml
Bromphenolblau 0,05% (w/v)	0,4 ml
Aqua bidest.	0,8 ml

Für halbkonzentrierten 2x-SDS-Probenpuffer wurde das Volumen an Tris-HCl um die Hälfte reduziert und durch Aqua bidest. ersetzt.

SP-Sepharose Äquilibrierungspuffer (SP-Puffer A)

Die Komponenten NaH_2PO_4 (30 mM in Aqua bidest.) und Na_2HPO_4 (30 mM in Aqua bidest.) wurden so gemischt, daß ein pH-Wert von 5,0 resultierte. Sofern der Puffer mit Detergenz (2% v/v NP40) angesetzt wurde, wurde dieses vor der pH-Einstellung zugesetzt, da es den pH-Wert veränderte.

SP-Sepharose Elutionspuffer (SP-Puffer B)

Die Komponenten NaH_2PO_4 (30 mM in Aqua bidest.) und Na_2HPO_4 (30 mM in Aqua bidest.) wurden in Gegenwart von 2% (v/v, Endkonzentration) NP40 und 1 M NaCl (Endkonzentration; Chromatographie-Methode 1), bzw. 750 mM NaCl (Endkonzentration; Chromatographie-Methode 2) so gemischt, daß ein pH-Wert von 5,0 resultierte. Die erwähnten Methoden sind weiter unten detailliert beschrieben.

Thimerosal-Stammlösung

2% Thimerosal (w/v) in Aqua bidest.

(Lagerung lichtgeschützt bei 4-8 °C, unbegrenzt haltbar)

Transferpuffer (20x, für Blot auf PVDF)

Tris base 200 mM

Glycin 1,92 M

Für den 1x-Transferpuffer (halbkonzentrierter Towbin-Puffer [*Towbin et al.* 1979]) werden 200 ml 20x-Transferpuffer mit 400 ml Methanol p.A. versetzt und ad 4 Liter mit Aqua bidest aufgefüllt. Der 1x-Transferpuffer sollte maximal 2 Stunden vor Gebrauch angesetzt und abgedeckt und kühl (Kühlraum 4 °C) gelagert werden, da sonst zu viel Methanol entweicht. Für einen Tank-Transfer werden 3 Liter Puffer benötigt.

Tris-EGTA-Eichlösung (pH 7,4) für fluorimetrische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$

EGTA 400 mM

Tris 3 M

in Aqua bidest.; pH-Einstellung mit 30 %iger HCl

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS, pH 7,6)

Tris base 20 mM

NaCl 137 mM

pH-Einstellung mit 30 %iger HCl

3.1.10 Geräte*3.1.10.1 Allgemeine Labor- und Zellkulturgeräte*

Analysenwaage HS4	<i>Mettler / Giessen</i>
Beckmann-Ultrazentrifuge Modell	<i>Beckmann Coulter / Unterschleißheim</i>
CU L-7 80 mit Titan-Festwinkelrotoren (Ti50 oder Ti80)	
CO ₂ -Inkubatoren	<i>Heraeus / Hanau</i>
Evehjem-Homogenisator	<i>IKA-Labortechnik / Staufen</i>
F-2000 Fluoreszenz Spectrophotometer (Hitachi)	<i>Colora Meßtechnik / Lorch</i>
Feinwaage Precisa 400 M	<i>Pak Oerlikon / Zürich, Schweiz</i>
Haemocytometer (Einteilung nach Neubauer)	<i>Hellma / Mülheim, Baden</i>
Heraeus Cryofuge Modell 8500i	<i>Heraeus / Hanau</i>
Heraeus Varifuge Modell 3.OR	<i>Heraeus / Hanau</i>

HPLC-Aparatur mit Autosampler (Modell 360), UV-Detektor (Modell 432) und Datenverarbeitungs- system MT2	(Kontron) Bio-Tek Instruments / Neufahrn
HPLC-Fluoreszenzdetektor Modell 1046A	Agilent Technologies / Waldbronn (Hewlett Packard)
Inversmikroskop	Leitz / Wetzlar
Lichtmikroskop	Will / Wetzlar
Lyophilisator	Snijders Scientific / Nijmegen, Holland
Photoanlage (digital) Vario Cam	Phase / Lübeck
Speed-Vak-Zentrifuge Modell Bioch 018/001	Bachhofer Labortechnik / Reutlingen mit
Kühlfalle Modell Bioch 017/001	Bachhofer Labortechnik / Reutlingen und
Vakuumpumpe Modell Bioch 016/001	Bachhofer Labortechnik / Reutlingen
Quarzküvetten (2 ml Volumen , 10 mm Schichtdicke)	Hellma / Mühlheim, Baden
Sterile Werkbank	BDK / Sonnenbühl-Genkingen
Thermomixer Modell 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz / Hamburg
Tischzentrifuge Mikro Rapid/K	Hettich / Tuttlingen
Vortex-Mischer Modell VF2	IKA-Labortechnik / Staufen
Wasserbad Thermomix UB	Braun / Melsungen
Wasserentsalzungsanlage Seralpur Pro 90 C	Seral / Ransbach
Zellkultur-Materialien aus Plastik	Greiner / Hamburg; Nunc A/S; Dänemark

3.1.10.2 Spezielle Geräte und Materialien

Chromatographie und HPLC)

Äktaprime Chromatographie-Anlage	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
Peristaltic Pump P1	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
HA Ultrogel®	Sigma / Deisenhofen
HiTrap® Blue-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
HiTrap™ CM-Sepharose FF	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
HiTrap™ Desalting	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
HiTrap™ Heparin-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
HiTrap™ Q-Sepharose FF	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
HiTrap™ SP-Sepharose FF	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg
HiTrap™ SP-Sepharose HP	Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg

Hypersil BDS C18-(5 µm-Partikel)-Chromatographiesäule (250 x 4,6 mm I.D.)	<i>Hypersil / UK; Refill durch CS Chromatographie Service GMBH / Langerwehe</i>
Hypersil BDS C18-(5µm-Partikel)-Vorsäule (17 x 4,6 mm I.D., wiederbefüllbar)	<i>CS Chromatographie Service GMBH / Langerwehe</i>
Protein G-Sepharose™ 4 FF	<i>Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg</i>
Resource™-S (Säule mit 1 ml Matrix)	<i>Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg</i>

Western Blot (Tank-Transfer)

Bio-Rad Transfer Blot™ Cell mit Zubehör	<i>Bio-Rad / München</i>
Phero-stab. 200 Electrophoresis Powersupply	<i>Biotec-Fischer /Hamburg</i>
Immobilon™-P PVDF-Transfermembranen	<i>Millipore / Eschborn</i>
Immobilon™-SQ PVDF-Transfermembranen	<i>Millipore / Eschborn</i>
Rothi® PVDF-Transfermembranen	<i>Roth / Karlsruhe</i>
Sequi-Blot™ PVDF-Membranen	<i>Bio-Rad / München</i>
Filmkassetten vom Typ Hypercassette™ (RPN 11642 18 x 24 cm)	<i>Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg</i>
Hyperfilm™ ECL™ (RPN2103K)	<i>Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg</i>

Elektrophorese

Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini Vertikal-Gelelektrophoreseapparatur mit Glasplatten, Abstandshaltern und Taschenschablonen für 2 Minigele (10 x 10,5 cm x 1 mm)	<i>Amersham Pharmacia Biotech /Freiburg</i>
Hoefer Mighty Small SE 260 Dual Gel Caster zum Gießen von je 2 Minigelen (10 x 10,5 cm)	<i>Amersham Pharmacia Biotech / Freiburg</i>
Phero-stab. 500 Electrophoresis Powersupply	<i>Biotec-Fischer / Hamburg</i>

Filtration

Centrex UF-2-Konzentratoren (Volumen 2 ml; 10, 50 und 100 kDa MWCO) oder Centricon-Filtrationseinheiten (2 ml Volumen; 10, 50 und 100 kDa MWCO)	<i>Schleicher & Schüll / Dassel</i>
	<i>Millipore / Eschborn</i>

Centriprep-Filtrationseinheiten (15 ml Volumen; 10 und 50 kDa MWCO)	<i>Millipore / Eschborn</i>
Stericup-Sterilfiltrationseinheiten (500 ml)	<i>Millipore / Eschborn</i>
Sterile Vorspritzenfilter (0,2 µm Porenweite)	<i>Millipore / Eschborn</i>
Inline-Minifilter für die HPLC (0,5 µm Porenweite; Opti Solv Code-Nr. 10-04-00095 PA/5)	<i>WiCom / Heppenheim</i>

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Jurkat T-Lymphozyten

Jurkat T-Lymphozyten des Subklons JMP wurden in RPMI 1640 Kulturmedium mit 2 mM Glutamax I (stabiles L-Glutamin) kultiviert. Als Ergänzungsstoffe wurden dem Medium Serum neonataler Kälber (7,5 % v/v NCS), HEPES (Endkonzentration 25 mM; pH 7,4), sowie die Antibiotika Penicillin (Endkonzentration 100 U/ml) und Streptomycin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugesetzt. Dabei wurden sterile Aliquots der Antibiotika und des HEPES (Stammlösung 1M) vor dem Zusatz zum Medium erneut sterilfiltriert (0,2 µm-Vorspritzenfilter/*Millipore*). Eine Subkultivierung der Zellen in frischem Medium wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Hierbei wurde die Zelldichte der Kulturen unter Berücksichtigung eines empirisch ermittelten Wachstumsfaktors von ca. 1,5-1,8 pro 24 Stunden jeweils so eingestellt, daß sich die Lymphozyten stets in der logarithmischen Wachstumsphase zwischen mindestens $2 \cdot 10^5$ und maximal $1 \cdot 10^6$ Lymphozyten je Milliliter befanden. Die Kulturen wurden in CO₂-begasten Inkubatoren bei 5% CO₂ und 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Der Zustand der Kulturen (Untersuchung auf Kontamination) und das Wachstumsverhalten der Lymphozyten, die unter günstigen Bedingungen frei flottierende Trauben aus runden, glattrandigen Zellen ausbilden, wurde regelmäßig bei vierzigfacher Vergrößerung unter einem Inversmikroskop kontrolliert. Eine gelegentliche Überprüfung der Viabilität der Zellen erfolgte über den Ausschluß des Farbstoffs Trypanblau (sterile Stammlösung 0,4% w/v). Dazu wurden den Kulturen steril entnommene Aliquots von Zellen 1:2 mit der Farbstofflösung versetzt und Aliquots dieser Ansätze in einer Zählkammer mit Neubauer-Einteilung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

3.2.2 Gewinnung von Wildtyp- und CD38 (-/-) T-Lymphozyten aus Milzen der Maus

Aus Milzen von Mäusen isolierte Wildtyp- (wt) und CD38 (-/-) T-Lymphozyten wurden uns freundlicherweise von *Dr. F. Lund* (Trudeau-Institut/Saranac Lake, USA) zur Verfügung gestellt, indem die bereits isolierten Zellen uns als Zell-Pellet auf Trockeneis zugestellt wurden. Das nachstehende, nach Informationen von *Dr. Lund* erstellte Kurzprotokoll zur Isolierung der Zellen soll daher nur dem Verständnis dienen, um welche Zellen es sich handelte.

Je 5 ca. 8 Wochen alte männliche Wildtyp- und CD38 (-/-)-Mäuse des Stamms B6 wurden getötet und die Milzen entnommen. Die Milzen wurden mechanisch mit einem Glasstab zerkleinert und das Homogenat zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension gefiltert. Rote Blutkörperchen wurden durch Lyse depletiert, die anderen Zellen aus der Lösung abzentrifugiert und in 1 ml Serum/Milz aufgenommen. Fc-Rezeptoren auf Zellen der Suspension wurden dann durch Behandlung mit anti-CD16/CD32-Antikörper (Klon 24G2/*Pharming*) blockiert (Inkubation der Zellen mit 30 µg Antikörper/5 Milzen für 15 Minuten auf Eis). Dieser Schritt dient als Vorbereitung für den nächsten Schritt der positiven Selektion von T-Zellen und soll die Kontamination mit Fc-Rezeptoren tragenden Zellen minimieren. Insbesondere B-Zellen und Makrophagen weisen eine hohe Expression dieser Rezeptoren auf. Anschließend wurden T-Zellen durch Zusatz von kovalent an magnetische Beads gekoppelte anti-CD4/anti-CD8-Antikörper markiert (Inkubation mit den Beads für 15 Minuten auf Eis). Der Überschuss an Bead-gekoppelten Antikörpern wurde durch Waschen entfernt und die Zellsuspension dann auf eine mit Stahlwolle gefüllte Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befand (MACS-Apparatur; MACS: magnetic activated cell sorting), aufgetragen. Mit den magnetischen Beads beladene Zellen werden in der Säule zurückgehalten, wohingegen unbeladene Zellen durchlaufen. Nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld können zurückgehaltene Zellen eluiert werden. Der Reinheitsgrad der T-Zellen nach diesem Schritt beträgt in der Regel ca. 95%. Die eluierten Zellen wurden gewaschen und zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ Lymphozyten/ml in Kulturmedium aufgenommen. Die Ausbeute an gereinigten T-Lymphozyten je 5 Milzen belief sich auf $7 \cdot 10^7$ Zellen der Wildtyp-Mäuse und $8 \cdot 10^7$ Zellen der CD38 (-/-)-Mäuse.

Da für die geplante subzelluläre Fraktionierung der Zellen (siehe weiter unten) jeweils ca 10^9 Zellen beider Typen benötigt wurden, eine Zellzahl dieser Höhe unter vertretbaren Voraussetzungen aus Mäusen jedoch nicht direkt gewonnen werden kann, wurden die isolierten Zellen in Kultur expandiert. Dazu wurden die Lymphozyten in Gegenwart von IL-2 (Endkonzentration 100 U/ml) zunächst für 48 Stunden bei 37 °C in anti-CD3-beschichteten

Flaschen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in unbeschichtete Flaschen überführt und in Gegenwart von IL-2 (Enkonzentration s.o.) bis zum Erreichen der erwünschten Zellzahl ($1 \cdot 10^9$ Zellen, erreicht in beiden Fällen an Tag 5) weiter kultiviert. Die Zellen (Tag 5 Effektorzellen) wurden schließlich in PBS gewaschen, abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und als gefrorene Zellpellets nach Hamburg zugestellt. Ein zuvor entnommenes Aliquot beider Zellpopulationen wurde durch FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorter) charakterisiert. Dabei stellten sich sowohl die Zellen der Wildtyp-Mäuse, als auch die Zellen der CD38 (-/-)-Mäuse als aktivierte (Zunahme an Größe und Granularität) und proliferierende T-Lymphoblasten dar. Ca. 20% (18,2%) der aus den Milzen von Wildtyp-Mäusen isolierten T-Zellen waren CD38 positiv. Dagegen war CD38 auf den aus den Milzen der CD38 (-/-)-Mäuse isolierten T-Zellen (2% positive Zellen) deutlich weniger stark vertreten (Abb. 3.1 A-D).

3.2.3 Subzelluläre Fraktionierung von Zellen

Je Präparation wurden ca. $1 \cdot 10^9$ Lymphozyten geerntet, 2x in Calcium-Messpuffer gewaschen ($500 \cdot g$, 5 Min., RT, Heraeus-Zentrifuge) und anschließend zu einem Endvolumen von 10 ml in diesem Puffer resuspendiert. Zur Temperaturadaptation wurden die Zellen dann für 20 Min. bei $37^\circ C$ im Wasserbad inkubiert. Wenn keine Stimulation der Zellen erfolgte (Inkubation der Zellen mit OKT3 $10 \mu g/ml$ für 10 Min. bei $37^\circ C$ im Wasserbad unter gelegentlichem Schwenken) wurde von extrazellulärem Calcium abhängige Signaltransduktion im Anschluß an die Ruhephase der Zellen direkt durch Zusatz von EGTA/Tris ($1,5/142 \text{ mM}$; pH 7,4; entsprechend $50 \mu l$ der Stammlösung je 5 ml Zellansatz) gestoppt. Die Zellen wurden auf Eis gestellt, mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) versetzt und in einem Potter-Elvehjem Homogenisator mechanisch aufgeschlossen (1500 U/Min. , 30 Zyklen). Alle weiteren Aufarbeitungsschritte wurden bei $4^\circ C$ durchgeführt. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden abzentrifugiert ($500 \cdot g$, 5 Min.) und die Überstände erneut für 10 Min. bei $2000 \cdot g$ zentrifugiert (Abtrennung von Zellkernen und restlichen Zelltrümmern). Die vorgereinigten Überstände wurden dann einer Zweischritt-Ultrazentrifugation zunächst bei $10.000 \cdot g$ für 30 Min. und danach bei $100.000 \cdot g$ für 90 Min. unterzogen, um die schwere (P10) und die leichte Membranfraktion (P100) der Zellen zu erhalten. Der nach dem zweiten Schritt erhaltene $100.000 \cdot g$ -Überstand wurde als cytosolische Fraktion (S100) betrachtet. Die $2000 \cdot g$ -Pellets, sowie die P10- und P100-Membranen wurden jeweils in $1000 \mu l$ Lysispuffer, versetzt mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250), je $5 \cdot 10^8$ aufgearbeiteter Zellen resuspendiert.

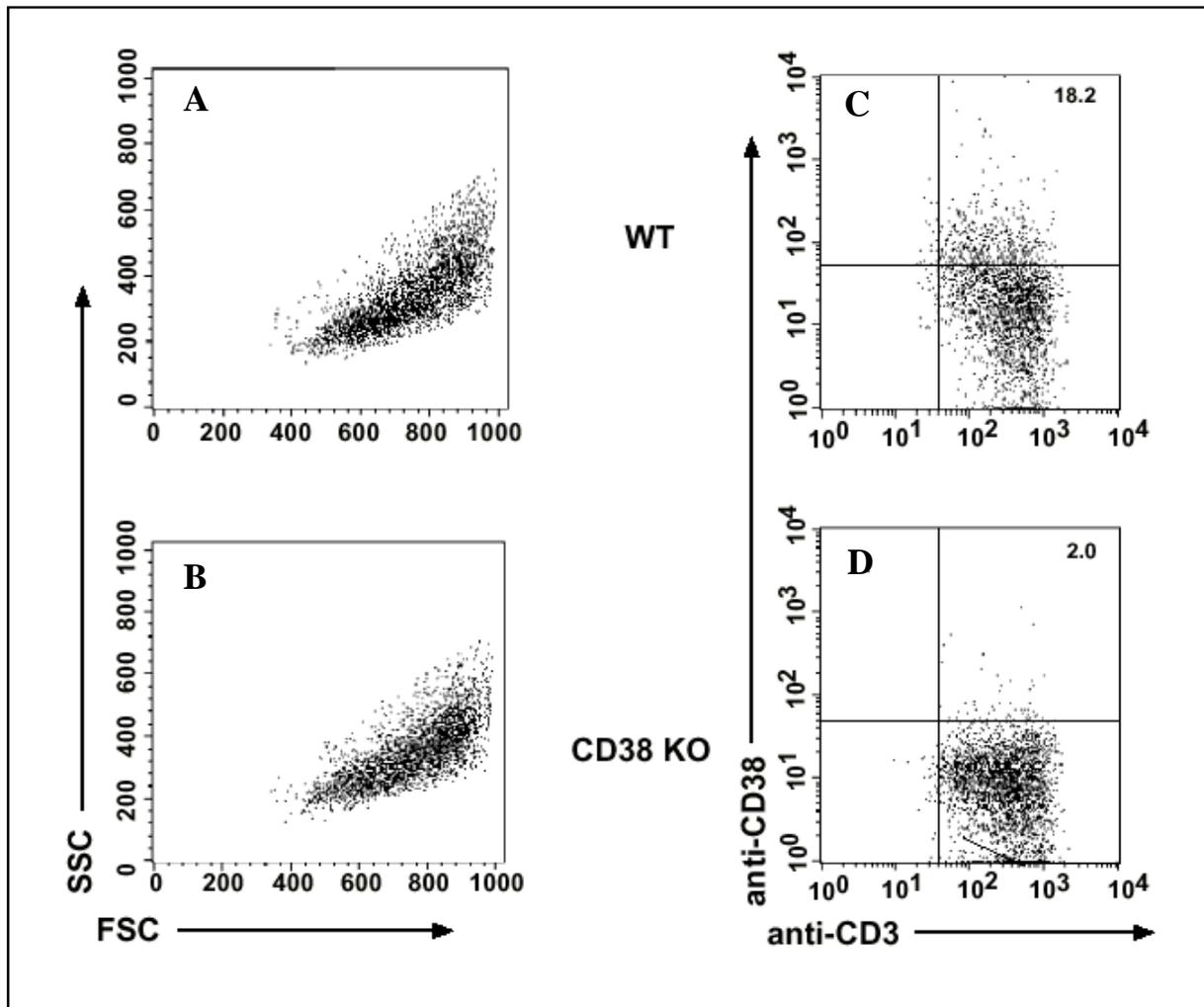


Abb. 3.1: Charakterisierung von aus Milzen von Wildtyp-, bzw. CD38-Knockout-Mäusen gewonnenen Tag 5 T-Effektorzellen durch FACS-Analyse. Entsprechend der Beschreibung im Text wurden aus Milzen von Wildtyp(wt)-, bzw. CD38 (-/-)-Mäusen gewonnene T-Lymphozyten, die in Kultur unter Stimulation mit anti-CD3 mAK und IL-2 zu Lymphoblasten differenziert und über 5 Tage expandiert worden waren, durch FACS-Analyse charakterisiert. Auf der linken Seite der Abbildung (A, B) ist die Untersuchung von wt- (A) und CD38 (-/-)-T-Lymphozyten (B) auf Zellgröße (Forward Scatter, FSC) und Granularität (Side Scatter, SSC) dargestellt. Anhand dieser Merkmale stellten sich die Lymphozyten als aktivierte, zu Effektorzellen differenzierte Lymphoblasten (Zunahme der Granularität und Zellgröße im Vergleich zu ruhenden T-Lymphozyten) dar. Im rechten Teil der Abbildung (C, D) ist das Ergebnis der Analyse der in Zellkultur expandierten wt- (C) und CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten (D) auf die Oberflächenexpression von CD3 (Teil des für T-Zellen charakteristischen TCR/CD3-Komplexes) und des Ektoenzym CD38 gezeigt. Während ein Teil (18,2%) der wt-T-Lymphoblasten CD38 an der Zelloberfläche exprimierten, war dieses Protein an der Oberfläche von CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten kaum (2% positive Zellen) nachweisbar. Anhand der Expression des CD3-Komplexes stellten sich jedoch alle Zellen (wt und CD38 (-/-)-Zellen) als T-Lymphozyten dar. Anmerkung: Die relativ geringe (ca. 20% positive Zellen) und schwache Expression von CD38 ist für aus der Milz gesunder Mäuse isolierte T-Lymphozyten charakteristisch, auch, wenn sie wie hier geschehen, *in vitro* mit anti-CD3 und IL-2 stimuliert wurden. *In vivo* kommt es beispielsweise im Rahmen von Infekten zu einer gesteigerten Expression von CD38. Die Stimuli, die *in vivo* für eine Steigerung der Expression von CD38 verantwortlich sind/benötigt werden, sind jedoch noch nicht bekannt. Werden Lymphozyten der Maus aus Infektionsherden isoliert, sind ca. 50% der CD4⁺ T-Lymphozyten und ca. 70% der CD8⁺ T-Lymphozyten für CD38 positiv und zeigen eine starke Expression des Ektoenzym. Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. F. Lund (Saranac Lake/USA) zur Verfügung gestellt.

Der Proteingehalt wurde ermittelt und die Fraktionen dann, bei nicht direkter Weiterverarbeitung, in Aliquots bei -70 °C eingefroren. Die S100-Fraktion wurde vor dem Einfrieren entsalzt und nach Bedarf umgepuffert (s.u.).

Um basische, cytosolische Proteine von den (negativ geladenen) Membranen abzulösen, wurden die P10- und die P100-Membranen einiger Präparationen vor der Aufnahme in Lysispuffer (s.o.) in alkalischem, salzhaltigem Puffer (150 mM Tris-Cl pH 8,0 mit 500 mM KCl; Membranwaschpuffer) resuspendiert und dann erneut bei $100.000\cdot g$ in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Bei diesem Schritt wurden die gewaschenen Membranfraktionen P10 und P100 und die korrespondierenden Waschfraktionen PS10 und PS100 erhalten (Übersicht, Abb. 3.2). Letztere wurden wie die S100-Fraktion vor der weiteren Verwendung (z. B. in Enzymassays) entsalzt und währenddessen nach Bedarf umgepuffert.

3.2.4 Entsalzung und/oder Umpufferung der S100-Fraktion über Sephadex G-25 superfine HiTrap-Säulen

Um niedermolekulare Bestandteile, insbesondere zelluläre Nukleotide, die durch Kompetition bei der Bestimmung der ADPRC-Aktivität in den S100-Fraktionen stören könnten, zu entfernen, wurden diese Fraktionen standardmäßig einer Entsalzung mit oder ohne Umpufferung unterzogen. Hierfür wurden Sephadex G-25 HiTrap-Säulen mit einem Bettvolumen von 5 ml verwendet, die nach Angaben des Herstellers für die spezifische Trennung von Proteinen und Peptiden mit einem Molekulargewicht (MW) $> 5\text{ kDa}$ von Molekülen mit einem MW $< 1\text{ kDa}$ (Ausschlußgrenze 5 kDa) geeignet sind.

Zunächst wurde die Säulenmatrix mit mindestens 3 Säulenvolumina (SV) entsprechend 15 ml des Zielpuffers äquilibriert. Ein Probenvolumen von bis zu 1,5 ml (bei geringerem Probenvolumen wurde die Probe mit dem Zielpuffer auf 1,5 ml ergänzt) wurde mit einer maximalen Flußrate von 5 ml/Min. auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurden Proteine in einem Volumen von 2 ml des Zielpuffers eluiert. Das Eluat wurde mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) versetzt. Der Proteingehalt des Eluates wurde ermittelt und das Eluat dann, sofern es nicht direkt weiterverwendet wurde, in Aliquots bei -70 °C eingefroren. Eine Entsalzung von Extrakten wurde in der Regel unter Verwendung vorgekühlter Puffer bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt.

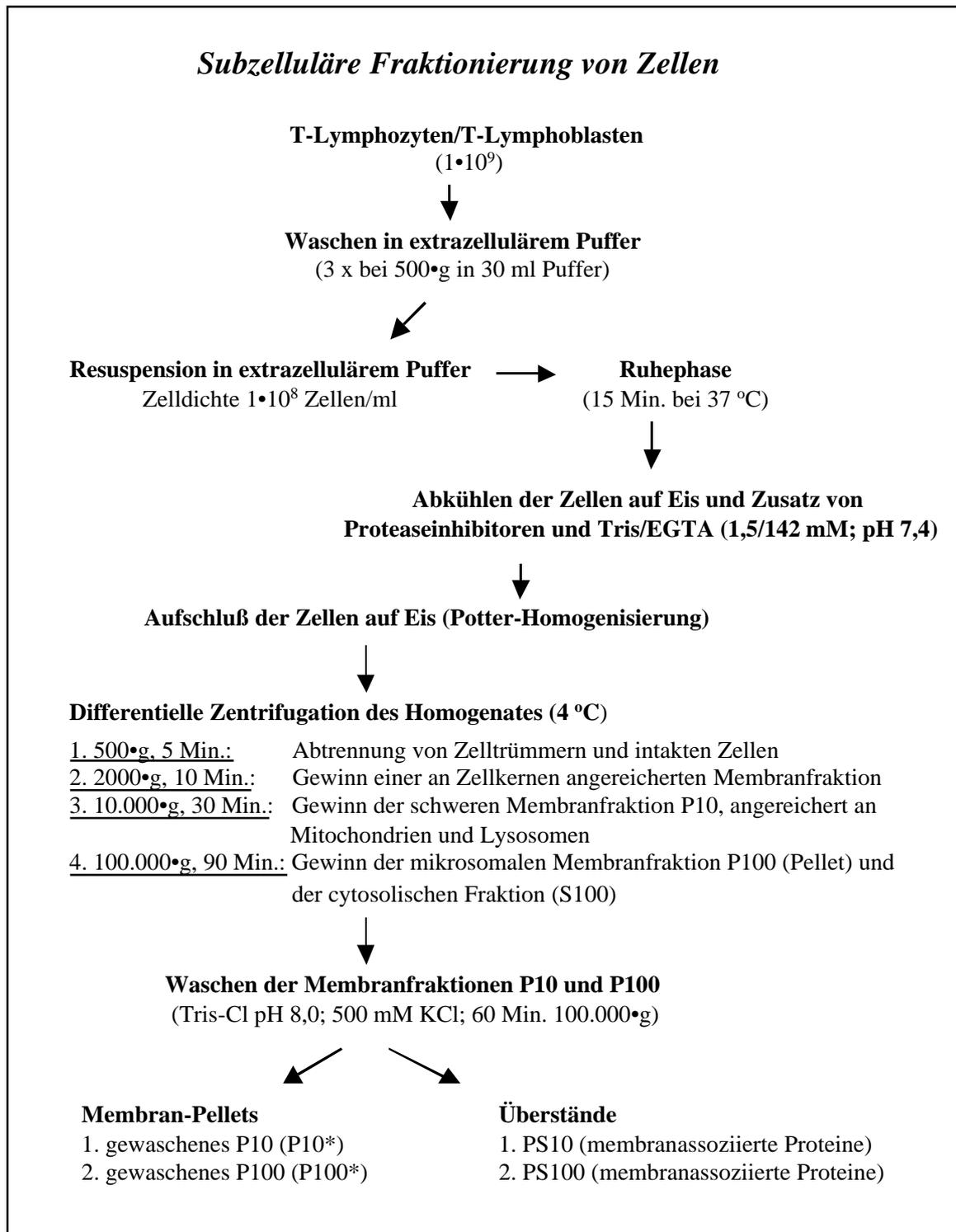


Abb. 3.2: Übersichtsabbildung zur subzellulären Fraktionierung von T-Lymphozyten. Detaillierte Methodenbeschreibung der subzellulären Fraktionierung, siehe Text (Abschnitt 3.2.3).

3.2.5 Proteingehaltsbestimmung nach der Bradford-Methode in subzellulären Fraktionen

Die Fraktionen wurden in den Verdünnungen 1:3, 1:10 und 1:20 in Aqua bidest., bei sehr verdünnten Protein-Fraktionen auch unverdünnt für die Bestimmung eingesetzt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V) in den Endkonzentrationen 0,125-1,25 mg/ml in Aqua bidest. verwendet. Zur Durchführung des Assays wurden je 5 µl der Verdünnung der Probe oder des Standards in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit flachem Boden vorgelegt und nach Zusatz von 250 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, 1:5 in Aqua bidest. verdünnt) 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 585 nm in einem Elisa-Mikrophotometer gemessen. Von jeder Probenverdünnung und jedem Standardwert wurde parallel eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.2.6 HPLC-Enzymassay auf ADPRC-Aktivität unter Verwendung des Substrates β -NAD und UV-Detektion zum Nachweis der Nukleotide

3.2.6.1 Vorbereitung von Proben für den HPLC-Enzymassay

Die aus unstimulierten oder für 10 Min. mit OKT3 (10 µg/ml) stimulierten JMP T-Lymphozyten gewonnene cytosolische Fraktion S100 wurde in intrazellulärem Puffer (2 mg/ml Protein, 300 µl Volumen) aufgenommen und 5 min. bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde das Substrat β -NAD (1mM) zugesetzt und die Proben bei 37 °C unter leichtem Schwenken für 0-20 Min. weiterinkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zusatz von 300 µl eisgekühlter 3M Perchlorsäure (PCA) zur Fällung des Proteins gestoppt. Zur Extraktion der Nukleotide wurden die Proben dann für 30 Min. in einem Eis-Salzbad (ca. -4 °C) inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate durch Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 10 Min., Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K) sedimentiert. Die Überstände mit den löslichen Nukleotiden wurden abgenommen und zur Entfernung der PCA bei 4 °C mit 7M KOH auf einen pH-Wert zwischen 7 und 8 titriert. Nach einer weiteren Inkubation von 30 Min. im Eis-Salzbad wurden die Proben erneut zentrifugiert (s.o.). Die Überstände wurden abgenommen, für mindestens 2 Stunden bei -70 °C eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden direkt durch HPLC analysiert oder ebenfalls bei -70 °C gelagert. Für die HPLC-Analyse wurden die Lyophilisate in Reversed-Phase Puffer A resuspendiert und vor der Injektion auf die Säule durch Filter mit 0,2 µm Porenweite filtriert. Zur Bestimmung der Ausbeute von cADPR nach der Probenaufarbeitung wurden einzelne Proben direkt nach Zusatz der PCA mit 1 nMol

Standard-cADPR versetzt und dann entsprechend den anderen Proben aufgearbeitet. Alle Ergebnisse einer Meßreihe wurden für die ermittelte Ausbeute korrigiert. Diese lag in der Regel zwischen 30 und 50%.

3.2.6.2 HPLC-Analyse

Die HPLC-Analyse wurde in Anlehnung an ein etabliertes Zweischritt-Meßsystem [da Silva et al. 1998a] durchgeführt. Dabei wurde für die Enzymassays auf den ersten Analyseschritt an einer Ionenaustauschermatrix (PRPX-100) verzichtet und nur der zweite Schritt der Reversed-Phase-Ionenpaar-HPLC (RP-HPLC) durchgeführt. Gearbeitet wurde mit einem HPLC-System von *Kontron Instruments* mit integriertem Autosampler zur automatischen Probeninjektion. Für die im Ergebnisteil gezeigten Analysen wurde eine Hypersil® Reversed-Phase BDS C18 HPLC-Säule (3 µm-Partikel; 5•4,6 mm I.D.) verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/Min. in einem Gradienten mit steigendem Methanolgehalt. Der Gradient [% RP-Puffer B] verlief wie folgt: 0 Min., 15%; 4 Min., 20%; 4,5 Min., 75%; 7,5 Min., 75%; 8 Min., 15%; 15 Min., 15%. Die Detektion der Nukleotide erfolgte über einen UV-Detektor bei einer Absorption von 270 nm. Zur Integration von Peakflächen wurde das MT2-Datenverarbeitungssystem von *Kontron Instruments* genutzt. Eine an jedem Versuchstag durchgeführte Analyse von Standard-cADPR ermöglichte eine Quantifizierung der in den Proben gebildeten Stoffmengen. RP-Puffer B enthielt 50% (v/v) Methanol.

3.2.7 Fluorimetrische Assays auf ADPRC- und NADGH-Aktivität

3.2.7.1 Kontinuierlicher ε-NAD Enzymassay (NADase-Assay)

A) Basisprotokoll

Proteinextrakte (subzelluläre Fraktionen aus Jurkat T-Lymphozyten oder Maus T-Lymphoblasten), eine rekombinante, lösliche Form des humanen CD38 (hCD38 rec), die ADPRC aus *A. californica* oder intakte Jurkat T-Lymphozyten wurden zu der gewünschten Endkonzentration, bzw. einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in intrazellulärem Puffer (1 ml Volumen) aufgenommen und bei RT unter Rühren bei einer Exzitationswellenlänge (λ_{Ex}) von 300 nm und einer Emissionswellenlänge (λ_{Em}) von 410 nm unter Rühren am Fluorimeter vermessen. Nach einem Vorlauf von 100 Sek., während dessen die basale Fluoreszenz aufgezeichnet wurde, wurde ε-NAD (100 µM) als Substrat zugesetzt und die Messung für 1900 Sek. unter Aufzeichnung der Fluoreszenz fortgesetzt. Nach Ablauf der fluorimetrischen Messung wurde die enzymatische Reaktion gestoppt, indem die Küvetteninhalte in ein Eis- (ca. 0 °C) oder ein Eis-Salzbad (ca. -5 °C) gestellt wurden. Zur Abtrennung des Proteins und

zur Vorbereitung einer nachfolgenden RP-HPLC-Analyse der aus dem Substrat entstandenen Produkte wurden die Proben in der Regel sofort über eine Centrex UF-2 Filtrationseinheit mit 10 kDa MWCO zentrifugiert/ultrafiltriert (exakt 30 Min., 4 °C, 3000•g, Heraeus-Zentrifuge). Die lange Zentrifugationsdauer war für eine effektive Ultrafiltration der subzellulären Rohfraktionen, die in relativ hoher Proteinkonzentration eingesetzt wurden, notwendig. Im Falle der Vermessung gereinigter Proteine (beispielsweise der ADPRC aus *A. californica*, die in erheblich niedrigerer Proteinkonzentration von maximal 1 µg/ml vermessen wurde) wäre prinzipiell eine Verkürzung des Zentrifugationsschrittes auf ca. 10 Min. möglich. Aliquots (170 µl) der die löslichen Nukleotide enthaltenden Ultrafiltrate wurden bis zur HPLC-Analyse bei – 70 °C gelagert. Im Falle der Vermessung intakter Zellen oder der P10-Fraktion wurden die Zellen, bzw. partikuläre Bestandteile der Membranfraktion, vor der Ultrafiltration durch Zentrifugation abgetrennt (12.000 rpm, 4 °C, 2 Min., Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K). Dieser Schritt erhöhte die Volumenausbeute nach der Ultrafiltration und verminderte das Risiko des Verstopfens der Ultrafiltrationsmembranen. Die Ausbeute an Volumen nach der Ultrafiltration lag in der Regel zwischen 680 und 850 µl.

B) Protokoll zur Evaluierung potentieller Inhibitoren der ADPRC- und/oder NADGH-Aktivität

Für Experimente zur Inhibition der ADPRC-/NADGH-Aktivität wurden in Calcium-Messpuffer (pH 7,4) aufgenommene intakte Zellen oder in intrazellulärem Puffer (pH 7,2) suspendierte Enzympräparationen (Assayvolumen jeweils 1 ml) für 30 Min. entweder bei alkalischem pH (pH 8,5) oder bei physiologischem pH (pH 7,4 oder pH 7,2) in Gegenwart von DTT (1 mM oder 10 mM) oder bei physiologischem pH in Gegenwart von araF-NAD (30 Min., 200 nM oder 60 Min., 500 nM) vorinkubiert, bevor der fluorimetrische Assay unter Fortbestehen der inhibitorischen Bedingungen durchgeführt wurde.

Als weitere Inhibitoren wurden Derivate von NHD (NHD selbst, 8-Br-NHD, 6-Thio-NHD und 7-Deaza-NHD), Nicotinamid (Nic.), Isonicotinamid (Iso-Nic.), β-Nicotinamid-Mononukleotid (β-NMN), cADPR, ADPR und ATP sowie 3-Aminobenzamid (3-ABA) und 1,5-Isoquinolindiol, als zwei bekannte Inhibitoren der Poly-ADP-Ribosyltransferase (PARP) und Ap₂A, Ip₂I und Benzamid-AMP (Bp₂A), als publizierte Inhibitoren der ADPRC aus *A. californica* [Migaud *et al.* 1999], an subzellulären Enzympräparationen, nicht jedoch an intakten Zellen getestet. Diese Inhibitoren wurden den Ansätzen von Enzympräparationen jeweils ohne Vorinkubation, direkt vor der Durchführung eines fluorimetrisch aufgezeichneten oder unter den gleichen Bedingungen „blind“ durchgeführten ε-NAD-

Enzymassays in Endkonzentrationen zwischen 1 μM und 1 mM, wie jeweils in den Abbildungslegenden im Ergebnisteil angegeben, zugesetzt. Nach Ablauf des Enzymassays wurden die Ansätze wie im Basisprotokoll beschrieben, für die Analyse durch RP-HPLC vorbereitet.

Die Wahl der Geräteeinstellung zur Durchführung der Messungen waren wie folgt:

λ_{Ex} : 300 nm, λ_{Em} : 410 nm, Spaltbreite (Ex, Em) 5 nm, Response Level: 8 Sek., PMT Voltage: 700 V, Gain: autoselect, Messzeit: 2000 Sek., Skala der Y-Achse (variabel): Grundeinstellung 500-3000 [Skt.]

3.2.7.2 Fluorimetrischer Enzymassay auf ADPRC-/NADGH-Aktivität im Photometriemodus

Dieser Assay wurde vorzugsweise eingesetzt, um bei Versuchen zur chromatographischen Aufreinigung von ADPRCs/NADGHs gesammelte Fraktionen auf ADPRC-/NADGH-Aktivität durchzumustern. Die Gesamtfaktionen oder Aliquots aller Fraktionen einer chromatographischen Trennung, wie jeweils den Abbildungslegenden zu entnehmen, wurden auf Eis zu einem Endvolumen von 1000 μl in vorgekühltem intrazellulärem Puffer (pH 7,2) aufgenommen und parallel mit einem der Substrate NGD oder ϵ -NAD (50 μM) versetzt. Die Ansätze wurden kurz geschüttelt und dann für 60 Min. bei RT unter kontinuierlichem Schütteln (Stufe 11-12) auf einem Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze wieder auf Eis gestellt und sofort nacheinander im Photometriemodus am Fluorimeter vermessen (Endpunktmessung). Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden ausgedruckt und anhand dieser Werte der Verlauf der Enzymaktivität parallel zu dem für die Trennung eingesetzten Gradienten in einem Graphen dargestellt. Für diesen Assay wurde meist NGD als Substrat verwendet, da es im Vergleich zum Substrat ϵ -NAD eine erheblich geringere Hintergrundfluoreszenz (Eigenfluoreszenz) aufwies.

Die Geräteeinstellungen für diese Messungen wurden wie folgt gewählt:

A) Test Setup

λ_{Ex} : 300 nm, λ_{Em} : 410 nm, Wellenlänge: 1, Anzahl der Messungen: 1, Initialverzögerung: 3 Sek., Integrationszeit: 10 Sek.

B) Voreinstellungen des Gerätes

Response Level: 8 Sek., Spaltbreite (Ex, Em): meist 5 nm (ϵ -NAD) oder 10 nm (NGD), PM-Voltage: 700 V, Druckfunktion: an

3.2.7.3 GDP-Ribosylcyclase(GDPRC)-Assay mit intakten Zellen am Fluorimeter

Die Durchführung dieser Messungen folgte im Wesentlichen nach einem etabliertem Protokoll [Bertheliet *et al.* 1998]. Die meisten dieser Versuche, mit Ausnahme einiger Experimente mit dem Inhibitor araF-NAD, wurden im Labor von Prof. P. Deterre (Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrier/Paris, Frankreich) durchgeführt und mir freundlicherweise als Ergebnisse zur Verfügung gestellt.

A) Basisprotokoll

JMP T-Lymphozyten ($1 \cdot 10^7$ Zellen je Messreihe) wurden abzentrifugiert (450•g, RT, 5 Min., Heraeus-Zentrifuge), 2x in je 5 ml auf 37 °C vorgewärmtem Calcium-Messpuffer gewaschen (s.o.) und anschließend in 2 ml des Puffers resuspendiert (Zelldichte $5 \cdot 10^6$ /ml). Nach einer Ruhephase von 15 Min. bei 37 °C im Wasserbad wurde die Zellsuspension mit dem Substratanalogon NGD (50 µM) versetzt und die Inkubation der Zellen bei 37 °C im Wasserbad unter gelegentlichem Schwenken fortgesetzt. Zur Erstellung einer Eichreihe für den Substratumsatz der Oberflächen-ADPRC/GDPRC unbehandelter Zellen wurde direkt nach dem Zusatz von NGD (Nullwert), sowie nach 15, 30 und 60 Min. Inkubation jeweils ein Aliquot von 300 µl aus der Zellsuspension entnommen und zur Abtrennung der Zellen für 1 Min. bei RT und 40% in der Hettich-Zentrifuge (Mikro Rapid/K) zentrifugiert. Ein Aliquot von jeweils 200 µl des Zellüberstandes wurde dann in eine vorbereitete Quarzküvette mit 800 µl Calcium-Messpuffer pipettiert und sofort unter Rühren bei RT am Fluorimeter vermessen. Dabei entsprach jedes 200 µl-Aliquot einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Lymphozyten und einer maximalen Substratmenge von 10 nMol NGD (Zeitpunkt 0). Für die Messung wurde zunächst die Basislinie der Fluoreszenzemission bei 410 nm für 100 Sek. aufgezeichnet. Nach 100 Sek. Vorlauf wurde dann die ADPRC aus *A. californica* (Endkonzentration 1 µg/ml) zugesetzt, um noch vorhandenes NGD vollständig zu cGDPR umzusetzen und so den Maximalwert der Fluoreszenz bei komplettem Substratumsatz zu erhalten. Die Messungen wurden gestoppt, sobald das Plateau des Umsatzes durch die ADPRC aus *A. californica* erreicht und für ca. 100 Sek. aufgezeichnet worden war (Gesamtdauer der Messungen ca. 300 Sek.). Um Messfehler zu vermeiden, wurden alle Messungen einer Messreihe in derselben Quarzküvette durchgeführt. Zusätzlich zum Nullwert (s.o.) wurde auf gleiche Weise eine Kontrollmessung ohne Zellüberstand durchgeführt, indem 200 µl einer NGD-Lösung (50 µM) in Calcium-Messpuffer zu in der Küvette vorgelegten 800 µl Calcium-Messpuffer (entsprechend einer resultierenden Endkonzentration von 10 µM NGD) zugesetzt wurden. Anhand der für die einzelnen Messwerte der Eichreihe erhaltenen numerischen Differenz zwischen Basal-

fluoreszenz und konstanter maximaler Fluoreszenz nach komplettem Substratumsatz durch die ADPRC aus *A. californica* wurde eine Kinetik/Eichreihe für den Substratumsatz durch die Oberflächen-ADPRC/GDPRC der Zellen berechnet. Durch den enzymatischen Umsatz des kaum fluoreszenten NGD zum fluoreszenten cyclischen Produkt cGDPR durch das Ektoenzym der Zellen stieg die Basislinie mit zunehmender Inkubationszeit der Zellen mit dem Substrat NGD charakteristischerweise an. Die Eichung erfolgte ausgehend von der maximalen Differenz zwischen Basislinie (Nullwert) und maximaler Fluoreszenz, die einer Stoffmenge 10 nMol cGDPR entsprach. Das Prinzip des Assays ist in Abb. 3.3 zusammenfassend dargestellt.

Die Wahl der Einstellungen am Fluorimeter war wie folgt:

λ_{Ex} : 300 nm, λ_{Em} : 410 nm, Spaltbreite (Ex, Em): 10 nm, Response Level: 8 Sek., PM-Voltage: 700 V, Gain: autoselect, Skala der Y-Achse: 0-400 [Skt.], Laufzeit: 500 Sek

B) Protokoll zur Validierung von Inhibitoren der ADPRC-/GDPRC-Aktivität

Zur Untersuchung der Wirkung potentieller ADPRC/GDPRC-Inhibitoren wurden Aliquots der gleichen Zellsuspension parallel zu unbehandelten Kontrollzellen bei 37 °C mit der jeweiligen Testsubstanz vorinkubiert. Nach Ablauf der Vorinkubation wurde das Substrat NGD (50 μM) zugesetzt. Nach definierten Zeitpunkten, vorzugsweise späteren (30 oder 60 Min. Inkubation), wurden dann, wie im Basisprotokoll beschrieben, Aliquots aus der Zellsuspension entnommen, am Fluorimeter vermessen und die verbliebene Aktivität der Oberflächen-ADPRC/GDPRC der Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen berechnet (Abb.3.3).

3.2.8 HPLC- ϵ -NAD-Enzymassay mit Fluoreszenzdetektion

3.2.8.1 Reversed-Phase-Ionenpaar-HPLC mit Fluoreszenzdetektion

Ansätze subzellulärer Fraktionen oder intakter Zellen wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.1 mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μM) am Fluorimeter vermessen oder über einen entsprechenden Zeitraum (2000 Sek.) bei RT unter Schütteln (Stufe 11-12) auf einem Eppendorf-Thermomixer mit dem Substrat inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde dann auf Eis (ca. 0 °C) oder in einem Eis-Salzbad (ca. -5 °C) gestoppt und die Proben schließlich wie in 3.2.7.1 beschrieben, für die HPLC vorbereitet. Eine quantitative Produktanalyse der Proben in injizierten Aliquots (100 μl) der Ultrafiltrate erfolgte, wie publiziert [Schweitzer *et al.* 2001], durch Reversed-Phase-Ionenpaar-HPLC (RP-HPLC) mit Fluoreszenzdetektion.

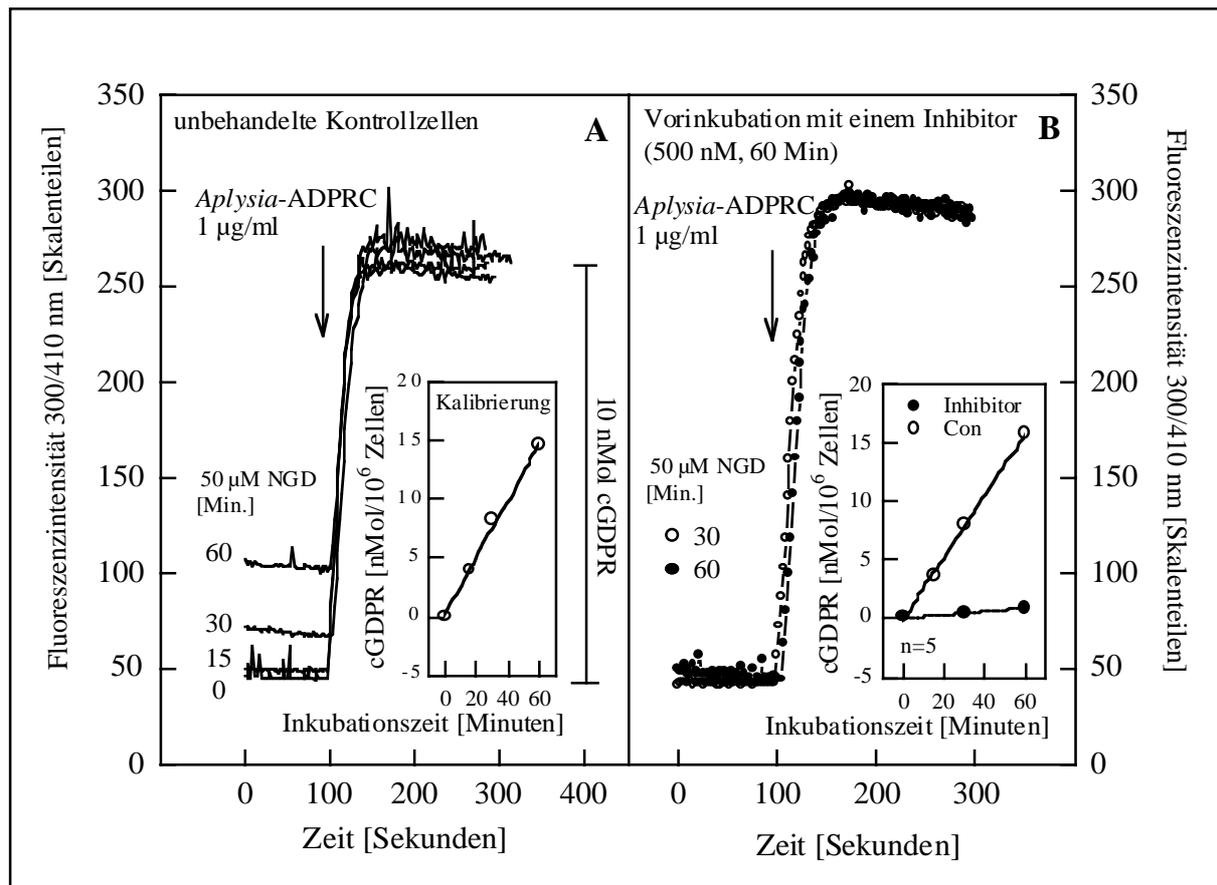


Abb. 3.3: Fluorimetrischer GDPRC-Assay mit intakten Zellen. In Calcium-Messpuffer suspendierte Jurkat T-Lymphozyten ($5 \cdot 10^6/\text{ml}$) wurden, wie im Text beschrieben, mit dem Substrat NGD ($50 \mu\text{M}$) versetzt und unter Schwenken bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um eine Eichgerade für den Substratumsatz an der Zelloberfläche un behandelter Kontrollzellen (A) zu erstellen, wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots des Ansatzes ($300 \mu\text{l}$) entnommen, die Zellen abzentrifugiert und $200 \mu\text{l}$ der Zellüberstände mit $800 \mu\text{l}$ Calcium-Messpuffer versetzt. Anschließend wurden die Ansätze sofort fluorimetrisch bei RT vermessen ($\lambda_{\text{Ex}}=300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=410 \text{ nm}$). Nach einem Vorlauf von 100 Sek., der zur Aufzeichnung der basalen Fluoreszenz diente, wurde die ADPRC aus *A. californica* ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt, um einen vollständigen Umsatz des noch in den Ansätzen verbliebenen Substrates zu erreichen, und die Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes abgewartet (ca. 200 Sek.). Anhand der für die einzelnen Messungen (Zeitpunkte der Inkubation der Zellen mit Substrat) ermittelten numerischen Differenzen der Basalfluoreszenz zum Zeitpunkt t, verglichen mit dem Zeitpunkt 0, jeweils in Relation zur Gesamtfluoreszenz nach vollständigem Substratumsatz (max. $10 \text{ nMol}/200 \mu\text{l}$) durch die *Aplysia*-ADPRC, wurde eine Eichreihe/Kinetik für den Substratumsatz der Zellen/Zeit erstellt. Zur Untersuchung der Wirkung potentieller Inhibitoren auf die ADPRC-/GDPRC-Aktivität (B), wurden Zellen der gleichen Ausgangssuspension parallel zu unbehandelten Kontrollzellen bei 37°C mit der Testsubstanz vorinkubiert. Nach Waschen der Zellen wurde dann das Substrat zugesetzt und die mit der Testsubstanz vorinkubierte Zellsuspension wie in A) für die Kontrollzellen beschrieben, bei RT vermessen. Anhand des Vergleichs der Steigung der Kinetik von mit der Testsubstanz vorbehandelten Zellen mit der von unbehandelten Kontrollzellen war dann die Wirkung der Testsubstanz feststellbar. In dem dargestellten Experiment (B) wurde als Inhibitor araF-NAD (500 nM , Vorinkubation 1 Stunde) verwendet.

Dabei wurde mit dem HPLC-System von *Kontron Instruments/Neufahrn* mit integriertem Autosampler zur automatischen Probeninjektion gearbeitet. Für die Trennung (Flußrate $1 \text{ ml}/\text{Min.}$) wurde eine Hypersil[®] BDS C18-Säule ($5 \mu\text{m}$ -Partikel, $250 \cdot 4,6 \text{ mm I.D.}$), ergänzt durch eine mit demselben Säulenmaterial gefüllte Vorsäule ($17 \cdot 4,6 \text{ mm I.D.}$), verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 74% RP-Puffer A und 26% RP-Puffer B äquilibriert und

anschließend folgender Gradient [% B] für die Auftrennung der Proben bei steigendem Methanolgehalt (13-25% v/v) verwendet: 0 Min., 26% ; 1,5 Min., 26% ; 3,5 Min., 30% ; 5,5 Min., 65% ; 6,5 Min., 65% ; 8 Min., 100% ; 16 Min., 100% ; 18 Min., 26% ; 27 Min., 26%. Zur Detektion der etheno-Adeninnukleotide wurden am Fluoreszenzdetektor folgende variable Einstellungen gewählt: λ_{Ex} , 300 nm; λ_{Em} , 410 nm; Response Level, 250 mSek.; PMT Gain, 10. Für die Integration der Peakflächen wurde das MT2 Datenverarbeitungssystem von *Kontron Instruments* benutzt. Als Standard zur Berechnung molarer Produktmengen unter Einbezug der ermittelten Ausbeute wurde, wie bereits etabliert [Klebl & Pette 1996], das käuflich erwerbliche ϵ -AMP verwendet.

3.2.8.2 Synthese von 1,N⁶-etheno-Adeninnukleotid-Standards für die HPLC

Zur Synthese des käuflich nicht erwerblichen cyclischen Nukleotides ϵ -cADPR wurde die ADPRC aus *A. californica* (1 $\mu\text{g/ml}$ in intrazellulärem Puffer pH 7,2) 5-10 Min. bei RT unter Schütteln (Stufe 11-12) mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μM) auf einem Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Zur Abtrennung des Enzyms wurde der Ansatz dann über einen Centrex UF-2-Konzentrator mit 10 kDa MWCO zentrifugiert (30 Min., 4 °C 3000•g, Heraeus-Zentrifuge). Aliquots des Ultrafiltrates (50 μl) wurden bei -70 °C gelagert und waren dort, bei Vermeidung wiederholter Auftau- und Gefrierzyklen, unbegrenzt stabil. Da durch HPLC-Analyse (UV- und Fluoreszenzdetektion) unter den beschriebenen Bedingungen ein vollständiger Umsatz des Substrates im Wesentlichen zu ϵ -cADPR und zu einem geringen Anteil zu ϵ -ADPR festgestellt wurde, lag die Konzentration dieses Standards, bei Vernachlässigung des entstandenen ϵ -ADPR, bei ca. 100 pMol ϵ -cADPR/ μl Ultrafiltrat. Durch Hitzebehandlung (2 Stunden, 80 °C) konnte ϵ -cADPR komplett zu dem ebenfalls käuflich nicht erwerblichen ϵ -ADPR umgesetzt werden. Zur Verifizierung seiner Identität konnte ϵ -ADPR durch Inkubation mit Nukleotid-Pyrophosphatase (PPase; 0.1 U/ml, 15 Min., 37 °C unter Schütteln) vollständig zu dem käuflich erwerblichen ϵ -AMP umgesetzt werden.

3.2.9 Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an Populationen intakter, mit Fura-2 beladener Zellen

3.2.9.1 Basisprotokoll

Die Beladung intakter Lymphozyten mit der membranpermeanten Form (Fura-2/AM) des nachfolgend durch Esterasen in der Zelle freigesetzten und dann aufgrund seiner Ladung in der Zelle gefangenen Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 [Thomas & Delaville 1991] sowie die Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden nach dem Protokoll von Treves *et al.* [1987] durchgeführt. Die Zellen ($1 \cdot 10^7$ Jurkat-Lymphozyten/ml Medium) wurden nach einer Vorinkubation für 5

Min. bei 37 °C für weitere 15 Min. in 1 ml komplettem RPMI 1640-Medium mit Fura-2/AM (Endkonzentration 1 µM) inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 1:5 mit dem Medium verdünnt und weitere 15 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (450•g, RT, 5 Min., Heraeus-Zentrifuge), 2x in 5 ml Calcium-Messpuffer gewaschen (s.o.), schließlich in 5 ml Calcium-Messpuffer resuspendiert und bis zur Vermessung bei RT im Dunkeln gelagert. Die $[Ca^{2+}]_i$ wurde ratiometrisch in Aliquots von 10^6 Zellen/ml an einem Fluorimeter bei abwechselnder Exzitation mit den Wellenlängen 340 und 380 nm (jeweils ± 10 nm) und einer Emissionswellenlänge von 495 ± 10 nm gemessen. Eine Stimulation der Zellen wurde wie folgt durchgeführt: Die Zellen wurden zunächst für 250 Sek. vorinkubiert, um die basale Fluoreszenz des Fura-2 Computer-gestützt aufzuzeichnen. Anschließend wurden die Zellen mit β -NAD (1 mM) oder OKT3 mAK (anti-CD3 mAK, 10 µg/ml) stimuliert und die Fluoreszenzentwicklung für weitere 750 Sek. verfolgt. Am Ende wurde jede Messung durch Zusatz zunächst von Ionomycin (2.6 µM), um die maximale Fluoreszenz des Ca^{2+} -gesättigten Fura-2 zu erhalten, und anschließend von Tris-EGTA (60/8 mM, pH 7,4), um die minimale Fluoreszenz des Fura-2 nach Calciumentzug zu erhalten, kalibriert. Die Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ nach einer vom Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Formel [Grynciewicz *et al.* 1985] erfolgte über das Computerprogramm *F-2000 Intracellular Calcium Measurement System* (Version 1.03).

3.2.9.2 Protokoll zur vorherigen Inhibition des Ektoenzym CD38 intakter Zellen

Die Inhibition von CD38 auf der Oberfläche intakter Zellen vor der fluorimetrischen Vermessung (s.o.) wurde entsprechend dem nachstehenden Protokoll durchgeführt: Die Zellen wurden bei 37 °C zunächst alternativ für 30 Min. alkalischem pH (Calcium-Messpuffer pH 8,5 in Gegenwart von 1 mM β -NAD) oder β -NAD (1 mM) und DTT (10 mM) bei neutralem pH oder nur der Substanz araF-NAD (200 oder 500 µM für 30 oder 60 Min.) bei neutralem pH ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen 2x in Calcium-Messpuffer (pH 7,4) gewaschen (s.o.), um den Überschuss an Inhibitoren und extrazelluläres β -NAD zu entfernen und wieder physiologische Bedingungen herzustellen. Im Anschluß an die jeweilige Vorbehandlung wurden die Zellen dann direkt für Stimulationsexperimente (s.o.) verwendet. Die Integrität der unter den für CD38 inhibitorischen Bedingungen vorinkubierten Zellen wurde lichtmikroskopisch anhand des Ausschlusses des Farbstoffs Trypanblau aus intakten Zellen überprüft. Diese Experimente wurden von Karin Weber im (Arbeitskreis von Prof. Guse) durchgeführt und die Ergebnisse mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.10 Proliferationsassay von Jurkat T-Lymphozyten

Jurkat T-Lymphozyten wurden, wie unter 3.2.1 beschrieben, auf einer Rundboden-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen kultiviert. Zunächst wurden die Zellen in einer Zelldichte von $2 \cdot 10^4$ Zellen/200 μ l ausgesät und für 2 Stunden in Gegenwart von 8-Br-NHD, zugesetzt in den Endkonzentrationen [μ M] 0; 0,53; 53; 530 und 5,3 mM, bei 37 °C in serumfreiem Medium vorinkubiert. In allen Fällen wurde das in sterilem HEPES-Puffer (25 mM, pH 7.4) gelöste 8-Br-NHD in einem Volumen von 2 μ l zu den Zellen zugegeben. Nach Ablauf der Vorinkubation wurde jeder Ansatz zu einer Endkonzentration von 7,5% (v/v) mit NCS versetzt und die Inkubation anschließend bei 37 °C fortgeführt. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden sterile Aliquots entnommen und in einer Zählkammer mit Neubauer-Einteilung unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Parallel wurde der Zustand der Zellen über den Ausschluß des Vitalfarbstoffs Trypanblau überprüft. Eine Dosis-Wirkungskurve für die Inhibition der Proliferation durch 8-Br-NHD wurde anhand der Zellzahlen nach 96-stündiger Inkubation berechnet. Von jeder Versuchsbedingung wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.2.11 Solubilisierung subzellulärer Fraktionen mit Detergenz

3.2.11.1 Solubilisierung von Protein für die CD38-Immunpräzipitation

Die Solubilisierung subzellulärer Fraktionen aus Jurkat T-Lymphozyten wurde in Anlehnung an ein publiziertes Protokoll durchgeführt [Ramaschi et al. 1996]. Wurden frisch präparierte Membranfraktionen (P10- oder P100-Pellets) verwendet, so wurden diese direkt in IP-Puffer mit 2% (v/v) NP40 und 1% (w/v) Natriumdesoxycholat aufgenommen und resuspendiert. Die Ansätze wurden für 45-60 Minuten unter mehrmaligem Schütteln auf Eis inkubiert und anschließend für 60 Min. bei 4 °C und 100.000•g ultrazentrifugiert. Die Überstände, die die solubilisierten ADPRCs/NADGHs enthielten, wurden abgenommen und, sofern sie nicht direkt weiterverwendet wurden, in Aliquots bei -70 °C eingefroren.

Wurden nicht frisch präparierte Membranfraktionen oder die S100-Fraktion für den direkten Gebrauch solubilisiert, wurde das bereits gelöste Protein zu der gewünschten Endkonzentration in IP Puffer mit 2% (v/v) NP40 und 1% (w/v) Natriumdesoxycholat aufgenommen, die Detergenzien zu den genannten Endkonzentrationen von 2% (NP40) und 1% (Natriumdesoxycholat) ergänzt und die Ansätze dann wie oben beschrieben weiterbehandelt. Die S100-Fraktion wurde nach der Solubilisierung mit Detergenz nicht erneut ultrazentrifugiert.

3.2.11.2 Solubilisierung von Protein für die säulenchromatographische Aufreinigung von ADPRCs/NADGHs

Für eine säulenchromatographische Aufreinigung von ADPRCs/NADGHs an Ionenaustauschern war es wünschenswert, die Solubilisierung ohne geladene Detergenzien wie Natriumdesoxycholat durchzuführen. Daher wurde die Solubilisierung in diesem Fall, wie oben beschrieben, jeweils in dem Äquilibrierungspuffer der gewählten Säule, jedoch nur mit dem Detergenz NP40 (2% v/v) durchgeführt. Zur Evaluierung dieser Solubilisierungsbedingung wurde intrazellulärer Puffer als Medium verwendet. Der Erfolg der Solubilisierung der ADPRCs/NADGHs nach beiden Protokollen wurde unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (100 μ M) im kontinuierlichen fluorimetrischen Enzymassay überprüft (Abb. 3.4). Dabei fand sich nach Anwendung beider Solubilisierungsprotokolle der weitaus größte Anteil der ADPRC- und NADGH-Aktivität der Extrakte in wiederholten Versuchen regelmäßig, wie gewünscht, im Solubilisierungsüberstand wieder, wohingegen die Membran-Pellets nach Durchführung der Solubilisierung nur noch eine geringe katalytische Restaktivität aufwiesen (Abb. 3.4).

3.2.12 Immunpräzipitation von CD38

Je IP-Ansatz wurden 50 μ l einer 50 %igen Lösung von Protein G Sepharose-Beads (= 25 μ g Beads) in Detergenz-freiem IP-Puffer mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und 4x in je 800 μ l Detergenz-freiem IP-Puffer (s.o.) gewaschen (12.000 rpm, 4 °C, 2 Min., Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K). Für die Immunpräzipitation (IP) von CD38 vorgesehene Beads wurden dann mit 10 μ g (50 μ l einer 200 μ g/ml Stammlösung) AT1 anti-CD38 mAK versetzt und das Ansatzvolumen mit 450 μ l Detergenz-freiem IP-Puffer (s.o.) auf 500 μ l ergänzt. Die Beads von Kontrollansätzen wurden entweder ohne Beladung mit einem Antikörper direkt in 500 μ l Detergenz-freiem IP-Puffer resuspendiert oder mit einem irrelevanten Antikörper (10 μ g OKT3/anti-CD3 mAK) versetzt und das Volumen mit dem Puffer auf 500 μ l ergänzt. Die Beads aller Ansätze wurden dann durch Schütteln resuspendiert und anschließend für 90 Min. bei 4 °C unter kontinuierlicher Rotation inkubiert. Zur Entfernung eines Überschusses an Antikörper wurden die Beads von IP- und Kontrollansätzen anschließend 4x in je 800 μ l Detergenz-freiem IP-Puffer (s.o.) gewaschen (12.000 rpm, 4 °C, 2 Min., Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K).

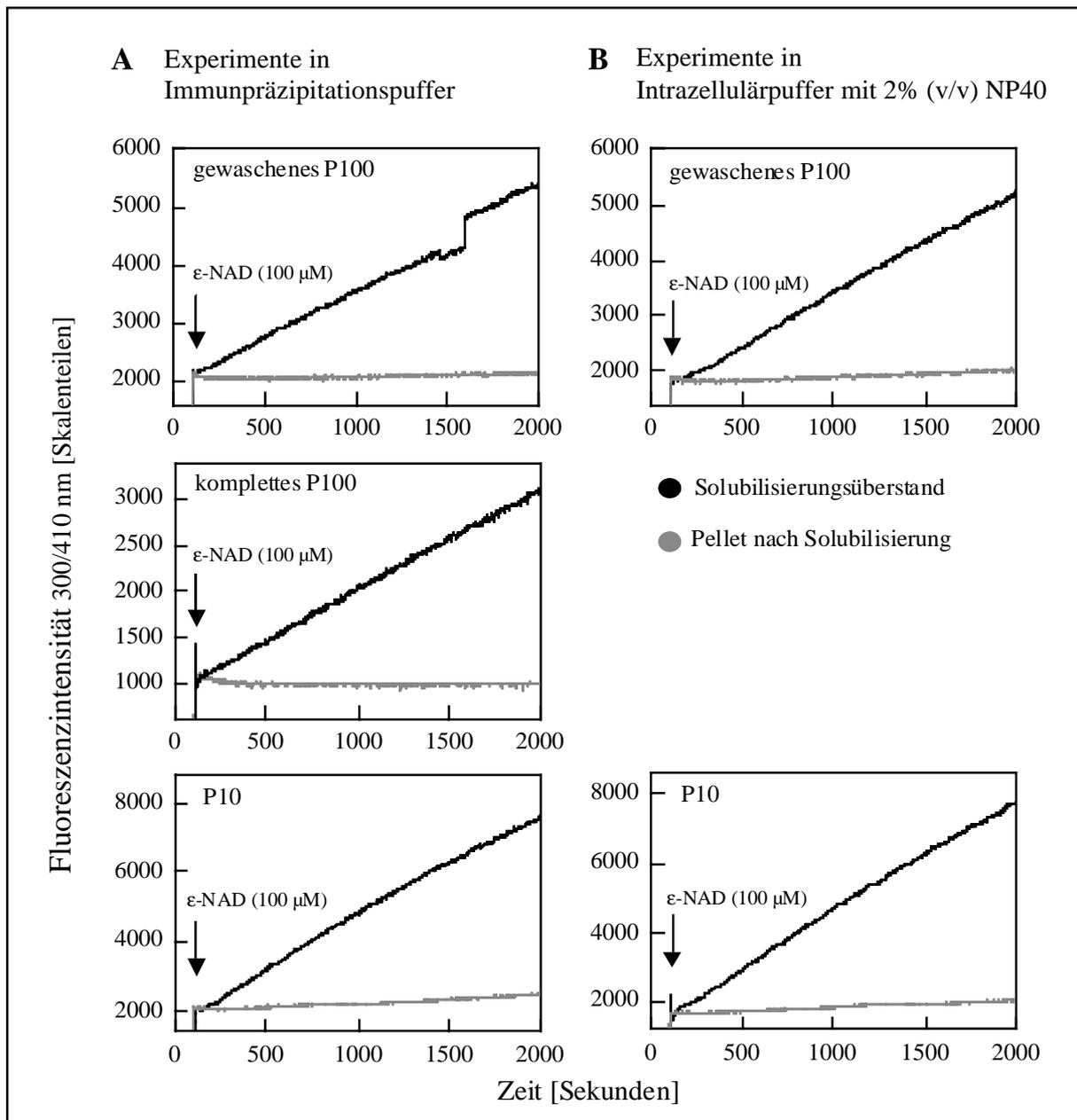


Abb. 3.4: Solubilisierung der ADPRCs/NADGHs der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen, subzellulären Membranfraktionen P10, P100 und „gewaschenes P100“ mit 2% (v/v) NP40. Die subzellulären Fraktionen P10, P100 und gewaschenes P100 der T-Lymphozyten wurden parallel jeweils zu einer Endkonzentration von 0,5 mg Protein/ml in intrazellulärem Puffer (pH 7,2) mit 2% (v/v) NP40 (B), bzw. in Immunpräzipitationspuffer (pH 7,2) mit 2% (v/v) NP40 und 1% (w/v) Natriumdesoxycholat(A) aufgenommen und resuspendiert. Alle Ansätze wurden für 45 Minuten unter wiederholtem Schütteln auf Eis inkubiert und anschließend für 60 Min. bei 4 °C und 100.000•g ultrazentrifugiert. Überstände und Pellets wurden getrennt und die Pellets jeweils in 1 ml intrazellulärem Puffer pH 7,2 ohne Detergenz resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung (s.u.) wurden alle Proben auf Eis gelagert. Alle Ansätze wurden dann entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.1 unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (100 μ M), zugesetzt jeweils nach einem Vorlauf von 100 Sek., über eine Messdauer von 2000 Sek. (33 Min.) fluorimetrisch im kontinuierlichen Enzymassay vermessen. Im Anschluß an die Solubilisierung wurde die katalytische Aktivität der Extrakte in Hinsicht auf ϵ -cADPR- und/oder ϵ -ADPR-Synthese unabhängig von dem für die Solubilisierung eingesetzten Protokoll (Abschnitt 3.2.11.1 oder Abschnitt 3.2.11.2) jeweils im Solubilisierungsüberstand vorgefunden. Die Pellets enthielten dagegen entweder keine katalytische Aktivität oder nur eine geringe Restaktivität. Demzufolge erwiesen sich beide Protokolle als gleichermaßen geeignet, um die ADPRCs/NADGHs der verschiedenen Zellextrakte zu solubilisieren.

Es erwies sich als wichtig, die Kopplung von Antikörpern an die Beads in Abwesenheit von Detergenz durchzuführen. Beads der Kontroll- und IP-Ansätze wurden dann mit der jeweils gleichen Menge an Protein einer solubilisierten Präparation von ADPRCs/NADGHs versetzt und das Ansatzvolumen mit Detergenz-haltigem IP-Puffer auf ein jeweils gleiches Endvolumen zwischen 350 und 800 µl ergänzt. Die Beads aller Ansätze wurden durch Schütteln resuspendiert und dann für 2,5-3 Stunden bei 4 °C unter kontinuierlicher Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (12.000 rpm, 4 °C, 2 Min., Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K), die Überstände abgenommen und auf Eis gelagert und die Beads erneut 4x in je 800 µl Detergenz-freiem Puffer gewaschen (12.000 rpm, 4 °C, 2 Min., Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K). Und zwar in IP-Puffer (s.o.), wenn sie nachfolgend für SDS-PAGE und/oder Western Blot mit/ohne vorherige Vermessung im Enzymassay verwendet wurden, oder in intrazellulärem Puffer mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250), wenn sie anschließend nur im ε-NAD-Enzymassay vermessen wurden. Die Weiterverarbeitung der Proben im ε-NAD-Enzymassay oder durch Vorbereitung für SDS-PAGE erfolgte jeweils direkt, ohne vorheriges Einfrieren.

Zur Vermessung im ε-NAD-Enzymassay wurden jeweils die gesamten mit Detergenz-freiem IP-Puffer/intrazellulärem Puffer auf ein Endvolumen von 1000 µl eingestellten Fraktionen eingesetzt und mit dem Substrat ε-NAD (100 µM) über 2000 Sek. am Fluorimeter vermessen. Nach Ablauf der Messungen wurden die Küvetteninhalte zurückgewonnen und zur Vorbereitung für eine nachfolgende HPLC-analytische Bestimmung der entstandenen Produkte (ε-cADPR und ε-ADPR) über Centrex UF-2-Konzentratoren mit 10 kDa MWCO zentrifugiert (30 Min., 4 °C, 3000•g, Heraeus-Zentrifuge). Aliquots der Ultrafiltrate (170 µl) wurden für die spätere HPLC-Analyse bei -70 °C eingefroren. Nach Rückzentrifugation der Retentate der IP-Überstände in Auffang-Gefäße (5 Min., 4 °C, 3000•g, Heraeus-Zentrifuge) wurden diese ebenfalls bei -70 °C eingefroren und standen dann für SDS-PAGEs und/oder Western Blot-Analysen zur Verfügung. Wurden auch die Beads der Enzymassays für SDS-PAGEs und/oder Western Blots benötigt, wurden sie direkt nach Durchführung der fluorimetrischen Messung abzentrifugiert (12.000 rpm, 4 °C, 2 Min., Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K), entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.14.2C für die SDS-PAGE vorbereitet und bei -20 °C aufbewahrt. Nur die Überstände der Beads wurden dann über die Centrex-UF-2-Konzentratoren zentrifugiert (s.o.). Die für die IPs von CD38 aus subzellulären Rohfraktionen eingesetzten Proteinmengen lagen bei 500 µg–1 mg Protein (S100), 50 µg–200 µg Protein (P10) und 50 µg–250 µg Protein (P100).

3.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.2.13.1 Gießen von Gelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen im SDS-PAGE erfolgte unter nicht reduzierenden (Verzicht auf β -ME) oder reduzierenden Bedingungen (Zusatz von β -ME) prinzipiell nach dem System von *Laemmli* [*Laemmli* 1970] in vertikalen Minigelen [10•10cm•1mm]. Dabei wurde ein Vertikal-Gelelektrophoresesystem von *Hoefler/Amersham Pharmacia Biotech* benutzt. Der verwendete SDS-Probenpuffer enthielt standardmäßig kein β -ME. Dieses wurde im Bedarfsfall in der Endkonzentration von 5% (v/v) ergänzt.

Es wurden grundsätzlich 3,0 %ige Sammelgele gegossen, deren Zusammensetzung, wie auch die der Trenngele, in der jeweils angegebenen Acrylamid-Konzentration, nachstehend tabellarisch aufgeführt ist.

Tab. 3.1: Zusammensetzung des Sammelgels (3,0 %ig, Ansatz für 2 Minigele)

Tris-Cl pH 6,8	2,5 ml
SDS 10 %ig	100 μ l
APS 10 %ig	100 μ l
Acrylamid-Lösung	1 ml
Wasser	6,3 ml
TEMED	10 μ l

Tab. 3.2: Zusammensetzung der Trenngele (Ansatz jeweils für 1 Minigel, für das 6 ml benötigt werden)

<u>Komponente</u>	<u>Acrylamid-Konzentration [%]</u>		
	<u>10</u>	<u>12,5</u>	<u>15</u>
Tris-Cl pH 8,8 (pH 7,45)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10 %ig	100 μ l	100 μ l	100 μ l
APS 10 %ig	100 ml	100 μ l	100 μ l
Acrylamid-Lösung	3,33 ml	4,16 ml	4,99 ml
Wasser	3,97 ml	3,14 ml	2,31 ml
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l

TEMED, als Radikalstarter, wurde immer zuletzt zugegeben, der Ansatz dann durch leichtes Schwenken gemischt und zügig zum Gießen des Geles/der Gele verwendet. Zum Auspolimerisieren unter Luftausschluß wurden die Trenngele mit 1 ml Aqua bidest.

überschichtet und bei RT stengelassen. Für das Trenngel wurden standardmäßig 6 ml Ansatz verwendet, wenn ein verlängertes Sammelgel benötigt wurde nur 5,5 ml. Die Gele (Trenngel und Sammelgel) wurden grundsätzlich mindestens 2 Stunden vor der Beladung mit Proben gegossen. Nach Einspannen des Gels/der Gele in die Elektrophoresekammer wurden oberes und unteres Puffer-Reservoir mit 1x-Elektrodenpuffer gefüllt und alle Probentaschen vor der Beladung mit Protein 3x mit 100 µl 1x-Elektrodenpuffer gespült. Nicht benötigte Taschen wurden, um ein gleichmäßiges Laufen der Gele zu gewährleisten, immer mit 1x-SDS-Probenpuffer mit/ohne β -ME beladen.

3.2.13.2 Probenaufbereitung und Durchführung der Elektrophorese

A) Grundprotokoll zur Probenaufbereitung

Das Protein wurde auf Eis mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) und Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) sowie, bei Bedarf (reduzierende SDS-PAGE), mit 5% (v/v) β -ME versetzt. Das maximale Ladevolumen für 1 Probe/Geltasche lag bei 50 µl. Die Proben wurden dann kurz kräftig geschüttelt und sofort für 5 Min. bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden sie kurz auf Eis abgekühlt und zum Entfernen unlöslicher Bestandteile für 3 Min. bei 12.000 rpm und RT zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K). Die Überstände wurden abgenommen und bis zur Beladung des Gels/der Gele bei RT verwahrt. Alternativ wurden die gekochten Proben bei -20 °C gelagert, mußten dann jedoch nach dem Auftauen zur Solubilisierung des SDS erneut erhitzt werden. Um ein gleichmäßiges Laufverhalten der Proben zu erzielen, wurden alle für 1 Gel vorgesehenen Proben im gleichen Endvolumen angesetzt (wurde mit 1x-SDS-Probenpuffer ausgeglichen) und aufgetragen.

B) Vorbereitung Detergenz-haltiger Proben für die Elektrophorese

Die Gegenwart von Detergenz (2% v/v NP40) in den Proben erwies sich grundsätzlich als problematisch, indem sich solche Proben während der Elektrophorese schlecht sammelten, sich in die Breite ausdehnten, ein blasiges Laufverhalten zeigten und nach der Färbung des Gels oft keine scharfen Banden lieferten. Durch Verdünnung Detergenz enthaltender Proben (beispielsweise IP-Überstände oder Fraktionen der SP-Sepharose-Chromatographie) mindestens im Verhältnis 1:2 mit halbkonzentriertem SDS-Probenpuffer, konnten diese Probleme weitgehend behoben werden. Auf diese Weise wurde die Konzentration an NP40 bei konstanter SDS-Konzentration mindestens halbiert. Gleichzeitig konnte die Aufkonzentrierung der Proben im Sammelgel durch die Erniedrigung der Ionenstärke des Probenpuffers verbessert werden.

C) Vorbereitung von IP-Beads für die Elektrophorese

Die abzentrifugierten und vom Überstand befreiten Beads wurden auf Eis mit jeweils 30 µl 2x SDS-Probenpuffer, 20 µl 1x-SDS-Probenpuffer und 3 µl β-ME versetzt, kurz kräftig geschüttelt und sofort für 5 Min. bei 95 °C erhitzt. Die Ansätze wurden kurz auf Eis abgekühlt und anschließend zur Abtrennung der Beads bei 12.000 rpm und RT für 3 Min. zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K). Die Überstände wurden abgenommen und entweder direkt weiterverwendet oder bei –20 °C gelagert.

D) Aufkonzentrierung von Protein aus verdünnten Proben durch Phenol-Ether-Präzipitation

Zur Aufkonzentrierung von Protein aus stark verdünnten Lösungen wurde die Phenol-Ether-Präzipitation [Sauvé *et al.* 1995] eingesetzt, die auch zur Extraktion von Protein aus Salz- und/oder Detergenz-haltigen Lösungen geeignet ist. Ein Aliquot der Lösungen (200-300 µl) wurde auf Eis in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß vorgelegt und mit einem gleichen Volumen an wassergesättigtem Phenol versetzt. Die Ansätze wurden dann jeweils 20 Sek. kräftig geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (4 °C, 5 Min., 12.000 rpm, Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K). Die oberen Phasen wurden abgenommen und verworfen und die unteren Phasen mit dem zweifachen Volumen an Diethylether versetzt. Anschließend wurden die Ansätze wieder kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (s.o.). Die oberen Phasen wurden erneut abgenommen und verworfen und die unteren Phasen ein weiteres Mal mit dem zweifachen Volumen an Diethylether extrahiert (s.o.). Nach erneuter Zentrifugation zur Phasentrennung (s.o.) wurden die oberen Phasen wiederum abgenommen und verworfen und die unteren Phasen für 2 Stunden bei –70 °C eingefroren. Anschließend wurden sie in einer Speed-Vak-Zentrifuge mit angeschlossener Kühlfalle bis zur Trockne eingengt (ca. 1,5 Stunden). Die eingengten Proben wurden auf Eis in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, mit 5% (v/v) β-ME versetzt, kräftig gemischt, sofort für 5 Min. bei 95 °C erhitzt und wie in A) beschrieben, weiterbehandelt.

E) Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese von Minigelen wurde unter kontinuierlicher Wasserkühlung bei 20 mA je Gel im Sammelgel und 30 mA je Gel im Trenngel durchgeführt.

3.2.14 „In-Gel“-ε-NAD-Enzymassay

„In-Gel“-Enzymassays von ADPRCs/NADGHs unter Verwendung des Substrates ε-NAD wurden in Anlehnung an ein von Zhang *et al.* [1995] etabliertes Protokoll durchgeführt. Für

diesen Zweck wurden entsprechend der Beschreibung in 3.2.13.1 inklusive Sammelgel (3,0 %ig; pH 6,8) gegossene und über 24-48 Stunden auspolymerisierte Gele verwendet. Diese wurden nach dem Gießen und Aushärten bei RT in feuchte Tücher eingewickelt, in einem verschließbaren Plastikbeutel verpackt und bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Die Trenngele wurden 12,5 %ig (pH 8,8) oder 15 %ig (pH 7,45), wie im Einzelfall angegeben, gegossen. Um breitere Probestaschen zu erhalten, wurden für die später mit Coomassie gefärbte Kontrollspur des Gels 2 Zähne (Taschenvolumen ca. 150 µl) und für die für den Enzymassay vorgesehene präparative Gelspur 7-8 Zähne der Taschenschablone (Taschenvolumen ca. 500-600 µl) mit Tesafilm vereinigt. Die meist Detergenz-haltigen Proben (SP-Sepharose-gereinigtes S100 oder P100) wurden, wie in Abschnitt 3.2.13.2 beschrieben, in Aliquots von 150 µl Volumen in halbkonzentriertem Probenpuffer angesetzt, jedoch nicht gekocht und nicht mit β-ME versetzt. Neben der Kontrollspur sowie rechts und links der präparativen Spur wurde jeweils in einer einfachen Tasche vorgefärbter MW-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese der Gele unter Wasserkühlung wurde wie in Abschnitt 3.2.13.2E beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das Gel zum Abspülen von SDS kurz in intrazellulärem Puffer geschwenkt, das von Marker eingerahmte präparative Gel abgetrennt und während der Coomassie-Färbung/Entfärbung der Kontrollspur des Gels bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert. Sobald das Bandenmuster der Kontrollspur deutlich zu erkennen war, wurde es zur Orientierung an das präparative Gel angelegt, um das Ausschneiden der Banden von Interesse aus dem ungefärbten präparativen Gel in einem möglichst schmalen Gelstreifen zu erleichtern. Das Restgel wurde dann unter Aufrechterhaltung der vertikalen im intakten Gel in genau gleich breite Streifen zerschnitten. Alle Gelstreifen wurden in kleine Würfel zerhackt, in 1,5 ml Eppendorfgefäße gefüllt und in je 1 ml vorgekühltem intrazellulärem Puffer mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) und 2% (v/v) NP40 aufgenommen. Zur Renaturierung des Proteins wurden die Ansätze dann 90 Min. bei 4 °C unter kontinuierlicher Rotation inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem Substrat ε-NAD (100 µM) versetzt und für 60 Min. bei RT unter Schütteln (Stufe 11-12) auf einem Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde dann auf Eis gestoppt und die Ansätze zum Abtrennen der Gelstückchen sofort für 3 Min. bei 4 °C und 12000 rpm (Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K) zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert, auf Eis gestellt und dann sofort nacheinander im Photometriemodus am Fluorimeter vermessen (3.2.7.2). Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden ausgedruckt und als Graph parallel zu einem Photo der intakten Coomassie-gefärbten Kontrollspur des Gels dargestellt. Als Spezifitätskontrolle für die gemessene Fluoreszenz wurde in manchen Fällen zusätzlich zur Fluoreszenz der ε-Adeninnukleotide auch die

Proteinfluoreszenz bei einer proteinspezifischen Exzitationswellenlänge von 275 nm und der Emissionswellenlänge von 410 nm gemessen und auf gleiche Weise dokumentiert. Zur Positivkontrolle wurde der beschriebene Assay auch mit der ADPRC aus *A. californica* und mit löslichem, rekombinatem CD38 (hCD38rec) durchgeführt. Diese Proteine (jeweils 1 µg Protein) wurden hier jedoch in einzelnen Probenaschen (50 µl Volumen) aufgetragen. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die entsprechenden Spuren des Gels, ohne die Färbung einer Kontrollspur abzuwarten, in gleich breite Gelstreifen zerschnitten. Auf eine Kontrollspur wurde verzichtet, da diese beiden Proteine in der eingesetzten Konzentration durch Coomassie-Färbung nicht nachweisbar waren. Die im Enzymassay erhaltenen Daten wurden dann parallel zu einer fotografierten Spur vorgefärbter MW-Standards dargestellt.

3.2.15 Nachweis von CD38 durch Western Blot im Tank-Blotverfahren

Proteinfractionen wurden zunächst unter nicht reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen, wie in den Abbildungslegenden jeweils angegeben, in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Details zu im Ergebnisteil dargestellten Experimenten sind ebenfalls den zugehörigen Legenden zu entnehmen. Anschließend wurde das Gel kurz in 1x-Transferpuffer gespült. Jeweils auf die Größe des Gels zugeschnittene PVDF-Membranen wurden zur Vorbereitung für den Blot kurz mit 100% (Immobilon-Membranen/*Millipore*), bzw. 60% Methanol in Aqua bidest. (*Rothi*[®]-PVDF-Membran/*Roth*) benetzt, anschließend in Aqua bidest. gespült und schließlich, vor dem Zusammenbau des Blots, für ca. 15 Minuten in 1x-PVDF-Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Benetzen mit Methanol dürfen die Membranen keinesfalls mehr an-, bzw. austrocknen. Die (luftblasenfreie) Schichtung von Blots im Kunststoffgitter, betrachtet vom Minus- zum Pluspol folgte nachstehendem Schema:

- Schwammtuch
- 2 Schichten Whatmann-Papier
- Gel
- PVDF-Membran
- 2 Schichten Whatmann-Papier
- Schwammtuch

Alle Komponenten wurden vor der Schichtung vollständig mit 1x-PVDF-Transferpuffer getränkt und anschließend vor Austrocknung geschützt. Der Proteintransfer auf die Membran wurde für 2,5 bis 3 Stunden bei 250 mA und 4 °C im Kühlraum durchgeführt.

Anschließend wurden die Membranen bei 4 °C im Kühlraum unter Schwenken wie nachstehend aufgeführt weiterbehandelt: 3x 10 Min. Spülen in Aqua bidest., Blocken für 1 Stunde in TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver und 0,01% (w/v) Thimerosal, 3x 10 Min. Spülen in TBS mit 0,1% (v/v) Tween-20 (= TBST) und schließlich Über-Nacht-Inkubation mit dem 1. Antikörper (anti-CD38 mAK, Endkonzentration 1 µg/ml) in TBST mit 2,5% (w/v) Magermilchpulver und 0,01% (w/v) Thimerosal. Weitere Inkubationsschritte erfolgten bei RT unter Schwenken: 3x 10 Min. Waschen in TBST mit 2,5% (w/v) Magermilchpulver und 0,01% (w/v) Thimerosal, 1 Stunde Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Zweitantikörper (human präabsorbiertes Ziege anti-Maus HRP-Konjugat 1:3000) in TBST mit 2,5% (w/v) Magermilchpulver und 0,01% (w/v) Thimerosal, 2x 3 Min. Spülen in TBS, 1x 10 Min. Spülen in TBST, 2x 15 Min. Spülen in TBST und 2x 30 Min. Spülen in TBS. Anschließend wurden die Blots mit Hilfe des ECL-Systems in einer Dunkelkammer entwickelt. Je Blot wurden 6 ml ECL-Reagenz 1 direkt vor Gebrauch mit 6 ml ECL-Reagenz 2 gemischt und der Ansatz ab sofort dunkel gehalten. Auf Filterpapier abgetropfte Blots wurden für 1 Min. in der fertigen ECL-Lösung inkubiert, erneut auf Filterpapier abgetropft und zwischen Klarsichtfolie gelegt. Danach wurden die Blots mit aufgelegtem Film in einer Filmkassette für wenige Sekunden bis 60 Min. inkubiert. Zur Entwicklung der Filme wurden diese in der Dunkelkammer bis zum Hervortreten von Banden in Entwickler inkubiert, dann kurz in Aqua bidest. gespült, anschließend bis zur Transparenz des Films in Filmentwickler inkubiert, danach erneut in Aqua bidest. gespült und schließlich an der Luft getrocknet.

3.2.16 Vorbereitung von Proteinen für die Sequenzierung

3.2.16.1 Vorbereitung von Proteinen für die N-terminale Sequenzierung

Gele (3,0 %iges Sammelgel, pH 6, 8 und 12,5 %iges Trenngel, pH 8,8) wurden prinzipiell wie in Abschnitt 3.2.13.1 beschrieben gegossen, jedoch 24-48 Stunden vor Durchführung der Elektrophorese und unter Verwendung frischer Puffer sowie einer auf die Hälfte reduzierten Menge an APS. Das Volumen der anderen Hälfte wurde durch Wasser ersetzt. Die zunächst bei RT ausgehärteten Gele (Trenngel und Sammelgel) wurden bis zum Gebrauch in feuchten Tüchern und einem verschlossenen Plastikbeutel bei 4 °C gelagert. Die mit 5% (v/v) β-ME reduzierten, wie in Abschnitt 3.2.13.2 (A/B) beschrieben aufgearbeiteten Proben wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.13.2E durch Elektrophorese aufgetrennt. Dabei enthielt der Kathodenpuffer (oberes Puffer-Reservoir) zusätzlich Natriumthioglycolat (Endkonzentration 0,1 mM). Dieses läuft während der Elektrophorese noch vor der Farbstoff-Front und schützt als Radikalfänger das langsamer laufende Protein. Nach der Elektrophorese

wurde das Protein wie unter 3.2.15 beschrieben, auf eine PVDF-Membran (Immobilon™-P, Immobilon™-SQ/Millipore oder Sequi-Blot™/Bio-Rad) transferiert. Direkt nach dem Blot-Transfer wurde die noch vollständig benetzte Membran gründlich mit Seralpurwasser gespült (6x 5 Min. unter Schwenken), um Reste von Glycin, das bei der Sequenzierung stören kann, zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen nach einem speziellen Protokoll (3.2.17.2) mit Coomassie gefärbt, wobei die Ausprägung der Färbung möglichst schwach gehalten wurde. Die für die Sequenzierung bestimmten Banden wurden mit einem sauberen/sterilen Skalpell ausgeschnitten und in einem ebenfalls sauberen/sterilen Eppendorfgefäß bei -20 °C eingefroren oder direkt dem Service-Labor von *Dr. F. Buck* (Institut für Zellbiochemie/UKE) übergeben.

3.2.16.2 Vorbereitung von Proteinen für die Sequenzierung durch Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS)

Das Gießen der Gele, die Probenaufbereitung und die Elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden wie in Abschnitt 3.2.13. beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Zur Färbung von Sequenziergelen wurden immer frisch angesetzte Färbe- und Entfärbelösungen mit reduziertem Gehalt an Essigsäure verwendet (3.2.17.1A). Für die Sequenzierung bestimmte Banden wurden wie in Absatz 3.2.16.1 beschrieben, direkt aus dem Gel ausgeschnitten und entweder bei -20 °C gelagert oder direkt zur Sequenzierung dem Service-Labor von *Dr. F. Buck* (s.o.) übergeben.

3.2.17 Coomassie-Färbung von Gelen und Western Blots

3.2.17.1 Coomassie-Färbung von Gelen

A) Standard-Protokoll der Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele kurz (ca. 5 Min.) in Coomassie-Entfärber (Standardlösung) fixiert und für 30 Min. unter Schwenken in der Coomassie-Färbelösung (Standardlösung) inkubiert. Anschließend wurden die Gele bis zum Erscheinen der Banden und einer optimal erscheinenden Transparenz des Hintergrundes in der Entfärbelösung (s.o.) geschwenkt. Zur Beschleunigung der Entfärbung wurde diese ca. alle 30 Min. gewechselt. Zur Dokumentation wurden die Gele mit Hilfe einer digitalen Photoanlage fotografiert und die Bilder digital gespeichert.

B) Coomassie-Färbung von Sequenziergelen

Für eine massenspektroskopische Sequenzierung durch Tandem-MS (MS/MS) im Service-Labor von *Dr. F. Buck* (Institut für Zellbiochemie/Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) bestimmte Gele wurden im Prinzip auf gleiche Weise gefärbt. Um das Risiko von die Sequenzierung erschwerenden Proteinmodifikationen zu reduzieren wurden für diese Gele jedoch immer frisch angesetzte Lösungen mit reduziertem Gehalt an Essigsäure (1% statt 10% v/v [*Wolf* 1999]) verwendet.

3.2.17.2 Coomassie-Färbung von für die N-terminale Sequenzierung von Proteinen bestimmten PVDF-Western Blots

Die nach dem Proteintransfer gründlich mit Seralpur-Wasser gespülte PVDF-Membran (3.2.17.1) wurde für 1 Min. in einer speziellen Coomassie-Färbelösung (0,25% Coomassie, keine Essigsäure [*Harper & Speicher* 1995]) inkubiert und anschließend, unter wiederholtem Austausch der Entfärbelösung (ebenfalls eine spezielle Lösung ohne Essigsäure [*Harper & Speicher* 1995]), entfärbt. Die ausreichend entfärbte Membran wurde 2x 5 Min. in Seralpur-Wasser gespült und nachfolgend, vor dem Ausschneiden von Banden, für 2 Stunden bei Raumluft getrocknet.

3.2.18 Molekulargewichtsbestimmung der ADPRCs/NADGHs subzellulärer Fraktionen der Jurkat T-Lymphozyten durch Photoaffinitätsmarkierung mit [³²P]8-N₃-NAD

Versuche zur Identifizierung und MW-Bestimmung der ADPRCs/NADGHs subzellulärer Fraktionen der Jurkat T-Lymphozyten durch Photoaffinitätsmarkierung mit [³²P]8-N₃-NAD wurden in Kooperation mit *Prof. T.F. Walseth* (University of Minnesota/Minneapolis, Minnesota, U.S.A.) durchgeführt. Dazu wurden die entsprechend der Beschreibung 3.2.3 und 3.2.19.1 vorbereiteten Proteinfractionen *Prof. Walseth* auf Tockeneis zugestellt und die Markierungsexperimente inklusive der Gelelektrophoresen wie publiziert [*Walseth et al.* 1993] in seinem Labor durchgeführt.

3.2.19 Säulenchromatographische Aufreinigung von ADPRCs/NADGHs

3.2.19.1 Hydroxylapatit(HA)-Chromatographie der cytosolischen S100-Fraktion der Jurkat T-Lymphozyten

Entsalzter, auf HA-Äquilibriumspuffer (10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8) mit Proteasinhitoren-Mix (1:250) umgepufferter, aus in der Regel ca. $2 \cdot 10^9$ Jurkat T-Lymphozyten gewonnener S100-Extrakt, wurde bei 4 °C auf eine mit HA-Ultrogel[®] gefüllte

und mit dem Puffer äquilibrierte Säule (Volumen ca. 30 ml Gel-Matrix, genutzte Ladekapazität bis zu 2 mg Protein/ml Gel) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule bei einer Flußrate von 1 ml/Min. mit ca. 3 Säulenvolumina (SV) HA-Äquilibrierungspuffer gewaschen. ADPRCs/NADGHs wurde ausschließlich im Durchlauf und der Waschfraktion vorgefunden. Diese beiden Fraktionen wurden im Pool auf Eis gesammelt und mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) versetzt. PPase-Aktivität band unter diesen Versuchsbedingungen quantitativ an die Säule und wurde somit effektiv abgetrennt. Der Pool aus Durchlauf- und Waschfraktion wurde entsprechend den Herstellerangaben (*Millipore/Eschborn*) in 15 ml-Aliquots durch Ultrazentrifugation über Centriprep-10-Konzentratoren eingengt und im Bedarfsfall umgepuffert (Zentrifugationsschritte bei 4 °C und 3000•g für 30-50 Min., Heraeus-Zentrifuge). Der eingengte Extrakt wurde mit Proteaseinhibitoren (s.o.) versetzt und Volumen sowie Proteingehalt bestimmt. Bei nicht direkter Weiterverwendung wurde er in Aliquots bei -70 °C gelagert. Die Elution der Säule bei 4 °C (Flußrate 1 ml/Min.) erfolgte mit ca. 3 SV HA-Elutionspuffer (500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 mit 100 mM KCl). Wurde das Eluat für weitere Versuche benötigt, wurde es ebenfalls auf Eis gesammelt, mit Proteaseinhibitoren (s.o.) versetzt und wie für die Durchlauf- und Waschfraktion beschrieben, weiterbehandelt. Um das Eluat zu entsalzen, wurde es vor dem entgültigen Einengen in jedem Fall 3x in 15 ml des angestrebten Zielpuffers gewaschen (4 °C, 3000•g, 50 Min., Heraeus-Zentrifuge).

3.2.19.2 Vorversuche an Minisäulen zur weiteren Aufreinigung der ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion der Jurkat T-Lymphotyten

Vorversuche zur weiteren chromatographischen Aufreinigung der ADPRCs/NADGHs der Jurkat T-Lymphozyten wurden bei 4 °C durchgeführt, um zunächst die Bindung der ADPRCs/NADGHs an verschiedene Säulen-Matrices auszutesten. Da zunächst von der Existenz einer löslichen (nicht membranständigen/membranassoziierten) ADPRC/NADGH in der cytosolischen S100-Fraktion ausgegangen wurde, wurden die Vorversuche ohne Einsatz von Detergenz durchgeführt. Dazu wurde das entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.4 entsalzte und auf den jeweiligen Äquilibrierungspuffer umgepufferte Protein unter Berücksichtigung der jeweils vom Hersteller angegebenen Bindungskapazität der Säulen-Matrices auf die Säulen (Bettvolumen 1-5 ml, wie in nachstehender Tabelle, Tab. 3.4., im Einzelnen aufgeführt) aufgetragen. Die verwendeten Äquilibrierungspuffer sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tab. 3.3: Auflistung der Äquilibrierungspuffer, die bei unterschiedlichen pH-Bedingungen der Chromatographie für verschiedene Säulen-Matrices verwendet wurden

<u>Säulenmatrix</u>	<u>pH-Bedingung</u>	<u>Äquilibrierungspuffer</u>	
SP-Sepharose	pH 8	HEPES	50 mM
	pH 7	Kaliumphosphat	50 mM
	pH 6	MES	50 mM
	pH 5,5	MES	50 mM
	pH 5	Na-Acetat	50 mM
CM-Sepharose	pH 7	Kaliumphosphat	50 mM
	pH 6	MES	50 mM
Q-Sepharose	pH 8	Tris-Cl	50 mM
	pH 7	Bis-Tris	50 mM
Heparin-Sepharose	pH 8	HEPES	50 mM
	pH 7	HEPES	50 mM
	pH 6	MES	50 mM
	pH 5,5	MES	50 mM
	pH 5	Na-Acetat	50 mM
Blue-Sepharose	pH 7	Kaliumphosphat	10-20 mM

Die jeweils mit Protein beschickte Säule wurde dann mit 3 SV Äquilibrierungspuffer gespült und das Protein schließlich mit jeweils 3 SV der in Tab 2 angegebenen Elutionspuffer eluiert. Durchlauf- und Waschfraktion sowie die Eluate wurden im Pool auf Eis gesammelt und mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) versetzt. Anschließend wurden die Pools in Aliquots je 15 ml entsprechend den Herstellerangaben (*Millipore/Eschborn*) über Centriprep-Konzentratoren (10 kDa MWCO) entsalzt, eingengt und währenddessen auf intrazellulären Puffer (pH 7,2) umgepuffert. Zentrifugiert wurde dabei jeweils für 30-50 Min. bei 4 °C und 3000•g (Heraeus-Zentrifuge). Die Volumina der Retentate wurden bestimmt, die Retentate mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) versetzt und der Proteingehalt entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.5 ermittelt. Bei nicht direkter Weiterverwendung wurden die Extrakte bei -70 °C gelagert.

Tab. 3.4: Herstellerdaten zu den für die Vorversuche zur Aufreinigung der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion der Jurkat T-Lymphozyten eingesetzten Minisäulen inklusive der eingesetzten Elutionsbedingungen

Matrix	Ligand oder aktive Gruppe	1. Bettvolumen 2. pH-Bereich	Elutionspuffer (Puffer B)	Bindungskapazität [nMol oder mg/ml Gel]
SP-Sepharose	-SO ₃ ⁻ (Sulfopropyl-)	1 ml Gel 3-14	1 M NaCl in Puffer A	<u>Gesamt-Ionenkapazität</u> 0,14-0,20 nMol <u>Dynamische Kapazität</u> IgG 50 mg Ribonuklease A 70 mg BSA 120 mg
CM-Sepharose	-COO ⁻ (Carboxyl-)	1 ml Gel 6-10	1 M NaCl in Puffer A	<u>Gesamt-Ionenkapazität</u> 0,09-0,13 nMol <u>Dynamische Kapazität</u> IgG 15 mg Ribonuklease A 50 mg
Q-Sepharose	-N ⁺ (CH ₃) ₃ quarternäres Ammoniumion	1 ml Gel 2-14	1 M NaCl in Puffer A	<u>Gesamt-Ionenkapazität</u> 0,14-0,20 nMol <u>Dynamische Kapazität</u> HSA 120 mg α-Laktalbumin 110 mg
Heparin-Sepharose	Heparin	1 ml Gel 5-9	1 M NaCl in Puffer A	Antithrombin III 3 mg/ml
Cibacron Blue-Sepharose	Cibacron Blue 3G-A	5 ml Gel 3-13	20 mM β-NAD in Puffer A 2 M KCl in Puffer A	HSA 20 mg

Anmerkung: Äquilibrierungspuffer, wie in Tab. 1 angegeben.

Mit Aliquots aller Fraktionen wurde, wie in Abschnitt 3.2.7.1A beschrieben, fluorimetrisch ein kontinuierlicher ε-NAD-Enzymassay durchgeführt (100 μM ε-NAD, 2000 Sek., RT unter Rühren) und die Assayansätze wurden anschließend für die nachfolgende HPLC-Analyse der Produkte vorbereitet. Die HPLC-Analyse der Proben wurde entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.8.1 durchgeführt und die Enzymaktivität der einzelnen Gesamtfaktionen (getrennt für ADPRC-Aktivität und NADGH-Aktivität) sowohl absolut als auch in Prozent der aufgetragenen Gesamtaktivität ermittelt.

3.2.19.3 SP-Sepharose-Chromatographie von ADPRCs/NADGHs

Für die chromatographische Auftrennung an einer HiTrap-SP-Sepharose HP-Säule (1 ml Bettvolumen) wurden die Enzympräparationen (die subzellulären Fraktionen P10, P100, HA-

gereinigtes S100, gewaschenes P100 und PS100 aus Jurkat oder, als Kontrollproteine, lösliches hCD38rec und die *Aplysia*-ADPRC) in SP-Puffer A (pH 5,0) mit mit 2% (v/v) NP40 und Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) aufgenommen und solubilisiert. Im Falle der Jurkat-Membranfraktionen (P10, P100, gewaschenes P100) wurde die Solubilisierung wie unter 3.2.11 beschrieben, durchgeführt. Die löslichen Fraktionen S100 (HA-gereinigt) und PS100 wurden über eine Sephadex G-25 superfine HiTrap-Säule (Bettvolumen 5 ml) entsprechend der Beschreibung in 3. 2.4 bei 4 °C zunächst auf Detergenz-freien SP-Puffer A umgepuffert und auf Eis mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) und NP40 (2% v/v) versetzt. Die *Aplysia*-ADPRC und hCD38rec wurden direkt in SP-Puffer A aufgenommen. Das Volumen der Ansätze entsprach jeweils dem späteren Injektionsvolumen der Probe (2, bzw. 5 oder 10 ml). Im Anschluß an die Injektion auf die Säule wurden die Proben nach einem der nachstehend aufgeführten Protokolle an einer Äktaprime-Chromatographie-Anlage (*Amersham Pharmacia Biotech*) aufgetrennt. Dabei wurde während der Probeninjektion eine Flußrate von 0,5 ml/Min. und während der Analyse in einem Gradienten von 0-1M (Protokoll 1) oder 0-750 mM NaCl (Protokoll 2) eine Flußrate von 1,0 ml/Min. verwendet. Die Chromatographie wurde bei RT unter Verwendung eisgekühlter Puffer durchgeführt. Wurden 10 ml Probe in Portionen von 5 ml Volumen auf die Säule injiziert, wurde Methode 2 nach Injektion des ersten Aliquots gestartet, nach 17 Min. zur Injektion des 2. Aliquots gestoppt und dann erneut gestartet. Die genannten Programme/Methoden sind nachstehend tabellarisch aufgeführt.

Tab. 3.5: Protokoll 1 für SP-Sepharose-Chromatographie

Zeitpunkt [Min.]	Puffer B [%]	Flußrate [ml/Min.]	Größe der Fraktion [Min.]	Pufferventil (Position)	Injektionsventil (Position)	Kommentar
0	0	0,5	1	1	injizieren	Probeninjektion (Start)
4	0	0,5	1	1	injizieren	Probeninjektion (Ende)
4,1	0	1,0	1	1	injizieren	Waschgang
8	0	1,0	1	1	laden	Gradient; Totschaltung der Proben- schleife
48	100	1,0	1	1	laden	
52	100	1,0	0	1	laden	
56	0	1,0	0	1	laden	Reäquilibration
64	0	1,0	0	1	laden	Ende

Drucklimit 1,1 MPa, Probenschleifenvolumen 2 ml

Tab. 3.6: Protokoll 2 für SP-Sepharose-Chromatographie

Zeitpunkt [Min.]	Puffer B [%]	Flußrate [ml/Min.]	Größe der Fraktion [Min.]	Pufferventil (Position)	Injektionsventil (Position)	Kommentar
0	0	0,5	1	1	injizieren	Probeninjektion (Start)
11,0	0	0,5	1	1	injizieren	Probeninjektion (Ende)
11,1	0	1,0	1	1	injizieren	Waschgang
17,0	0	1,0	1	1	laden	Gradient; Totschaltung der Proben- schleife
47,0	100	1,0	1	1	laden	
52,0	100	1,0	0	1	laden	
56,0	0	1,0	0	1	laden	Reäquil- brierung
64,0	0	1,0	0	1	laden	Ende

Drucklimit 1,1 MPa, Probenschleifenvolumen 5 ml

Durchlauf- und Waschfraktion wurden jeweils im Pool und die Fraktionen des Gradienten in 1-Minuten(1 ml)-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen/Pools wurden mit Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) versetzt und auf Eis gelagert. Direkt nach Ablauf der chromatographischen Trennung wurde unter Verwendung eines der Substrate ϵ -NAD (50 μ M) oder NGD (50 μ M), wie unter 3.2.7.2 beschrieben, eine Durchmusterung der Fraktionen auf Enzymaktivität im fluorimetrischen Enzymassay (Photometriemodus) durchgeführt. Nicht direkt weiterverwendete Anteile der Fraktionen wurden bei -70 °C gelagert. Gelegentlich wurden die Ansätze der Enzymassays zusätzlich HPLC-analytisch (Fluoreszenzdetektion) vermessen, um die fluorimetrisch erhobenen Daten zu verifizieren. Dazu wurden die Assayansätze zur Abtrennung des Proteins über Centrex UF-2-Konzentratoren (10 kDa MWC0) zentrifugiert (30 Min., 4 °C 3000•g, Heraeus-Zentrifuge) und Aliquots der Ultrafiltrate (170 μ l) bis zur Vermessung durch HPLC (3.2.8.1) bei -70 °C gelagert.

3.2.20 Statistische Auswertung von Daten

Alle Daten der vorliegenden Arbeit sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm SD ($n \geq 3$) dargestellt. Die Signifikanz erhaltener Ergebnisse wurde mit Hilfe des T-Tests für ungepaarte Daten nach *Student* überprüft. Exemplarisch gezeigte Daten, Chromatogramme und zeitliche Verläufe der Enzymaktivität oder der $[Ca^{2+}]_i$ wurden so ausgewählt, daß sie das im Mittel erhaltene Ergebnis möglichst repräsentativ widerspiegeln.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung eines sensitiven HPLC-Enzymassays zum Nachweis von ADPRC-Aktivität

Zielsetzung des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Etablierung/Optimierung eines möglichst schnellen, sensitiven und verlässlichen HPLC-Enzymassays auf ADPRC- und NADGH-Aktivität, der sowohl zum Durchmustern von Proteinfractionen auf Enzymaktivität während einer biochemischen Aufreinigung von ADPRCs/NADGHs als auch zur Evaluierung der Wirkung von Testsubstanzen auf die Enzymaktivität geeignet sein sollte.

4.1.1 Versuch zur Optimierung einer etablierten Zwei-Schritt-HPLC-Methode zur Bestimmung von cADPR als Enzymassay auf ADPRC-Aktivität

Eine auf UV-Detektion von Nukleotiden bei einer Absorption von 270 nm basierende Zwei-Schritt-HPLC-Methode zur Bestimmung des intrazellulären Gehaltes an cADPR war bereits etabliert [*da Silva et al.* 1998a]. Daher bestand die naheliegendste Option zunächst darin, diese Methode, die eine Perchlorsäure(PCA)-Extraktion von Nukleotiden aus Zellextrakten, eine 1. HPLC-Analyse der lyophilisierten PCA-Extrakte an einer Anionenaustauschersäule (PRPX-100) und eine 2. quantitative HPLC-Analyse von lyophilisierten Fraktionen, die während der ersten HPLC-Analyse mit Standard-cADPR koeluierten, durch RP-HPLC unter Ionenpaar-Bedingungen an einer Hypersil BDS C18-Säule (250 x 4,6 mm I.D.) umfaßte, als Enzymassay zu optimieren. Als Ziele standen dabei insbesondere eine Verkürzung der Probenaufarbeitung durch Verzicht auf den ersten HPLC-Schritt sowie eine Verkürzung der Einzelanalysendauer von bislang 21 Min. im Vordergrund. Ein Problem der etablierten HPLC-Methode stellte außerdem eine geringe Variabilität (Abb. 4.1) der Retentionszeiten dar. Diese machte es in Verbindung mit einer gemessen an den experimentellen Erfordernissen grenzwertig geringen Detektionsempfindlichkeit der HPLC-Methode für cADPR trotz einer regelmäßigen Analyse von geteilten Proben, von denen die eine Hälfte zur Identifizierung des cADPR-Peaks mit Standard-cADPR versetzt worden war und die direkt nacheinander analysiert wurden, oft schwierig den Elutionspeak von cADPR eindeutig zu identifizieren. Aufgrund der geringen synthetisierten Stoffmengen an cADPR erwies es sich zudem als schwierig, die ADPRC-Aktivität von Proben, die für unterschiedliche Zeiten mit dem Substrat β -NAD inkubiert worden waren, zuverlässig anhand einer Änderung der Fläche des cADPR-Peaks zu messen. Erschwerend kam dabei hinzu, daß cADPR unter den sauren Extraktionsbedingungen, die benötigt werden, um Protein-gebundene Nukleotide aus der

Bindung an Protein freizusetzen, nur bedingt stabil ist [Walseth et al. 1991, da Silva et al. 1998a], was regelmäßig in schlechten Ausbeuten dieses Nukleotids zwischen 30 und 50 % resultierte. Nach Austestung verschiedener, zum Teil kürzerer Trennsäulen (20 und 5 cm Säulenlänge) mit der gleichen (Hypersil BDS C18) oder, wie im gezeigten Beispiel (Abb. 4.1), einer modifizierten Säulenmatrix (HyPurity Elite; 15 cm x 4,6 mm I.D.), in beiden Fällen aber mit kleinerer Partikelgröße (3 µm statt 5 µm), erwies es sich als möglich, Proben unter Ionenpaarbedingungen direkt durch RP-HPLC zu analysieren. Dies wurde im Weiteren beibehalten. Zusätzlich war es möglich die Einzelanalysedauer auf 15 Min. zu verkürzen, wobei die Stabilität der Retentionszeiten jedoch weiterhin unbefriedigend blieb (Abb. 4.1). Letztere konnte durch eine Verlängerung der Reäquilibrierungsphase der jeweils verwendeten Trennsäule erheblich verbessert werden. Dies resultierte jedoch gleichzeitig wieder in einer Verlängerung der Einzelanalysedauer. Letztlich wurde zur Durchführung experimenteller Analysen wieder auf die ursprünglich verwendete RP-HPLC-Säule (Hypersil BDS C18, 250 x 4,6 mm I.D., 5 µm-Partikel) und den für die weiter unten beschriebene HPLC-Methode verwendeten, für die Reäquilibrierung der Säule optimierten Gradienten zurückgegriffen. Diese Säule verursachte bei der eingesetzten Flußrate (1 ml/Min.) den geringsten Gegendruck, welcher sich bei dem verwendeten Puffersystem mit Methanol als Eluent oftmals als kritisch erwies. Zusätzlich führte die Integration einer bei Bedarf austauschbaren, mit der Hypersil BDS C18-Säulenmatrix gefüllten Vorsäule (17 x 4,6 mm I.D.) in das analytische Mess-System, zu einer deutlichen Steigerung der Lebensdauer der analytischen Trennsäule, auch unter den Bedingungen einer hohen Probendurchsatzrate. Insgesamt erwies sich jedoch das Hauptproblem der unzureichenden Detektionsempfindlichkeit für cADPR bei Anwendung dieser HPLC-Methode als unlösbar. Deshalb blieb die auf PCA-Extraktion und UV-Detektion der Nukleotide basierende HPLC-Methode für die in dieser Arbeit angestrebten Versuchsziele letztendlich unbefriedigend.

4.1.2 Entwicklung eines auf Fluoreszenzdetektion basierenden HPLC-Enzymassays auf ADPRC- und NADGH-Aktivität unter Verwendung des Ersatzsubstrates 1,N⁶-etheno-NAD (ϵ -NAD)

Mit dem Ziel einen sensitiveren, auf Fluoreszenzdetektion basierenden Enzymassay zu etablieren, wurde die Eigenschaft der geringen Substratspezifität von ADPRCs/NADGHs genutzt und als Substrat für den Enzymassay auf das aufgrund einer zusätzlichen Ringstruktur selbst bereits fluoreszente ϵ -NAD zurückgegriffen.

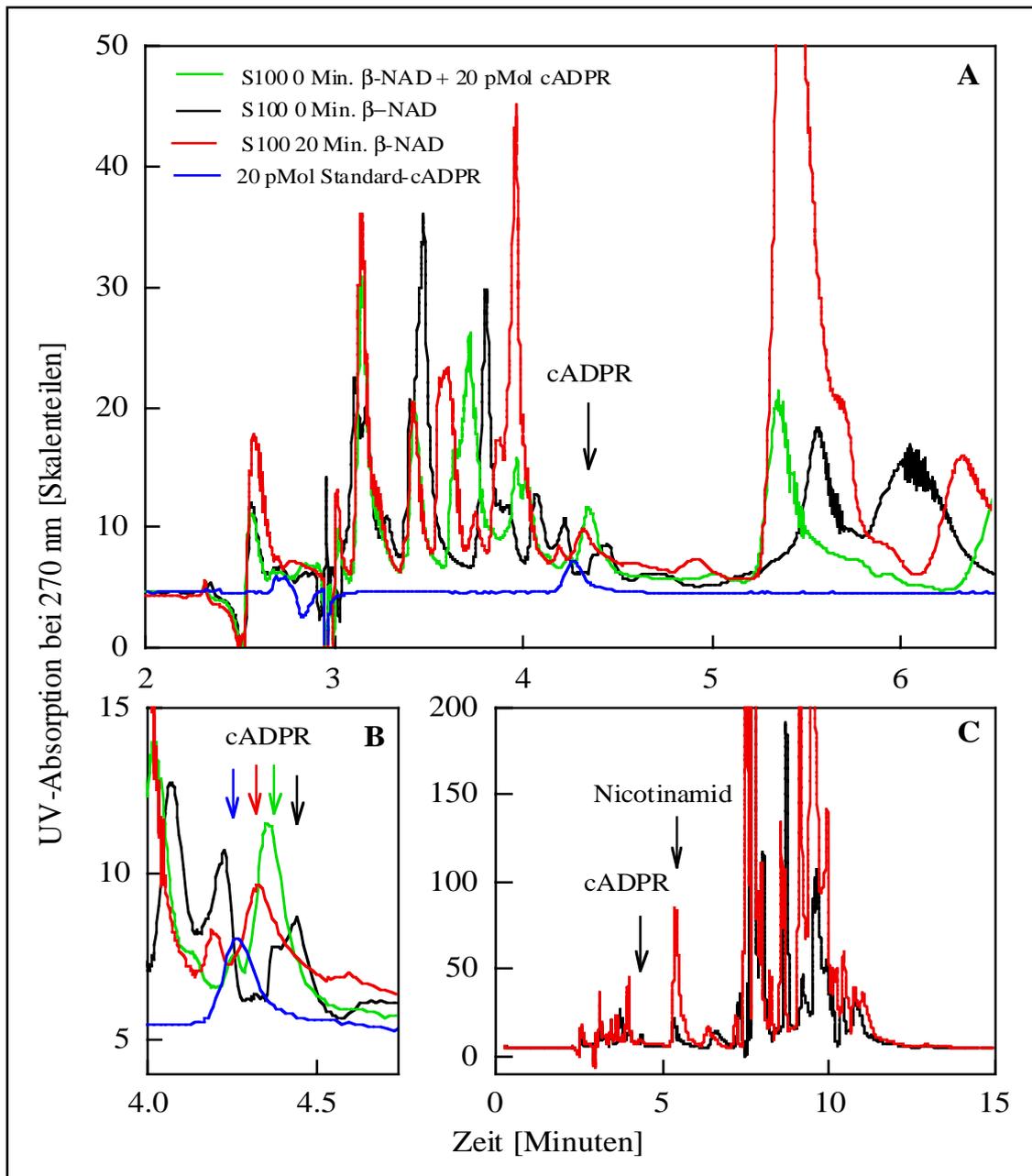


Abb. 4.1: HPLC-Enzymassay auf ADPRC-Aktivität unter Verwendung von β -NAD als Substrat und UV-Detektion zum Nachweis der Nukleotide. Entsprechend der Darstellung in Abschnitt 3.2.3 aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnener S100-Extrakt (2 mg/ml Protein in intrazellulärem Puffer pH 7,2; 300 μ l Ansatzvolumen) wurde nach einer Vorinkubation von 5 Min. bei 37 °C mit dem Substrat β -NAD (1 mM) versetzt und für 0 oder 20 Min. bei 37 °C inkubiert. Eine PCA-Extraktion der Nukleotide und die weitere Probenaufarbeitung für den HPLC-Enzymassay wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.6.1 durchgeführt. Die Analyse der Proben durch RP-HPLC (Flußrate 1 ml/Min.) erfolgte entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.6.2 an einer HyPurity Elite C18-Säule mit angeschlossenen UV-Detektor ($\lambda = 270$ nm). Die auf die Säule injizierten Proben (100 μ l) entsprachen jeweils einem Drittel der ursprünglichen Reaktionsansätze. Dargestellt sind Ausschnitte charakteristischer Chromatogramme von Proben, die für 0 oder 20 Min. mit β -NAD (1 mM) inkubiert worden waren (A), in einem Overlay mit Chromatogrammen von Standard-cADPR (20 pMol) und eines Aliquots der für 0 Min. mit β -NAD inkubierten Probe, die zur Identifizierung des cADPR-Peaks mit Standard-cADPR (20 pMol) versetzt worden war. In B) wurde der Ausschnitt des Overlays (A) vergrößert dargestellt, in dem cADPR eluierte. Vollständige Chromatogramme der für 0, bzw. 20 Min. mit β -NAD inkubierten Proben sind zur Übersicht in C) als Overlay gezeigt.

Bei diesem handelt es sich um ein Substrat, das häufig zum fluorimetrischen Nachweis von NADGH-Aktivität [z. B. *Yost et al.* 1981, *Zhang et al.* 1995 und *Cockayne et al.* 1998] und ADP-Ribosyltransferaseaktivität [*Klebl & Pette* 1996] verwendet wird. Eine Nutzung des Substrates ϵ -NAD durch ADPRCs/NADGHs für die Synthese von cADPR (ϵ -cADPR) war unter Verwendung von rekombinantem CD38 und der gereinigten ADPRC aus *A. californica* in der Literatur bereits belegt [*Graeff et al.* 1996]. Allerdings erschienen Trenneigenschaften und Auflösung der in dieser Publikation verwendeten HPLC-Methode nicht optimal.

Um erste Hinweise auf die Eignung dieses Substrates für die Etablierung eines HPLC-Enzymassays zum Nachweis von ADPRC-Aktivität in T-Lymphozyten zu erhalten, wurde zunächst der katalytische Umsatz von ϵ -NAD durch unterschiedliche, mit Hilfe differentieller Zentrifugation aus Homogenaten von Jurkat T-Lymphozyten gewonnene, subzelluläre Fraktionen mit potentieller ADPRC-/NADGH-Aktivität im fluorimetrischen Enzymassay überprüft (Abb. 4.2). Als Testfraktionen wurden dabei die Membranfraktionen P2 (2000•g-Pellet), P10 (gewaschenes 10.000•g-Pellet) und P100 (gewaschenes 100.000•g-Pellet), die cytosolische Fraktion S100 (100.000•g-Überstand) sowie die Waschfraktionen PS10 und PS100 verwendet. Bei den Waschfraktionen der P10- (PS10) und P100-Membranen (PS100) handelte es sich jeweils um für basische, cytosolische und/oder membranassoziierte Proteine angereicherte Fraktionen [*Lambert* 1995]. Als Positivkontrolle für den Assay wurde die käuflich erworbene, gereinigte ADPRC aus *A. californica* (1 μ g) verwendet, deren ADPRC-Aktivität die NADGH-Aktivität bei Weitem übertrifft [*Lee & Aarhus* 1991, *Hellmich & Strumwasser* 1991]. Wie in Abb. 4.2 A gezeigt, wurde das Substrat ϵ -NAD durch die ADPRC aus *A. californica* sehr rasch umgesetzt und das Reaktionsgleichgewicht bereits ca. 200 Sek. nach Zusatz des Substrates erreicht. Wie weiter unten anhand von RP-HPLC-Chromatogrammen dargestellt (Abb. 4.4), war das zugesetzte ϵ -NAD nach Eintritt des Reaktionsgleichgewichts vollständig zu den Produkten ϵ -cADPR (Hauptprodukt) und ϵ -ADPR (Nebenprodukt) metabolisiert. Auch in allen subzellulären Fraktionen der T-Lymphozyten, mit Ausnahme der Waschfraktion PS10, die als einzige Fraktion keine Enzymaktivität aufwies, konnte in unterschiedlichem Ausmaß Substratumsatz festgestellt werden (Abb. 4.2 B). Überraschend, insbesondere in Anbetracht des fehlenden Substratumsatzes in der Waschfraktion PS10, war der hohe Substratumsatz in der Waschfraktion PS100. Die hohe katalytische Aktivität dieser Fraktion stützte die Hypothese, daß es in den Lymphozyten neben dem Transmembranprotein CD38 zusätzlich eine lösliche, eventuell aber dennoch membranassoziierte Form der ADPRC/NADGH gibt.

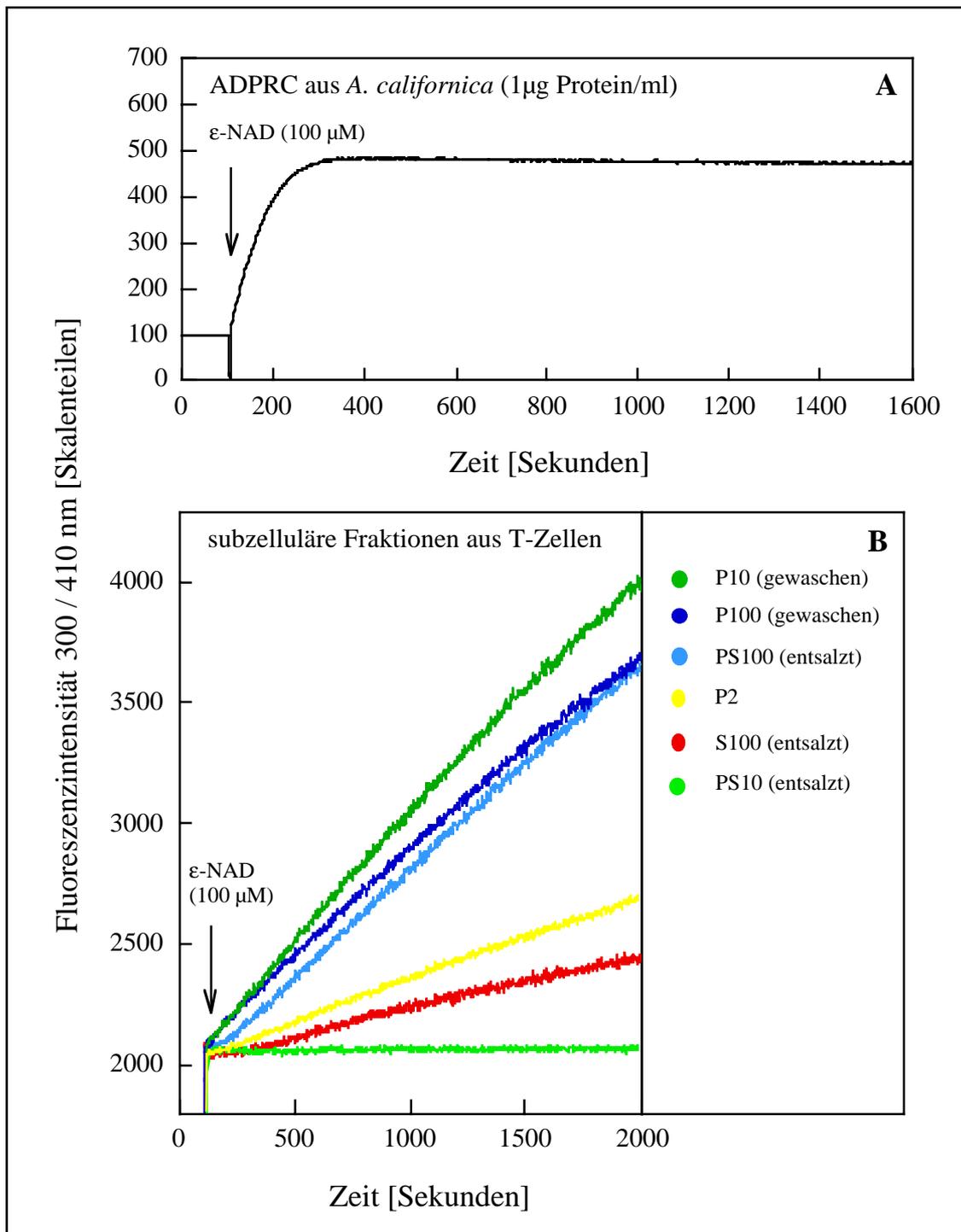


Abb. 4.2: Kontinuierliche fluorimetrische ϵ -NAD-Enzymassays mit unterschiedlichen Präparationen von ADPRCs/NADGHs. Die ADPRC aus *A. californica* (1 μg Protein, A) oder entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.3 aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen subzellulären Fraktionen (B) wurden in einem Assayvolumen von 1 ml in intrazellulärem Puffer (pH 7,2) ohne Detergenz für 33 Min. (2000 Sek.) bei RT mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μM) im kontinuierlichen fluorimetrischen Enzymassay vermessen (Abschnitt 3.2.7.1; $\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 410 \text{ nm}$). Die Mengen an eingesetztem Protein [μg] waren dabei wie folgt: gewaschene P10-Membranen 200, gewaschene P100-Membranen 500, Waschfraktion PS10 1000, Waschfraktion PS100 500, P2-Fraktion 500, cytosolische Fraktion S100 1000. Die ADPRC aus *A. californica* (A), die eine sehr hohe katalytische Aktivität mit entsprechend starker Fluoreszenzentwicklung aufwies, wurde bei erniedrigter Messempfindlichkeit vermessen, um während der gesamten Dauer der Messung innerhalb des dynamischen Messbereichs des Gerätes zu bleiben. Daher weist diese Messung im Vergleich zu den anderen Messungen (B) eine erheblich abweichende Skala der Y-Achse auf.

Den Daten zufolge ist diese mit einem in der P100-Fraktion enthaltenen Membransystem, möglicherweise der PM, nicht jedoch mit in der P10-Fraktion angereicherten Membranen assoziiert. Bei diesem Enzym könnte es sich um die, bzw. eine cytosolische Variante der ADPRC/NADGH handeln, die eventuell in Abhängigkeit von einer Stimulation zwischen dem Cytoplasma und der cytosolischen Seite der PM transloziert.

Da ϵ -NAD potentiell als Substrat verschiedener enzymatischer Reaktionen dient, war anhand der fluorimetrischen Enzymassays prinzipiell keine Aussage über die entstandenen Reaktionsprodukte und den Typ der beteiligten Enzyme (z.B. ADPRCs/NADGHs) möglich. Zum Zweck der Identifikation und eines quantitativen Nachweises der entstandenen Produkte war daher zusätzlich eine RP-HPLC-Analyse der Reaktionsansätze erforderlich. Zur Gewinnung der ϵ -Adeninnukleotide aus den Ansätzen wurde anfangs, wie etabliert [*da Silva et al.* 1998a] und in Abschnitt 3.2.6.1 beschrieben, eine PCA-Extraktion vorgenommen. Zur Evaluierung der Extraktionsbedingungen wurde die Extraktion zunächst mit dem ϵ -NAD-Standard (50 nmol, Abb. 4.3 A) und, da ϵ -cADPR käuflich nicht erhältlich ist, mit Aliquots von Assayansätzen der ADPRC aus *A. californica* (Abb. 4.2 A) durchgeführt, die, bei Annahme eines vollständigen Substratumsatzes während des Assays, näherungsweise einer Stoffmenge von 1 nMol ϵ -cADPR entsprachen. Zur Abtrennung des Enzyms wurden die Ansätze vor Durchführung der RP-HPLC-Analyse (Abb. 4.3 B) über Membranen mit 10 kDa MWCO ultrafiltriert. Übereinstimmend mit publizierten Daten [*Klebl & Pette* 1996] enthielt kommerziell erworbenes ϵ -NAD bei Analyse durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion regelmäßig eine in Abhängigkeit von der verwendeten Charge unterschiedlich stark ausgeprägte Verunreinigung mit ϵ -ADPR (Abb. 4.3 A). Da ϵ -ADPR verglichen mit ϵ -NAD aufgrund der Abspaltung von Nicotinamid jedoch ca. 10-fach stärker fluoresziert, erscheint die Verunreinigung des ϵ -NAD mit ϵ -ADPR aufgrund der Analysedaten erheblich größer als sie bei Betrachtung der Stoffmengen tatsächlich ist [*Klebl & Pette* 1996]. Dementsprechend war die Verunreinigung des ϵ -NAD-Standards mit ϵ -ADPR bei Analyse durch RP-HPLC mit UV-Detektion auch analytisch deutlich geringer ausgeprägt. Bei der quantitativen Auswertung von Daten wurde die Kontamination mit ϵ -ADPR in jedem Fall berücksichtigt, indem die in Proben bestimmte Stoffmenge an ϵ -ADPR um die am gleichen Versuchstag über die Analyse eines Aliquots von ϵ -NAD ermittelte, in dem Substrat bereits vorhandene Menge an ϵ -ADPR korrigiert wurde. In Abb. 4.3 (B, C und E, F) ist anhand von RP-HPLC-Chromatogrammen ein charakteristisches Ergebnis der Extraktion von ϵ -NAD (B, C) und ϵ -cADPR (E, F) unter Verwendung von 3M oder 0,3M PCA gezeigt.

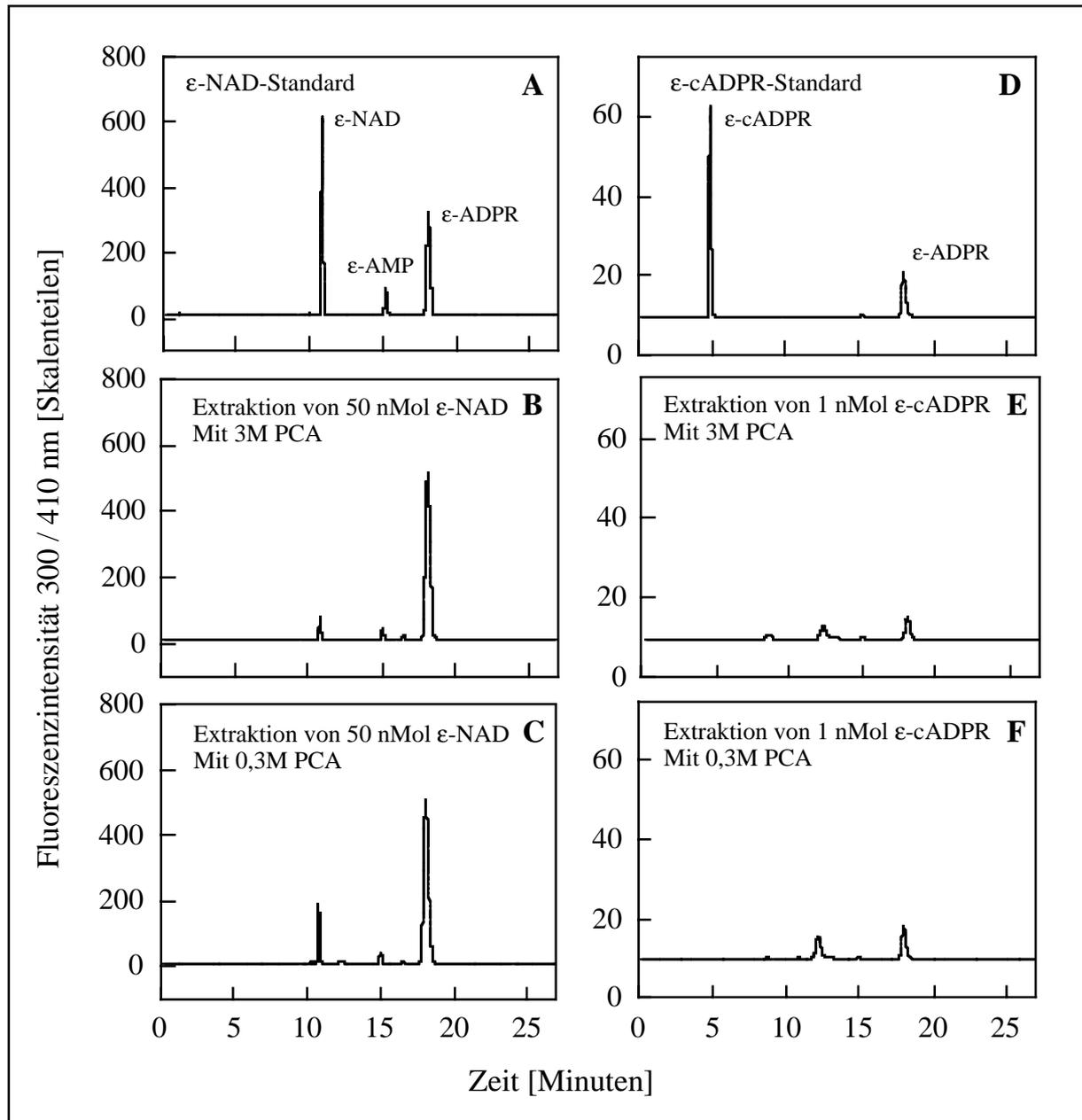


Abb. 4.3: Degradation von ϵ -NAD und ϵ -cADPR durch PCA-Extraktion. Im oberen Teil der Abbildung (A,D) sind charakteristische RP-HPLC-Chromatogramme des käuflich erworbenen ϵ -NAD (50 nMol, A) und des cyclischen Nukleotids ϵ -cADPR (1 nMol, D) gezeigt. Letzteres wurde mit Hilfe der ADPRC aus *A. californica* (1 μ g/ml Protein) aus ϵ -NAD (100 μ M) synthetisiert. Die HPLC-Analyse injizierter Proben (100 μ l) unter Ionenpaarbedingungen erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/Min. an einer Hypersil BDS C18-Säule (3.2.8.1). Dabei wurden die ϵ -Adeninnukleotide durch Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{EX} = 300$ nm, $\lambda_{EM} = 410$ nm) nachgewiesen. In B), C), E) und F) wurden die gleichen Mengen an ϵ -NAD (B, C), bzw. ϵ -cADPR (E, F), die zu diesem Zweck in einer artifiziellen Proteinlösung, nämlich in intrazellulärem Puffer (pH 7,2) mit 2 mg/ml BSA aufgenommen wurden, vor Durchführung der HPLC-Analyse entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.6.1 mit 3M PCA (B, E) oder 0,3M PCA (C, F) extrahiert. Während ϵ -NAD insbesondere bei reduzierter Menge an PCA (0,3M) zumindest partiell extrahierbar war (B,C), wurde ϵ -cADPR unter beiden Extraktionsbedingungen komplett zerstört (E,F). Wie in A) gezeigt, war der ϵ -NAD-Standard bereits mit gewissen Mengen an ϵ -Ado, ϵ -AMP und ϵ -ADPR kontaminiert. Da die Fluoreszenz der Kontaminanten aufgrund des Fehlens der Nicotinamidgruppe jedoch 10-fach höher als die von ϵ -NAD selbst ist, ist die Kontamination an Stoffmenge erheblich geringer.

Die bereits für cADPR unter den sauren Extraktionsbedingungen nachgewiesene Instabilität, die regelmäßig in Ausbeuteverlusten von über 50% resultierte, traf insbesondere für das cyclische ϵ -cADPR (Abb. 4.3 D), zusätzlich aber auch für die linearen ϵ -Nukleotide ϵ -NAD und ϵ -ADPR (Abb. 4.3 B) in noch verstärktem Umfang zu, indem es zu einer vollständigen Zerstörung ihrer fluoreszierenden Base kam. Obwohl eine 10-fache Reduktion der Konzentration an PCA die Ausbeute an ϵ -NAD zumindest partiell verbesserte (Abb. 4.3 C), wurde ϵ -cADPR auch unter diesen Bedingungen vollständig zerstört (Abb. 4.3 F). Demzufolge war die PCA-Extraktion zur Gewinnung von ϵ -Adeninnukleotiden aus Reaktionsgemischen als ungeeignet anzusehen. Als Alternativmethode zur Abtrennung des Proteins aus den Reaktionsansätzen wurde als nächstes Ultrafiltration über eine YM-Membran in Erwägung gezogen. Dazu wurden die Assayansätze (Volumen 1 ml) nach Ablauf einer definierten, exakt 30 Min. betragenden Inkubation mit dem Substrat bei 4 °C über Centrex UF-2-Konzentratoren (10 kDa MWCO/Millipore oder Schleicher & Schuell) zentrifugiert. Die lange Zentrifugationsdauer war notwendig, um auch eine effektive Ultrafiltration konzentrierterer (bis zu 1 mg/ml Protein) oder inhomogener Proteinextrakte (Reaktionsansätze von Membranfraktionen) zu erzielen. Mit dieser Extraktionsmethode wurden überraschend gute Ausbeuten von $87 \pm 3\%$ für ϵ -cADPR ($n = 4$), $89 \pm 3\%$ für ϵ -NAD ($n = 3$) und $85 \pm 4\%$ für ϵ -ADPR ($n = 3$) erreicht. Daher wurde sie in allen weiteren Experimenten routinemäßig eingesetzt. Um auch bei Nutzung dieser Methode den Substratumsatz möglichst effektiv stoppen zu können, wurden zwei Bedingungen verglichen: Die Proben wurden direkt nach Ablauf der Inkubation mit dem Substrat entweder zunächst in ein Eisbad (ca. 0 °C) oder in ein Eis-Salzbad (ca.-5 °C) gestellt und dann, in der Regel sofort, wie oben beschrieben ultrafiltriert. Dabei zeigte sich, daß ein Herunterkühlen der Proben bei -5 °C den enzymatischen Umsatz wesentlich effektiver stoppt als ein Herunterkühlen der Proben bei 0 °C (Tab. 4.1). Die erstgenannte Bedingung erlaubte es zusätzlich, die Proben für eine Weile stehen zu lassen, bevor die Ultrafiltration durchgeführt wurde (Tab. 4.2). Zur weiteren Etablierung des ϵ -NAD-HPLC-Enzymassays wurden dann käuflich nicht erhältliche ϵ -Adeninnukleotid-Standards enzymatisch synthetisiert und zum Nachweis ihrer Identität durch Hitzebehandlung oder katalytischen Umsatz ineinander überführt. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der ADPRC aus *A. californica* zunächst, wie oben bereits beschrieben, ϵ -cADPR in größerer Menge hergestellt (1 μ g/ml Protein, 100 μ M ϵ -NAD, 5 Min., Inkubation bei RT unter Schütteln), das Enzym durch Ultrafiltration von den Nukleotiden des Reaktionsansatzes getrennt (s.o.) und die Reaktionsprodukte in einem Aliquot (100 μ l), wie weiter unten beschrieben, durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion analysiert.

Tab. 4.1: Effekt der Kühltemperatur auf die Genauigkeit der Bestimmung von ADPRC- und NADGH-Aktivität in P10-Extrakten

Exp. Typ	Eisbad (ungefähr 0 °C)		Eisbad (ungefähr -5 °C)	
	ϵ -cADPR [nMol/mg Protein]	ϵ -ADPR [nMol/mg Protein]	ϵ -cADPR [nMol/mg Protein]	ϵ -ADPR [nMol/mg Protein]
A1	14,77	161,18	11,08	113,59
A2	15,94	174,31	11,44	116,77
A3	18,31	195,00	11,26	115,88
A4	19,03	205,59	11,12	113,83
MW \pm SD	17,11 \pm 1,99	184,02 \pm 20,02	11,23 \pm 0,17	115,02 \pm 1,56

Anmerkung: P10-Membranen (0,1 mg Protein) wurden parallel in 4 Einzelexperimenten (A1-A4) bei RT und unter Schütteln in einem Assayvolumen von 1 ml intrazellulärem Puffer (pH 7,2) für 2000 Sek. mit ϵ -NAD (Endkonzentration 100 μ M) inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben entweder in ein normales Eisbad oder in ein Eis-Salzbad platziert wurden. Die Proben wurden dann parallel durch Zentrifugation für 2 Min. bei 12.000 rpm und 4 °C (Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K) vorgereinigt. Bestandteile hohen Molekulargewichts wurden anschließend aus den Probenüberständen entfernt, indem sie parallel für exakt 30 Min. bei 3000•g und 4 °C über Centrex UF-2-Konzentratoren (10 kDa MWCO) zentrifugiert wurden (3.2.7.1). Aliquots der Ultrafiltrate (100 μ l) wurden durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion analysiert (3.2.8.1). Die unterschiedlichen Gesamtaktivitäten in dem dargestellten Experiment sind in der Verwendung unterschiedlicher P10-Präparationen für die beiden Telexperimente begründet.

Tab. 4.2: Effekt der Kühlperiode bei -5 °C auf die Genauigkeit der Bestimmung von ADPRC- und NADGH-Aktivität in P10-Extrakten

Exp. Typ	Eissalzbad (ungefähr -5 °C)		
	Inkubation auf Eis [Min.]	ϵ -cADPR [nMol/mg Protein]	ϵ -ADPR [nMol/mg Protein]
B1	10	14,18	154,711
B2	7	13,68	149,41
B3	4	14,25	156,18
B4	1	13,82	151,18

Anmerkung: P10-Membranen (100 μ g Protein) wurden in 4 Einzelexperimenten (B1-B4) für 2000 Sek. bei RT und unter Schütteln in einem Assayvolumen von 1 ml intrazellulärem Puffer (pH 7,2) mit dem Substrat ϵ -NAD (Endkonzentration 100 μ M) inkubiert. Die Telexperimente wurden in einem Abstand von 3 Min. gestartet. Anschließend wurden die Telexperimente ebenfalls in einem Abstand von 3 Min. gestoppt, indem die Proben in ein Eis-Salzbad gestellt wurden, in dem sie für die in der Tabelle angegebenen Zeiten gelagert wurden. Alle Ansätze wurden dann parallel durch Zentrifugation für 2 Min. bei 12.000 rpm (Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K) vorgereinigt, bevor Bestandteile der resultierenden Überstände mit hohem Molekulargewicht durch Zentrifugation für exakt 30 Min. bei 3000•g und 4 °C über Centrex UF-2-Konzentratoren (10 kDa MWCO) abgetrennt wurden (3.2.7.1). Aliquots der Ultrafiltrate (100 μ l) wurden durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion analysiert (3.2.8.1).

Weitere Aliquots des Ultrafiltrates wurden bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und waren über Monate stabil. Die Identität des Hauptproduktes der Reaktion wurde wie in Abb. 4.4 gezeigt verifiziert. Charakteristische Chromatogramme verfügbarer ϵ -Adeninnukleotid-Standards sind in Abb. 4.4 für ein Standard-Gemisch (A) und für den ϵ -NAD-Standard alleine (B) dargestellt. Ein Umsatz von ϵ -NAD zu ϵ -cADPR war nur feststellbar, wenn die intakte ADPRC aus *A. californica* verwendet wurde (Abb. 4.4 D). Durch Hitzebehandlung für 10 Min. bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln wurde die Aktivität des Enzyms nahezu vollständig zerstört (Abb. 4.4 C). Um zu zeigen, daß es sich bei dem neu erschienenen Peak bei ca. 4,5 Min. tatsächlich um das cyclische Produkt ϵ -cADPR handelte, wurde ein Aliquot dieser Substanz nach einer für die Linearisierung von cADPR etablierten Methode [da Silva et al. 1998a] durch Hitzebehandlung für 2 Stunden bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln hydrolysiert, um sie zu ϵ -ADPR umzusetzen (Abb. 4.4 E). Zum Beweis der Identität von ϵ -ADPR wurde ein hydrolysiertes Aliquot von ϵ -cADPR (ϵ -ADPR) durch Zusatz von Nukleotid-Pyrophosphatase (PPase; $0,1\text{ U/ml}$; 15 Min. Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln) weiter zu ϵ -AMP metabolisiert (Abb. 4.4 F). Die Identität von auf diese Weise synthetisiertem ϵ -AMP wurde durch seine Koelution mit der käuflich erworbenen Standardsubstanz in der HPLC-Analyse verifiziert (Abb. 4.4 A).

Als nächstes wurden Extraktionsmethode und RP-HPLC-Analyse angewendet, um die ADPRC- und NADGH-Aktivität sowohl in verschiedenen, aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen, subzellulären Fraktionen als auch an der Oberfläche intakter Zellen zu ermitteln. Da die Trennung von Protein und ϵ -Adeninnukleotiden durch Ultrafiltration bei zellulären Extrakten viel Zeit beanspruchte (30 Min.) und die zu erwartende Enzymaktivität in den verschiedenen Fraktionen sehr unterschiedlich war, wurde für die Aktivitätsbestimmung ein später Zeitpunkt von 2000 Sek. (33 Min.) der Inkubation mit dem Substrat ($100\text{ }\mu\text{M}$ ϵ -NAD) gewählt. Wie aufgrund vorhergehender Daten erwartet [da Silva et al. 1998b] konnte durch die RP-HPLC-Analyse auf der Oberfläche intakter T-Lymphozyten sowohl ADPRC- als auch NADGH-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.5 A-D). Durch vorherige Hitzebehandlung der Zellen (10 Min., $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln) wurde ihre katalytische Aktivität komplett inhibiert. Auch in den beiden Membranfraktionen P10 und P100 wurden ADPRC- und NADGH-Aktivität detektiert (Abb. 4.5 E-H). Das Verhältnis von ADPRC- zu NADGH-Aktivität belief sich sowohl an der Oberfläche intakter Zellen als auch in den nicht solubilisierten Membranfraktionen regelmäßig auf einen Wert von ca. 1:10. Anders als in der cytosolischen S100-Fraktion wurde in den Membranfraktionen und an der Oberfläche intakter Zellen keine weitere Verstoffwechslung von ϵ -cADPR oder ϵ -ADPR festgestellt.

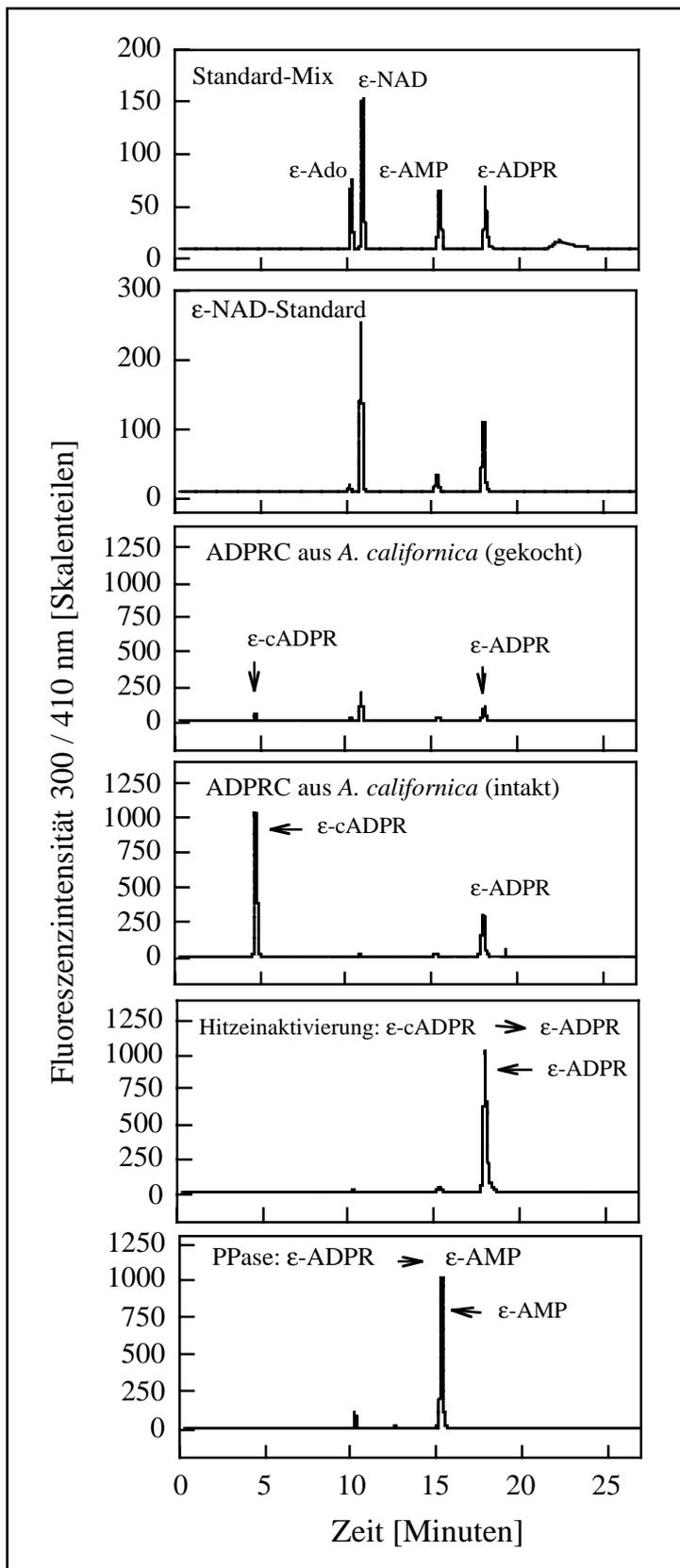


Abb. 4.4: HPLC-Detektion und Nachweis der Identität von ϵ -cADPR, das mit Hilfe der ADPRC aus *A. californica* aus ϵ -NAD synthetisiert wurde. Im oberen Teil der Abbildung sind Chromatogramme kommerziell erhältlicher ϵ -Adeninnukleotid-Standards gezeigt, die durch Auftrennung eines Standardgemisches (A), bzw. von ϵ -NAD alleine (B), an einer Hypersil BDS C18-Säule (Flußrate 1 ml/Min.) mit abgeschlossenem Fluoreszenzdetektor ($\lambda_{\text{EX}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 400 \text{ nm}$) erhalten wurden. In C und D ist die Synthese von ϵ -cADPR unter Verwendung der ADPRC aus *A. californica* (1 μg Protein/ml) in ihrer intakten Form (D) oder nach Hitzeinaktivierung (10 Min., 95 $^{\circ}\text{C}$, C) gezeigt. Ein neuer Peak erschien bei ca. 4,5 Min, sofern das intakte Enzym verwendet wurde. Durch Hitzebehandlung (2 Std., 80 $^{\circ}\text{C}$) wurde dieser Peak zu einer später, bei ca. 18 Min. eluierenden Substanz umgesetzt (E), die als ϵ -ADPR identifiziert wurde. Der ϵ -ADPR-Peak wurde durch Behandlung mit PPase (15 Min. 37 $^{\circ}\text{C}$) zu einem früher, bei ca. 15 Min. eluierenden Peak umgesetzt (F), der mit käuflich erworbenem ϵ -AMP koeluierte.

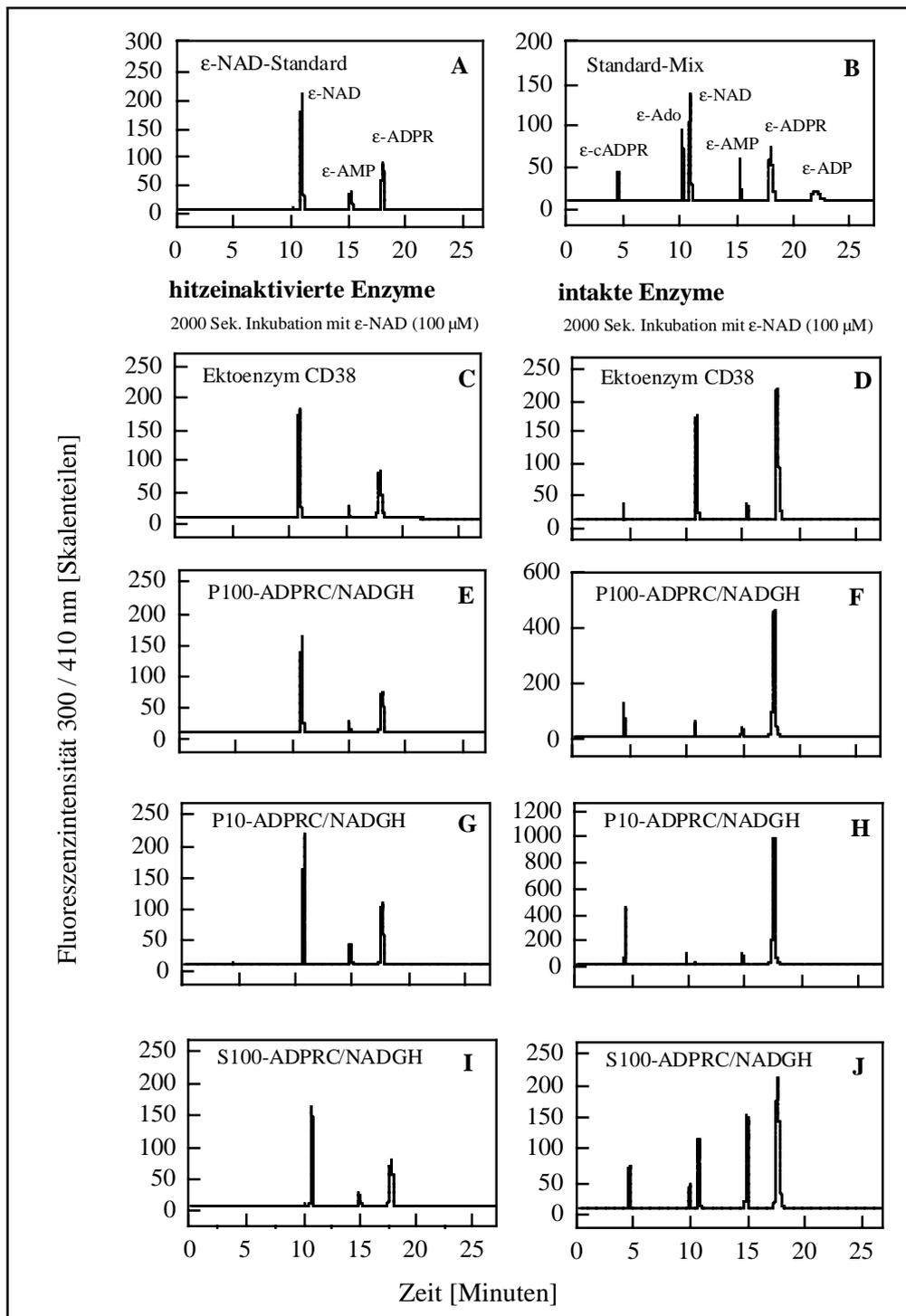


Abb. 4.5: Nachweis von ADPR- und NADGH-Aktivität an der Oberfläche intakter Zellen und in subzellulären Fraktionen von Jurkat T-Lymphozyten. Intakte Zellen ($2 \cdot 10^6$), S100-Extrakt (1 mg Protein) und P10- oder P100-Membranen (0,5 mg Protein) wurden in einem Assayvolumen von 1 ml für 2000 Sek. bei RT mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μ M) inkubiert. Zum Stop der Reaktion wurden die Proben auf Eis gestellt. Ansätze für P10 oder intakten Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation vorgereinigt (12.000 rpm, 4 °C, Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K). Protein und Nucleotide aller Ansätze wurden dann durch Ultrafiltration (30 Min., 4 °C, 3000•g, 10 kDa MWCO) getrennt (3.2.7.1). Aliquots (100 μ l) der Ultrafiltrate wurden bei einer Flußrate von 1 ml/Min. durch RP-HPLC an einer Hypersil BDS C18-Säule mit angeschlossenenem Fluoreszenzdetektor analysiert (3.2.8.1). Charakteristische Chromatogramme sind für den ϵ -NAD-Standard (A), ein ϵ -Adennukleotid-Gemisch (B), und für die Produkte von ADPRC-/NADGH-Assays mit intakten Zellen (C, D), P100-Membranen (E, F), P10-Membranen (G, H) und mit S100-Protein (I, J) gezeigt. Als Spezifitätskontrolle für die enzymatische Synthese von ϵ -cADPR und ϵ ADPR wurde jeder Enzymassay sowohl mit der intakten (D, F, H, J) als auch mit der hitzeinaktivierten Enzympräparation (10 Min., 95 °C; C, E, G, I) durchgeführt.

In der S100-Fraktion waren ebenfalls sowohl ADPRC- als auch NADGH-Aktivität nachweisbar, wie die beiden Peaks bei ca. 4,5 Min. (ϵ -cADPR) und ca. 18 Min. (ϵ -ADPR) zeigen (Abb. 4.5 I und J). Zusätzlich erschienene Peaks bei ca. 10 und 15 Min., die aufgrund ihrer Koelution mit den entsprechenden Standard-Substanzen als ϵ -Ado und ϵ -AMP identifiziert wurden, ließen in dieser Fraktion jedoch auf einen weiteren Metabolismus zumindest von ϵ -ADPR durch zelluläre/cytosolische PPase(n) und 5'-Phosphatase(n) schließen (Abb. 4.5 I und J). Dieser variierte in seinem Ausmaß von Präparation zu Präparation stark und führte während der Vermessung von S100-Rohextrakten nicht selten zu einem nahezu vollständigen Abbau von ϵ -ADPR. Wie an der Oberfläche intakter T-Lymphozyten wurde die ADPRC- und NADGH-Aktivität auch in allen subzellulären Fraktionen durch eine vorherige Hitzebehandlung vollständig unterbunden (Abb. 4.5 E, G, I). In Abb. 4.6 ist exemplarisch eine quantitative Auswertung der RP-HPLC-Ergebnisse dargestellt, die nach Vermessung aller einzelnen Fraktionen einer charakteristischen subzellulären Fraktionierung unstimulierter Jurkat T-Lymphozyten im ϵ -NAD-Enzymassay (Inkubation mit 100 μ M ϵ -NAD, 33 Min, RT) erhalten wurden. Die Gesamtaktivität der ADPRC war in P10-Fraktion, die schwere Membranen enthält, am höchsten (Abb. 4.6 A). Literaturangaben zufolge [Lambert 1995] ist diese Fraktion an Mitochondrien, aber auch an Lysosomen angereichert. Die mikrosomale P100-Fraktion, die leichte Membranen inklusive der PM beinhaltet [Lambert 1995], wies eine ca. 3,3-fach geringere Aktivität dieses Enzyms auf. Die mit einer ca. 4,6-fach, bzw. 5,7-fach geringeren ADPRC-Aktivität im Vergleich zur P10-Fraktion geringsten Gesamtaktivitäten wurden in der S100-Fraktion und in der P2-Fraktion gemessen (Abb. 4.6 A), von denen die letztere vermutlich noch Zelltrümmer des Homogenates enthält, vor allem aber auch an Zellkernen angereichert ist [Goodwin 1995]. Eine exakte Charakterisierung der zellulären Bestandteile der einzelnen Fraktionen, beispielsweise anhand der Aktivitätsmessung oder eines immunologischen Nachweises charakteristischer Leitenzyme, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht durchgeführt. Da die S100-Fraktion erwartungsgemäß die Hauptmenge an zellulärem Protein enthielt, fiel die spezifische Aktivität der ADPRC dieser Fraktion im Vergleich zu der in allen anderen Fraktionen wesentlich geringer aus (Abb. 4.6 C). Für die Verteilung sowohl der Gesamt- als auch der spezifischen NADGH-Aktivität auf die unterschiedlichen subzellulären Fraktionen ergab sich insgesamt ein vergleichbares Bild (Abb. 4.6 B, D). In der S100-Fraktion konnte die NADGH-Aktivität (gesamt und spezifisch) aufgrund der oben bereits erwähnten Verstoffwechslung von ϵ -ADPR zu ϵ -AMP und ϵ -Ado allerdings nicht exakt ermittelt werden.

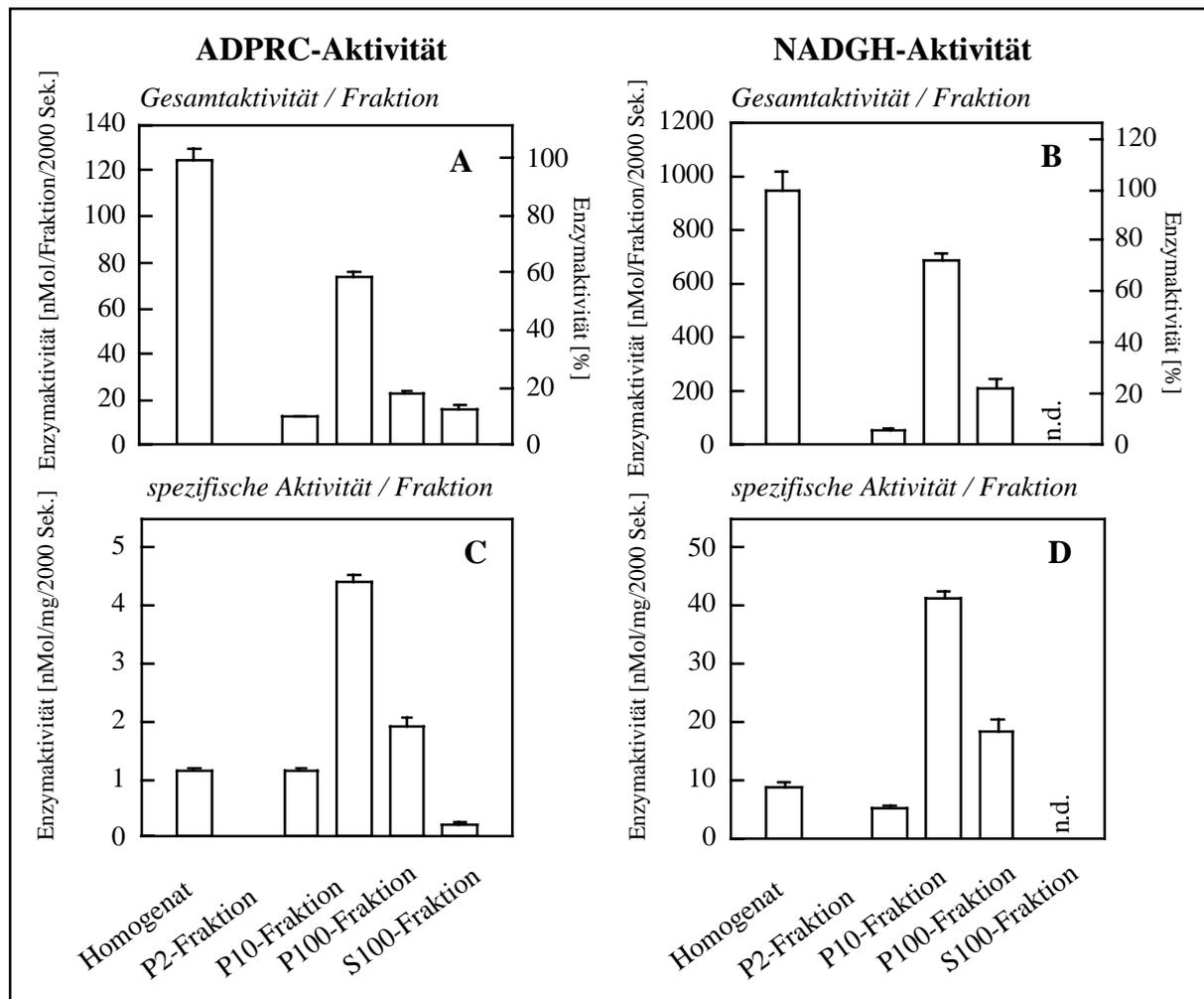


Abb. 4.6: Verteilung der ADPRC- und NADGH-Aktivität in subzellulären Fraktionen von Jurkat T-Lymphozyten. Aus Jurkat T-Lymphozyten entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.3 durch differentielle Zentrifugation gewonnene, subzelluläre Fraktionen wurden entsprechend der Beschreibung in den Abschnitten 3.2.7.1 und 3.2.8.1 sowie in der Legende zu Abb. 4.5 unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (Endkonzentration 100 μ M, Inkubation mit dem Substrat für 33 Min. bei RT) im RP-HPLC-Enzymassay vermessen und die synthetisierten Mengen an ϵ -cADPR und ϵ -ADPR quantitativ bestimmt. Die für den Assay eingesetzte Menge an Protein lag bei 500 μ g (P2-Fraktion, P10-Fraktion und P100-Fraktion) oder bei 1 mg (S100-Fraktion) in einem Assayvolumen von 1 ml intrazellulärem Puffer (pH 7,2). In A) und B) sind die Gesamtaktivitäten je Fraktion [nMol/2000 Sek.] für ADPRC (A) und NADGH (B) dargestellt. Dagegen sind in C) und D) die entsprechenden spezifischen Aktivitäten [nMol/mg/2000 Sek.] der ADPRC, bzw. NADGH der einzelnen Fraktionen gezeigt. Die präsentierten Daten stellen die Mittelwerte \pm SD dar, die durch Vermessung aller subzellulären Fraktionen einer charakteristischen Zellaufarbeitung/subzellulären Fraktionierung in jeweils zwei Parallelansätzen erhalten wurden. Die Enzymaktivität des Gesamthomogenates wurde aufgrund der Inhomogenität und Trübe dieser Fraktion nicht analytisch ermittelt, sondern als Summe der Einzelaktivitäten aller Fraktionen berechnet. n.d. = nicht detektierbar

Zusammenfassend gelang es, unter Verwendung des fluoreszenten Ersatzsubstrates ϵ -NAD, einen sensitiven, gut reproduzierbaren und verlässlichen RP-HPLC-Enzymassay zur quantitativen Bestimmung von ADPRC-Aktivität sowohl an der Oberfläche intakter Zellen als auch in subzellulären Fraktionen der Lymphozyten zu etablieren. Das Detektionslimit für ϵ -cADPR, ϵ -ADPR und ϵ -AMP lag jeweils bei ca. 1 pMol, das gerade noch zuverlässig detektierbar war. Das Detektionslimit der UV-Detektion bei 270 nm lag dagegen bei ca. 10

pMol cADPR [da Silva et al. 1998a]. Der Einsatz eines Fluoreszenzdetektors zum Nachweis von ϵ -Adeninnukleotiden erlaubte es, sowohl das Substrat (ϵ -NAD) als auch die Produkte seines enzymatischen Umsatzes ohne den Hintergrund zellulärer Nukleotide und anderer UV-absorbierender Substanzen zu bestimmen, die die Sensitivität der UV-Detektion bei der Vermessung von Zellextrakten weiter limitieren. Der hier beschriebene RP-HPLC-Enzymassays ermöglichte es zudem, neben der ADPRC-Aktivität während der selben RP-HPLC-Analyse zusätzlich auch die NADGH- und PPase-Aktivität der Zellextrakte exakt zu bestimmen. Gemessen an dem anfangs gesteckten Ziel erschien es daher realistisch anzunehmen, daß dieser HPLC-Enzymassay geeignet sein würde, um erstens ADPRC- und NADGH-Aktivität während proteinbiochemischer Reinigungsschritte zu verfolgen und zweitens die in unterschiedlichen subzellulären Fraktionen lokalisierten ADPRCs/NADGHs pharmakologisch charakterisieren zu können. Als Nachteil dieses Enzymassays war prinzipiell die Verwendung eines unphysiologischen Ersatzsubstrates zu betrachten, das sich sowohl in seinen Eigenschaften als Substrat als auch in kinetischen Eigenschaften von dem natürlichen Substrat (β -NAD) unterscheiden kann. Im ungünstigsten Fall kann es ADPRCs/NADGHs geben, die ϵ -NAD nicht als Substrat nutzen können und sich dadurch einem Nachweis mit dieser Methode entziehen. Als weiterer Nachteil ist prinzipiell zu werten, daß enzymatische Reaktionen allein durch Herunterkühlen möglicherweise nicht exakt zu definierten Zeitpunkten gestoppt werden können, ein Aspekt, der bei Analysen der Enzymkinetik problematisch gewesen wäre. Auf dem Hintergrund des Fehlens einer besseren methodischen Alternative erschienen diese Nachteile für die in dieser Arbeit angestrebten Ziele jedoch akzeptabel.

4.2 Untersuchung der Bedeutung der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 für die TCR/CD3-Komplex-vermittelte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$

Als Ergänzung zu einer vorangegangenen Publikation [da Silva et al. 1998b] wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Bedeutung des an der Oberfläche von T-Lymphozyten exprimierten Ektoenzym CD38, das sowohl ADPRC- als auch NADGH- und cADPR-Hydrolaseaktivität besitzt, für die nach Stimulation der Zellen über den TCR/CD3-Komplex vermittelte, intrazelluläre Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ noch einmal auf unabhängige Weise untersucht. Durch intensives Waschen der Zellen nach erfolgter Stimulation und vor Durchführung einer PCA-Extraktion der zellulären Nukleotide war in der oben zitierten Arbeit [da Silva et al. 1998b] gezeigt worden, daß nach extrazellulärer Stimulation mit β -NAD von Jurkat T-Lymphozyten extrazellulär synthetisiertes cADPR nicht in signifikanter

Menge ins Innere der Zellen gelangt und somit nicht die intrazellulär lokalisierten cADPR-sensitiven Calciumspeicher erreicht, denen eine essentielle Bedeutung bei der über den TCR/CD3-Komplex ausgelösten Signalkaskade beigemessen wird [Guse *et al.* 1999]. Diese Signalkaskade führt in einem wesentlichen Zweig über eine langanhaltende Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ zur Aktivierung von Effektorfunktionen und einer Stimulation der Proliferation der Lymphozyten. Um noch einmal auf andere Weise zu bestätigen, daß der enzymatischen Aktivität des Ektoenzym CD38 in dem oben dargestellten Zusammenhang keine funktionelle Bedeutung zukommt, wurde in der vorliegenden Arbeit als Strategie eine der über den TCR/CD3-Komplex vermittelten Stimulation der Zellen vorausgehende, effektive Inhibition des Ektoenzym CD38 gewählt. Die nachfolgend dargestellten Experimente wurden in Kooperation mit *Prof. P. Deterre* (Paris/Frankreich) und unter Mitwirkung von *K. Weber* (technische Assistentin, Arbeitskreis von *Prof. Guse*) durchgeführt.

4.2.1 Inhibition der ADPRC-/NADGH-Aktivität des Ektoenzym CD38

Zum Zweck der Inhibition des Ektoenzym CD38 an der Oberfläche intakter T-Lymphozyten wurden drei unterschiedliche Strategien eingesetzt und der Erfolg der Inhibition jeweils fluorimetrisch im GDP-Ribosylcyclaseassay (GDPRC-Assay, Fig. 4.7 A) oder unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD im RP-HPLC-Enzymassay (Fig. 4.7 B, C) überprüft. Ein erster methodischer Ansatz sah eine parakatalytische Inaktivierung (Inaktivierung während der Substratbindung) des Ektoenzym CD38 bei alkalischem pH vor [Bertheliet *et al.* 1998]. Dazu wurden in extrazellulärem Puffer (pH 8,5) zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommene intakte Lymphozyten für 60 Min. in Gegenwart einer sättigenden Konzentration des Substrates β -NAD (Endkonzentration 2 mM) vorinkubiert. Nach Durchführung mehrerer Waschschrte, die dazu dienen sollten, einen Überschuß an Substrat und/oder Inhibitoren zu entfernen und wieder physiologische Bedingungen (pH 7,4) herzustellen, wurde dann vergleichend die GDPRC-Aktivität an der Oberfläche der vorbehandelten Zellen und unbehandelter Kontrollzellen bestimmt. Wie in Abb. 4.7 (A) gezeigt, war nach Vorbehandlung der Zellen unter dieser Bedingung eine starke Inhibition der katalytischen Aktivität des Ektoenzym von knapp 80% feststellbar, die nicht auftrat, wenn das Substrat β -NAD während der Vorinkubationsphase nicht zugegen war (*Prof. P. Deterre*, persönliche Mitteilung). Ein zweites Protokoll, das die Vorinkubation von in extrazellulärem Puffer (pH 7,4) suspendierten Zellen für 60 Min. in Gegenwart von DTT (10 mM) sowie in Gegenwart oder Abwesenheit (letzteres nicht gezeigt; *Prof. P. Deterre*, persönliche Mitteilung) von β -NAD (2 mM) beinhaltete, zielte auf eine Inhibition des Ektoenzym durch das Aufbrechen

von Disulfidbrücken ab. Eine inhibitorische Wirkung der Reduktion in CD38 enthaltener Disulfidbrücken auf seine katalytische Aktivität wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben [Kontani *et al.* 1993, Zocchi *et al.* 1995, Bertheliet *et al.* 2000]. Bei Erreichen einer ebenfalls ca 80 %igen Inhibition der GDPRC-Aktivität an der Zelloberfläche der Lymphozyten erwies sich dieses Protokoll zur Inhibition von CD38 als vergleichbar effektiv (Abb. 4.7 A). Als dritte Variante wurde araF-NAD, ein Arabinose-Analogon von β -NAD [Sleath *et al.* 1991], zunächst in einer Endkonzentration von 200 nM, zur Inhibition des Ektoenzym eingesetzt. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen bei einem publizierten K_i -Wert von 1,69 nM für CD38 [Bertheliet *et al.* 1998] sehr wirksamen, kompetitiven und reversiblen Inhibitor von Säugetier-NADasen, der sich durch langsame Bindungseigenschaften auszeichnet [Muller-Steffner *et al.* 1992, Bertheliet *et al.* 1998]. Dieser Inhibitor stellte sich auch in den hier dargestellten Experimenten mit intakten T-Lymphozyten als sehr effizient dar, indem er, verglichen mit den anderen Bedingungen zur Inhibition von CD38, bei physiologischem pH (pH 7,4) und bei Verwendung in der niedrigsten Endkonzentration (nM *versus* mM) die effektivste Inhibition (Abb. 4.7 A) des Ektoenzym bewirkte. Da unter keiner der beschriebenen Bedingungen eine vollständige Hemmung der GDPRC-Aktivität an der Oberfläche der Zellen erreicht wurde, wurden mit dem wirksamsten Inhibitor (araF-NAD), der bei der eingesetzten Endkonzentration von 200 nM immerhin eine 92 %ige Inhibition dieser katalytischen Aktivität bewirkte, weitere Experimente unter Steigerung seiner Endkonzentration von 200 nM auf 500 nM und einer Verlängerung der Vorinkubationsphase von 30 Min. auf 60 Min. durchgeführt. Im Ergebnis konnte die Restaktivität des Ektoenzym dabei im Mittel von 8% auf 5% reduziert werden (Abb. 4.7 A). Gleichzeitig stieg jedoch die Standardabweichung und damit die Varianz der in einzelnen Experimenten erzielten Ergebnisse von 2% auf 15% an. Bei der Anzahl der durchgeführten Experimente (n=5) war die Verstärkung der inhibitorischen Wirkung daher nicht signifikant.

Alternativ zur Überprüfung des Erfolgs der Inhibition in dem experimentell weniger aufwendigen GDPRC-Assay (Fig. 4.7 A) wurde für den gleichen Zweck unter Nutzung des Substrates ϵ -NAD auch der RP-HPLC-Enzymassay eingesetzt (Fig. 4.7 B, C). Da mit diesem Assay zusätzlich zur ADPRC-Aktivität gleichzeitig auch die NADGH-Aktivität bestimmt werden kann, ist er potentiell dazu geeignet, zusätzliche Informationen zu liefern. Mit Hinblick auf weitere Experimente, in denen die ADPRCs/NADGHs der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen subzellulären Fraktionen pharmakologisch im Vergleich zum Ektoenzym CD38 charakterisiert werden sollten, sollte der RP-HPLC-Enzymassay außerdem im Vergleich zum fluorimetrischen GDPRC-Assay evaluiert werden.

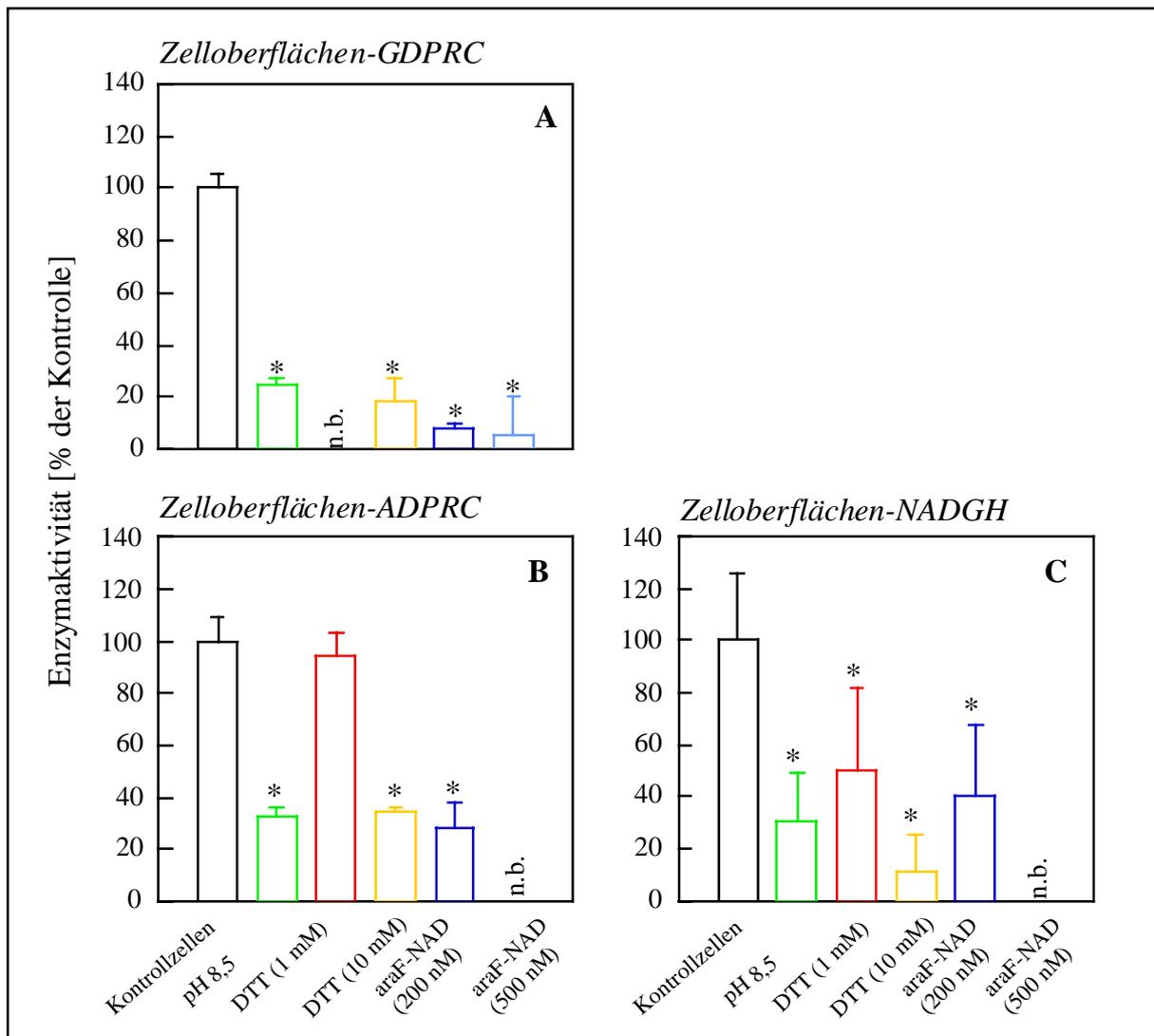


Abb. 4.7: Evaluierung der Inhibition der katalytischen Aktivität des an der Oberfläche intakter Jurkat T-Lymphozyten exprimierten Ektoenzym CD38 unter verschiedenen Bedingungen im fluorimetrischen GDPRC-Assay und im ϵ -NAD-basierten RP-HPLC-Enzymassay. In extrazellulärem Puffer (pH 7,4) suspendierte intakte Jurkat T-Lymphozyten ($1 \cdot 10^6/\text{ml}$) wurden zur Inhibition der katalytischen Aktivität des an der Zelloberfläche der Lymphozyten exprimierten Ektoenzym CD38 zunächst unter verschiedenen, nachstehend aufgeführten Bedingungen vorinkubiert: 60 Min. pH 8,5 in Gegenwart von β -NAD (2 mM); 30 Min. bei pH 7,4 in Gegenwart von DTT (10 mM) und β -NAD (2 mM); 30 Min. bei pH 7,4 in Gegenwart von araF-NAD (200 nM) oder 60 Min. bei pH 7,4 in Gegenwart von araF-NAD (500 nM), Teilabb. A, bzw. jeweils in Abwesenheit von β -NAD 30 Min. bei pH 8,5; 30 Min. bei pH 7,4 in Gegenwart von DTT (1 mM oder 10 mM) oder 30 Min. bei pH 7,4 in Gegenwart von araF-NAD (200 nM), Teilabb B und C. Als Vorbereitung für den fluorimetrischen GDPRC-Assay (A) wurden die Zellen im Anschluß an die Vorinkubation gewaschen, in 1 ml extrazellulärem Puffer (pH 7,4) resuspendiert und direkt danach, wie in Abschnitt 3.2.7.3 (A und B) beschrieben, vermessen. Bei Vermessung der Zellen unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD im RP-HPLC-Enzymassay (B, C) wurden die Zellen im Anschluß an die Vorinkubation ohne vorheriges Waschen direkt mit dem Substrat (100 μM) versetzt und für 33 Min. unter Schütteln/Rühren bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und die Überstände zur Abtrennung von Protein und anderen Bestandteilen mit hohem MW ultrafiltriert. Aliquots der Ultrafiltrate (100 μl) mit den löslichen Nukleotiden wurden dann durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion analysiert (3.2.7.1 A, B und 3.2.8.1). Dargestellt, in % der Aktivität unbehandelter Kontrollzellen, sind jeweils die Mittelwerte \pm SD für die Aktivität der GDPRC (A), der ADPRC (B) und der NADGH (C) an der Oberfläche der intakten Zellen. Diese berechneten sich jeweils anhand der Daten aus je Versuchsbedingung mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelexperimenten. Werte, die sich mit $p \leq 0,05$ signifikant vom jeweiligen Kontrollwert unterscheiden, sind mit einem Stern markiert. Die meisten der in A) dargestellten Daten wurden von Prof. P. Deterre zur Verfügung gestellt. n.b. = nicht bestimmt

Da das Waschen subzellulärer Fraktionen verglichen mit intakten Zellen experimentell aufwendig ist und viel Zeit beansprucht hätte, wurden die oben beschriebenen, für CD38 inhibitorischen Bedingungen für den RP-HPLC-Enzymassay auch bei Verwendung intakter Zellen in der Weise verändert, daß während der Präinkubationszeit in keinem Fall Substrat (β -NAD) zugesetzt und nach ihrem Ablauf auf die Durchführung der oben erwähnten Waschschriffe verzichtet wurde. Demzufolge wurden alle RP-HPLC-Enzymassays, in denen ϵ -NAD als Substrat verwendet wurde, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.1 (A und B) unter Fortbestehen der für CD38 inhibitorischen Bedingungen durchgeführt. Wie in Abb. 4.7 dargestellt, wurden unter diesen modifizierten Bedingungen und der Nutzung des RP-HPLC-Enzymassays vergleichbare Ergebnisse für die Inhibition der Aktivität der ADPRC an der Oberfläche der Zellen erzielt (Abb. 4.7 B). Tendenziell fiel die Inhibition von CD38 in diesen Experimenten unter allen Bedingungen etwas schwächer aus. Insbesondere auch nach einer Vorinkubation der Zellen bei alkalischem pH in Abwesenheit von Substrat (β -NAD) wurde jedoch eine wirksame Inhibition des Ektoenzym erreicht (Abb. 4.7 B). Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Gegenwart von Substrat für die Inhibition von CD38 bei alkalischem pH keine essentielle Voraussetzung darstellt, oder daß die zur Durchführung des Enzymassays zugesetzte Menge an Substrat (100 μ M ϵ -NAD) ohne eine Vorinkubationsperiode von 60 Min. genügt, um den parakatalytischen Mechanismus der Inaktivierung des Ektoenzym auszulösen. Ergänzend wurde festgestellt, daß bei einer 10-fachen Reduktion der Endkonzentration von DTT (von 10 auf 1 mM) keine signifikante Inhibition der ADPRC-Aktivität von CD38 mehr nachweisbar ist (Abb. 4.7 B). Im Gegensatz dazu wurde die NADGH-Aktivität des Ektoenzym interessanterweise in Gegenwart von 1 mM DTT bereits signifikant und in Gegenwart von 10 mM DTT deutlich stärker als die ADPRC-Aktivität inhibiert (Abb. 4.7 B, C). Dieser Befund deutet darauf hin, daß die NADGH-Aktivität in stärkerem Maße als die ADPRC-Aktivität von der Ausbildung einer auf Disulfidbrücken basierenden Sekundärstruktur des CD38-Moleküls abhängig ist. Durch alkalischen pH wurden beide Enzymaktivitäten in nahezu gleichem Umfang inhibiert. Die Substanz araF-NAD hemmte tendentiell etwas stärker die ADPRC-Aktivität (Abb. 4.7 B, C).

4.2.2 FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CD38 unter Kontroll- und für CD38 inhibitorischen Bedingungen

Publizierte, an verschiedenen Zelltypen, darunter auch an Lymphozyten erhobene Daten [Funaro *et al.* 1996, Zocchi *et al.* 1996] deuteten darauf hin, daß eine Reduktion der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 unter manchen experimentellen Bedingungen

möglicherweise auf eine durch Internalisierung bedingte Abnahme seiner Oberflächenexpression zurückgeführt werden kann. Zu den Bedingungen, unter denen Internalisierung von CD38 beschrieben wurde, gehören eine Quervernetzung des Oberflächenmoleküls durch CD38-spezifische Antikörper [Funaro *et al.* 1996], die Inkubation von Zellen in Gegenwart einer hohen (extrazellulären) Konzentrationen an Substrat (β -NAD) und die Behandlung von Zellen mit Disulfidbrücken reduzierenden Verbindungen wie DTT, β -ME und reduziertes Glutathion [Zocchi *et al.* 1996 und 1999, Chidambaram *et al.* 1999], von denen einige auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden (s.o.). Als Auslöser für die Internalisierung wurde eine unter den genannten Bedingungen auftretende Aggregation von CD38 vorgeschlagen. Von einigen Autoren wurde weiterhin spekuliert, daß eine durch Bindung von DTT oder Liganden vermittelte Internalisierung von CD38 gleichzeitig zu einer Verlagerung seiner enzymatischen Aktivität ins Innere der Zelle führt, auch wenn das katalytische Zentrum des Enzyms nach seiner endocytotischen Aufnahme in die Zelle im Lumen einer cytosolischen Vesikelfraktion und nicht direkt im Cytosol zu liegen kommt [Zocchi *et al.* 1999]. Um auszuschließen, daß Internalisierung von CD38 für den Verlust an ADPRC- und NADGH-Aktivität an der Zelloberfläche von Jurkat T-Lymphozyten verantwortlich ist, der in den oben beschriebenen Experimenten zur Inhibition des Ektoenzym festgestellt wurde, wurde deshalb parallel zu fluorimetrischen Bestimmungen der GPRC-Aktivität eine FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CD38 an unbehandelten Kontrollzellen und solchen Zellen durchgeführt, die zur Inhibition des Ektoenzym CD38 unter den verschiedenen Bedingungen vorinkubiert worden waren (Abb. 4.8). Die dabei erhaltenen Ergebnisse belegen eindeutig, daß die Expression von CD38 an der Oberfläche von Jurkat T-Lymphozyten durch eine Vorinkubation der Zellen bei physiologischem (pH 7,4) oder alkalischem (pH 8,5) pH, jeweils in Gegenwart des Substrates β -NAD, sowie durch eine Vorinkubation der Zellen bei physiologischem pH in Gegenwart von araF-NAD in keiner Weise beeinträchtigt wird. Sowohl eine Vorinkubation bei alkalischem pH als auch eine Vorinkubation in Gegenwart von araF-NAD bewirkte jedoch eine starke Inhibition der katalytischen Aktivität des Ektoenzym (Abb. 4.8). Im Gegensatz dazu hatte eine Vorinkubation der Zellen mit DTT (10 mM) tatsächlich einen drastischen Verlust (90%) der Oberflächenexpression von CD38 zur Folge (Abb. 4.8). Gegen diesen gewährte die gleichzeitige Gegenwart von β -NAD während der Präinkubationsphase aber einen bemerkenswerten (konformationellen) Schutz. Dieser zeigte sich darin, daß sich der durch DTT bewirkte Verlust der Oberflächenexpression von CD38 von 90% auf 40% reduzierte (Abb. 4.8). Wohlgermerkt wurde die katalytische Aktivität von CD38 durch die Gegenwart von β -NAD nicht in gleichem Maße geschützt (Abb. 4.8).

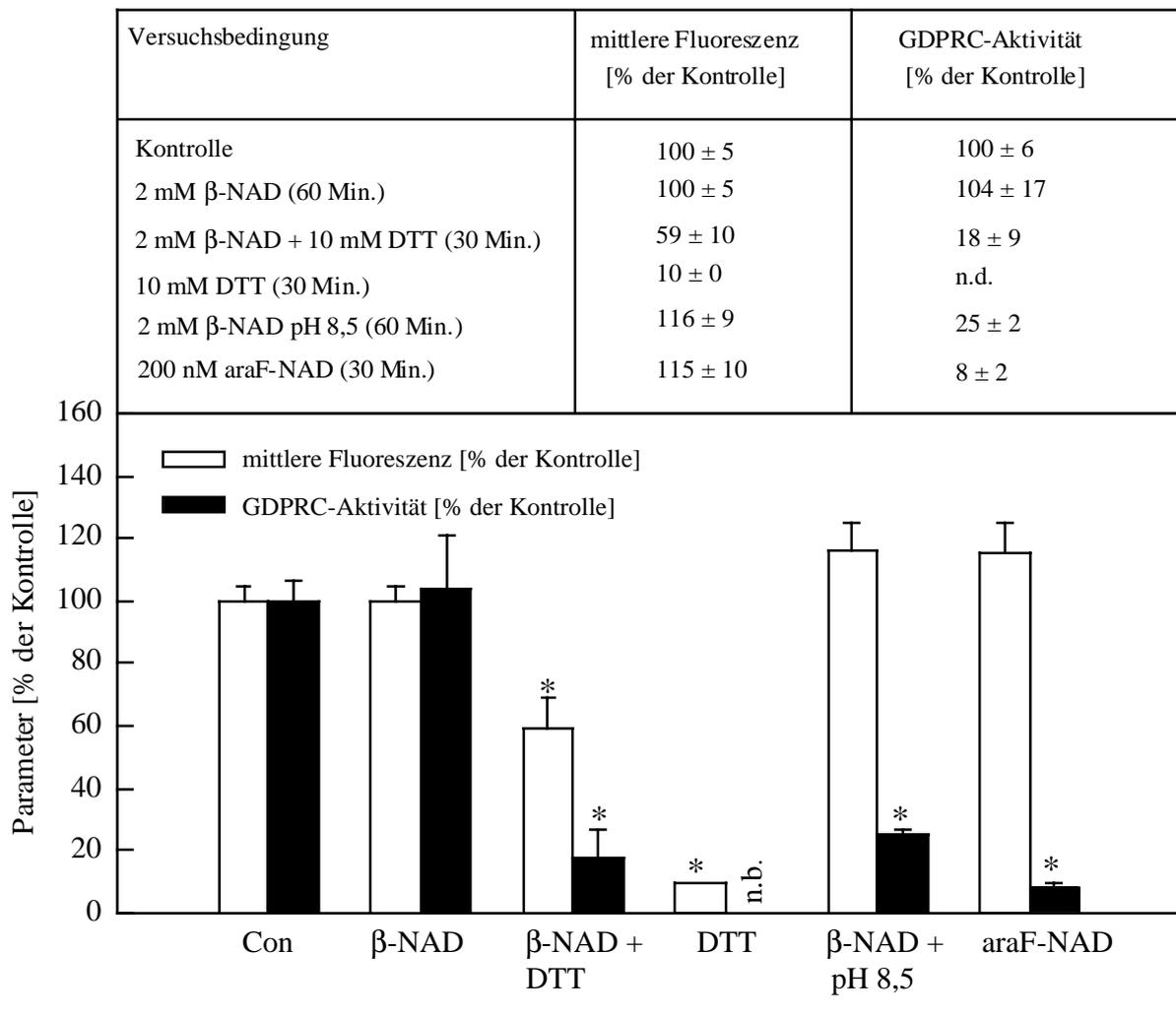


Abb. 4.8: FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CD38 in Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten ($1 \cdot 10^6/\text{ml}$) wurden zunächst in extrazellulärem Puffer unter nachstehenden Bedingungen vorinkubiert: 60 Min. bei pH 7,4 in Gegenwart von β -NAD (2 mM); 60 Min. bei pH 8,5 in Gegenwart von β -NAD (2 mM); 30 Min. bei pH 7,4 in Gegenwart von DTT (10 mM) sowie in Gegenwart oder Abwesenheit von β -NAD (2 mM) oder 30 Min. bei pH 7,4 in Gegenwart von araF-NAD (200 nM). Zur Vorbereitung einer Bestimmung der katalytischen Aktivität des an der Oberfläche der Zellen exprimierten CD38 im fluorimetrischen GDPRC-Assay wurden die Zellen anschließend in extrazellulärem Puffer (pH 7,4) gewaschen und dann wie im Text (4.2.1), in Abb. 4.7 und in Abschnitt 3.2.7.3 (A und B) beschrieben, weiterbehandelt. Zur Vorbereitung der Bestimmung der Oberflächenexpression von CD38 durch FACS-Analyse wurden die Zellen nach der Vorinkubation in RPMI-Medium mit 5% (v/v) FCS und 0,2% NaN_3 gewaschen und anschließend in 200 μl Medium resuspendiert. Anti-CD38 mAK (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder ein irrelevanter mAK (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Kontrollen nicht gezeigt) wurde dann zugesetzt und für 30 Min. im Dunklen bei 4 $^\circ\text{C}$ mit den Zellen inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen erneut, diesmal in PBS mit 0,2 % NaN_3 gewaschen und dann durch FACS analysiert. Gezeigt [% der Kontrolle] sind jeweils die Mittelwerte \pm SD, die in mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelexperimenten erhalten wurden. Con = unbehandelte Kontrollzellen, n.b. = nicht bestimmt. Werte, die sich mit $p \leq 0,05$ signifikant von den Kontrollwerten unterscheiden sind mit einem Stern markiert. Die in der Abbildung gezeigten Daten wurden freundlicherweise von Prof. P. Deterre (Paris/Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Als wesentlicher Punkt kann somit festgehalten werden, daß ein auf unterschiedliche Weise durch Inhibition oder Inaktivierung bewirkter starker Verlust der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 in Jurkat T-Lymphozyten nicht mit einem Verlust der Oberflächenexpression dieses Proteins korrelierte und daher nicht durch einen solchen erklärt werden

kann. Weiterhin stützen die hier dargestellten Daten in keiner Weise die Annahme, daß es unter den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, für das Ektoenzym inhibitorischen Bedingungen zu einer nennenswerten Verschiebung von katalytisch aktivem CD38 ins Zellinnere und einer dadurch bedingten Ermöglichung einer intrazellulären Synthese von cADPR kommt.

4.2.3 Bedeutung der katalytischen Aktivität des Oberflächenmoleküls CD38 für die intrazelluläre über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$

Um die funktionelle Bedeutung der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 für die über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ zu untersuchen, wurden fluorimetrisch ratiometrische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ an Suspensionen intakter, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 beladener, unbehandelter Jurkat-Lymphozyten im Vergleich zu Suspensionen von Jurkat-Lymphozyten, die unter den für CD38 inhibitorischen Bedingungen vorinkubiert worden waren, durchgeführt (Abb. 4.9). Jeweils nach einem Vorlauf von 100 Sek., während dessen die basale Fluoreszenz der Zellen aufgezeichnet wurde, wurden die Lymphozyten mit einem gegen den CD3-Komplex gerichteten monoklonalen Antikörper (OKT3, 10 µg/ml) stimuliert. Mit OKT3 stimulierte, unbehandelte Kontrollzellen reagieren charakteristischerweise mit einem biphasischen Ca^{2+} -Signal, das sich aus einer initialen Peakphase und einer nachfolgenden, langanhaltenden Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ zusammensetzt (Abb. 4.9 A). Während der Peakphase des Ca^{2+} -Signals steigt die $[Ca^{2+}]_i$ rasch, d.h. innerhalb weniger Sekunden, von einem basalen Wert von ca. 50-100 nM auf hohe Werte (zwischen 500 nM und 1 µM) an und fällt dann ebenfalls relativ rasch wieder auf niedrigere, gegenüber dem Basalwert jedoch weiterhin erhöhte Werte der $[Ca^{2+}]_i$ ab. In der Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ wird eine gegenüber dem Basalwert erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ (typischerweise ca. 200 bis 300 nM) über einen langen Zeitraum (Beobachtungszeitraum 15 Min.), der mehrere Stunden andauern kann, weitgehend konstant aufrechterhalten (Abb. 4.9 A). Auch nach Vorbehandlung der Zellen unter den verschiedenen für das Ektoenzym CD38 inhibitorischen Bedingungen wurde während der Peakphase der $[Ca^{2+}]_i$ ein gegenüber den Kontrollzellen unverändertes Ca^{2+} -Signal beobachtet (Abb.4.9 A, C). Während der Plateauphase des Ca^{2+} -Signals war die $[Ca^{2+}]_i$ von Zellen, die in Gegenwart von β -NAD (2 mM) entweder bei alkalischem pH (pH 8,5) oder mit DDT (10 mM) sowie von Zellen, die nur mit araF-NAD (200 für 30 Min. oder 500 nM für 60 Min.) vorbehandelt worden waren, in einigen Experimenten geringfügig, jedoch insgesamt nicht signifikant gegenüber unbehandelten Kontrollzellen erniedrigt (Abb. 4.9 A, C).

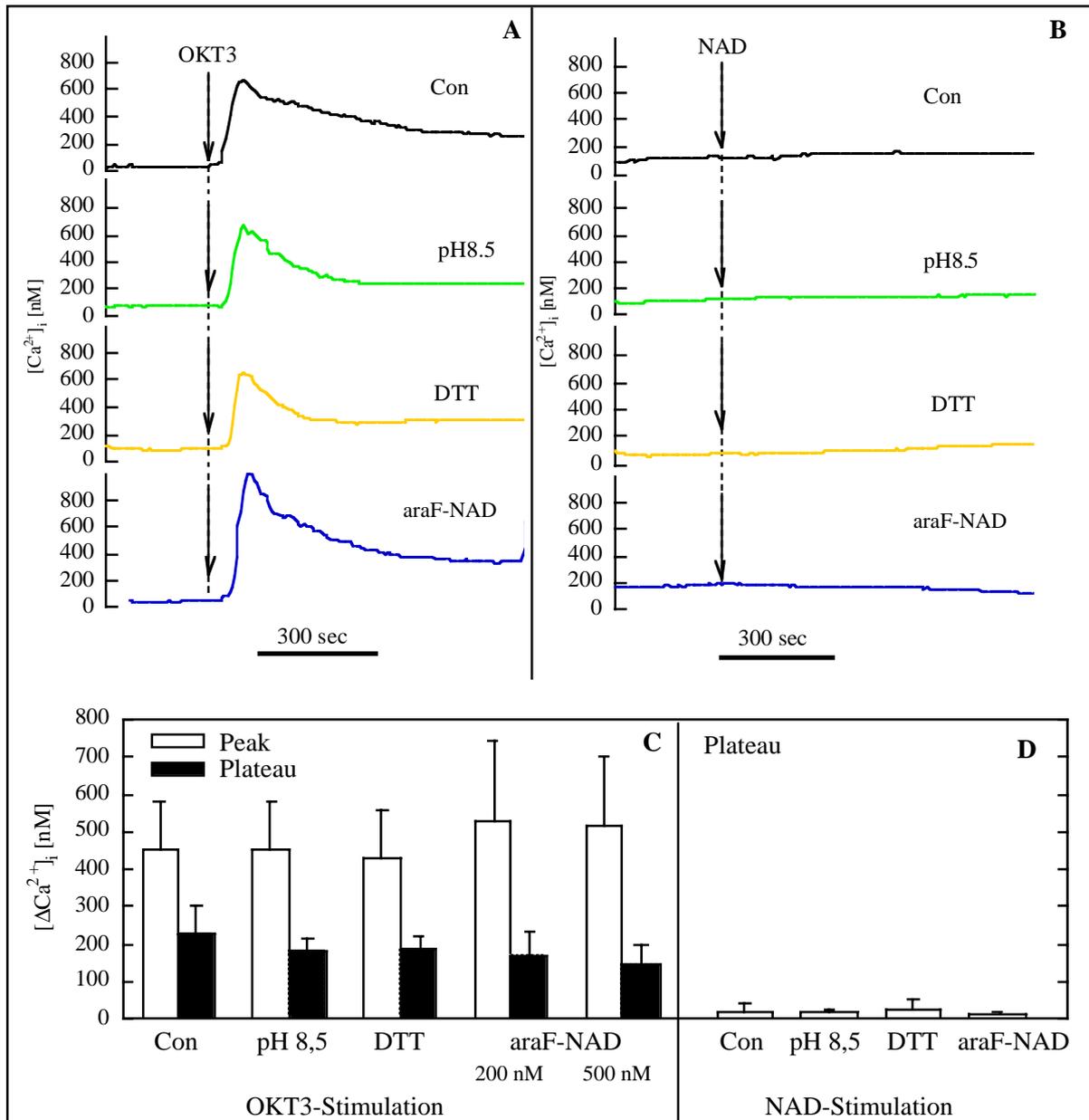


Abb. 4.9: Auswirkung der Inhibition der katalytischen Aktivität des Zelloberflächenmoleküls und Ektoenzym CD38 auf das TCR/CD3-Komplex-vermittelte intrazelluläre Ca^{2+} -Signal in Jurkat T-Lymphozyten. In extrazellulärem Puffer suspendierte Fura-2-beladene intakte Jurkat T-Lymphozyten ($1 \cdot 10^6$ /ml) wurden zur Inhibition des Ektoenzym CD38 1. in Gegenwart von β -NAD (1 mM) entweder für 30 Min. bei alkalischem pH (pH 8,5) oder bei physiologischem pH (pH 7,4) in Gegenwart von DTT (10 mM) oder 2. nur in Gegenwart von araF-NAD (200 nM für 30 Min. oder 500 nM für 60 Min.) vorinkubiert. Unbehandelte Kontrollzellen (Con) und vorbehandelte Zellen wurden dann gewaschen, in 1 ml extrazellulärem Puffer (pH 7,4) resuspendiert und anschließend unter Stimulation mit OKT3 (10 μ g/ml; A, C) oder mit β -NAD (1 mM; B, D) am Fluorimeter vermessen. Für alle oben genannten Bedingungen sind in A) (nach OKT3-Stimulation) und B) (nach β -NAD-Stimulation) exemplarisch charakteristische zeitliche Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ gezeigt. Der für die Vorbehandlung mit araF-NAD dargestellte zeitliche Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ wurde mit Zellen aufgenommen, die 30 Min. in Gegenwart von 200 nM araF-NAD vorinkubiert worden waren. In C) und D) sind die Mittelwerte \pm SD der $\Delta[Ca^{2+}]_i$, definiert als $[Ca^{2+}]_i$ zu einem definierten Zeitpunkt abzüglich der basalen $[Ca^{2+}]_i$, für die Peakphase ($t = 350$ Sek.) und die Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ ($t = 900$ Sek.) im Anschluß an die Stimulation mit OKT3 (C) und für $t = 900$ Sek. im Anschluß an die Stimulation mit β -NAD (D) dargestellt. Alle Messungen wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die hier präsentierten Daten wurden mir freundlicherweise von K. Weber und Prof. Guse zur Verfügung gestellt.

Zieht man in Betracht, daß durch Vorbehandlung der Zellen unter diesen Bedingungen Werte zwischen 80 und 95% für die Inhibition der katalytischen Aktivität des an der Oberfläche der Lymphozyten exprimierten Ektoenzym erreicht wurden (Abb. 4.7 A und Abb. 4.8), sprechen die hier in den fluorimetrischen Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ erhaltenen Daten deutlich gegen eine fundamentale Bedeutung der katalytischen Tätigkeit dieses Enzyms bei der Ausbildung des über den TCR/CD3-Komplex vermittelten intrazellulären Ca^{2+} -Signals. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten [da Silva et al. 1998b], hatte eine Stimulation der Lymphozyten mit extrazellulär appliziertem β -NAD (1 mM) im Gegensatz zu einer Stimulation mit OKT3 keinen signifikante Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 4.9 B, D). Auch wenn die Zellen zuvor unter den verschiedenen für das Ektoenzym CD38 inhibitorischen Bedingungen inkubiert worden waren, konnten nach einer Stimulation mit β -NAD keine signifikanten Unterschiede in ihrer $[Ca^{2+}]_i$ gemessen werden (Abb. 4.9 B, D).

Insgesamt erhärten die in diesem Abschnitt präsentierten Daten die zuvor aufgestellte Hypothese [da Silva et al. 1998b], daß der enzymatischen Aktivität des an der Zelloberfläche von Lymphozyten exprimierten Ektoenzym CD38 keine funktionelle Bedeutung bei der Entstehung intrazellulärer, durch Stimulation über den TCR/CD3-Komplex vermittelter Ca^{2+} -Signale zukommt, indem diese Signale nach effektiver Inhibition der ADPRC- und NADGH-Aktivität des Ektoenzym in unveränderter Weise auslösbar sind. Eine Stimulation mit β -NAD, dem physiologischen Substrat des Ektoenzym ist dagegen nicht geeignet, eine signifikant messbare Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ in Jurkat T-Lymphozyten auszulösen. Letzteres spricht gegen einen Transport des extrazellulär synthetisierten cyclischen Nukleotids und Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoffs cADPR ins Cytosol der Lymphozyten, das die für cADPR sensitiven Calciumspeicher enthält. Auch das Modell einer durch die Bindung von Substrat oder mittels einer Inkubation mit DTT durch die Reduktion von Disulfidbrücken bewirkten Internalisierung des katalytisch aktiven Ektoenzym wird durch die dargestellten Daten nicht gestützt. Insbesondere eine Inkubation unbehandelter Kontrollzellen, die das vollständig aktive Ektoenzym an ihrer Oberfläche exprimieren, mit dem natürlichen Liganden und Substrat β -NAD hatte keine Internalisierung zur Folge, die als Abnahme der Oberflächenexpression dieses Proteins nachweisbar war.

4.3 Charakterisierung der ADPRCs/NADGHs subzellulärer Fraktionen der Lymphozyten im Vergleich zum Ektoenzym CD38.

Ziel des dritten Teils der vorliegenden Arbeit war es die ADPRCs/NADGHs der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen subzellulären Fraktionen, insbesondere die ADPRC(s)/NADGH(s) der cytosolischen S100-Fraktion, im Vergleich zu dem an der Zelloberfläche der Lymphozyten exprimierten Ektoenzym CD38 zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden Western Blots zum Nachweis von CD38 und CD38-Immünpräzipitationen (IPs) unter Verwendung unterschiedlicher CD38-spezifischer polyklonaler Antiseren (pAKs) und monoklonaler Antikörper (mAKs) mit den verschiedenen Fraktionen durchgeführt. Weiterhin wurden die ADPRCs/NADGHs der subzellulären Fraktionen pharmakologisch charakterisiert. Zusätzlich wurden CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten vergleichend zu wt-T-Lymphoblasten der Maus nach Durchführung einer subzellulären Fraktionierung auf das Vorkommen und die Verteilung von ADPRC- und NADGH-Aktivität in den einzelnen Fraktionen untersucht.

4.3.1 Analyse der Expression und subzellulären Verteilung von CD38 in Jurkat T-Lymphozyten im Western Blot

Um Aufschluß über die Expression, subzelluläre Verteilung und das potentielle Vorkommen unterschiedlicher Varianten von CD38 in T-Lymphozyten zu erhalten, wurden zunächst Western Blot-Analysen unter Einsatz der in Hinsicht auf eine Synthese von ϵ -cADPR und/oder ϵ -ADPR katalytisch aktiven subzellulären Fraktionen P10, P100 und S100 sowie der P2-Fraktion durchgeführt, in denen zum Nachweis von CD38 verschiedene CD38-spezifische mAKs und pAKs verwendet wurden. Bei Vorkommen von Varianten des Ektoenzym CD38 wurde angenommen, daß diese sich sowohl in ihrem MW als auch in der subzellulären Verteilung von dem Ektoenzym unterscheiden könnten. Von einer cytosolischen Variante wurde beispielsweise angenommen, daß diese aufgrund des Fehlens der Transmembrandomäne und der für das Ektoenzym charakteristischen Glykosylierung ein niedrigeres MW aufweisen würde. Auch bei einem Vorkommen von in intrazellulären Membransystemen lokalisierten Varianten des Ektoenzym wurde davon ausgegangen, daß sie eine abweichende Größe aufweisen könnten. Zum einen wurde vermutet, daß sie aufgrund der intrazellulären Lokalisierung ebenfalls unglykosyliert wären. Zum anderen könnten sie ein Transportsignal enthalten, das ihre korrekte Anordnung innerhalb der Zelle sicherstellt. Als hinderlich bei der Etablierung eines zuverlässigen, für CD38 spezifischen Detektionssystems erwies sich bei der anfänglich eingesetzten, auf der Verwendung von Nitrocellulose-Membranen basierenden

Western Blot-Methode, eine massive Kreuzreaktion verschiedener, darunter auch gegen Serumproteine diverser Species präabsorbierter Zweitantikörper mit CD38. Diese hatte wiederholt zur Folge hatte, daß bei der Entwicklung von Blots mit oder ohne Einsatz des CD38-spezifischen Erstantikörpers jeweils das gleiche Ergebnis erhalten wurde. Nach Umstellung der Methode auf die Nutzung von PVDF-Membranen (Abschnitt 3.2.15) trat dieses Problem nicht mehr auf (Abb. 4.10 A). Während der Probenvorbereitung und ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE wurde grundsätzlich auf β -ME verzichtet, da von diesem gezeigt wurde, daß es zu einer massiven Agglutination von CD38 durch Selbstaggregation führen und dadurch ein vollständiges Verschwinden seines Monomers aus dem Gel bewirken kann [Guida *et al.* 1995]. Vergleichbare Effekte wurde auch bei Verwendung potentieller Ersatzsubstanzen wie DTT [Berthelie *et al.* 2000] und reduziertem Glutathion (GSH) [Zocchi *et al.* 1995] beobachtet. Als Ursache für das „klebrige“ Verhalten von CD38 in Gegenwart dieser Substanzen wurden 4 Leucin-Zipper-ähnliche Sequenzbereiche in seinem extrazellulären Bereich vorgeschlagen, die durch eine Reduktion von Disulfidbrücken im CD38-Molekül möglicherweise freigelegt werden [Guida *et al.* 1995].

In Abb. 4.10 (A-C) sind charakteristische Ergebnisse von Western Blots zum Nachweis von CD38 gezeigt, in denen die Membranfraktionen P10 und P100 in gleicher Menge nebeneinander und zusätzlich neben der cytosolischen Rohfraktion S100 und der an Hydroxylapatit (HA) aufgereinigten S100-Fraktion aufgetragen wurden. Zur spezifischen Detektion von CD38 wurden in den dargestellten Blots drei verschiedene anti-CD38 mAKs, nämlich der IB4 mAK (Abb. 4. 10 A), der AT1 mAK (Abb. 4.10 B) und der HB7 mAK (Abb. 4.10 C) verwendet. Als Positivkontrolle für das Detektionssystem wurde in einigen Western Blots zusätzlich eine rekombinante, lösliche Form des humanen CD38 eingesetzt (hCD38rec, z. B. Abb. 4.10 A). Diese wurde, wie die rekombinante, lösliche Form des Maus-Homologs von CD38, in eukariotischen Zellen synthetisiert [Howard *et al.* 1993] und ist daher ebenso wie das Ektoenzym glykosyliert. Diese Tatsache erklärt das dem Monomer des Ektoenzym vergleichbare MW des rekombinanten Proteins. Mit der Glykosidase Endo-H deglykosyliertes CD38 ist in der Literatur mit einem MW von ca. 36 kDa angegeben [Alessio *et al.* 1990], wohingegen das unglykosylierte CD38 ein MW von 34,288 kDa aufweist [Jackson & Bell 1990]. Proteine dieses MW-Bereichs stellten in zum Nachweis von CD38 durchgeführten Western Blots (z.B. Abb. 4.10 A-C) aber niemals intensive Banden dar. Alle drei eingesetzten mAKs detektierten in der P10- (besonders stark) und in der P100-Fraktion (schwächer) eine intensive Bande, die in ihrem MW dem Monomer des Ektoenzym CD38 und hCD38rec entsprach.

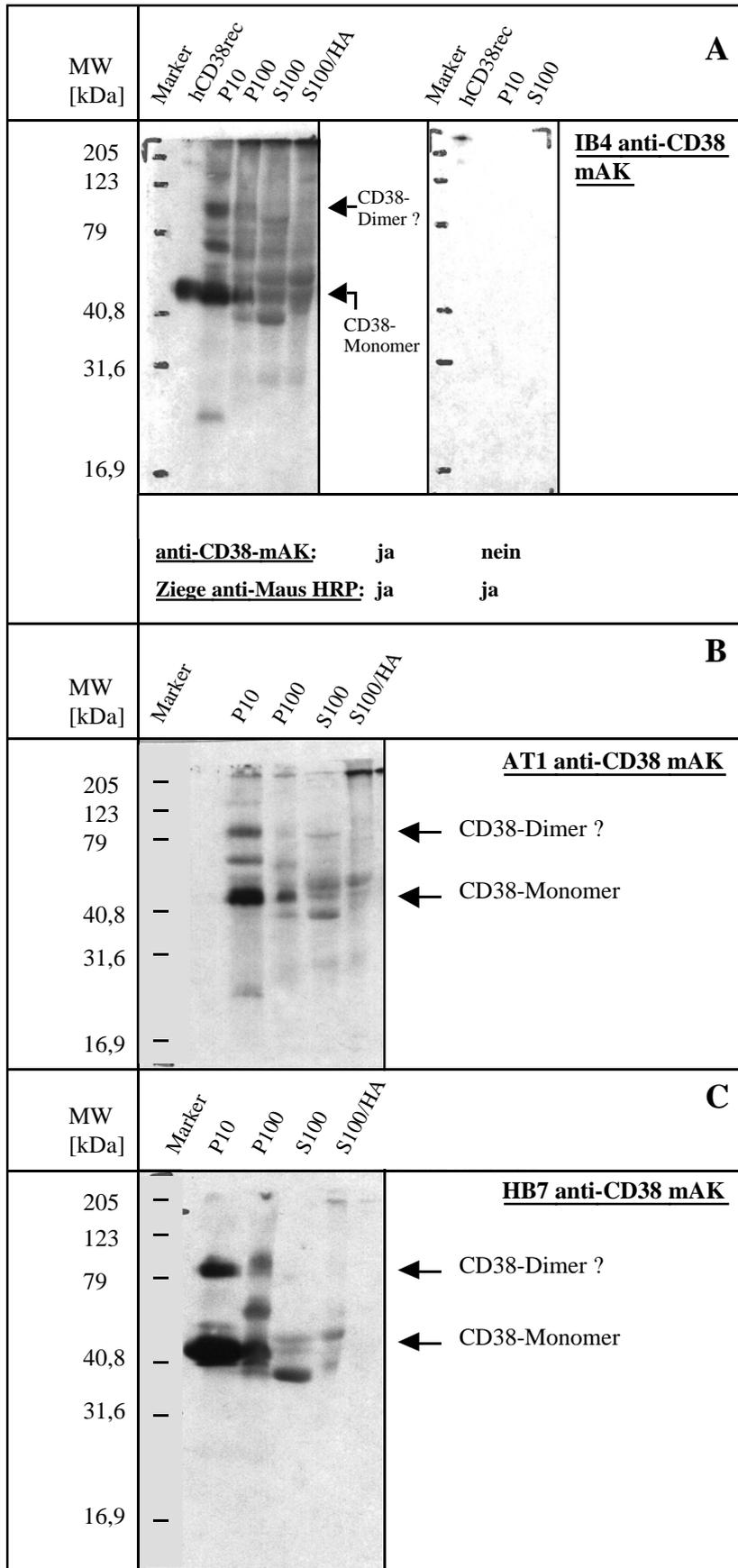


Abb. 4.10 Nachweis von CD38 in subzellulären Fraktionen von Jurkat T-Lymphozyten durch Western Blot-Analyse und Detektion von CD38 mit monoklonalen Antikörpern.

Die Proteine, nämlich eine lösliche rekombinante Form von CD38 (hCD38rec), und die subzellulären Fraktionen P10 (10.000•g-Membranen, 50 µg), und P100 (100.000•g-Membranen, 50 µg) sowie die cytosolische Fraktion S100 (100.000•g-Überstand, 75 µg) und das HA-gereinigte S100 (75 µg) wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen (in Abwesenheit von β-ME) in einem 12,5 %igen Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch Tank-Blottransfer (2,5 bis 3 Stunden, 240 mA, 4 °C) auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Detektion von CD38 wurden die Membranen bei 4 °C über Nacht mit einem der anti-CD38 mAKs IB4 (A), AT1 (B) oder HB7 (C) inkubiert (1 µg/ml mAK). Die Entwicklung der Blots erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems der Firma *Amer-sham Pharmacia Biotech* unter Verwendung eines HRP-konjugierten, gegen humane Serumproteine präabsorbierten Zweitantikörpers (Ziege anti-Maus IgG / *Santa Cruz Biotechnology*) in der Verdünnung 1:3000. Zur Kontrolle der Spezifität der Detektion von CD38 wurde in manchen Experimenten (hier für Blot A gezeigt) ein Teil des Blots parallel unter Weglassen der Inkubation mit dem Erstantikörper entwickelt. Dem CD38-Monomer, bzw. einem potentiellen Dimer in ihrem MW entsprechende Banden wurden mit einem Pfeil markiert. Jeweils im linken Teil der Abbildung sind die Größen von MW-Standards in kDa angegeben. Als Marker wurde der Kaleidoskopmarker der Firma *Bio-Rad* verwendet.

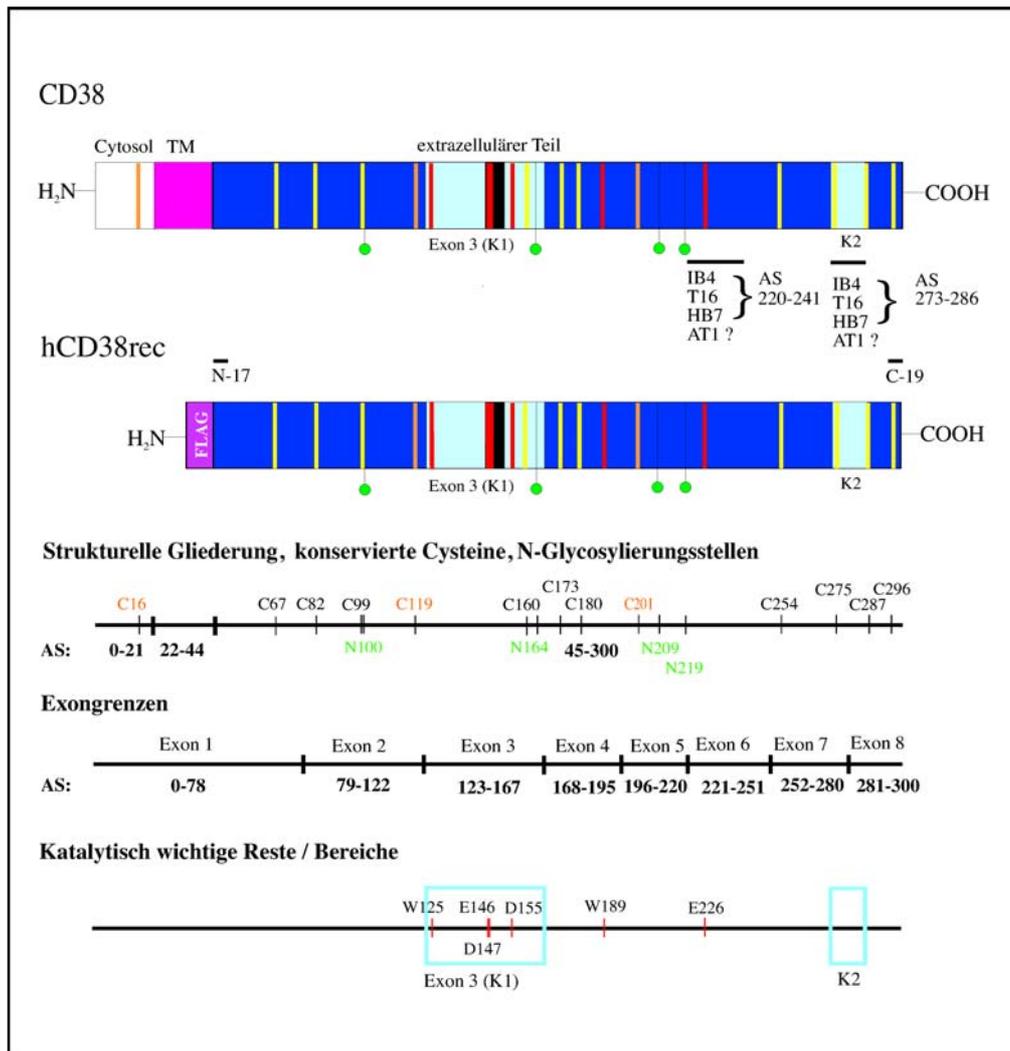


Abb. 4.11: Übersicht über die Struktur der humanen Form des vollständigen Transmembranproteins und Ektoenzym CD38 und einer rekombinanten löslichen Variante. Im oberen Teil der Abbildung ist die humane Form des vollständigen Ektoenzym CD38, das sich aus insgesamt 300 Aminosäuren (AS) zusammensetzt, schematisch dargestellt. Es umfasst eine kurze, N-terminal lokalisierte cytosolische Domäne (AS 1-21), eine einzelne Transmembrandomäne (AS 22-44) und einen ausgedehnten extrazellulären Bereich, den C-Terminus einschließenden Bereich (AS 45-300). Der extrazellulär gelegene Bereich beinhaltet das katalytische Zentrum (für die katalytische Aktivität bedeutsame Bereiche sind hellblau markiert), enthält 12 der insgesamt 13 im CD38-Protein verschiedener Species konservierten Cysteine (gelb oder orange markiert) und zusätzlich 4 N-Glykosylierungsstellen (grüne Kreise). Gelb eingezeichnete Cysteine sind auch in den ADPRCs aus *A. californica* und *A. kurodai* konserviert, während die drei orange markierten Cysteine für CD38-Proteine verschiedener Species charakteristisch sind. Von letzteren sind die beiden extrazellulär gelegenen Cysteine für die NADGH-Aktivität von CD38 von Bedeutung. Die *Aplysia*-ADPRCs, denen diese Cysteine fehlen, weisen nur eine sehr viel schwächere NADGH-Aktivität auf. Viele der für die katalytische Aktivität von CD38 bedeutsamen Aminosäurereste sind in einem Bereich des Proteins lokalisiert, der von Exon 3 (K1) kodiert wird. Dieser Bereich beinhaltet auch ein hochkonserviertes Signaturmotiv von CD38 (AS 145-173: TLEDTLLGY [Grimaldi et al. 1995], schwarze Box), das auch in den Aminosäuresequenzen der ADPRCs aus *Aplysia spec.* sowie in leicht abgewandelter Form in derjenigen von CD157 vertreten ist. Ein weiterer größerer Bereich (K2), dem Bedeutung für die enzymatische Aktivität beigemessen wird, ist weiter C-terminal lokalisiert. Epitope, die von den in dieser Arbeit verwendeten anti-CD38 mAKs (IB4, T16, HB7 und AT1) und anti-CD38 pAKs (N-17 und C-19) erkannt werden, sind, soweit bekannt, in der Abbildung durch schwarze Balken markiert. Für die mAKs IB4, T16 und HB7 wurde experimentell ein identisches, diskontinuierliches Epitop nachgewiesen [Hoshino et al. 1997]. Die Epitope des AT1 anti-CD38 mAKs und der beiden pAKs sind nicht exakt bekannt. Die lösliche, rekombinante Form des humanen CD38 (hCD38rec) umfasst den gesamten extrazellulären Bereich des Ektoenzym CD38 ab Aminosäure V43 und ist, da es in eukariotischen Zellen synthetisiert wurde, ebenfalls glykosyliert. Der N-Terminus und die Transmembrandomäne des vollständigen CD38-Moleküls fehlen diesem

Protein und wurden durch das in dem löslichen Protein N-terminal gelegene FLAG-Epitop (bestehend aus den 8 Aminosäuren DYKDDDDY) ersetzt [Howard *et al.* 1993]. Letzteres dient der Affinitätsaufreinigung des rekombinanten Proteins mit Hilfe eines anti-FLAG-Antikörpers. Im unteren Teil der Abbildung sind die strukturelle Gliederung des Ektoenzym CD38 sowie die Lage der Cysteine, der putativen N-Glykosylierungsstellen, der Exongrenzen des codierenden Gens auf Proteinebene und die Lage katalytisch wichtiger Aminosäuren in der Aminosäuresequenz exakt definiert. Als der katalytische Rest wurde E226 identifiziert [Munshi *et al.* 2000]. Während für E146 und D147 eine regulatorische Funktion in Bezug auf die ADPRC- und D155 eine solche in Bezug auf die GPRC-Aktivität nachgewiesen wurde, sind W125 und W189 für die Positionierung des Substrates im aktiven Zentrum des Enzyms von Bedeutung [Munshi *et al.* 2000]. Neben den bereits zitierten wurden zur Erstellung der Abbildung folgende Publikationen herangezogen: Jackson & Bell [1990], Tohgo *et al.* [1994], Ferrero *et al.* [1997], Nata *et al.* [1997], und Graeff *et al.* [2001].

Letzteres stellte sich trotz des Fehlens der cytosolischen Domäne und des Transmembranbereichs von CD38 im Gel/Blot nicht kleiner als das komplette, membranständige Ektoenzym dar. Auch das MW des CD38-Monomers der P10-Fraktion, von der angenommen wird, daß sie für intrazelluläre Membranen und Organellen (Mitochondrien und Lysosomen) angereichert ist, unterschied sich nicht von dem des CD38-Monomers der P100-Fraktion, die den Erwartungen zufolge die PM und somit in angereicherter Form das Ektoenzym CD38 enthalten sollte. In der S100-Rohfraktion und der partiell durch HA-Chromatographie gereinigten S100-Fraktion wurde ebenfalls eine in ihrem MW der Größe des monomeren Ektoenzym entsprechende Bande detektiert, allerdings in sehr viel schwächerer Intensität (Abb. 4.10 A-C). Letzteres, obwohl von diesen Fraktionen mehr Protein für die Western Blot-Analysen eingesetzt wurde. Der schwache Nachweis von CD38 in den cytosolischen Fraktionen ist mit einer Restkontamination der Fraktionen mit Membranen vereinbar. Wiederum am intensivsten in der P10-Fraktion, in wechselnder Ausprägung jedoch auch in der P100-Fraktion, wurde von allen drei anti-CD38 mAKs zusätzlich eine größere, ebenfalls stark ausgeprägte Bande nachgewiesen, bei der es sich um ein Dimer von CD38 handeln könnte. Das Vorkommen von katalytisch aktivem, durch posttranslationale Modifikation oligomerisiertem CD38 [Umar *et al.* 1996] sowie von ebenfalls katalytisch aktiven Dimeren und Tetrameren des Ektoenzym [Bruzzone *et al.* 1998] wurde in der Literatur bereits für CD38 an der Zelloberfläche basal nur schwach oder gar nicht exprimierende HeLa-Zellen beschrieben, nachdem diese zuvor mit all-*trans*-Retinsäure (ATRA) inkubiert [Umar *et al.* 1996] oder mit CD38 transfiziert worden waren [Bruzzone *et al.* 1998]. Bei ATRA handelt es sich um einen spezifischen Induktor der CD38-Expression in myeloischen [Kontani *et al.* 1993] und anderen Zellen [Kontani *et al.* 1996, De Toledo *et al.* 1997], darunter auch in Jurkat T-Lymphozyten [Kontani *et al.* 1996]. Eine hauptsächlich in den cytosolischen Fraktionen auftretende, direkt über der des CD38-Monomers liegende Bande wurde durch Proteinsequenzierung als α -Enolase identifiziert, die, wie weiter unten beschrieben, eine Kreuzreaktion mit CD38-spezifischen Antikörpern zeigt. Eine weitere von

ihrem MW her kleinere Bande von ca 37 kDa wurde ebenfalls von allen drei anti-CD38 mAKs besonders stark in der S100-Fraktion detektiert. Die Tatsache, daß diese Bande durch HA-Chromatographie im Gegensatz zur ADPRC-/NADGH-Aktivität der S100-Fraktion nicht angereichert wurde, spricht jedoch dagegen, daß sie einer löslichen, katalytisch aktiven Variante von CD38 entsprechen könnte. *Nata et al.* [1997] zufolge, gibt es jedoch eine verkürzte Splicevariante von CD38 („CD38 alt“), der das gesamte Exon 3 (Abb. 4.11) und damit auch der von diesem Exon kodierte Bereich des vollständigen Proteins fehlt, das insgesamt von acht Exons kodiert wird (Abb. 4.11). Die mRNA dieser Splicevariante wird in Zellen ubiquitär zusammen mit der CD38-mRNA vollständiger Länge exprimiert [*Nata et al.* 1997]. Für das translatierte, vermutlich membranständige Protein, dessen ausgehend von der Aminosäuresequenz theoretisch berechnetes MW 13,761 kDa beträgt, wurde nach Expression in COS-Zellen gezeigt, daß es katalytisch inaktiv ist [*Nata et al.* 1997]. Da sich drei der vier putativen N-Glykosylierungsstellen des CD38-Proteins außerhalb des von Exon 3 kodierten Bereichs der Aminosäuresequenz befinden (Abb. 4.11) ist anzunehmen, daß das verkürzte CD38-Protein ebenfalls ein Glykoprotein ist. Demzufolge könnte das MW des exprimierten Proteins *in vivo* erheblich höher als die aufgrund der Primärsequenz vorhergesagten 13,761 kDa liegen. Da sich eine der vier N-Glykosylierungsstellen jedoch in dem von Exon 3 kodierten Bereich befindet (Abb. 4.11) und unbekannt ist, ob alle, bzw. welche der 4 N-Glykosylierungsstellen tatsächlich für die Glykosylierung von CD38 genutzt werden, ist es an dieser Stelle nicht möglich, die tatsächliche Größe des „CD38 alt“-Proteins abzuschätzen. Auch eine sichere Aussage darüber, in welcher subzellulären Fraktion der Lymphozyten das verkürzte Protein zu erwarten wäre, erscheint zumindest fragwürdig.

In Abb. 4.12 (A) ist das Ergebnis eines Western Blots gezeigt, in dem verschiedene Präparationen der P2-Fraktion auf CD38 untersucht wurden. Wie weiter oben dargestellt, wies diese Fraktion bei Vermessung im RP-HPLC-Enzymassay ebenfalls ADPRC- und NADGH-Aktivität auf (Abb. 4.6). Zur Detektion von CD38 wurde in dem dargestellten Experiment der AT1 anti-CD38 mAk verwendet. Ebenso wie in den Fraktionen P10 und P100, war auch in dieser Membranfraktion eindeutig CD38 nachweisbar. Ebenso wie für das CD38 der P10-Fraktion beschrieben, konnte auch für das CD38 der P2-Fraktion, das interessanterweise nur als Monomer nachweisbar war, kein Größenunterschied zu dem in der P100-Fraktion detektierten Monomer des Ektoenzym CD38 festgestellt werden.

In weiteren Western Blot-Analysen wurden zur Detektion von CD38 in den verschiedenen subzellulären Fraktionen zusätzlich auch die pAKs C-19 und N-17 eingesetzt, die gegen den C-Terminus (C-19) und den N-Terminus (N-17) von humanem CD38 gerichtet sind.

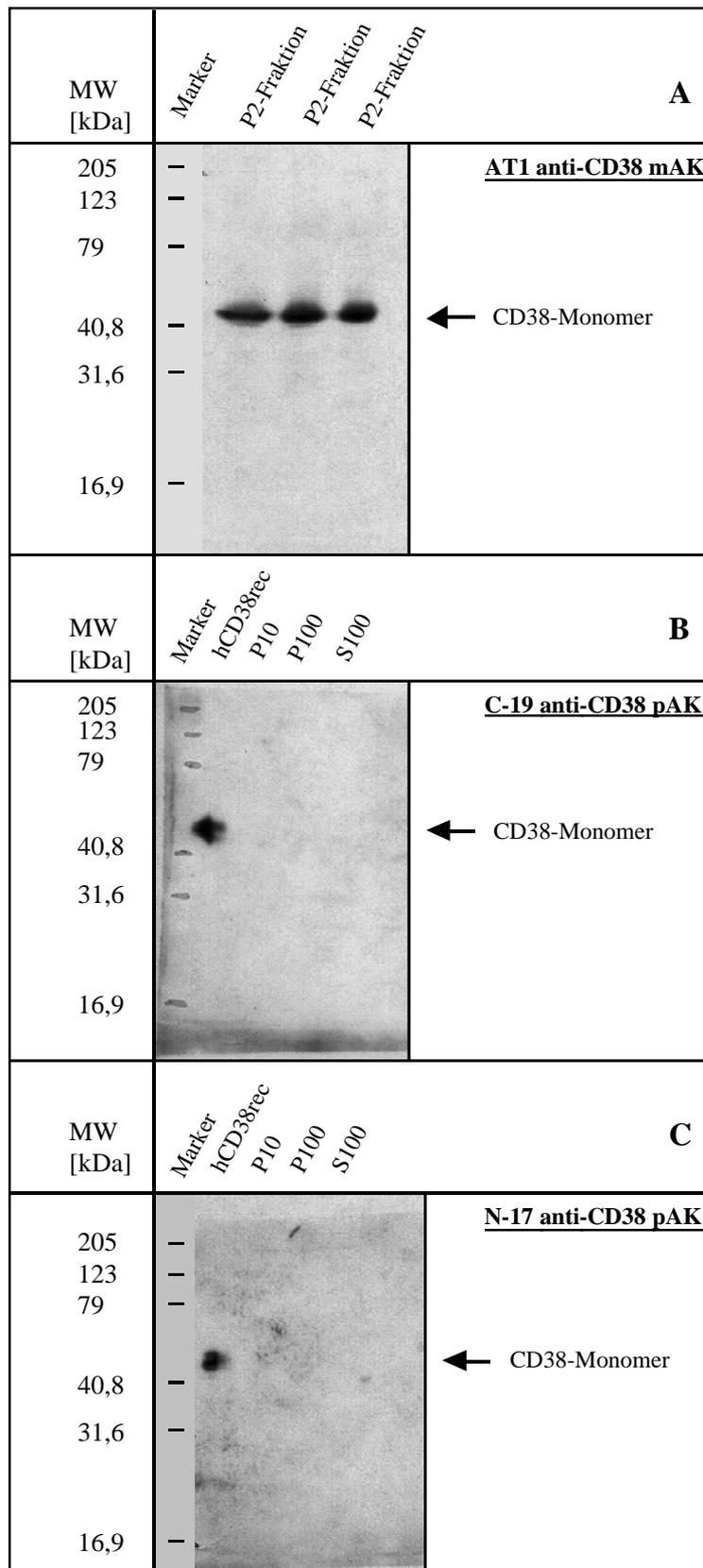


Abb. 4.12 Analyse subzellulärer, aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnener Fraktionen im anti-CD38 Western Blot unter Verwendung des AT1 anti-CD38 mAKs und polyklonaler, gegen den N-, bzw. C-Terminus von CD38 gerichteter Antisera. Die Proteine, namentlich die subzellulären Fraktionen P2 (2000•g-Membranen, 50 µg), P10 (10.000•g-Membranen, 50 µg), P100 (100.000•g-Membranen, 50 µg) und S100-Fraktion (100.000•g-Überstand, 75 µg) sowie eine lösliche, rekombinante Form des humanen CD38 (hCD38rec, 100 ng) wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE in einem 12,5 %igen Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine im Tank-Blotverfahren (2,5-3 Stunden, 4 °C, 250 mA) auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion von CD38 wurden die Membranen bei 4 °C über Nacht entweder mit dem AT1 anti-CD38 mAK (A) oder mit einem der polyklonalen anti-CD38 Antisera C-19 (B; gerichtet gegen den C-Terminus von CD38) oder N-17 (C; gerichtet gegen den N-Terminus von löslichem CD38, siehe Text), jeweils eingesetzt in der Endkonzentration von 1 µg/ml, inkubiert. Zur Entwicklung der Blots wurde das ECL-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Als Zweitantikörper wurden gegen humane Serumproteine präabsorbierte HRP-Konjugate, nämlich Ziege anti-Maus IgG (*Santa Cruz Biotechnology*; 1:3000, Blot A) oder Hase anti-Ziege IgG (*Dianova/Jackson Immuno Research Inc.*; 1:5000, Blot B und Blot C) eingesetzt. Detektierte Banden des Monomers von CD38 sind mit Pfeilen markiert. Auf der linken Seite sind die Größen der eingesetzten MW-Standards in kDa angegeben. Als Marker wurde für alle dargestellten Blots der Kaleidoskopmarker der Firma Bio-Rad eingesetzt.

Erstaunlicherweise konnte mit Hilfe dieser Antiseren in keiner der untersuchten subzellulären Fraktionen der Lymphozyten (P10, P100, S100 und HA-gereinigtes S100) CD38 nachgewiesen werden, obwohl hCD38rec von beiden Antiseren einwandfrei detektiert wurde (Abb. 4.12 B, C). Die erfolgreiche Detektion von hCD38rec spricht dafür, daß die Antiseren selbst intakt waren. Der Grund für dieses mehrfach reproduzierte Ergebnis ist bisher ungeklärt. Denkbare Interpretationen wären, daß N- und C-Terminus des in den subzellulären Fraktionen enthaltenen CD38 entweder aufgrund einer Modifikation des Proteins schwerer zugänglich sind oder, daß diese Bereiche des CD38 der Jurkat-Lymphozyten sich von den entsprechenden Bereichen des klassischen CD38-Ektoenzym unterscheiden. Überraschend war zusätzlich, daß das nach Angaben der Firma *Santa Cruz Biotechnology* gegen den N-Terminus von humanem CD38 gerichtete N-17-Antiserum hCD38rec einwandfrei detektierte (Abb. 4.12 C), obwohl diesem löslichen Protein sowohl der cytosolisch gelegene N-Terminus als auch die Transmembrandomäne des vollständigen CD38-Moleküls fehlen. Dieser Widerspruch konnte geklärt werden, indem von der Firma eingeräumt wurde, daß für die Produktion des Antiserums eine lösliche Form von CD38 verwendet wurde und das Antiserum demzufolge nicht den natürlichen N-Terminus des Proteins erkennt. Eine exakte Angabe zur Lage des Bindungsepitops des Antikörpers war allerdings nicht zu erhalten. Nach Einsenden der Sequenzdaten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten, löslichen Form von CD38 (hCD38rec) wurde aber immerhin von *Santa Cruz Biotechnology* bestätigt, daß diese das von dem Antikörper erkannte Epitop enthält.

Als nächstes wurden die unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD im RP-HPLC-Enzymassay für die aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen subzellulären Fraktionen P10, P100 und S100 ermittelten Gesamtaktivitäten der ADPRC mit der Intensität des Signals verglichen, das diese Fraktionen in Western Blots zum Nachweis von CD38 lieferten. Der in Abb. 4.13 exemplarisch dargestellte Blot wurde mit dem AT1 anti-CD38 mAK entwickelt. Um die Unterschiede der Signale hervorzuheben wurde für die Darstellung ein Film verwendet, der nur kurz zur Belichtung auf dem mit der ECL-Lösung (*Amersham Pharmacia Biotech*) behandelten Blot inkubiert worden war. Dieser zeigte daher im Wesentlichen die am stärksten ausgeprägte Bande des CD38-Monomers, im Falle der P10-Fraktion auch die des potentiellen CD38-Dimers, jedoch kaum unspezifischen Hintergrund (Abb. 4.13). Übereinstimmend mit der Verteilung der ADPRC-Aktivität im Anschluß an eine subzelluläre Fraktionierung der Lymphozyten, wurde in dem hier (Abb. 4.13) dargestellten Western Blot, in Übereinstimmung mit dem bereits zuvor gezeigten (Abb. 4.10 B), in der P10-Fraktion das stärkste Signal für CD38 erhalten.

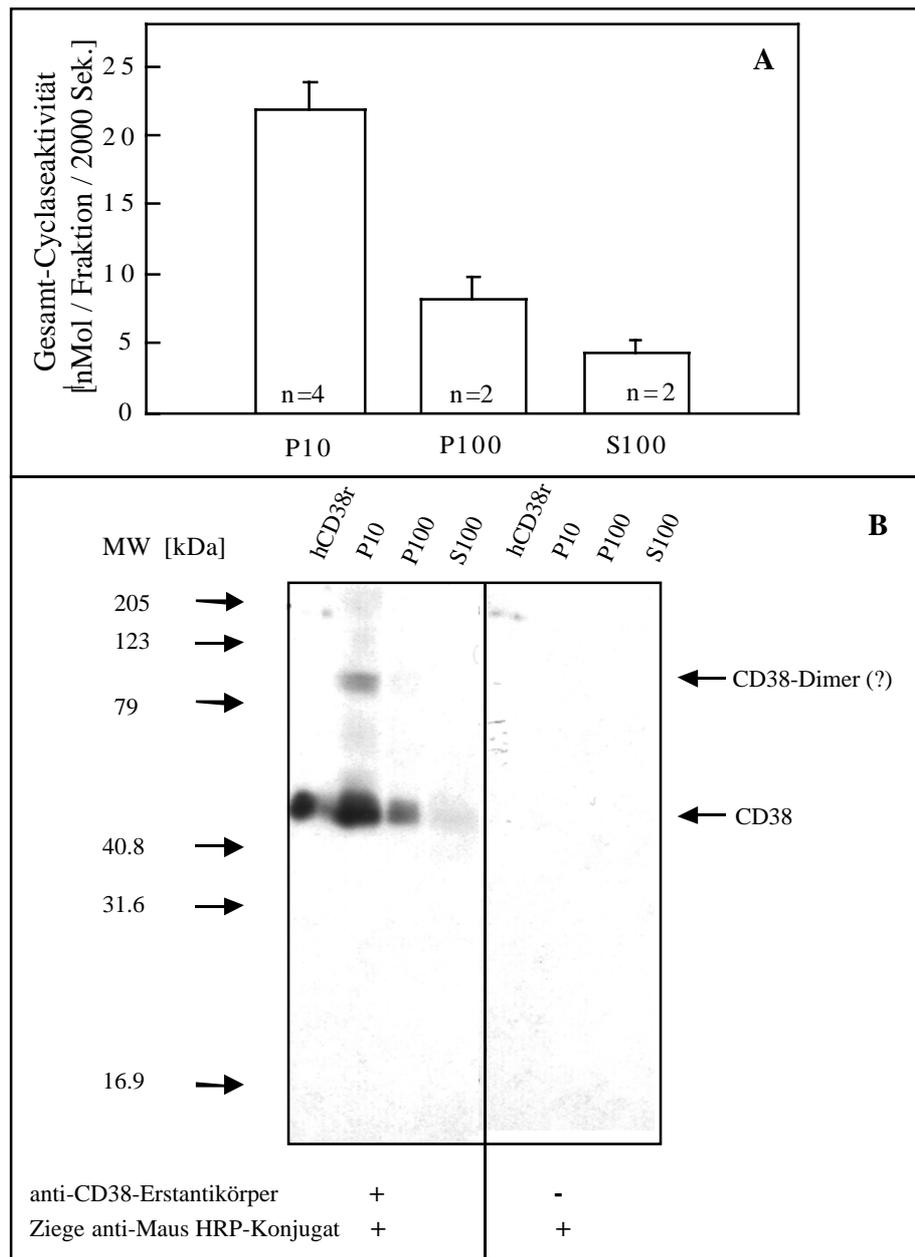


Abb. 4.13: Gesamtaktivität der ADPRC und Expression von CD38 in aus Jurkat T-Lymphozyten präparierten subzellulären Fraktionen. (A) Die Gesamtaktivität der ADPRCs der aus $5 \cdot 10^8$ Jurkat-Lymphozyten präparierten subzellulären Fraktionen P10 (10.000•g-Membranen), P100 (100.000•g-Membranen) und S100 (100.000•g-Überstand, cytosolische Fraktion) wurde unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (Endkonzentration 100 μ M) im RP-HPLC-Enzymassay bestimmt (3.2.7.1 & 3.2.8.1). Die präsentierten Daten stellen die Mittelwerte \pm SD der Ergebnisse dar, die durch Vermessung der einzelnen, aus 2-4 unabhängig voneinander durchgeführten Zellaufschlüssen erhaltenen Fraktionen im RP-HPLC-Enzymassay erhoben wurden. (B) Eine lösliche, rekombinante Form des humanen CD38 (hCD38r, 100 ng Protein), P10- und P100-Membranen (je 50 μ g Protein) und die S100-Fraktion (75 μ g Protein) wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE in einem 12,5 %igen Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine im Tank-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert (2,5 Stunden, 4 °C, 250 mA). Zur Entwicklung des Blots wurde das ECL-System (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Der Blot, der zum Zweck der Kontrolle auf die Spezifität der Detektion durch den für CD38 spezifischen Erstantikörper in zwei Hälften geteilt wurde, wurde zunächst mit (linke Seite), bzw. ohne (rechte Seite) den AT1 anti-CD38 mAK (Endkonzentration 1 μ g/ml), inkubiert. Anschließend folgte eine zweite Inkubation beider Membranhälften mit einem als Zweitantikörper eingesetzten, gegen humane Serumproteine präabsorbierten Ziege anti-Maus IgG HRP-Konjugat (Santa Cruz Biotechnology, 1:3000). Als MW-Standard wurde der Kaleidoskopmarker der Firma Bio-Rad verwendet. Die Größen der darin enthaltenen Markerproteine [kDa] sind auf der linken Seite aufgeführt.

In der P100-Fraktion war CD38 bei gleicher aufgetragener Proteinmenge entsprechend der geringeren ADPRC-Aktivität dieser Fraktion deutlich schwächer, jedoch ebenfalls als intensive Bande nachweisbar. Im Gegensatz dazu war CD38 in der S100-Fraktion, von der mehr Protein eingesetzt wurde nur schwach detektierbar, obwohl diese Fraktion im RP-HPLC-Enzymassay eine beachtliche ADPRC-Gesamtaktivität aufwies. Dieses Ergebnis läßt die Interpretation zu, daß es neben der in der S100-Fraktion detektierten schwachen Bande des CD38-Monomers, dessen Nachweis auf eine Restkontamination der cytosolischen Fraktion mit Membranen hindeutet, noch ein weiteres Protein mit ADPRC-Aktivität geben könnte, das in Western Blots zum Nachweis von CD38 kein Signal liefert. Bei diesem Protein könnte es sich sowohl um eine durch die eingesetzten anti-CD38 mAKs nicht detektierbare Variante von CD38 als auch um ein anderes, mit CD38 nicht verwandtes Enzym handeln.

Zusammenfassend konnte in dieser Versuchsreihe durch Western Blot-Analyse unter Verwendung unterschiedlicher anti-CD38 mAKs in allen subzellulären Fraktionen der Jurkat T-Lymphozyten, die im Enzymassay ADPRC- und NADGH- Aktivität aufwiesen, CD38 nachgewiesen werden, das in seinem MW der monomeren Form des Ektoenzym entspricht. In der P10- und P100-Fraktion wurde zusätzlich eine Bande nachgewiesen, die einem CD38-Dimer entsprechen könnte. Obwohl davon auszugehen ist, daß ein beträchtlicher Teil des in der P10- und P2-Fraktion detektierten CD38 intrazelluläres CD38 ist, konnte kein Unterschied des MW des in diesen Fraktionen enthaltenen CD38 im Vergleich zu dem des Ektoenzym festgestellt werden. Von letzterem wurde angenommen, daß es zusammen mit der PM in angereicherter Form in der P100-Fraktion enthalten ist. Dies Ergebnis wirft unter anderen die Fragen auf, ob auch intrazellulär lokalisiertes CD38 die für das Ektoenzym charakteristische Glykosylierung aufweist und wie die Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle funktioniert. Auch in der S100-Fraktion konnte in den Western Blot-Analysen keine Bande nachgewiesen werden, die einen vielversprechenden Kandidaten für eine aufgrund des Fehlens der Transmembrandomäne verkürzte, lösliche und möglicherweise unglykosylierte, cytosolische Variante von CD38 darstellen würde. Aufgrund des verglichen mit der ADPRC-Aktivität dieser Fraktion nur sehr schwachen Nachweises von CD38, bleibt in Hinblick auf diese Fraktion die Möglichkeit offen, daß sie neben (kontaminierendem) CD38 ein weiteres, mit diesem nicht verwandtes Enzym mit ADPRC-/NADGH-Aktivität enthalten könnte. Die Tatsache, daß das CD38 der Jurkat-Lymphozyten nicht durch die gegen humanes CD38 gerichteten pAKs erkannt wurde, könnte darauf hinweisen, daß es in noch ungeklärter Weise posttranslational modifiziert oder aber nicht vollständig mit der klassischen Form von CD38 identisch ist. Um diesen Punkt zu klären, sind weitere Experimente erforderlich.

4.3.2 Pharmakologische Charakterisierung intrazellulärer ADPRCs/NADGHs und der ADPRC aus *A. californica* im Vergleich zum Ektoenzym CD38

Die Tatsache, daß die Ergebnisse vorangegangener Experimente die Hypothese bestätigten, daß die katalytische Aktivität des Ektoenzym CD38 und damit die extrazelluläre Synthese von cADPR keine wesentliche Bedeutung für die über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ besitzt, bestärkte die Vermutung, daß eine oder mehrere intrazellulär lokalisierte ADPRCs/NADGHs eine intrazelluläre Synthese von cADPR vermitteln. Als ein gegenüber im Zellkern oder in den Mitochondrien lokalisierten, membranständigen ADPRCs/NADGHs bevorzugter Kandidat zur Erfüllung dieser Funktion wurde ein lösliches, cytosolisches Enzym angesehen. Während die Ergebnisse der zuvor dargestellten Western Blots zum Nachweis von CD38 nahelegten, daß es sich bei den (wahrscheinlich) an intrazellulären Membranen lokalisierten ADPRCs/NADGHs der Jurkat T-Lymphozyten ebenfalls um CD38 handelt, deutete das mit der cytosolischen S100-Fraktion erhaltene Ergebnis darauf hin, daß sie ein weiteres, möglicherweise nicht mit CD38 verwandtes Protein mit ADPRC-/NADGH-Aktivität enthalten könnte. Um mehr Information über dieses lösliche Enzym zu erhalten, wurde die katalytische Aktivität der S100-Fraktion in den nachfolgend beschriebenen Experimenten pharmakologisch im Vergleich zu der des Ektoenzym CD38 und der der P10-Fraktion charakterisiert. Die ADPRC/NADGH der letzteren war durch Western Blot-Analyse als CD38 identifiziert worden (Abb. 4.10 und 4.13). Zunächst wurde mit Hilfe des RP-HPLC-Enzymassays die Wirkung der zuvor zur Inhibition der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 intakter Lymphozyten eingesetzten, inhibitorischen Bedingungen auf die cADPR-Synthese der ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion untersucht. Wie in Abb. 4.14 dargestellt, wurde die ADPRC-Aktivität der ADPRCs/NADGHs der cytosolischen Fraktion durch Vorinkubation mit araF-NAD (200 nM, 30 Min. Inkubation) vergleichbar gut wie die des Ektoenzym inhibiert (A, B). Im deutlichen Gegensatz dazu waren die cytosolischen Enzyme gegenüber einer Inhibition/Inaktivierung der cADPR-Synthese durch Vorinkubation bei alkalischem pH (pH 8,5; 30 Min.) jedoch deutlich weniger sensitiv und gegenüber einer Inhibition/Inaktivierung durch Vorinkubation bei physiologischem pH (pH 7,2) in Gegenwart von DTT (1 mM oder 10 mM, 30 Min. Inkubation) sogar nahezu insensitiv (Abb. 4.14 A, B). Dennoch bewirkte eine Vorinkubation des Enzyms in Gegenwart von DTT (10 mM) eine zwar schwache, aber signifikante Inhibition ihrer ADPRC-Aktivität (Abb. 4.14 B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß auch die ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion ebenso wie das Ektoenzym CD38 in ihrer Sekundärstruktur Disulfidbrücken enthalten, deren Erhalt für die Konformation des katalytischen Zentrums des Enzyms wichtig ist.

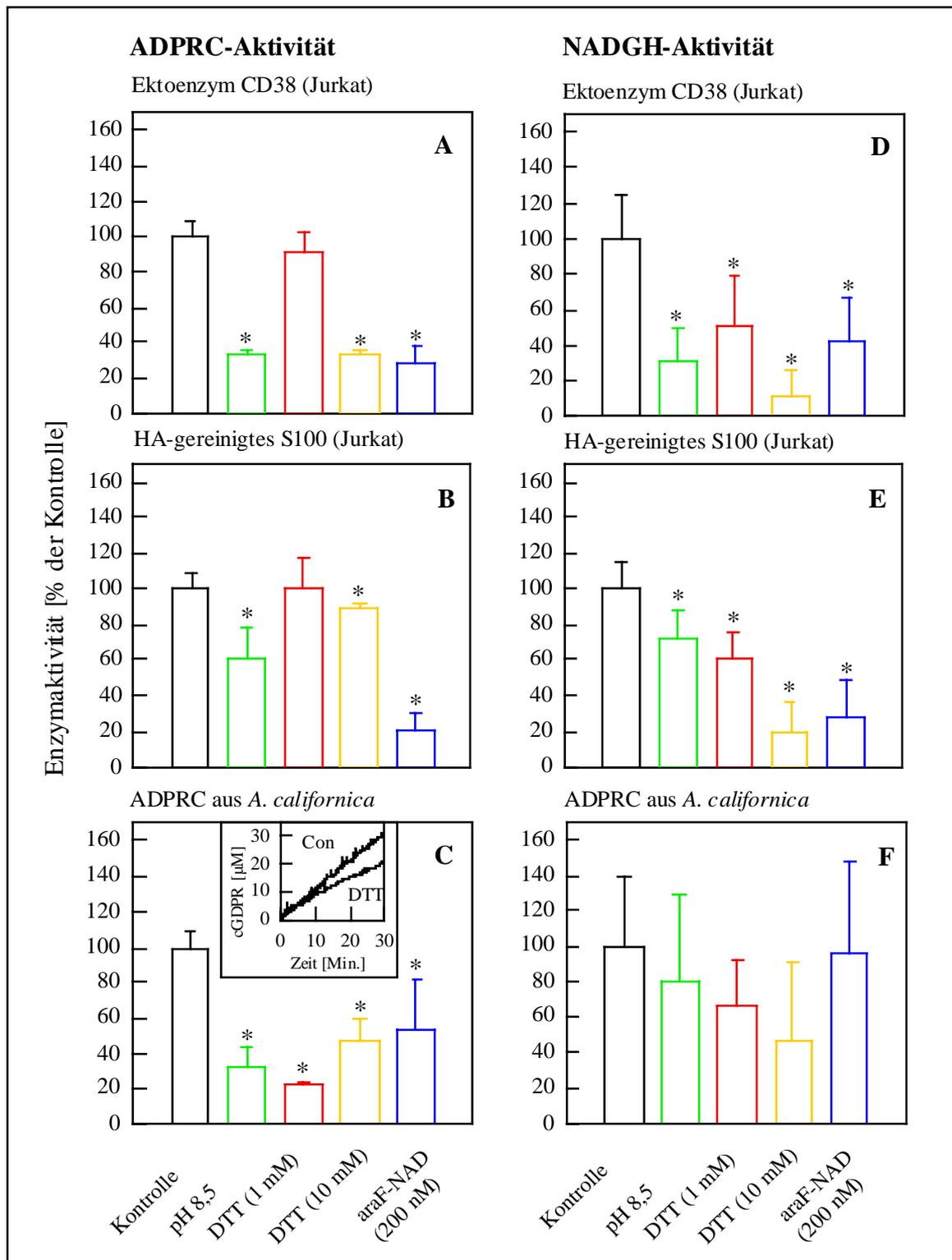


Abb. 4.14: Effekte von alkalischem pH, DTT und araF-NAD auf die katalytische Aktivität des Ektoenzym CD38 an der Oberfläche intakter Jurkat T-Zellen, der cytosolischen ADPRC/NADGH der Lymphozyten und der ADPRC aus *A. californica*. Intakte Jurkat T-Lymphozyten ($2 \cdot 10^6$ /ml; A, D), HA-gereinigter S100-Extrakt (0,5 mg/ml Protein; B, E) oder die gereinigte ADPRC aus *A. californica* (100 ng/ml Protein; C, F) wurden für 30 Min. bei alkalischem pH (pH 8,5) oder bei physiologischem pH (subzelluläre Extrakte bei pH 7,2; intakte Zellen bei pH 7,4) entweder in Gegenwart von DTT (1 oder 10 mM) oder in Gegenwart von araF-NAD (200 nM) vorinkubiert. Anschließend wurden unbehandelte Zellen/Extrakte (Kontrolle, Con) und vorinkubierte Ansätze unter Fortbestehen der inhibitorischen Bedingungen mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μ M) versetzt und für 2000 Sek. (33 Min.) bei RT inkubiert. Die synthetisierte Menge an den Produkten ϵ -cADPR (A, B, C) und ϵ -ADPR (D, E, F) wurden dann durch RP-HPLC mit

Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 410 \text{ nm}$) bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte \pm SD, die in mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten unter Verwendung von unterschiedlichen Enzympräparationen aus Jurkat T-Zellen, bzw. verschiedener Ansätze intakter Zellen erhalten wurden. Ergebnisse, die sich mit $p \leq 0,05$ (Student's T-Test) signifikant vom Kontrollwert unterscheiden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Insert (C): GDPRC-Aktivität durch die ADPRC aus *A. californica* (100 U/ml) wurde zusätzlich fluorimetrisch, wie publiziert [Bertheliet *et al.* 1998], nachgewiesen. Dargestellt ist der Umsatz von NGD (100 μM) in Abwesenheit (Con) oder in Gegenwart von DTT (10 mM).

Ergänzend wurde auch das Verhalten der ADPRC aus *A. californica*, als einem anderen, löslichen Vertreter der Enzymklasse der NADasen, der ADPRC-Aktivität besitzt, unter den für das Ektoenzym CD38 inhibitorischen Bedingungen untersucht. Das Inhibitionsprofil dieses Proteins (Abb. 4.14 C) stimmte überraschenderweise jedoch besser mit dem der ADPRC/NADGH an der Oberfläche intakter Lymphozyten (A) als mit dem der in der S100-Fraktion enthaltenen ADPRCs (B) überein, indem sowohl eine Vorinkubation bei alkalischem pH (pH 8,5) als auch eine Vorinkubation in Gegenwart von DTT (1 oder 10 mM) eine starke Inhibition seiner Fähigkeit zur cADPR-Synthese bewirkten. Die effektivste Inhibition der katalytischen Aktivität der *Aplysia*-ADPRC (C) trat verglichen mit der des Ektoenzym CD38 (A) sogar bei Verwendung der niedrigeren Endkonzentration an DTT (1 mM) ein. An dieser Stelle sei angemerkt, daß die Sensitivität der ADPRCs aus *Aplysia spec.* gegenüber Disulfidbrücken spaltenden Verbindungen wie DTT, in der Literatur kontrovers beschrieben ist. Während *Tohgo et al.* [1994] in Übereinstimmung mit den hier dargestellten Daten die *Aplysia*-ADPRC (in diesem Fall das Enzym aus *A. kurodai*) als sensitiv gegenüber einer DTT-Behandlung befanden, wurde von *Inageda et al.* [1995] publiziert und von *Guida et al.* [1995] unter Verwendung von β -ME anstelle von DTT bestätigt, daß eine solche Sensitivität bei der ADPRC aus *A. californica* im Gegensatz zu CD38 nicht besteht. Das in der vorliegenden Arbeit erhaltene Ergebnis wurde aber sowohl durch Vermessung des Enzyms aus *A. californica* im kontinuierlichen GDPRC-Assay (Abb. 4.14 C, Insert) als auch durch Vermessung einer im Vergleich zu dem kommerziell erhältlichen Enzym weiter aufgereinigten Enzympräparation (*H. Muller-Steffner & F. Schuber*, Illkirch/Frankreich, persönliche Mitteilung) gestützt. Eine Inhibition/Inaktivierung der *Aplysia*-ADPRC durch alkalischen pH (pH 8,5) erwies sich essentiell von einer Vorinkubation (30 Min.) des Enzyms unter dieser Bedingung abhängig. und trat bemerkenswerterweise nicht auf, wenn das Enzym ohne vorherige Inkubation direkt bei alkalischem pH vermessen wurde. Im letztgenannten Fall wurde sogar eine gesteigerte katalytische Aktivität des Enzyms festgestellt (nicht gezeigt). Durch den Inhibitor araF-NAD (200 nM) wurde die *Aplysia*-ADPRC deutlich schwächer als die ADPRCs der Jurkat T-Lymphozyten inhibiert. Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß die ADPRC aus *A. californica* verglichen mit den ADPRCs/NADGHs der

Vertebraten spezifische pharmakologische Eigenschaften aufweist, aufgrund derer sie sich von letzteren abgrenzen läßt. Gleichzeitig deuten sie darauf hin, daß die dargestellten Unterschiede zwischen den ADPRCs/NADGHs der Jurkat-Lymphozyten (Ektoenzym CD38 *versus* cytosolisches Enzym) nicht einfach dadurch erklärbar sind, daß das cytosolische Enzym, ebenso wie die *Aplysia*-ADPRC, vermutlich keine Transmembrandomäne besitzt.

Ergänzend wurde auch die Auswirkung der verschiedenen inhibitorischen Bedingungen auf die NADGH-Aktivität der ADPRCs/NADGHs der Jurkat-Lymphozyten (D, E) und der ADPRC aus *A. californica* (F) untersucht. Dabei fiel auf, daß der weiter oben für die ADPRC-Aktivität der beiden Enzyme der Lymphozyten beschriebene Unterschied in ihrer Sensitivität gegenüber einer Inhibition/Inaktivierung durch Vorinkubation bei alkalischem pH (pH 8,5; A, B) in vergleichbarem Ausmaß auch auf ihre NADGH-Aktivität zutraf, wohingegen der in Bezug auf ihre ADPRC-Aktivität festgestellte Unterschied in der Sensitivität gegenüber einer Vorbehandlung mit DTT (pH 7,2; 1 oder 10 mM) in Bezug auf ihre NADGH-Aktivität kaum nachweisbar war (D, E). Das Ergebnis, daß die ADPR-Synthese (NADGH-Aktivität) beider Enzyme, die in Konkurrenz zur cADPR-Synthese (ADPRC-Aktivität) steht, durch DTT in nahezu gleichem Umfang inhibiert wird, die ADPRC-Aktivität des cytosolischen Enzyms sich im Gegensatz zu der des Ektoenzym jedoch weitgehend einer Inhibition durch diese Substanz entzieht, kann als weiteres Indiz betrachtet werden, daß die cytosolische ADPRC/NADGH der Lymphozyten möglicherweise nicht mit CD38 identisch ist. Zusätzlich herausgestellt sei weiterhin, daß die selektive Modulation der NADGH-Aktivität der (postulierten) im Cytosol der Lymphozyten lokalisierten ADPRC/NADGH über den intrazellulären Reduktionsstatus aus physiologischer Sicht durchaus als Mechanismus zur Regulation ihrer zellulären Funktion(en) dienen könnte, da eine selektive Inhibition der NADGH-Aktivität des Enzyms im Cytoplasma zu einer Verschiebung des Verhältnisses der synthetisierten Stoffmengen an cADPR und ADPR zugunsten des cyclischen Produktes und Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoffs (cADPR) führen würde. Als physiologischer Regulator anstelle von DTT könnte innerhalb der Zelle beispielsweise reduziertes Glutathion (GSH) dienen. Bei quantitativer Betrachtung der hier erhobenen Daten, denen zufolge durch Behandlung der HA-gereinigten S100-Fraktion mit DTT (10 mM) eine ca. 82 %ige Inhibition der NADGH-Aktivität, gleichzeitig jedoch nur eine ca. 11%ige Inhibition der ADPRC-Aktivität der in dieser Fraktion enthaltenen ADPRCs/NADGHs erzielt wurde, resultierte die Inkubation des cytosolischen Extraktes mit DTT, in einer Reduktion des initialen Ratios beider Enzymaktivitäten von anfangs 1:14 auf nur noch 1:2,9 zugunsten der ADPRC-Aktivität. Dies entspricht rechnerisch einer um das ca. fünffache gesteigerten Befähigung zur cADPR-Synthese.

Eine zusätzliche Betrachtung der Auswirkung der verschiedenen inhibitorischen Bedingungen auf die NADGH-Aktivität ADPRC aus *A. californica* (F) ergab keine weiteren, nennenswerten Aspekte, da keine statistisch signifikanten Ergebnisse erhalten wurden. Bemerkenswert war hier lediglich, daß die NADGH-Aktivität, die bei diesem Enzym, das im Wesentlichen eine ADPRC ist, eigentlich nur eine Nebenaktivität darstellt, sofern das Enzym bei RT vermessen wird, immerhin rund 30% der Gesamtaktivität beträgt. Wird diese ADPRC, die aus einem marinen, an kaltes Wasser adaptierten Organismus (*Aplysia*) stammt, bei erniedrigten Temperaturen vermessen, läßt sich der Anteil der NADGH-Aktivität an der Gesamtaktivität des Enzyms allerdings beträchtlich reduzieren (*R. Fliegert*, persönliche Mitteilung). Die jeweils unter Kontrollbedingungen gemessene katalytische Aktivität von ADPRC und NADGH der in den Experimenten (Abb. 4.14) eingesetzten Enzympräparationen und intakten Zellen ist nachstehend tabellarisch aufgeführt.

Tab. 4.3: Spezifische Aktivitäten der für die in Abb. 4.14 dargestellten Experimente eingesetzten Enzympräparationen und intakten Jurkat T-Zellen

ADPRC-Aktivität [nMol / Enzym / 2000 Sek.]	NADGH-Aktivität [nMol / Enzym / 2000 Sek.]	Ratio ADPRC / NADGH
ADPRC / NADGH an der Oberfläche intakter Jurkat T-Lymphozyten		
0,544 ± 0,053 / 10 ⁷ Zellen	9,47 ± 2,44 / 10 ⁷ Zellen	1 : 17.4
HA-gereinigte ADPRC / NADGH der S100-Fraktion der Jurkat T-Zellen		
0,329 ± 0,031 / mg (Präp. 1)	4,18 ± 0,54 / mg	1 : 12.69
0,148 ± 0,016 / mg (Präp. 2)	2,55 ± 0,60 / mg	1 : 17.28
0,307 ± 0,043 / mg (Präp. 3)	3,55 ± 0,36 / mg	1 : 11.57
ADPRC aus <i>A. californica</i>		
11,72 ± 1,20 / µg	6,53 ± 2,66 / µg	1,8 : 1

Anmerkung: Die katalytische Aktivität der Enzympräparationen und intakten Zellen wurde bei RT mit dem Substrat ε-NAD (100 µM) wie in Abschnitt 3.2.7.1 und 3.2.8.1 beschrieben, im RP-HPLC-Enzymassay bestimmt.

Mit dem Ziel, die lösliche ADPRC/NADGH der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen cytosolischen Fraktion S100 noch besser vom Ektoenzym CD38, bzw. von intrazellulär lokalisierten, ebenfalls membranständigen Formen dieses Enzyms abzugrenzen, wurde in nachfolgenden Experimenten zusätzlich die Wirkung einer Reihe weiterer potentieller

Inhibitoren auf ADPRC- und NADGH-Aktivität der unterschiedlich lokalisierten Enzyme untersucht. Als Quelle des membranständigen Enzyms CD38 wurde in diesen Experimenten anstelle von intakten Zellen die subzelluläre Fraktion P10 (10.000•g-Membranen) verwendet, die, wie zuvor in Western Blot-Analysen gezeigt, CD38 des für das Ektoenzym charakteristischen MWs enthielt (Abb. 4.10 und 4.13). Auch wenn es sich bei dieser Fraktion wahrscheinlich um eine an intrazellulären Membranen/Organellen angereicherte Fraktion handelt, die eine im Inneren der Zellen lokalisierte Form (Variante?) von CD38 enthält, erschien die Verwendung dieser Fraktion trotzdem gerechtfertigt, da sich ihre ADPRC- und NADGH-Aktivität unter den für das Ektoenzym CD38 inhibitorischen Bedingungen (Abb. 4.14) sehr ähnlich wie die des letzteren verhielt (Daten nicht gezeigt). Verglichen mit intakten Zellen, wies die P10-Fraktion, die immer in ausreichender Menge und konstanter Qualität verfügbar war, basal eine deutlich höhere katalytische Aktivität als intakte Zellen auf. Zusätzlich war sie in den RP-HPLC-Enzymassays leichter handhabbar.

Die zur pharmakologischen Charakterisierung der verschiedenen Präparationen der ADPRCs/NADGHs ausgewählten Testsubstanzen umfaßten Produkte und Nebenprodukte der katalytischen Reaktion (cADPR, ADPR und Nicotinamid sowie, zur Kontrolle, sein Strukturhomolog Isonicotinamid), publizierte Inhibitoren von CD38, der ADPRC aus *A. californica* und der Poly-ADP-Ribosylpolymerase/-transferase (PARP) sowie zusätzlich einige weitere, interessant erscheinende Verbindungen. Die meisten der untersuchten Substanzen inhibierten die katalytische Aktivität der beiden subzellulären Fraktionen P10 und S100 kaum oder nur sehr schwach. Zu diesen Substanzen gehörten die Nukleotide cADPR, ADPR und ATP (Abb. 15 G, H und Abb. 16.G, H) und ebenso die PARP-Inhibitoren 1,5-Isoquinolindiol und 3-Aminobenzamid (3-ABA; Abb. 15 E, F und Abb. 16 E, F). Zur Inhibition von PARP weisen die beiden letztgenannten Verbindungen halbmaximale inhibitorische Wirkkonzentrationen (IC_{50} -Werte) von 0,39 μ M (1,5-Isoquinolindiol [Banasik et al. 1992]) und 5,4-33 μ M (3-Aminobenzamid [Rankin et al. 1989, Banasik et al. 1992]) auf. Eine wesentlich stärkere Inhibition der katalytischen Aktivität, jeweils sowohl der ADPRC- (ϵ -cADPR-Synthese) als auch der NADGH-Aktivität (ϵ -ADPR-Synthese), beider Enzympräparationen wurde mit der Substanz Nicotinamid (Nic; Abb. 4.15. C, D und Abb. 4.16 C, D), nicht aber mit Isonicotinamid (Iso-Nic; gleiche Abbildungen), sowie mit den Verbindungen Nicotinamidhypoxanthindinukleotid (NHD; Abb. 4.15 A,B und Abb. 4.16 A, B) und β -Nicotinamidmononukleotid (β -NMN; Abb. 4.15 C, D und Abb. 4.16 C, D) erreicht. Als vollständig unwirksam im untersuchten Konzentrationsbereich (10 μ M bis 1 mM) erwiesen sich die mit NHD verwandten Substanzen Inosin und Inosin-5'-Monophosphat (nicht gezeigt).

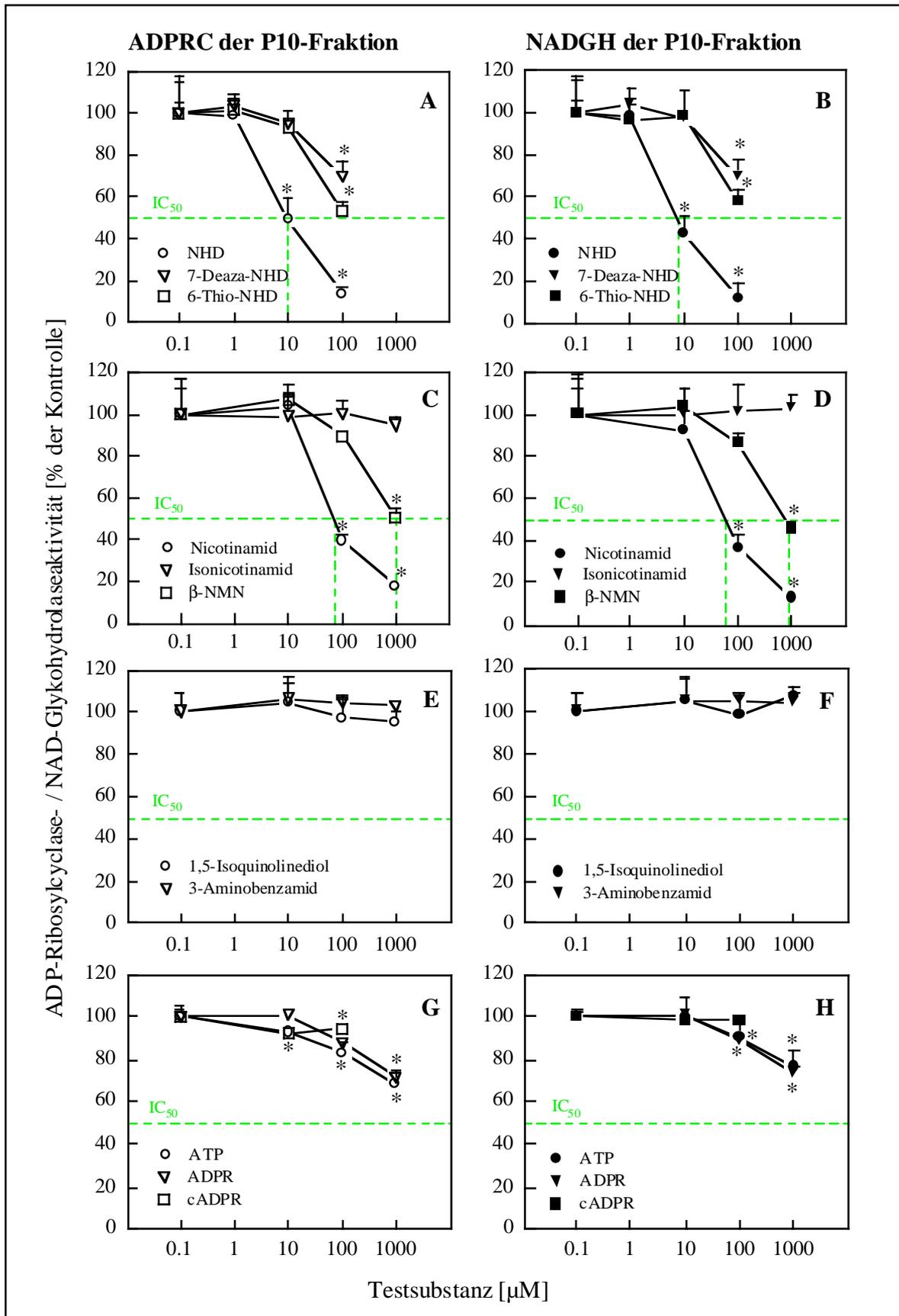


Abb. 4.15: Pharmakologisches Profil der membranständigen ADPRC/NADGH (CD38) der Membranfraktion P10 der Jurkat-Lymphozyten. Abbildungslegende, siehe übernächste Seite.

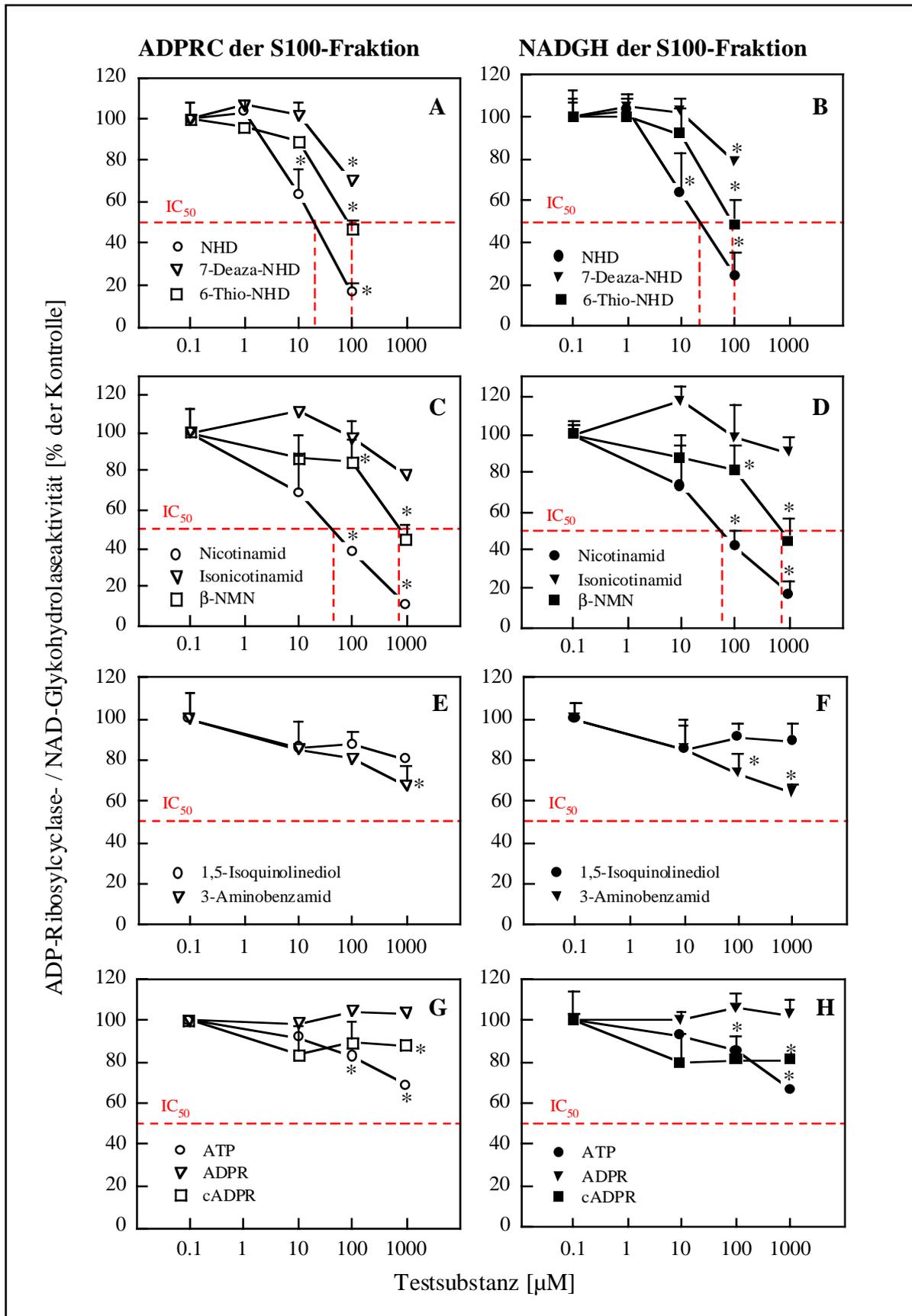


Abb. 4.16: Pharmakologisches Profil der HA-gereinigten ADPRC/NADGH der cytosolischen S100-Fraktion (100.000-g-Überstand) der Jurkat T-Lymphozyten. Abbildungslegende, siehe nächste Seite.

Legende zu Abb. 4.15

Aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnene P10-Membranen (0,1-0,2mg Protein/ml), suspendiert in intrazellulärem Puffer (pH 7,2), wurden nach Zusatz verschiedener Testsubstanzen (Endkonzentrationen, wie in der Abbildung aufgeführt) in Gegenwart des Substrates ϵ -NAD (Endkonzentration 100 μ M) für 2000 Sek. (33 Min.) unter kontinuierlichem Rühren bei RT inkubiert. Zum Stop der enzymatischen Reaktion wurden die Ansätze in ein Eis-Salzbad (ca. -5 °C) gestellt. Anschließend wurden die Proben durch Zentrifugation (12.000 rpm, 3 Min., 4 °C, Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K) vorgereinigt und Proteine sowie andere Komponenten der Proben mit hohem MW dann durch Ultrazentrifugation abgetrennt (10 kDa MWCO, Zentrifugation für 30 Min. bei 4 °C und 3000•g; 3.2.7.1). Die Substanzmengen an ϵ -cADPR und ϵ -ADPR, die während der enzymatischen Reaktion aus ϵ -NAD synthetisiert worden waren, wurden dann entsprechend der Beschreibung im Abschnitt Material & Methoden (3.2.8.1) quantitativ durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{Ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm) bestimmt. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus jeweils mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelexperimenten. Werte, die sich mit $p \leq 0,05$ (Student's T-Test) signifikant von dem jeweiligen Kontrollwert (unbehandelter Extrakt) unterscheiden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Mittelwerte der Aktivität von ADPRC und NADGH der für die Experimente eingesetzten P10-Extrakte wurden mit 17,99 nMol/mg (ADPRC) und 164,07 nMol/mg (NADGH) bestimmt. Das Verhältnis von ADPRC- zu NADGH-Aktivität belief sich auf einen Wert von 1:9,12 (n=15).

Legende zu Abb. 4.16

Aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnener, HA-gereinigter S100-Extrakt (0,3-1 mg Protein/ml), gelöst in intrazellulärem Puffer (pH 7,2) wurde in Abwesenheit oder nach Zusatz von diversen Testsubstanzen, wie in der Abbildung im Einzelnen aufgeführt, in Gegenwart des Substrates ϵ -NAD (Endkonzentration 100 μ M) für 2000 Sek. (33 Min.) bei RT unter kontinuierlichem Rühren inkubiert. Zum Stop der enzymatischen Reaktion wurden die Ansätze in ein Eis-Salzbad (ca. -5 °C) gestellt. Protein und andere Ansatzkomponenten mit hohem MW wurden anschließend durch Ultrafiltration (10 kDa MWCO, Zentrifugation für 30 Min., bei 4 °C und 3000•g) von den löslichen Nukleotiden getrennt (3.2.7.1). Die Substanzmengen an ϵ -cADPR und ϵ -ADPR, die während des katalytischen Umsatzes aus ϵ -NAD synthetisiert worden waren, wurden dann quantitativ durch RP-HPLC mit Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{Ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm) bestimmt (3.2.8.1). Die präsentierten Daten stellen die Mittelwerte \pm SD aus jeweils mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Einzelexperimenten dar. Werte die sich mit $p \leq 0,05$ (entsprechend Student's T-Test) signifikant von dem jeweils zugehörigen Kontrollwert (unbehandelter Extrakt) unterscheiden, sind mit einem Stern markiert. Die Mittelwerte der Aktivität von ADPRC und NADGH der für die Experimente eingesetzten cytosolischen Extrakte wurden mit 0,820 nMol/mg (ADPRC) und 8,57 nMol/mg (NADGH) bei einem Ratio von 1:10,45 (ADPRC-/NADGH-Aktivität) bestimmt (n=17).

Hypoxanthin konnte aufgrund seiner Unlöslichkeit sowohl in DMSO als auch in wässrigen Lösungen nicht auf seine inhibitorische Wirkung untersucht werden. Die Verbindungen *bis*-Adenindinukleotid (Ap_2A), *bis*-Inosindinukleotid (Ip_2I) und Benzamidadenindinukleotid (Bp_2A) waren inhibitorisch unwirksam. Bei den letztgenannten Verbindungen handelt es sich um wirksame Inhibitoren der ADPRC aus *A. californica* [Migaud *et al.* 1999]. Insbesondere Bp_2A stellt sich mit einem IC_{50} von 189 nM als ein sehr effektiver Inhibitor dieses Enzyms dar. Obgleich die Verbindungen Ap_2A und Ip_2I nach Angaben der gleichen Autoren mit IC_{50} -Werten von 900 nM (Ap_2A) und 12 μ M (Ip_2I) eine erheblich schwächere inhibitorische Wirksamkeit zeigen, sind sie mit IC_{50} -Werten im niedrig mikromolaren Bereich immernoch als effiziente Inhibitoren der *Aplysia*-ADPRC anzusehen [Migaud *et al.* 1999].

Die inhibitorischen Eigenschaften von NHD, das sich bei einem IC_{50} von etwa 10 μ M (ADPRC/NADGH der P10-Fraktion), bzw. von 30-40 μ M (ADPRC/NADGH der S100-Fraktion) verglichen mit den anderen durchgemusterten Testsubstanzen als diejenige mit der

niedrigsten effektiven Wirkungskonzentration erwies, wurden in weiteren Experimenten näher charakterisiert. Dazu wurden auch Varianten dieser Substanz, nämlich 6-Thio-NHD und 7-Deaza-NHD, auf ihre inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Diese wurden zu diesem Zweck neu synthetisiert und freundlicherweise von *Prof. B.V.L. Potter* (Universität Bath/UK) zur Verfügung gestellt. Obwohl beide NHD-Varianten ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die ADPRC- und NADGH-Aktivität der untersuchten Enzympräparationen zeigten (Abb. 4.15 A,B und Abb. 4.16 A,B), waren sie ebenfalls beide dennoch deutlich schlechter wirksam als die Ausgangsverbindung NHD (gleiche Abbildungen, bzw. Tab. 4.4). Anhand der dargestellten Daten ermittelte IC_{50} -Werte inhibitorisch effektiv wirksamer Testsubstanzen sind in Tab. 4.4 zusammenfassend dargestellt. Vergleicht man die gesamten Inhibitionsprofile, die für die ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion (Abb. 4.16), bzw. der P10-Fraktion (Abb. 4.15) der Lymphozyten erhalten wurden, so ähneln diese sich gesamt gesehen stark. Dennoch gibt es einige signifikante Unterschiede, die die einesteils auf den kombinierten Daten aus Western Blots zum Nachweis von CD38 und der Bestimmung der ADPRC-Gesamtaktivität in den subzellulären Fraktionen P10, P100 und S100 basierende (Abb. 4.13) und andernteils auf den in Abb. 4.14 dargestellten Experimenten begründete Schlußfolgerung stärken, daß sich die cytosolische ADPRC/NADGH der Jurkat-Lymphozyten zumindest in einigen, vielleicht wichtigen Aspekten von membranständigem CD38 unterscheidet. So wurde das cytosolische Enzym von den beiden PARP-Inhibitoren 1,5-Isoquinolindiol und 3-Aminobenzamid zumindest schwach inhibiert (Abb. 4.16 E, F), während sich das membranständige CD38 vollständig insensitiv zeigte (Abb. 4.15 E, F). Umgekehrt wurde das CD38 der P10-Fraktion schwach durch ADPR inhibiert (Abb. 4.15 G, H), wohingegen sich das cytosolische Enzym als insensitiv darstellte (Abb. 4.16 G, H). Beide Enzyme wurden dagegen schwach durch ATP inhibiert. Dabei kam es entgegen einem Literaturbericht [*Takasawa et al.* 1993b] jedoch nicht zu einer nennenswerten Verschiebung des Verhältnisses von ADPRC- und NADGH-Aktivität zugunsten der cADPR-Synthese (Abb. 4.15 G, H und Abb. 4.16 G, H). Da in der zitierten Publikation [*Takasawa et al.* 1993b] jedoch ein anderes, spezialisiertes Zellsystem (β -Zellen des Pankreas) bearbeitet wurde, sind die dort beschriebenen Daten mit den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen möglicherweise nicht direkt vergleichbar.

Von der sowohl die membranständigen (CD38) als auch die lösliche ADPRC/NADGH der S100-Fraktion der Jurkat-Lymphozyten wirksam inhibierenden Substanz NHD wurde zusätzlich eine membranpermeante Variante (8-Br-NHD) entwickelt und synthetisiert (*Prof. Potter*, Bath/UK) und anschließend ebenfalls in ihren Eigenschaften charakterisiert.

Tab. 4.4: Auflistung als Inhibitoren der ADPRC/NADGHs der Jurkat T-Lymphozyten identifizierter Testsubstanzen

Inhibition der ADPRC/NADGH der Membranfraktion P10			Inhibition der ADPRC/NADGH der cytosolischen Fraktion S100		
Testsubstanz	IC ₅₀ [μM]		Testsubstanz	IC ₅₀ [μM]	
	ADPRC	NADGH		ADPRC	NADGH
NHD	10	9	NHD	33	43
6-Thio-NHD	> 100	> 100	6-Thio-NHD	95	100
8-Br-NHD	172	187	8-Br-NHD	138	85
Nikotinamid	85,5	80	Nikotinamid	70	77,5
β-NMN	1000	900	β-NMN	900	850

Anmerkung: Die IC₅₀-Werte wurden bei linearer Auftragung der dargestellten Versuchsdaten abgelesen. Nur die Testsubstanzen, deren IC₅₀ innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs lag, wurden in der Tabelle berücksichtigt. Der IC₅₀ für die Inhibition des Ektoenzym CD38 durch 8-Br-NHD lag bei 172 μM (ADPRC) und 205 μM (NADGH).

Dazu wurde zunächst auch das inhibitorische Potential dieser NHD-Variante auf die ε-cADPR- und ε-ADPR-Synthese sowohl der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion als auch des membranständigen CD38 der P10-Fraktion sowie zusätzlich des an der Zelloberfläche intakter Lymphozyten exprimierten CD38-Ektoenzym untersucht. Wie bereits die zuvor durchgemusterten NHD-Varianten (6-Thio-NHD und 7-Deaza-NHD), zeigte auch 8-Br-NHD verglichen mit der Ausgangsverbindung NHD eine schwächer ausgeprägte inhibitorische Wirkung (Abb. 4.17 A, B, im Vergleich zu Abb. 4.15 A, B und Abb. 4.16 A, B). Trotzdem stellte 8-Br-NHD als erster membrangängiger ADPRC-/NADGH-Inhibitor ein sehr nützliches Werkzeug dar. So wurde 8-Br-NHD in nachfolgenden Experimenten genutzt, um mittels einer Vorinkubation intakter Lymphozyten in seiner Gegenwart auch intrazellulär lokalisierte ADPRCs/NADGHs zu inhibieren, und dann über einen Vergleich mit unbehandelten Zellen die Bedeutung der katalytischen Aktivität dieser Enzyme für die Erhöhung der [Ca²⁺]_i im Anschluß an eine über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Stimulation zu analysieren. Eine Vorinkubation der Zellen mit 8-Br-NHD (30 Min.) war hier, anders als in Enzymassays, notwendig, um die Aufnahme der Substanz in die Zellen zu ermöglichen. Als problematisch für die Durchführung fluorimetrischer Messungen der [Ca²⁺]_i an intakten, mit Fura-2 beladenen Zellen in Gegenwart von 8-Br-NHD stellte sich eine erhebliche Eigenfluoreszenz der Verbindung bei der Exzitationswellenlänge von 380 nm dar. Letztere wird in ratiometrischen Messungen der [Ca²⁺]_i neben einer zweiten Exzitationswellenlänge von 340 nm zur Anregung der Fluoreszenz von Fura-2 verwendet. Das Phänomen der Eigenfluoreszenz von 8-Br-NHD hatte zur Folge, daß stimulierte Ca²⁺-Signale stark unterdrückt und eine Kalibrierung der Messungen verhindert, bzw. in ihrer Aussagekraft

maßgeblich beeinträchtigt wurde. Dieses Problem konnte jedoch gelöst werden, indem die mit 8-Br-NHD vorinkubierten Zellen vor ihrer Vermessung am Fluorimeter wiederholt gewaschen wurden, um nicht in die Zellen aufgenommenes 8-Br-NHD zu entfernen.

In Abb. 4.17 (C) sind charakteristische zeitliche Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ in mit Fura-2 beladenen Lymphozyten dargestellt, die ohne Vorbehandlung (Con) oder nach Vorbehandlung mit 8-Br-NHD durch OKT3 mAK über den TCR/CD3-Komplex stimuliert worden waren. Während die Peakphase der $[Ca^{2+}]_i$ nach OKT3-Stimulation der Lymphozyten nur schwach, nach Vorinkubation der Zellen in Gegenwart von 500 μ M 8-Br-NHD jedoch signifikant ($p \leq 0,05$) inhibiert wurde, war der inhibitorische Effekt der Substanz auf die Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ im Anschluß an die Stimulation stärker ausgeprägt und bereits nach Vorinkubation der Zellen in Gegenwart von 250 μ M 8-Br-NHD mit $p \leq 0,05$ signifikant nachweisbar. Um zu belegen, daß es sich bei der inhibitorischen Wirkung von 8-Br-NHD nicht um einen artifiziellen Effekt handelt, die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher prinzipiell intakt und depletierbar sind und eine Freisetzung von Ca^{2+} aus den Speichern mit der eingesetzten Methode auch nach Vorinkubation der Zellen mit 8-Br-NHD noch adäquat bestimmt werden kann, wurden die Zellen nach der ersten Stimulation mit OKT3 und dem Erreichen der Plateauphase des über diese Stimulation vermittelten Ca^{2+} -Signals ein zweites Mal mit Thapsigargin (Tg) stimuliert. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor der am ER/SR lokalisierten Ca^{2+} -ATPasen (SERCAs), deren Aufgabe es ist, Ca^{2+} aus dem Cytosol ins Lumen dieses intrazellulären Membransystems zu pumpen, das als ein wichtiger (der wichtigste) Ca^{2+} -Speicher im Cytosol von Zellen dient.

Wie die zeitlichen Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ der OKT3-stimulierten Lymphozyten zeigen (Abb. 4.17 C), konnte durch eine zweite Stimulation mit Tg sowohl in unbehandelten Kontrollzellen (Con) als auch in Zellen, die mit 8-Br-NHD vorbehandelt worden waren, jeweils ein zusätzliches Ca^{2+} -Signal, wiederum bestehend aus einer ausgeprägten Peak- und einer weniger ausgeprägten Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ ausgelöst werden, das in seiner Ausprägung nach einer erfolgten Vorinkubation der Zellen in Gegenwart von 8-Br-NHD nicht beeinträchtigt war. Während sich die Höhe der $[Ca^{2+}]_i$ in der Peakphase nach Tg-Stimulation in unbehandelten Kontrollzellen signifikant ($p \leq 0,05$) von derjenigen in der Peakphase nach OKT3-Stimulation unterschied, war in der Höhe der $[Ca^{2+}]_i$ der Plateauphasen nach Tg-Stimulation, bzw. nach OKT3-Stimulation kein signifikanter Unterschied feststellbar, was bedeutet, daß Tg im Wesentlichen ein monophasisches Ca^{2+} -Signal stimuliert.

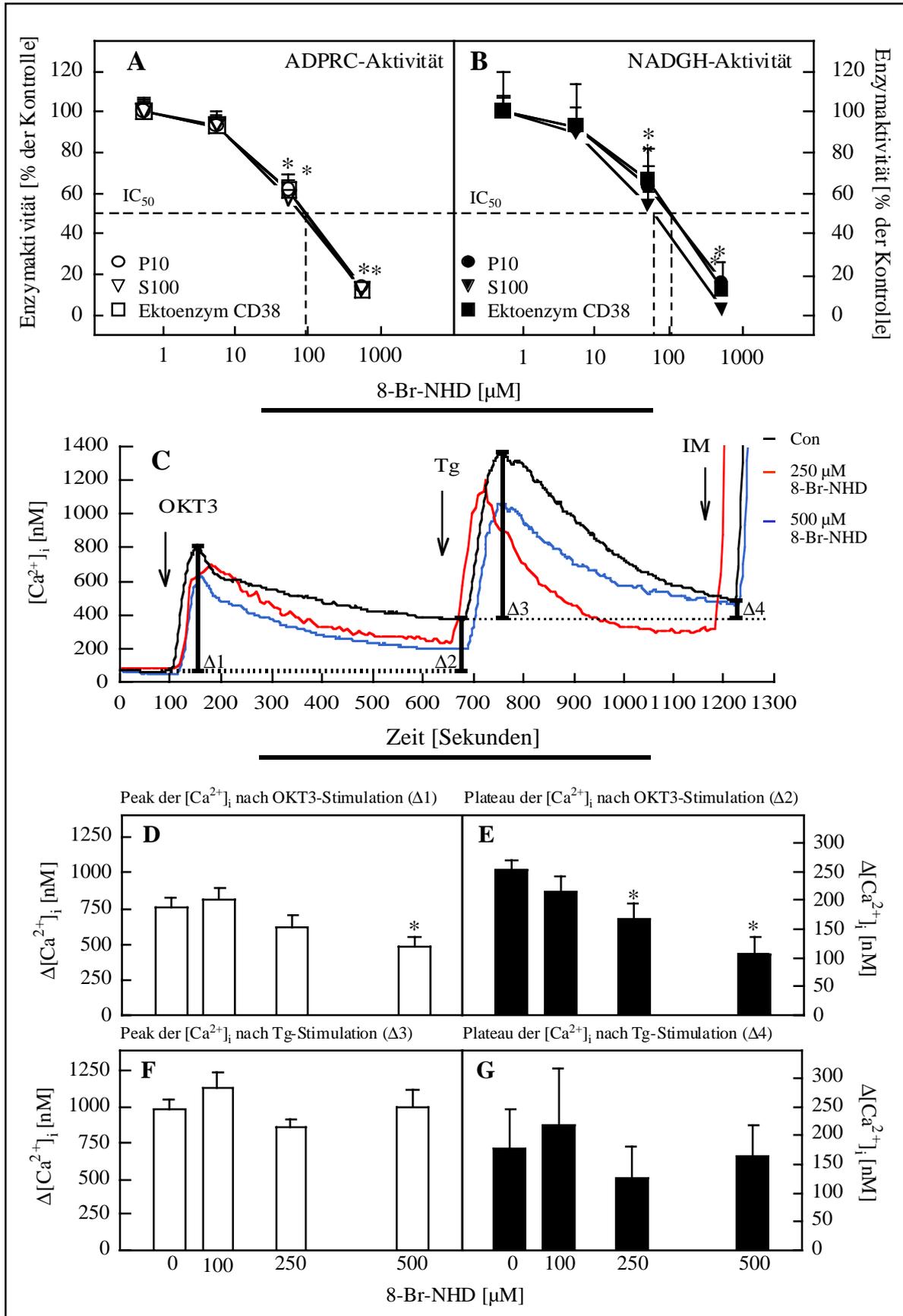


Abb. 4.17: Wirkung des membranpermeanten 8-Br-NHD (1.) auf ADPRCs/NADGHs von Jurkat T-Lymphozyten und (2.) auf das über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Ca^{2+} -Signal im Anschluß an eine Stimulation der Lymphozyten mit OKT3 (anti-CD3 mAK). Abbildungslegende, siehe nächste Seite.

Legende zu Abb. 4.17

In Abb. 4.17 (A, B) ist die inhibitorische Wirkung der Substanz 8-Br-NHD auf die katalytische Aktivität des Ektoenzym CD38 an der Oberfläche intakter Jurkat T-Lymphozyten (resuspendiert zu einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Calcium-Messpuffer pH 7.4) sowie auf die ADPRCs/NADGHs der aus Jurkat-Lymphozyten gewonnenen Membranfraktion P10 (0,1 mg Protein/ml) und der HA-gereinigten S100-Fraktion (0,3 mg Protein/ml) dargestellt. Die Bestimmung der katalytischen Aktivität der Extrakte/intakten Zellen unter Kontroll- und inhibitorischen Bedingungen erfolgte, wie im Kapitel Material & Methoden beschrieben (3.2.7.1 und 3.2.8.1), im RP-HPLC-Enzymassay unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (100 μ M). 8-Br-NHD wurde den Versuchsansätzen ohne vorausgehende Vorinkubation direkt vor dem Substrat zugesetzt und war dann während der gesamten Dauer des Assays zugegen. Die für die Inhibition der ADPRC- (A) und NADGH-Aktivität (B) erhaltenen Daten sind als Mittelwerte \pm SD aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. Werte, die sich mit $p \leq 0,05$ (Student's T-Test) von den Kontrollwerten unter nicht inhibitorischen Bedingungen unterscheiden, wurden mit einem Stern markiert. In (C) sind charakteristische zeitliche Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ der fluorimetrischen Vermessung von intakten Fura-2-beladenen Lymphozyten ($1 \cdot 10^6$ /ml Calcium-Messpuffer; pH 7,4) unter Kontrollbedingungen (Con) und nach Inhibition mit 8-Br-NHD (Endkonzentration 100, 250 oder 500 μ M, Vorinkubation 30 Min. im Dunklen) dargestellt. Nach Aufzeichnung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ wurden die Zellen zunächst mit OKT3 (10 μ g/ml) stimuliert und das Eintreten sowohl der Peak- als auch der Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ im Anschluß an die Stimulation abgewartet. Anschließend wurden die Zellen ein zweites Mal mit Thapsigargin (Tg, Endkonzentration 1 μ M) stimuliert und wiederum Peak- und Plateauphase des dadurch ausgelösten Ca^{2+} -Signals aufgezeichnet. Zu definierten Zeitpunkten (in der Abbildung mit $\Delta 1$ - $\Delta 4$ gekennzeichnet), die der Peakphase des Ca^{2+} -Signals nach OKT3- ($\Delta 1$) oder Tg-Stimulation ($\Delta 3$), bzw. der Plateauphase des Ca^{2+} -Signals nach OKT3- ($\Delta 2$) oder Tg-Stimulation ($\Delta 4$) entsprachen, wurde die Differenz zwischen der $[Ca^{2+}]_i$ zu Beginn der jeweiligen Messung (basale $[Ca^{2+}]_i$ vor OKT3-Stimulation), bzw. direkt vor Zusatz des Stimulans (Tg-Stimulation) und dem Wert der $[Ca^{2+}]_i$ zu dem gegebenen Zeitpunkt [nM] bestimmt (= $\Delta[Ca^{2+}]_i$). In (D-G) sind die Mittelwerte \pm SD der auf diese Weise an unbehandelten Kontrollzellen, bzw. an zur Inhibition des Ca^{2+} -Signals mit 8-Br-NHD vorinkubierten Zellen (s.o.) erhobenen Werte der $\Delta[Ca^{2+}]_i$, jeweils getrennt für die Peak- (D) und die Plateauphase (E) der $[Ca^{2+}]_i$ nach OKT3-Stimulation und für die Peak- (F) und die Plateauphase (G) nach Tg-Stimulation dargestellt. Unter jeder Versuchsbedingung wurden 5-7 voneinander unabhängige Einzelmessungen durchgeführt. Werte, die sich mit $p \leq 0,05$ von dem jeweils zugehörigen, an unbehandelten Zellen erhobenen Kontrollwert unterscheiden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die präsentierten fluorimetrischen Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ wurden von *K. Weber* durchgeführt und die Ergebnisse mir freundlicherweise von *K. Weber & Prof Guse* zur Verfügung gestellt.

Wichtig an dieser Stelle war jedoch lediglich, daß durch Stimulation mit Tg, über eine Entleerung des ER- Ca^{2+} -Speichers, unabhängig von einer Vorbehandlung der Zellen mit der Substanz 8-Br-NHD eine Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ im Cytosol der Lymphozyten erreicht werden konnte. In Abb. 4.17 (D-G) ist das Gesamtergebnis aus allen durchgeführten Einzelmessungen dargestellt. Während sich die Werte der $[Ca^{2+}]_i$ von unbehandelten Lymphozyten, verglichen mit denen, die mit 8-Br-NHD vorinkubiert worden waren, nach Tg-Stimulation sowohl während der Peak- (F) als auch während der Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ (G) nicht signifikant unterschieden, waren nach spezifischer Stimulation der Zellen über den TCR/CD3-Komplex jeweils signifikante Unterschiede feststellbar. Insbesondere die lang anhaltende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (E) wurde durch Vorinkubation der Zellen mit 8-Br-NHD (500 μ M) stark (ca. 50%) inhibiert. Die Peakphase der $[Ca^{2+}]_i$ (D) wurde dagegen schwächer (ca. 36%), aber ebenfalls signifikant ($p \leq 0,05$) inhibiert. Die Unterdrückung des lang anhaltenden, durch Stimulation der Lymphozyten über den TCR/CD3-Komplex vermittelten Ca^{2+} -Signals entsprach in ihrem Ausmaß sehr gut dem inhibitorischen Effekt des membranpermeanten cADPR-Antagonisten 7-Deaza-8-Bromo-cADPR [*Sethi et al.* 1997] auf eben dieses Ca^{2+} -Signal [*Guse et al.* 1999].

Zur Vervollständigung der Daten zu diesem Inhibitor wurde schließlich auch die Auswirkung einer Inhibition von intrazellulär lokalisierten ADPRCs/NADGHs durch 8-Br-NHD auf die Proliferation der Jurkat T-Lymphozyten untersucht. Wie in Abbildung 4.18 (D) gezeigt, konnte auch in Bezug auf die Proliferation eine dosisabhängige Inhibition festgestellt werden.

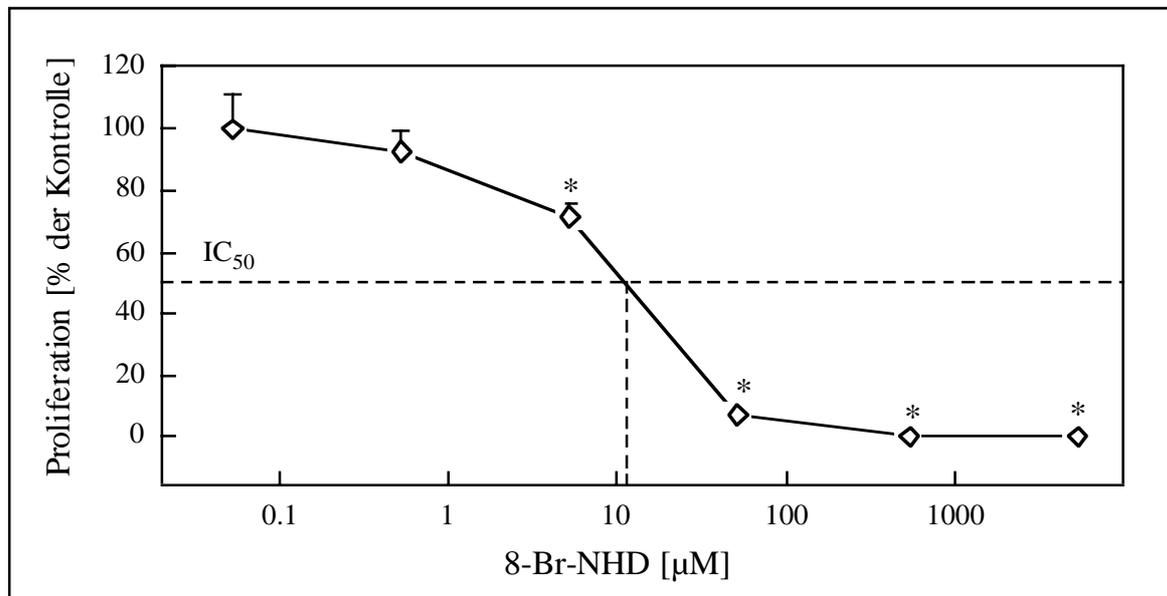


Abb. 4.18: Inhibition der Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten durch 8-Br-NHD. Um die Wirkung der Substanz 8-Br-NHD auf die Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden die zu diesem Zweck in serumfreiem Medium suspendierten Zellen (Zellichte $2 \cdot 10^4$ Zellen/200 µl) zunächst für 2 Stunden bei 37 °C in Gegenwart von 8-Br-NHD (Endkonzentrationen, wie in der Abbildung angegeben) vorinkubiert. Anschließend wurde den Ansätzen Serum (NCS; 7,5% v/v) zugesetzt und die Zellen dann weiter für 96 Stunden bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Alle 24 Stunden wurde die Zellzahl in den Ansätzen durch Auszählen in einem Hämocytometer bestimmt. Anhand der nach 96 Stunden Inkubation erhaltenen Zellzahlen wurde eine Dosiswirkungskurve für die Inhibition der Proliferation der Lymphozyten berechnet. Der Zustand der Zellen wurde bei jeder Zellzählung durch Trypanblau-Färbung überprüft. Jede der Versuchsbedingungen umfaßte 3 Parallelansätze. Das Gesamtexperiment wurde zweimal unabhängig durchgeführt. Werte, die sich mit $p \leq 0,05$ vom Kontrollwert unterschieden, sind mit einem Stern markiert. Der IC₅₀-Wert für die Inhibition der Proliferation durch die Substanz 8-Br-NHD wurde bei linearer Auftragung der dargestellten Daten mit 19 µM bestimmt.

Während nach kurzzeitiger Inkubation der Zellen in Gegenwart von 8-Br-NHD und anschließender Trypanblau-Färbung der Lymphozyten, beispielweise nach 30-60 Minuten Vorinkubation und nachfolgender Durchführung einer fluorimetrischen Messung der $[Ca^{2+}]_i$, keine toxischen Effekte des Inhibitors feststellbar waren, wurde nach längerfristiger Inkubation der Zellen unter den inhibitorischen Bedingungen, wie hier im Proliferationsassay, doch ein vermehrtes Absterben der Lymphozyten, insbesondere bei Inkubation der Zellen in Gegenwart hoher Konzentrationen von 8-Br-NHD, festgestellt (nicht dargestellt). Dabei ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar, ob dies auf direkt toxische Effekte der Substanz oder die Inhibition der Proliferation und eines (oder auch mehrerer) für die Zellen möglicherweise essentiellen Signalweges zurückzuführen ist.

Auch wenn es mit Hilfe einer pharmakologischen Charakterisierung der in Jurkat T-Lymphozyten unterschiedlich lokalisierten ADPRCs/NADGHs, insbesondere einer Charakterisierung des in der cytosolischen Fraktion der Lymphozyten vorhandenen Enzyms gegenüber den membranständigen Varianten von CD38, nicht gelang, besonders auffällige Unterschiede in den Eigenschaften dieser Enzyme aufzutun, ließen sich doch einige spezifische Eigenschaften der cytosolischen ADPRC/NADGH herausarbeiten. Zu diesen Eigenschaften gehören eine physiologisch potentiell bedeutsame, selektive Insensitivität der ADPRC-Aktivität dieses Enzyms gegenüber einer Inhibition/Inaktivierung durch DTT, die seine NADGH-Aktivität bemerkenswerterweise nicht betrifft und damit eine Möglichkeit zur Regulation des Verhältnisses von ADPRC- und NADGH-Aktivität bietet, eine im Vergleich zum Ektoenzym CD38 geringere Sensitivität gegenüber einer Inaktivierung durch alkalischen pH sowie eine, wenngleich nur geringfügige, Sensitivität gegenüber den PARP-Inhibitoren Isoquinolindiol und 3-Aminobenzamid. Ob und inwieweit das cytosolische Enzym mit CD38 verwandt ist, blieb weiterhin ungeklärt. Als wichtigste Ergebnisse dieses experimentellen Abschnitts sind die Entdeckung der inhibitorischen Eigenschaften von NHD und die erfolgreiche Synthese einer wirksamen, membranpermeanten Variante dieser Substanz (8-Br-NHD) inklusive ihrer Charakterisierung herauszustellen. Mittels dieser Substanz gelang es zu zeigen, daß unabhängig von einer Verwandtschaft mit dem Ektoenzym CD38 eine oder mehrere intrazellulär lokalisierte ADPRC(s)/NADGH(s) von wesentlicher Bedeutung sowohl für die Proliferation der Lymphozyten als auch für die Ausbildung eines lang anhaltenden Ca^{2+} -Signals im Cytosol der Zellen sind. Während eine wirksame Inhibition der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 an der Oberfläche intakter Lymphozyten das durch OKT3 stimulierte intrazelluläre Ca^{2+} -Signal in keiner Weise beeinträchtigte, war dieses nach Vorinkubation der Zellen in Gegenwart von 8-Br-NHD, das neben dem Ektoenzym CD38 auch die intrazellulären ADPRCs/NADGHs inhibiert, erheblich (ca. 50%) reduziert. Die Tatsache, daß die inhibitorische Wirkung von 8-Br-NHD sehr gut mit der des ebenfalls membranpermeanten cADPR-Antagonisten 7-Deaza-8-Bromo-cADPR korrelierte [Guse *et al.* 1999], kann als Indiz für eine selektive Wirkung beider Substanzen auf durch cADPR vermittelte intrazelluläre Signalwege und eine funktionelle Bedeutung dieser Signalwege für die Regulation zellulärer Funktionen der Lymphozyten gewertet werden, zu denen die Proliferation der Lymphozyten sowie ihre spezifische Aktivierung über den TCR/CD3-Komplex gehören.

4.3.3 ADPRC- und NADGH-Aktivität in CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten versus wt-T-Lymphoblasten der Maus

Als eine weitere Option, um Aufschluß über die (quantitative) Bedeutung des Ektoenzym CD38 und möglicher intrazellulärer Varianten dieses Proteins sowie über die potentielle Expression und (quantitative) Bedeutung weiterer, möglicherweise nicht mit CD38 verwandter ADPRCs/NADGHs für die cADPR-Synthese in T-Lymphozyten zu erhalten, wurde die Möglichkeit genutzt, Aktivität und subzelluläre Verteilung von ADPRCs/NADGHs vergleichend in aus Milzen von CD38 (-/-)- und aus wt-Mäusen isolierten T-Lymphoblasten zu bestimmen und die subzelluläre Verteilung der Enzyme in T-Lymphoblasten der wt-Mäuse zusätzlich mit der in den humanen Jurkat T-Lymphozyten zu vergleichen. Aus Milzen von homozygoten CD38 (-/-)-Mäusen und wt-Mäusen isolierte und, wie im Abschnitt Material & Methoden beschrieben, in Zellkultur expandierte T-Lymphoblasten wurden freundlicherweise von *Dr. F. Lund* (Saranac Lake/USA) zur Verfügung gestellt. Im Rahmen des CD38-Knockouts auf embryonaler Stammzebene waren in den homozygot negativen Mäusen Exon 2 und Exon 3 des für CD38 codierenden Gens durch homologe Rekombination entfernt und durch ein Neomycinresistenzgen ausgetauscht worden [*Cockayne et al.* 1998]. Der Austausch dieser beiden Exons des CD38-Gens wurde gewählt, da sie für eine Reihe von Aminosäureresten codieren, die für die katalytische Aktivität des Proteins bedeutsam sind [*Grimaldi et al.* 1995, sowie Abb. 4.11 und Referenzen]. In den CD38 (-/-)-Mäusen wurde das Fehlen der CD38-spezifischen mRNA durch Northern Blot-Analyse und die Expression des CD38-Proteins durch Untersuchung der Immunreaktivität des Ektoenzym im fluoreszenz-aktivierten Cell Sorter (FACS-Analyse) nachgewiesen [*Cockayne et al.* 1998].

Zur Vorbereitung der nachfolgend dargestellten Experimente wurde mit den aus CD38 (-/-)- und wt-Mäusen gewonnenen T-Lymphoblasten zunächst entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.3 eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Zum Nachweis katalytischer Aktivität in Hinblick auf cADPR- und ADPR-Synthese wurden Aliquots der Fraktionen dann, unter Nutzung des Substrates ϵ -NAD im RP-HPLC-Enzymassay vermessen. In Abb. 4.19 sind die als Summe aus der jeweiligen katalytischen Aktivität aller einzelnen subzellulären Fraktionen für die Gesamthomogenate der Zellen berechneten Gesamtaktivitäten dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die für die katalytische Aktivität der Homogenate in Hinblick auf ϵ -cADPR- (B), ϵ -ADPR- (C) und ϵ -Ado-Synthese (D) berechneten Ergebnisse jeweils auf eine gleiche Menge an eingesetztem Gesamtprotein (A) bezogen.

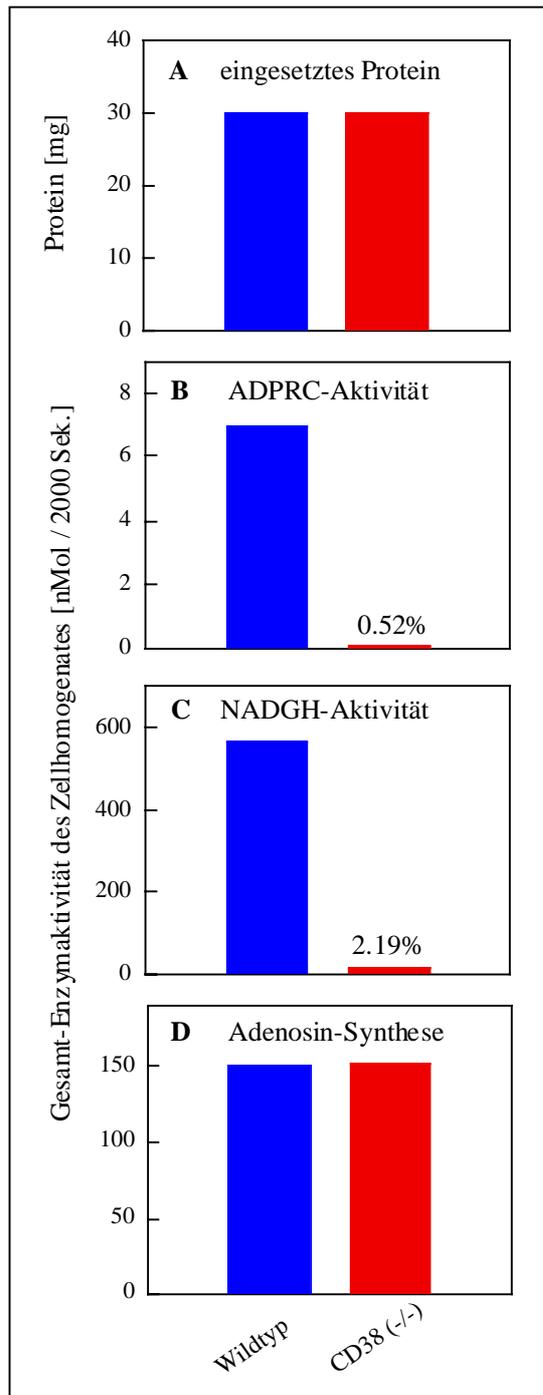


Abb. 4.19: Vergleich der ADPRC- und NADGH-Aktivität von Homogenaten aus Milzen von wt-, bzw. CD38 (-/-)-Mäusen gewonnener T-Lymphoblasten. Durch differentielle Zentrifugation erhaltene subzelluläre Fraktionen aus Milzen von wt-, bzw. CD38 (-/-)-Mäusen isolierter T-Lymphoblasten wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.1 und 3.2.8.1 unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (100 μ M) im RP-HPLC-Enzymassay vermessen. Von allen Fraktionen wurde die Gesamtaktivität in Bezug auf die Synthese der Nucleotide ϵ -cADPR, ϵ -ADPR und ϵ -Adenosin je 2000 Sek. (33 Min.) bestimmt. Die Assays wurden in einem Volumen von 1 ml intrazellulärem Puffer (pH 7,2) durchgeführt. Die eingesetzten Mengen an Protein lagen bei 1 mg (entsalztes S100, 100.000•g-Überstand), 0,5 mg (P2-Membranen und gewaschene P100-Membranen, P100*), 0,3 mg (entsalzte P100-Waschfraktion, PS100) und 0,2 mg (P10-Membranen). Die katalytische Gesamtaktivität der Homogenate bezogen auf die Synthese der Nucleotide ϵ -cADPR (B), ϵ -ADPR (C) und ϵ -Adenosin (D) wurde als Summe der Gesamtaktivitäten der einzelnen Fraktionen in dieser Hinsicht berechnet. Aufgrund der Trübheit und Partikularität der Lösung wurden die Homogenate selbst nicht direkt vermessen. Zur besseren Vergleichbarkeit der mit den aus wt- (blau) bzw. aus CD38 (-/-)-Mäusen (rot) gewonnenen T-Lymphoblasten erhaltenen Ergebnisse wurden alle Daten auf eine gleiche für die Zellfraktionierung eingesetzte Proteinmenge von 30 mg (A) bezogen. P100-Membranen = 100.000•g-Pellet, P10-Membranen = 10.000•g-Pellet, P2-Membranen = 2000•g-Pellet

Während die aus wt-Mäusen gewonnenen T-Lymphoblasten eine in ihrer Ausprägung den Erwartungen entsprechende ADPRC- und NADGH-Aktivität aufwiesen, war die katalytische Aktivität beider Enzyme in den aus Milzen von CD38 (-/-)-Mäusen gewonnenen Zellen, obgleich noch nachweisbar, drastisch reduziert. Dieses Ergebnis deutete stark darauf hin, daß CD38 unter quantitativen Gesichtspunkten in T-Lymphoblasten der Maus die vorherrschende ADPRC und NADGH ist. Eine weitere, in Jurkat T-Lymphozyten nicht nachgewiesene ϵ -NAD zu ϵ -Adenosin metabolisierende, enzymatische Aktivität der Maus-T-Zellen blieb durch den Knockout des CD38-Proteins unberührt und ist daher von diesem Enzym unabhängig. Ein

bemerkenswerter Befund war weiterhin, daß das in den wt-T-Lymphoblasten der Maus gemessene Ratio von ADPRC- zu NADGH-Aktivität nahezu exakt dem für CD38 publizierten Ratio von 1:100 entsprach [Zocchi *et al.* 1993]. Dagegen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Jurkat T-Lymphozyten, verglichen mit dem Wert von 1:100, regelmäßig ein zugunsten der ADPRC-Aktivität verschobenes Ratio von 1:10 bis 1:20 nachgewiesen. Die Ursache für diesen Unterschied ist ungeklärt, wie demzufolge auch die Fragen, ob in Jurkat T-Lymphozyten möglicherweise eine gesteigerte Aktivität des cADPR/Ca²⁺-Signalwegs vorliegt und ob die Verschiebung des Verhältnisses von ϵ -cADPR- und ϵ -ADPR-Synthese in diesen Zellen durch eine Regulation (Fehlregulation) der katalytischen Aktivität von CD38 bedingt ist oder durch die zusätzliche Aktivität einer anderen ADPRC verursacht wird.

In Abb. 4.20 (A) sind die an T-Lymphoblasten der Maus erhobenen Daten (Abb. 4.19, A-C) in aufgeschlüsselter Weise dargestellt. Gezeigt sind hier die für die einzelnen subzellulären Fraktionen der Zellen erhaltenen Ergebnisse der katalytischen Aktivität, aufgliedert in spezifische Aktivität (A, C) und Gesamtaktivität (B, D) zum einen der ϵ -cADPR-Synthese (A, B) und zum anderen der ϵ -ADPR-Synthese (C, D). Diesen Daten läßt sich entnehmen, daß sich die katalytische Restaktivität der aus CD38 (-/-)-Mäusen gewonnenen T-Lymphoblasten in Hinblick auf die Synthese beider Nukleotide auf mehrere subzelluläre Fraktionen verteilt und sich nicht, wie zunächst erhofft, ausschließlich in einer der Fraktionen, vorzugsweise der cytosolischen Fraktion konzentriert. Die Restaktivität in Hinblick auf die vor allem interessierende ϵ -cADPR-Synthese war allerdings tatsächlich am stärksten in der cytosolischen Fraktion (3,4%) und der PS100-Fraktion (6,2%) der Lymphoblasten vertreten (Abb. 4.20 A, Inset der linken oberen Teilabb.). Nachweis und Anreicherung von ADPRC-Restaktivität in der S100- und der für membranassoziierte, cytosolische Proteine angereicherten PS100-Fraktion der CD38 (-/-)-Zellen können in Kombination mit den Ergebnissen von Western Blot-Analysen, in denen die Expression von CD38 in subzellulären Fraktionen der Jurkat T-Lymphozyten untersucht worden war (z.B. Abb. 4.13), in jedem Fall als ein starker Hinweis auf die tatsächliche Existenz einer bereits postulierten, cytosolischen, nicht mit CD38 verwandten ADPRC/NADGH in T-Lymphozyten/T-Lymphoblasten gewertet werden. Im unteren Teil der Abbildung (4.20 B) sind vergleichend die Resultate einer subzellulären Fraktionierung von Jurkat T-Lymphozyten gezeigt.

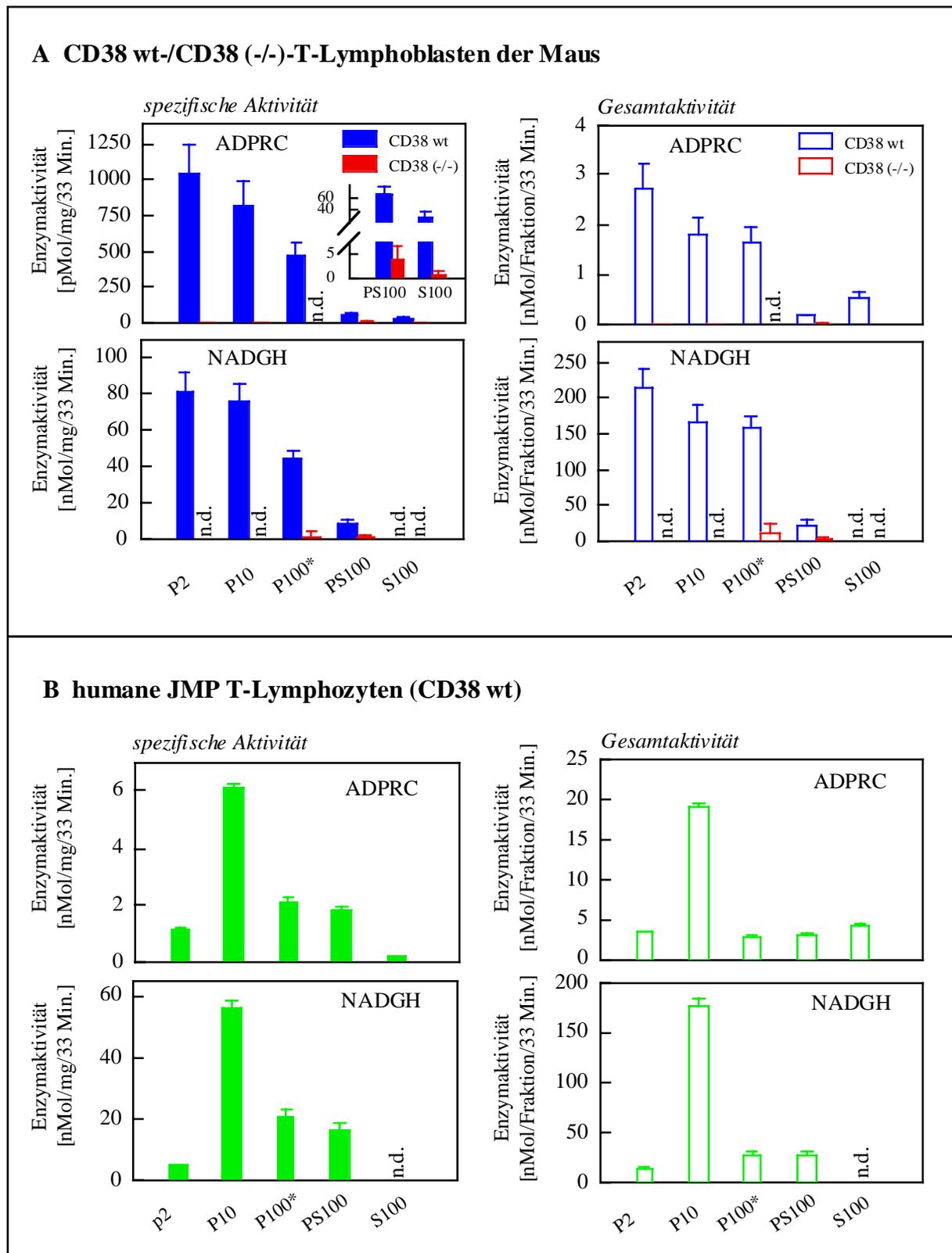


Abb. 4.20: Katalytische Aktivität von ADPRCs und NADGHs in (A) subzellulären Fraktionen muriner, aus wt-, bzw. CD38 (-/-)-Mäusen gewonnener T-Lymphoblasten sowie (B) in subzellulären Fraktionen humaner Jurkat T-Lymphozyten. Abbildungslegende, siehe nachfolgende Seite.

Legende zu Abbildung 4.20

Die subzellulären Fraktionen P2 (2000•g-Membranen), P10 (10.000•g-Membranen), P100* (gewaschene 100.000•g-Membranen), PS100 (entsalzte P100-Waschfraktion) und S100 (100.000•g-Überstand) wurden durch differentielle Zentrifugation entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.3 aus tiefgefrorenen Zell-Pellets muriner, aus Milzen von wt- oder CD38 (-/-)-Mäusen isolierter T-Lymphoblasten, bzw. aus einem tiefgefrorenen Pellet humaner Jurkat T-Lymphozyten gewonnen. Alle Fraktionen wurden gelöst zu einem Assayvolumen von 1 ml in intrazellulärem Puffer (pH 7,2) entsprechend den Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.1 & 3.2.8.1 im RP-HPLC-Enzymassay (Substratkonzentration 100 μ M ϵ -NAD, Inkubationszeit 2000 Sek.) vermessen. Anhand der erhobenen HPLC-Daten wurden jeweils sowohl die spezifische (A, a und b, bzw. B, a und b) als auch die katalytische Gesamtaktivität (A, c und d, bzw. B, c und d) der einzelnen Fraktionen in Hinblick auf die Synthese von ϵ -cADPR (A, a und c, bzw. B, a und c) und ϵ -ADPR (A, b und d, bzw. B, b und d) bestimmt. Die für die Assays eingesetzte Menge an Protein belief sich auf 0,5 mg (2000•g-Fraktion und gewaschenes P100, P100*), 0,3 mg (P100-Waschfraktion, PS100), 0,2 mg (P10) und 1 mg (S100). Dargestellt sind die Ergebnisse \pm SD die nach dreimaliger, unabhängig voneinander durchgeführter Vermessung der Fraktionen im RP-HPLC-Enzymassay erhalten wurden. Die subzelluläre Fraktionierung der Zellen eines tiefgefrorenen Zell-Pellets wurde jeweils nur einmalig durchgeführt. n.d. = nicht detektierbar. Wenn kein Balken sichtbar ist, war die gemessene katalytische Aktivität nahe null.

Die diesen Daten zugrunde liegende, parallel zur Aufarbeitung der T-Lymphoblasten der Maus durchgeführte Zellfraktionierung diente in erster Linie als Kontrolle für die Aufarbeitungsbedingungen der Lymphoblasten der Maus (subzelluläre Fraktionierung tiefgefrorener, pelletierter anstelle direkt einer Kultur entnommener Zellen). Zusätzlich ermöglichte die Vermessung der einzelnen Fraktionen im ϵ -NAD-basierten RP-HPLC-Enzymassay aber auch einen Vergleich der subzellulären Verteilung der katalytischen Aktivität von ADPRCs und NADGHs in humanen Jurkat T-Lymphozyten *versus* wt-T-Lymphoblasten der Maus. Bei diesem Vergleich fielen einige Unterschiede zwischen den Zellen beider Herkunft auf. So wies die P2-Fraktion der wt-T-Lymphoblasten der Maus eine sehr hohe und verglichen mit den anderen Fraktionen sogar die höchste spezifische Aktivität beider Enzyme auf, wohingegen die spezifische Aktivität der P2-Fraktion der Jurkat-Lymphozyten verglichen mit der der anderen Membranfraktionen gering ausfiel. In den humanen Zellen wies die P10-Fraktion, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Präparationen, in denen direkt der Kultur entnommene Zellen aufgearbeitet wurden, die höchste spezifische Aktivität von ϵ -cADPR- und ϵ -ADPR-Synthese auf. In der cytosolischen Fraktion war die spezifische Aktivität der ϵ -cADPR-Synthese in den T-Zellen beider Herkunft gering und NADGH-Aktivität aufgrund der Verstoffwechslung von ϵ -ADPR durch eine PPase gar nicht nachweisbar. Bei Betrachtung der Gesamtaktivitäten entsprach die Aktivität der cytosolischen ADPRC in Jurkat T-Lymphozyten jedoch derjenigen der P2-Fraktion, wohingegen ihr Anteil an der Gesamtaktivität aller Fraktionen in T-Lymphoblasten der Maus weiterhin gering ausfiel. Auffällig war zudem, daß die P100-Fraktion der humanen Lymphozyten (P100* + PS100) zusätzlich zu der membranständigen Form von CD38 einen relativ hohen Anteil an einer offensichtlich nicht fest membranverankerten ADPRC/NADGH

enthielt (ca. 50%). Dieser Anteil ließ sich durch Waschen der P100-Membranfraktion entsprechend einem Protokoll zur Ablösung membranassoziierter, cytosolischer Proteine (pH 8,0; 500 mM KCL) von den Membranen trennen (PS100-Fraktion). In T-Lymphoblasten der Maus traf dies jedoch nicht in gleicher Weise zu. Hier machte die enzymatische Aktivität der membranassozierten Form des Enzyms (PS100) sowohl auf die spezifische als auch auf die Gesamtaktivität bezogen einen deutlich geringeren Anteil an ADPRC- und NADGH-Aktivität der kompletten P100-Fraktion (PS100 + P100*) aus.

Insgesamt ließen auch die in diesem Abschnitt dargestellten Daten keinen sicheren Schluß zu, ob es in T-Lymphozyten/T-Lymphoblasten neben CD38 noch ein oder mehrere weitere, von CD38 verschiedene Proteine mit ADPRC-Aktivität gibt. Bei Betrachtung unter quantitativen Aspekten muß aufgrund dieser Daten in T-Lymphoblasten der Maus dem Ektoenzym CD38 und wahrscheinlich mit dem Ektoenzym eng verwandten intrazellulären Varianten von CD38 die weitaus größte Bedeutung bei der zellulären Synthese von ϵ -cADPR und ϵ -ADPR zugeschrieben werden. Übereinstimmend mit dieser Interpretation war die Synthese beider Verbindungen in den aus CD38 (-/-)-Mäusen isolierten T-Lymphoblasten um mindestens 97% reduziert. Gleichwohl war eine Restaktivität von ADPRC und NADGH, die sich jeweils deutlich unter 3% der Aktivität im Gesamthomogenat der Zellen bewegte, in den CD38 (-/-)-Lymphoblasten nachweisbar. Damit ist die Existenz einer weiteren ADPRC/NADGH, mit unter quantitativen Gesichtspunkten für die zelluläre Synthese von ϵ -cADPR und ϵ -ADPR untergeordneter Bedeutung, wenigstens nicht auszuschließen. Im Kontext einer spezifischen Funktion und Anordnung in der Zelle könnte ein solches zusätzliches, nicht mit CD38 identisches Enzym funktionell eine wichtige Rolle spielen. Da zudem Unterschiede in der subzellulären Verteilung und der katalytischen Aktivität (Ratio ADPRC/NADGH) der ADPRCs/NADGHs zwischen T-Lymphoblasten der Maus und humanen T-Lymphozyten festgestellt wurden, blieb weiterhin zu bedenken, daß an T-Zellen der Maus erhobene Daten möglicherweise nicht uneingeschränkt auf humane Lymphozyten übertragbar sind.

4.3.4 Immunpräzipitation von CD38 aus subzellulären Fraktionen von Jurkat-Lymphozyten

Die Tatsache, daß die an T-Lymphoblasten der Maus erhobenen Daten den Schluß nahelegten, daß CD38 (dem Ektoenzym und intrazellulär lokalisierten Varianten) in diesen Zellen aus quantitativer Sicht die Hauptrolle bei der Synthese von cADPR zukommt, wurde zum Anlaß genommen, die Bedeutung von CD38 auch in humanen T-Lymphozyten erneut zu überdenken und die Möglichkeit einer molekularen Verwandtschaft der löslichen, in der

S100-Fraktion der T-Lymphozyten enthaltenen ADPRC(s)/NADGH(s) mit CD38 wieder verstärkt in Betracht zu ziehen, auch wenn dieses/diese cytosolischen Enzym(e) in Western Blot-Analysen unter Einsatz verschiedener anti-CD38 mAKs zum Nachweis von CD38 nicht oder nur sehr schwach detektierbar war(en). Da eine in der S100-Fraktion regelmäßig schwach detektierte Bande in ihrem MW exakt dem Monomer des Ektoenzym CD38 entsprach, wurde zunächst von einer Restverschmutzung dieser Fraktion mit Membranen ausgegangen. Zur Erklärung der katalytischen Aktivität dieser Fraktion wurde zusätzlich die Gegenwart einer weiteren, von CD38 verschiedenen ADPRC/NADGH postuliert. Leider sind humane T-Lymphozyten, in denen das CD38-Gen selektiv deletiert wurde, bislang nicht verfügbar. Mit Hilfe solcher Zellen könnte die Hypothese der Koexpression einer von CD38 unabhängigen ADPRC/NADGH mit CD38 in T-Lymphozyten am besten überprüft werden. Um trotz des Mangels an solchen Zellen Aufschluß in dieser Frage zu erhalten, wurde vergleichend die Eignung einer Immunpräzipitation (IP) von CD38 zur Anreicherung der ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion einerseits und der immunologisch als CD38 identifizierten ADPRCs/NADGHs der Membranfraktionen P10 und P100 andererseits untersucht. Routinemäßig wurde zur IP von CD38 der AT1 anti-CD38 mAK eingesetzt. In einigen Experimenten wurden jedoch auch die anti-CD38 mAKs T16 und HIT-2 sowie die polyklonalen, gegen N- und C-Terminus von CD38 gerichteten Antiseren N-17 und C-19 zur IP verwendet. Der Literatur zufolge erkennen die meisten monoklonalen gegen CD38 gerichteten Antikörper ein nahezu identisches Epitop des Proteins [*Hoshino et al.* 1997, *Funaro et al.* 2000 und Abb. 4.11]. Das CD38-Epitop, das vom AT1 anti-CD38 mAK erkannt wird, wurde experimentell bislang noch nicht exakt ermittelt.

Um das Risiko einer unerwünschten Kopräzipitation anderer Proteine mit CD38 zu verringern, wurden die Fraktionen P10 und P100, wie in Abschnitt 3.2.12 beschrieben, vor Durchführung von IPs mit Detergenz (2% v/v NP40 und 1% w/v Natriumdesoxycholat) solubilisiert. Unlösliche Bestandteile der Fraktionen wurden anschließend durch Ultrazentrifugation (UZ) abgetrennt. Durch eine nachfolgende fluorimetrische Vermessung von Solubilisierungsüberständen und UZ-Pellets im ϵ -NAD-Enzymassay konnte unter diesen Bedingungen eine erfolgreiche Solubilisierung der ADPRCs/NADGHs beider Membranfraktionen nachgewiesen werden, die sich auch bei RP-HPLC-Analyse der Assay-Ansätze bestätigte (nicht gezeigt). Im Falle der S100-Fraktion wurde zunächst auf eine Solubilisierung verzichtet, da angenommen wurde, daß sich die ADPRC-/NADGH-Aktivität dieser Fraktion auf ein lösliches/mehrere lösliche Proteine zurückführen läßt. Im Verlauf wiederholter Experimente stellte sich allerdings heraus, daß auch die katalytische Aktivität dieser Fraktion

hydrophobe Eigenschaften aufweist. Für eine erfolgreiche IP der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) erwies es sich aufgrund dieser Eigenschaften entgegen der vorherigen Annahme sogar als essentiell notwendig, zunächst eine Solubilisierung des S100-Proteins durchzuführen. Auf eine anschließende Ultrazentrifugation des cytosolischen Extraktes zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde jedoch weiterhin verzichtet. Zur Durchführung von IPs wurden unbeladene (Kontroll-IP) oder mit anti-CD38 mAK beladene Protein-G Sepharose-Beads in Gegenwart (P10- und P100-Fraktion, später auch S100-Fraktion) oder Abwesenheit (S100-Fraktion) von Detergenz (s.o.) mit den subzellulären Fraktionen der Lymphozyten versetzt und für 2,5 bis 3 Stunden unter kontinuierlicher Rotation bei 4 °C inkubiert. Sowohl die ersten Überstände der IPs und Kontroll-IPs als auch die zur Ablösung unspezifisch an die Beads gebundener Proteine zuvor wiederholt gewaschenen Immunpräzipitate (IP-Pellets) der IP- und Kontroll-IP- Ansätze wurden dann unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD im kontinuierlichen, fluorimetrischen Enzymassay vermessen. Die im Verlauf des fluorimetrischen Enzymassays synthetisierten Produktmengen an ϵ -cADPR und ϵ -ADPR wurden anschließend quantitativ durch RP-HPLC bestimmt.

In Abb. 4.21 (A, B) ist exemplarisch das Ergebnis jeweils einer charakteristischen CD38-IP und parallel durchgeführten Kontroll-IP der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) aus der S100-Fraktion der T-Lymphozyten dargestellt. Die CD38-IPs wurden unter Nutzung des AT1 anti-CD38 mAKs in Abwesenheit von Detergenz (A, B, jeweils a, b), bzw. nach Solubilisierung des cytosolischen Extraktes mit Detergenz durchgeführt (A, B, jeweils c, d). Der obere Teil der Abbildung (4.21 A) zeigt jeweils in einem Overlay die anhand der Fluoreszenzentwicklung ($\lambda_{\text{Ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm) aufgezeichneten zeitlichen Verläufe des Substratumsatzes in den fluorimetrischen Enzymassays, die durch Vermessung einerseits der für die IPs/Kontroll-IPs eingesetzten Originalextrakte und andererseits der verschiedenen CD38-IP-Fraktionen/Kontroll-IP-Fraktionen (IP-Pellets und erste Überstände der IPs/Kontroll-IPs) mit dem Substrat ϵ -NAD erhalten wurden. In Kontroll-IPs (A, a & c) konnte, gemessen an der katalytischen Aktivität, keine unspezifische Anreicherung der ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion im IP-Pellet (grün) nachgewiesen werden. Substratumsatz wurde ausschließlich in den ersten Überständen der Kontroll-IPs festgestellt (blau; A, a, c). Dabei stimmte der in den ersten Überständen gemessene Umsatz von ϵ -NAD relativ gut mit dem im Originalextrakt (rot; A, a & c) überein. Im Anschluß an eine CD38-IP unter Verwendung nicht solubilisierten S100-Extraktes (A, b), konnte an den im dargestellten Experiment mit AT1 anti-CD38 mAK beladenen Protein-G Sepharose-Beads (IP-Pellet, grün) ebenfalls keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden.

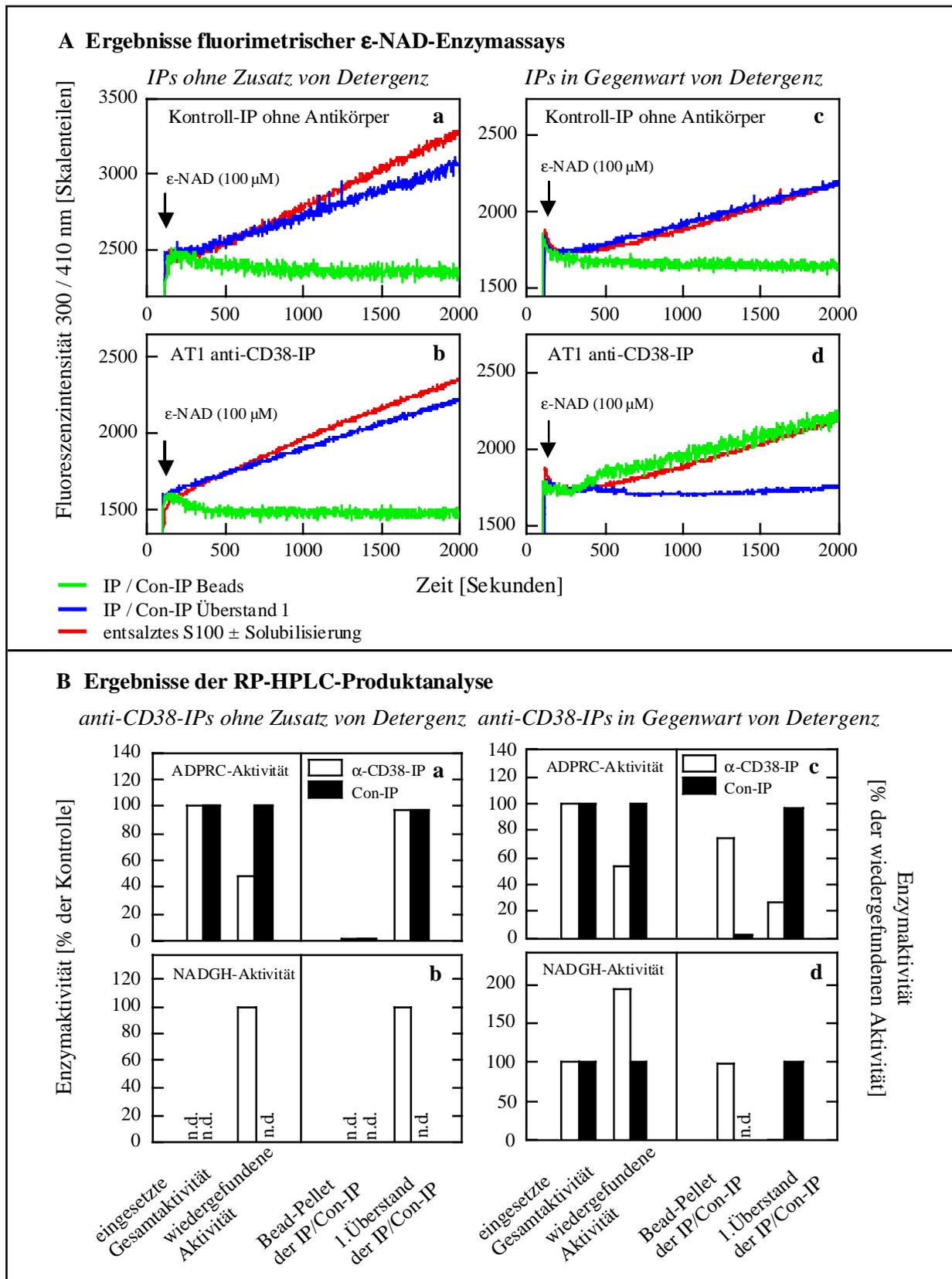


Abb. 4.21: Immunpräzipitation der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) aus der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen S100-Fraktion in Gegenwart oder Abwesenheit von Detergenz und unter Verwendung des AT1 anti-CD38 mAKs. Abbildungslegende, siehe folgende Seite.

Legende zu Abbildung 4.21

IPs der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) der Jurkat T-Lymphozyten wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.12 unter Verwendung der nicht solubilisierten S100-Fraktion (100.000•g-Überstand bei der subzellulären Fraktionierung der Lymphozyten, Abschnitt.3.2.3) in Abwesenheit von Detergenz (A, a und B, a & b) oder unter Verwendung des zuvor wie in Abschnitt 3.2.11.1 beschrieben, mit Detergenz solubilisierten Extraktes in Gegenwart von 2% (v/v) NP40 und 1% (w/v) Natriumdesoxycholat (A, b und B, c & d) an mit AT1 anti-CD38 mAK (10 µg) beladenen Protein-G Sepharose-Beads (25 µg) durchgeführt. Als Spezifitätskontrolle dienten parallel unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführte Kontroll-IPs (Con-IPs) an unbeladenen Protein-G Sepharose-Beads (A, b & d, bzw. B, a-d). Die in den IPs/Con-IPs eingesetzte Menge an S100-Protein lag jeweils bei 1 mg. Die Originalextrakte (jeweils 1 mg Protein), die 1. Überstände der IPs/Con-IPs sowie die zuvor zur Entfernung unspezifisch gebundenen Proteins viermalig in intrazellulärem Puffer (pH 7,2; kein Detergenz) gewaschenen IP-Pellets/Kontroll-IP-Pellets wurden dann in einem Assayvolumen von 1 ml intrazellulärem Puffer (s.o.) zunächst fluorimetrisch mit dem Substrat ε-NAD (100 µM, RT, 33 Min.) im kontinuierlichen ε-NAD-Enzymassay vermessen (A, a-d). Zum Stop der enzymatischen Reaktion wurden die Proben anschließend sofort in ein Eis-Salzbad gestellt und zur Abtrennung von Protein und anderen Probenbestandteilen hohen Molekulargewichtes ultrazentrifugiert (10 kDa MWCO, Abschnitt 3.2.7.1). Die Substanzmenge der während der fluorimetrischen Assays aus ε-NAD synthetisierten Produkte ε-cADPR (B, a & c) und ε-ADPR (B, b & d) wurde schließlich quantitativ durch RP-HPLC-Analyse bestimmt (Abschnitte 3.2.7.1 & 3.2.8.1). Zum Zweck der Übersichtlichkeit der Darstellung der durch HPLC erhobenen Daten (B, a-d) wurde anstelle der katalytischen Aktivität der Rohextrakte (hier nicht dargestellt) die Ausbeute an ADPRC-Aktivität (B, a & c) und NADGH-Aktivität (B, c & d) in der jeweiligen Con-IP als 100% eingesetzte Gesamtaktivität definiert. Die in den einzelnen Fraktionen der IPs/Con-IPs vorgefundene Aktivität von ε-cADPR- und ε-ADPR-Synthese wurde dann anteilig auf diesen Wert bezogen.

Die im ersten Überstand (blau) der CD38-IP gemessene katalytische Aktivität stimmte auch hier gut mit der im Originalextrakt (rot) überein. Wurde für die CD38-IP dagegen mit Detergenz solubilisierter S100-Extrakt eingesetzt (A, d) wurde die gesamte katalytische Aktivität im IP-Pellet vorgefunden (grün). Dementsprechend stimmte in diesem Fall der Substratumsatz des IP-Pellets näherungsweise mit dem des Originalextraktes (rot) überein, wohingegen im ersten Überstand der IP kein Substratumsatz messbar war.

Im unteren Teil der Abbildung (4.21 B) ist das Ergebnis der quantitativen Auswertung der RP-HPLC-Daten getrennt für die IP der ADPRC-Aktivität (a & c) und der NADGH-Aktivität (b & d) dargestellt. Um die Darstellung dieser Daten zu erleichtern, wurde die in Kontroll-IPs an unbeladenen Protein-G Sepharose-Beads insgesamt wiedergefundene enzymatische Aktivität in Bezug auf ε-cADPR- und ε-ADPR-Synthese jeweils als 100% eingesetzte Aktivität definiert. Verglichen mit der Gesamtaktivität der für die IPs eingesetzten Originalextrakte lag die Ausbeute an ADPRC- und NADGH-Aktivität in den Kontroll-IPs bei $63,53 \pm 11,37\%$ (ε-cADPR-Synthese, n=14), bzw. $81,27 \pm 4,49\%$ (ε-ADPR-Synthese, n=10). Durch die Inkubation mit dem AT1 anti-CD38 mAK während der IPs wurde die ADPRC-Aktivität der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion um ca. 50% inhibiert. Diese Inhibition zeigte sich bemerkenswerterweise unabhängig von einer Solubilisierung des Extraktes mit Detergenz. (B, a & c). Im Übrigen bestätigten die Ergebnisse der HPLC-Analysen die zuvor im fluorimetrischen Enzymassay erhobenen Daten. Während fast keine ADPRC-Aktivität an mit dem AT1 anti-CD38 mAk beladene Protein-G Sepharose-Beads präzipitiert werden

konnte, wenn nicht solubilisierter S100-Extrakt in der IP verwendet wurde (B, a) und sich nahezu die gesamte Ausbeute an enzymatischer Aktivität dann im ersten Überstand der IP befand (B, a), konnten immerhin ca. zwei Drittel der Gesamtausbeute an ADPRC-Aktivität im IP-Pellet angereichert werden, wenn für die CD38-IP mit Detergenz solubilisierter S100-Extrakt verwendet wurde (B, c). Die Daten zur IP der NADGH-Aktivität der S100-Fraktion waren meist nur schwer oder gar nicht quantitativ auswertbar, da diese Aktivität im S100-Rohextrakt aufgrund der Gegenwart einer PPase, wie zuvor schon mehrmals erwähnt, nicht exakt bestimmbar war. In Abhängigkeit von ihrer katalytischen Aktivität setzte die PPase während des fluorimetrischen Assays synthetisiertes ϵ -ADPR teilweise oder vollständig zu ϵ -AMP und ϵ -Ado um. Im Zuge einer Solubilisierung der S100-Extrakte mit Detergenz wurde ihre PPase-Aktivität meist (partiell) inhibiert, so daß dann häufig eine Synthese von ϵ -ADPR messbar war (B, d). In ihrem Ausmaß blieb diese jedoch weiterhin sehr variabel. Im Gegensatz zu der weiter oben erwähnten Inhibition der ϵ -cADPR-Synthese durch den AT1 anti-CD38 mAK, wurde die ϵ -ADPR-Synthese durch Kontakt mit dem Antikörper eher aktiviert (B, d). Bei Verwendung von solubilisiertem S100-Extrakt, wurde die nachweisbare NADGH-Aktivität während der anti-CD38-IP nahezu quantitativ immunpräzipitiert (B, d). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in IPs von CD38 unter Verwendung der aus den T-Lymphozyten gewonnenen Membranfraktionen P10 und P100 erhalten (nicht dargestellt). Auch bei den ADPRCs/NADGHs dieser Fraktionen bewirkte der Kontakt mit dem AT1 anti-CD38 mAK regelmäßig eine ca. 40-50%ige Inhibition der ϵ -cADPR-Synthese, wohingegen die ϵ -ADPR-Synthese leicht bis mäßig aktiviert wurde. In jedem Fall wurde eine Verschiebung des Verhältnisses beider Enzymaktivitäten zugunsten der NADGH-Aktivität festgestellt. Während das Ratio von ϵ -cADPR- zu ϵ -ADPR-Synthese in solubilierten Extrakten der Membranfraktionen in der Regel zwischen 1:10 und 1:20 lag, wiesen die durch eine IP mit dem AT1 anti-CD38 mAK in IP-Pellets angereicherten ADPRCs/NADGHs aller subzellulären Fraktionen der Lymphozyten reproduzierbar ein Ratio beider Aktivitäten von ca. 1:40 auf. Tab. 4.5 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse aller mit dem AT1 anti-CD38 mAK durchgeführten einmaligen IPs. Die spezifischen Aktivitäten der für die IPs eingesetzten Extrakte in Hinblick auf ϵ -cADPR und ϵ -ADPR-Synthese sind in Tab. 4.6 aufgeführt. Diese Tabelle enthält zusätzlich Daten zu der Beeinflussung der katalytischen Aktivität der Extrakte durch Detergenz und den Kontakt mit dem AT1 anti-CD38 mAK. Interessanterweise veränderten unterschiedliche für die IPs eingesetzte anti-CD38 mAKs die katalytische Aktivität der ADPRCs/NADGHs der Lymphozyten-Extrakte in unterschiedlicher Weise.

Tab. 4.5: Ergebnisse einmaliger anti-CD38-Immunpräzipitationen aus subzellulären Fraktionen von Jurkat T-Lymphozyten unter Verwendung von AT1 anti-CD38 mAK

Fraktion & Experiment	für die IP eingesetzte Gesamtaktivität [%] (Aktivitätsausbeute der Con-IP = 100%)		Aktivitätsausbeute in der anti-CD38-IP [% der Gesamtaktivität]		Aktivität im Bead-Pellet der anti-CD38-IP 1.[% der Gesamtaktivität] 2.[% der Ausbeute]		Aktivität im 1. Überstand der anti-CD38-IP 1.[% der Gesamtaktivität] 2.[% der Ausbeute]		Aktivität im Bead-Pellet der Con-IP [% der Gesamtaktivität]		Aktivität im 1. Überstand der Con-IP [% der Gesamtaktivität]	
	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH
S100 Exp. 1	100	100	59,85	126,14	38,20 63,83	89,67 71,08	21,65 36,17	36,47 28,91	0,26	0	99,74	100
S100 Exp. 2	100	100	57,95	118,46	40,71 70,25	118,46 100,00	17,24 29,75	0 0	2,80	0	97,09	100
S100 Exp. 3	100	100	54,09	195,00	39,94 73,85	192,06 98,64	14,14 26,15	2,43 1,36	2,41	0	97,59	100
S100 Exp. 4	100	100	51,34	142,37	31,43 61,22	127,86 89,82	19,91 38,78	14,50 10,18	3,36	0	96,64	100
Mittelwerte ± SD	100	100	55,81 ± 3	145,49 ± 29	37,57 ± 3 67,29 ± 5	132,01 ± 37 89,89 ± 11	18,24 ± 3 32,71 ± 5	13,35 ± 14 10,11 ± 12	2,21 ± 1	0	97,77 ± 1	100
P100 Exp. 1	100	100	56,71	117,48	46,25 81,57	104,37 88,84	10,45 18,43	13,11 11,16	1,86	0	98,14	100
P100 Exp. 2	100	100	58,58	92,25	48,81 83,33	92,25 100,00	9,76 16,67	0 0	0,42	0	99,58	100
P100 Exp. 3	100	100	59,67	123,92	42,64 71,46	96,51 77,88	17,03 28,54	27,42 22,12	3,86	0	96,14	100
Mittelwerte ± SD	100	100	58,32 ± 1	111,22 ± 14	45,90 ± 3 78,79 ± 5	97,71 ± 5 88,91 ± 9	12,41 ± 3 21,21 ± 5	13,51 ± 11 11,09 ± 9	2,05 ± 1	0	97,95 ± 1	100
P10 Exp. 1	100	100	63,04	125,12	52,71 83,61	110,86 88,60	10,33 16,39	14,26 11,40	1,44	0	98,56	100
P10 Exp. 2	100	100	79,37	126,10	69,30 87,31	110,17 87,37	10,07 12,69	15,93 12,63	1,76	0	98,24	100
P10 Exp. 3	100	100	54,96	109,28	41,13 74,84	79,79 73,01	13,83 25,16	29,49 26,99	0,14	0	99,86	100
Mittelwerte ± SD	100	100	65,79 ± 10	120,17 ± 8	54,38 ± 12 81,92 ± 5	100,27 ± 14 82,99 ± 7	11,41 ± 2 18,08 ± 5	19,89 ± 7 17,01 ± 7	1,11 ± 1	0	98,89 ± 1	100

Anmerkung: die für die Immunpräzipitationen (je 10 µg an Protein-G Sepharose-Beads gekoppelten Antikörpers) eingesetzten Proteinmengen lagen bei 1 mg (S100-Fraktion) oder 50 µg (P10- und P100-Membranen). Die Durchführung der Immunpräzipitationen erfolgte entsprechend der Beschreibung im Text, bzw. im Kapitel Material & Methoden (Abschnitt 3.2.13). IP = Immunpräzipitation, Con-IP = Kontroll-IP, ADPRC = ADP-Ribosylcyclase, NADGH = NAD-Glykohydrolase.

Tab. 4.6: Katalytische Aktivität der für die anti-CD38-Immunpräzipitationen eingesetzten, aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen Extrakte und Beeinflussung der katalytischen Aktivität durch Detergenz und den AT1 anti-CD38 mAK

Fraktion	Katalytische Aktivität der mit Detergenz solubilisierten Extrakte [nMol/mg/2000 Sek.]			Katalytische Aktivität der 1. Überstände der Kontroll-IPs an unbeladenen Protein-G Sepharose-Beads [nMol/mg/2000 Sek.]			Ratio ADPRC/NADGH der Extrakte vor Solubilisierung	Ratio ADPRC/NADGH der durch AT1 anti-CD38mAK immunpräzipitierten Enzyme
	ADPRC	NADGH	Ratio ADPRC/NADGH	ADPRC	NADGH	Ratio ADPRC/NADGH		
S100	0,433	0,00	1:0,00	0,188	3,29	1:17,55	nicht bestimmbar wegen PPase	1:41,06
S100	0,376	2,09	1:5,55	0,209	3,25	1:15,60		1:44,13
S100	0,254	1,08	1:4,26	0,203	1,89	1:9,33		1:43,80
S100	0,295	1,09	1:3,70	0,237	2,62	1:11,97		1:43,41
S100	0,168	0,00	1:0,00	0,139	(0,145)	(1:1,04)		1:31,05
S100	0,310	2,44	1:7,87	0,155	1,74	1:11,22		1:44,96
S100	0,361	1,51	1:4,18	0,197	2,76	1:13,98		1:44,15
Mittelwerte ± SD	0,314 ± 0,08	1,18 ± 0,87	1:3,76	0,190 ± 0,03	2,24 ± 1,02	1:11,79	nicht bestimmbar	1:41,79
P100	6,52	98,00	1:15,03	3,57	80,00	1:22,41	1:9,06 (n=15)	1:55,59
P100	6,30	89,00	1:14,13	3,87	74,40	1:19,22		1:42,17
P100	5,86	106,20	1:18,12	3,28	82,40	1:25,12		1:41,86
P100	4,10	116,45	1:28,40	4,65	112,74	1:24,25		1:30,38
P100	5,62	97,43	1:17,34	3,89	87,39	1:22,47		1:37,81
Mittelwerte ± SD	5,68 ± 0,85	101,42 ± 9,28	1:17,86	3,85 ± 0,46	87,39 ± 13,35	1:22,70	1:9,06	1:41,56
P10	13,11	185,80	1:14,17	8,31	168,20	1:20,24	1:9,12 (n=15)	1:45,37
P10	7,70	103,60	1:13,45	6,63	131,80	1:19,88		1:39,21
P10	11,35	164,80	1:14,52	6,40	140,00	1:21,88		1:31,03
P10	6,66	136,18	1:20,45	6,00	121,77	1:20,30		1:39,50
P10	8,37	137,77	1:16,46	5,81	136,24	1:23,45		1:48,02
Mittelwerte ± SD	9,44 ± 2,41	145,63 ± 27,9	1:15,43	6,63 ± 0,89	139,60 ± 15,5	1:21,06	1:9,12	1:40,63

Anmerkung: Zu den Kontroll-Immunpräzipitationen mit dem an Protein-G Sepharose-Beads gekoppelten OKT3 mAK sind in der Tabelle keine Daten enthalten. Durch diesen mAK wurde die katalytische Aktivität der Extrakte jedoch nicht in anderer Weise beeinflusst als durch die unbeladenen Protein-G Sepharose-Beads. ADPRC = ADP-Ribosylcyclase, NADGH = NAD-Glykohydrolase.

So beeinflusste der T16 anti-CD38 mAK die Aktivität der membranständigen ADPRCs/NADGHs der P10- und P100-Fraktion der Lymphozyten im Rahmen der IP kaum ($< 10\%$, $n=5$) und in Lösung überhaupt nicht ($n=2$, Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu bewirkte der Hit-2 anti-CD38 mAK in IPs, mit einer 70-80 %igen Inhibition, eine deutlich stärkere Inhibition der ADPRC-Aktivität der ADPRCs/NADGHs der P10- und P100-Fraktion als der AT1 anti-CD38 mAK. Gleichzeitig ließ er die NADGH-Aktivität der ADPRCs/NADGHs dieser subzellulären Fraktionen jedoch weitgehend unbeeinflusst ($n=2$, Daten nicht dargestellt). Diese Daten legen den Schluß nahe, daß sich die Bindungsepitope der verschiedenen anti-CD38 mAKs doch zumindest geringfügig unterscheiden müssen. Alle drei untersuchten anti-CD38 mAKs waren zur IP der ADPRCs/NADGHs der P10- und der P100-Fraktion prinzipiell geeignet. Dagegen erwiesen sich die gegen C- und N-Terminus von humanem CD38 gerichteten, polyklonalen Antiseren (C-19 und N-17), die in Western Blot-Analysen hCD38rec, eine lösliche, rekombinante Form von humanem CD38 detektierten, jedoch nicht geeignet waren, um CD38 in subzellulären Fraktionen der Jurkat T-Lymphozyten nachzuweisen, auch für die IP von CD38 aus diesen Fraktionen als ungeeignet. Die Eignung dieser Antiseren sowie der anti-CD38 mAKs T16 und Hit-2 zur IP der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) wurde nicht untersucht.

Obwohl in IPs, in denen die Fraktionen P10 und P100 verwendet wurden, im Vergleich zu IPs, in denen die S100-Fraktion verwendet wurde, in der Regel eine höhere katalytische Gesamtaktivität eingesetzt wurde, gelang es regelmäßig, aus den Membranfraktionen bereits während einer einmalig durchgeführten IP ca. 80% der wiedergefundenen ADPRC-Aktivität und ca. 80-90% der wiedergefundenen NADGH-Aktivität an die mit AT1 anti-CD38 mAK beladenen IP-Beads zu präzipitieren. Eine 5% überschreitende und im Vergleich zur S100-Fraktion gesteigerte unspezifische Bindung der ADPRCs/NADGHs dieser Fraktionen an die unbeladenen Protein-G Sepharose-Beads wurde dagegen nie beobachtet. Damit funktionierte die CD38-IP der ADPRCs/NADGHs (CD38) aus diesen Fraktionen tendenziell etwas besser als die der löslichen ADPRC(s)/NADGH(s) (CD38?) aus der S100-Fraktion. Andererseits steht die überraschend gute Präzipitierbarkeit der ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion in Widerspruch zu ihrer schlechten Detektierbarkeit in Western Blot-Analysen, in denen zur spezifischen Detektion von CD38 neben anderen anti-CD38 mAKs auch der AT1 anti-CD38 mAK verwendet wurde. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß dieses Enzym von dem AT1-mAK in der nativen Konformation besser als im denaturierten Zustand erkannt wird. Die Tatsache, daß eine erfolgreiche IP der ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion zwingend die vorherige Solubilisierung des cytosolischen Extraktes mit Detergenz erforderte,

könnte darauf hindeuten, daß das Enzym/die Enzyme in der S100-Fraktion in aggregierter und dadurch für den Antikörper schwerer zugänglicher Form vorliegen.

Um die Spezifität der Präzipitierbarkeit der ADPRCs/NADGHs der subzellulären Fraktionen der Jurkat-Lymphozyten durch den AT1 anti-CD38 mAK noch einmal zu überprüfen und eine unspezifische Bindung der Enzyme an Immunglobuline auszuschließen, wurden als weiteres Kontrollexperiment IPs der ADPRCs/NADGHs der Membranfraktionen P10 und P100 an mit anti-CD3 mAK (OKT3; 10 µg mAK je IP-Ansatz) beladenen Protein-G Sepharose-Beads durchgeführt. Auf dem Hintergrund von Literaturberichten, daß CD38 möglicherweise stimulationsbedingt mit dem TCR/CD3-Komplex von T-Lymphozyten interagieren kann [Morra, *et al.* 1998, Zubiaur, *et al.* 1999], wurde als irrelevanter Kontrollantikörper absichtlich der OKT3 mAK gewählt. Damit wurde eine potentiell erhöhte, „unspezifische“ Präzipitation von ADPRC-/NADGH-Aktivität, bedingt durch eventuell schon im unstimulierten Zustand der Zellen mit dem TCR/CD3-Komplex assoziiertes CD38, bereits im Voraus in Kauf genommen. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abb. 4.22 dargestellt. Im Vergleich zu Kontroll-IPs an unbeladenen Protein-G Sepharose-Beads wurde eine geringfügig gesteigerte Anreicherung von ADPRC- und NADGH-Aktivität an mit OKT3 mAK beladenen IP-Beads nachgewiesen. Verglichen mit IPs unter Nutzung der P100-Fraktion (A, B), war dies besonders deutlich in den IPs erkennbar, die unter Einsatz der P10-Fraktion durchgeführt wurden (C, D). In allen Experimenten bewegte sich die nicht für CD38 spezifische Präzipitation von ADPRC- und NADGH-Aktivität an die IP-Pellets jedoch deutlich unter 10% der für die IPs insgesamt eingesetzten katalytischen Aktivität. Damit sprechen die Kontrollexperimente deutlich für eine spezifische Erkennung der ADPRCs/NADGHs der T-Lymphozyten durch den AT1 anti-CD38 mAK.

Um zu prüfen, ob nach einmalig mit dem AT1 anti-CD38 mAK durchgeführten IPs in den ersten Überständen der IP-Beads verbliebene Restaktivität von ADPRCs/NADGHs prinzipiell ebenfalls präzipitierbar ist und ihr Verbleiben im IP-Überstand damit auf eine Sättigung der für die einmaligen IPs eingesetzten Menge an Antikörper zurückzuführen wäre, wurden mit den drei subzellulären Fraktionen P10, P100 und S100 der Jurkat-Lymphozyten zusätzlich zweimalige IPs an mit dem AT1 anti-CD38 mAK beladenen Protein-G Sepharose-Beads durchgeführt. Dazu wurden die in einem ersten IP-Schritt erhaltenen ersten Überstände der IP-Beads zur Durchführung einer identischen zweiten IP direkt auf zuvor neu vorbereitete, mit dem anti-CD38 mAK beladene Protein-G Sepharose-Beads aufgetragen.

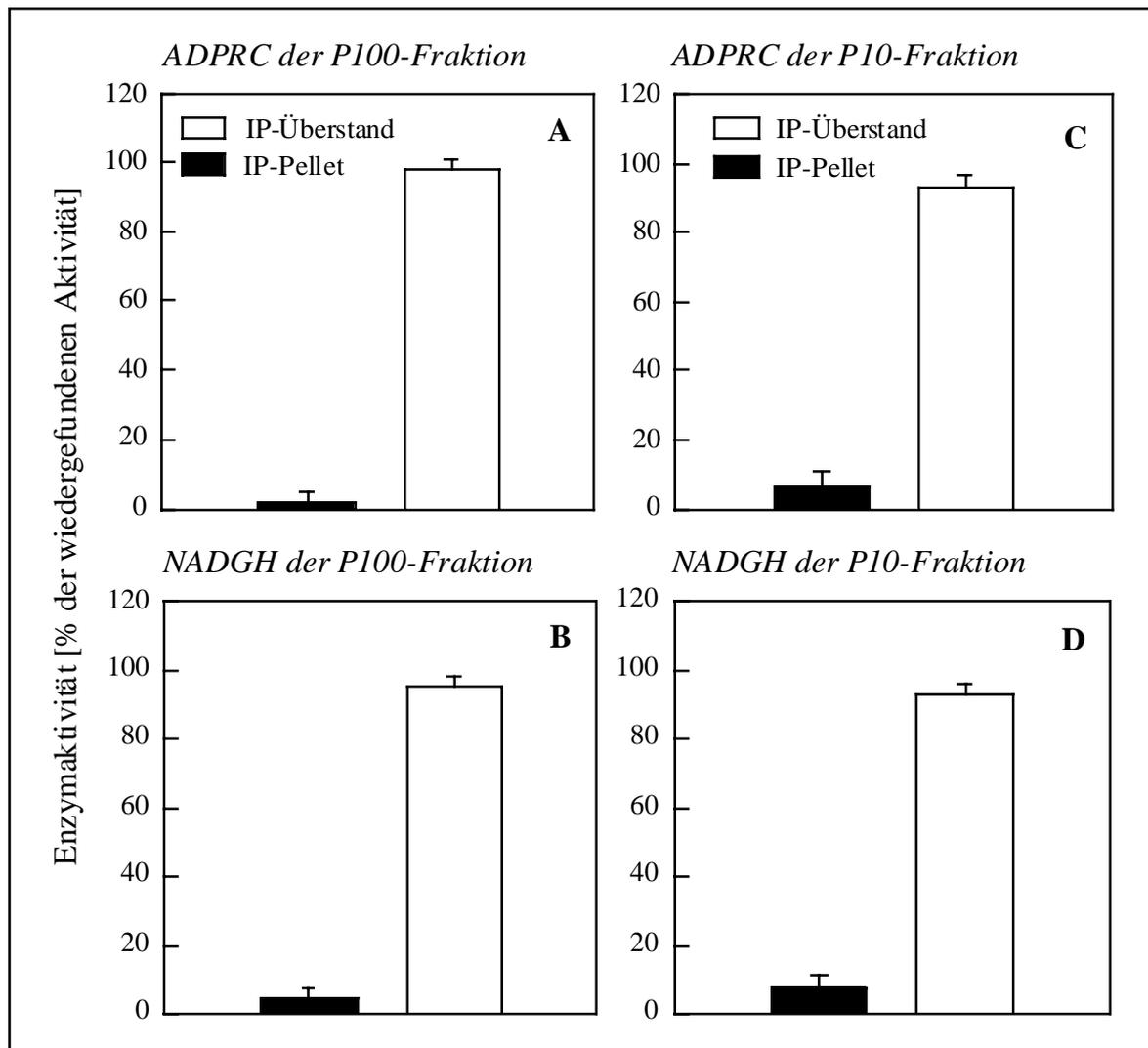


Abb. 4.22: Immunpräzipitation der membranständigen ADPRCs/NADGHs der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen subzellulären Fraktionen P10 und P100 mit anti-CD3 mAK (OKT3). Die Membranfraktionen P10 (10.000•g-Pellet) und P100 (100.000•g-Pellet) wurden durch subzelluläre Fraktionierung aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnen (3.2.3). IPs der ADPRCs/NADGHs dieser zuvor mit Hilfe von 2% (v/v) und 1% (w/v) Natriumdesoxycholat solubilisierten Membranfraktionen wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.12 in Gegenwart von Detergenz (2% v/v NP40 und 1% w/v Natriumdesoxycholat) an mit OKT3 mAK (10 µg) beladenen Protein-G Sepharose-Beads (25 µg) durchgeführt. Dabei lag die je Ansatz eingesetzte Proteinmenge bei 100 µg (P10), bzw 250 µg (P100). Die ersten Überstände der IPs sowie die zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine zuvor viermalig in intrazellulärem Puffer (pH 7,2; kein Detergenz) gewaschenen IP-Pellets wurden dann in einem Assayvolumen von 1 ml (eingestellt mit intrazellulärem Puffer, s.o.) für 2000 Sek. (33 Min.) bei RT unter Schwenken mit dem Substrat (ϵ -NAD, Endkonzentration 100 µM) inkubiert. Zum Stop der enzymatischen Reaktion wurden die Ansätze in ein Eis-Salzbad gestellt und zur Abtrennung von Protein und anderen Probenbestandteilen hohen Molekulargewichts ultrafiltriert (10 kDa MWCO; 3.2.7.1). Die während der Inkubation mit dem Substrat synthetisierten Stoffmengen an ϵ -cADPR und ϵ -ADPR wurden anschließend entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.8.1 quantitativ durch RP-HPLC bestimmt. Für die Darstellung wurde die Gesamtausbeute an ϵ -cADPR (A,C) und ϵ -ADPR (B, D) nach durchgeführter IP jeweils als 100% Aktivität definiert. Die präsentierten Daten stellen die Mittelwerte \pm SD aus jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar, in denen unterschiedliche Präparationen der Jurkat-Extrakte (P10 und P100) verwendet wurden.

Im Anschluß an die zweite IP wurden die zur Entfernung unspezifisch gebundenen Proteins mehrfach gewaschenen IP-Pellets beider IPs sowie die ersten Überstände der zweiten IPs

dann, wie zuvor für die Fraktionen der einmaligen IPs beschrieben, unter Nutzung des Substrates ϵ -NAD sowohl fluorimetrisch als auch im RP-HPLC-Enzymassay vermessen. In Abb. 4.23 (A-E) ist für jede der drei subzellulären Fraktionen exemplarisch das Ergebnis der RP-HPLC-Daten einer charakteristischen zweimaligen CD38-IP sowie einer parallel unter identischen Versuchsbedingungen an unbeladenen Protein-G Sepharose-Beads durchgeführten zweimaligen Kontroll-IP dargestellt. Zum Zweck der Übersichtlichkeit der Darstellung der Daten wurde die Ausbeute an ADPRC- (A, C, E) und NADGH-Aktivität (B, D) nach Durchführung der Kontroll-IPs wieder als 100% eingesetzte Gesamtaktivität definiert. Aufgrund der katalytischen Aktivität einer PPase in dieser Fraktion wurden die Daten zur Präzipitation der NADGH-Aktivität in dem mit der S100-Fraktion durchgeführten Experiment nicht ausgewertet. Wie bereits in einmalig durchgeführten CD38-IPs nachgewiesen und beschrieben, wurde auch in den zweimalig durchgeführten IPs eine ca. 40 %ige Inhibition der ϵ -cADPR-Synthese der ADPRCs/NADGHs aller drei subzellulären Fraktionen durch den AT1 anti-CD38 mAK festgestellt. In allen Fällen konnte aber aus dem ersten Überstand des IP-Pellets der ersten CD38-IP während der zweiten CD38-IP nochmals ADPRC-Aktivität immunpräzipitiert werden (A, C, E). Dadurch wurde die nach der ersten CD38-IP im Überstand verbliebene Restaktivität von im Durchschnitt ca. 20-30% auf im Mittel unter 7% reduziert. Allerdings wurde die ADPRC-Aktivität erneut in keinem Experiment vollständig präzipitiert. Auch die nach Durchführung der ersten CD38-IPs im Überstand verbliebene NADGH-Aktivität der Fraktionen P10 und P100 konnte durch eine direkt anschließende zweite CD38-IP von durchschnittlich 10-20% weiter auf unter 4% reduziert werden (B, D). Die Einzelergebnisse aller durchgeführten zweimaligen IPs sind in Tab. 4.7 dargestellt.

Während die in einmaligen CD38-IPs unter Verwendung des AT1 anti-CD38-mAKs erhaltenen Ergebnisse einen signifikanten Unterschied in der Präzipitierbarkeit der ADPRC/NADGH der cytosolischen Fraktion im Vergleich zu den ADPRCs/NADGHs der Membranfraktionen P10 und P100 erkennen ließen (Abb. 4.24 A), war nach Durchführung zweimaliger CD38-IPs kein signifikanter Unterschied in der Präzipitierbarkeit der katalytischen Aktivität dieser Enzyme mehr nachweisbar (Abb. 4.24 B). Demzufolge ist die cytosolische ADPRC/NADGH in der Tendenz möglicherweise etwas schlechter, im Endergebnis aber wie die membranständigen ADPRCs/NADGHs der Fraktionen P10 und P100, die in Western Blot-Analysen unter Einsatz verschiedener anti-CD38-mAKs als CD38 identifiziert wurden, sehr gut (zu > 90%) mit dem AT1 anti-CD38 mAK immunpräzipitierbar.

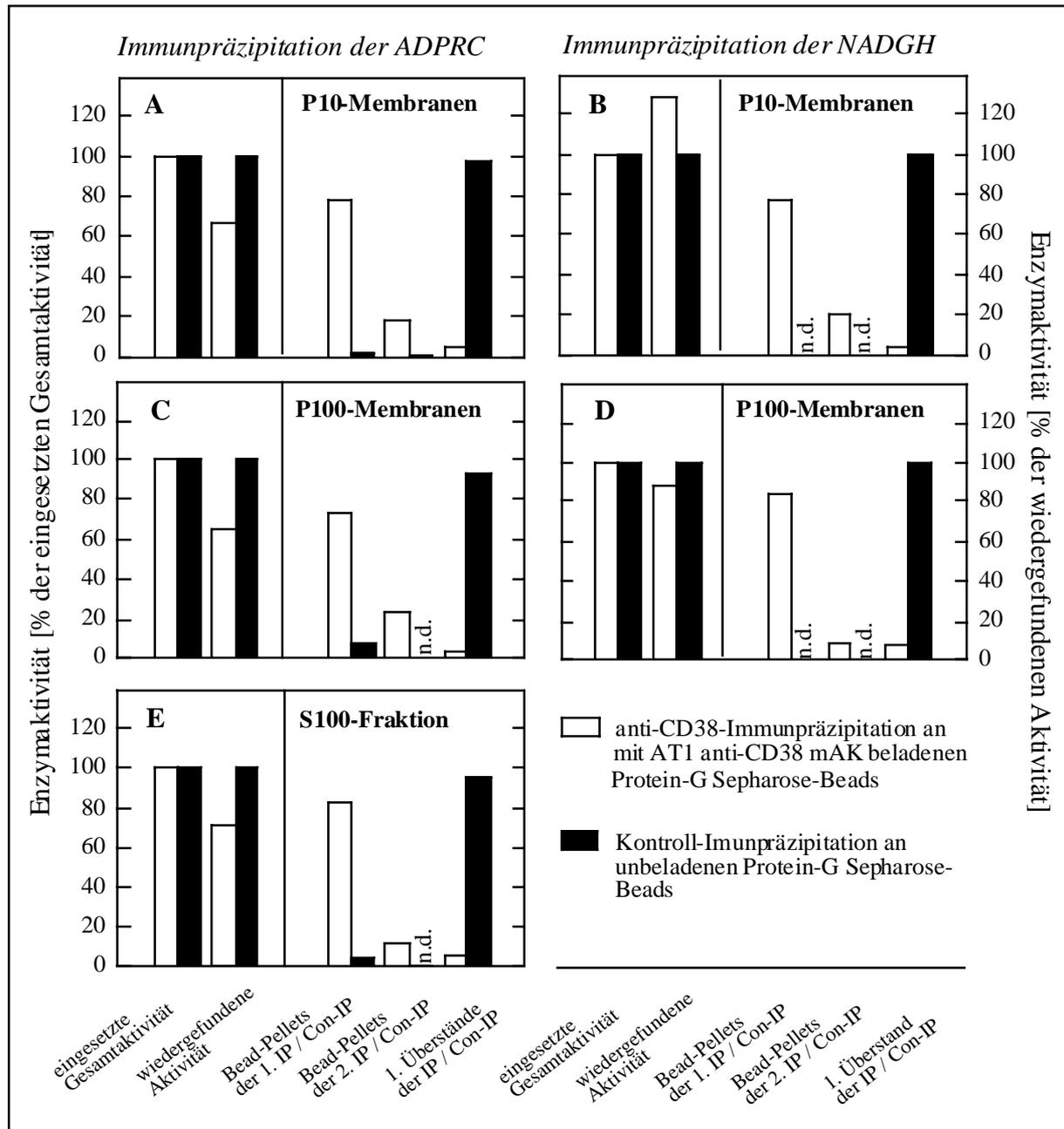


Abb. 4.23: Ergebnisse zweimaliger Immunpräzipitationen der ADPRCs/NADGHs der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen subzellulären Fraktionen P10, P100 und S100 mit AT1 anti-CD38 mAK. Die subzellulären Fraktionen P10 (10.000•g-Pellet), P100 (100.000•g-Pellet) und S100 (100.000•g-Überstand) wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.3 aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnen und vor der Verwendung in der IP mit Detergenz solubilisiert (3.2.12.1). Die in den IPs eingesetzten Mengen an Protein lagen bei 100 µg (P10, A & B), 200 µg (P100, C & D), bzw. 1 mg (S100, E). Alle dargestellten IPs an mit AT1 anti-CD38 mAK (10 µg) beladenen Protein-G Sepharose-Beads (25 µg) sowie die parallel unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Kontroll-IPs (Con-IPs) an unbeladenen Protein-G Sepharose-Beads (25 µg) wurden wie in Abschnitt 3.2.12 beschrieben, in Gegenwart von 2% (v/v) NP40 und 1% (w/v) Natriumdesoxycholat durchgeführt. Die ersten Überstände der zweiten IPs/Con-IPs sowie die zur Entfernung unspezifisch gebundenen Proteins zuvor viermal in intrazellulärem Puffer (pH 7,2; kein Detergenz) gewaschenen IP-Pellets wurden dann bei RT mit dem Substrat ϵ -NAD (100 µM, Inkubationszeit 2000 Sek.) im fluorimetrischen Enzymassay vermessen (3.2.7.1) und die synthetisierten Mengen der Produkte ϵ -cADPR (A, C, E) und ϵ -ADPR (B, D) anschließend quantitativ durch RP-HPLC bestimmt (3.2.8.1). Zur Übersichtlichkeit der Darstellung der Daten wurde anstelle der ADPRC- und NADGH-Aktivität der für die IPs verwendeten Rohextrakte jeweils die Ausbeute an ADPRC- und NADGH-Aktivität nach Durchführung der Kontroll-IPs als 100% eingesetzte Gesamtaktivität der ADPRC (A, C, E), bzw. der NADGH (B, D) definiert.

Tab. 4.7: Ergebnisse zweimaliger direkt aufeinanderfolgend durchgeführter anti-CD38-Immunpräzipitationen aus subzellulären Fraktionen von Jurkat T-Lymphozyten unter Verwendung von AT1 anti-CD38 mAK

Fraktion & Experiment	für die IP eingesetzte Gesamtaktivität [%] (Aktivitätsausbeute der Con-IP = 100%)		Aktivitätsausbeute in der anti-CD38-IP [% der Gesamtaktivität]		Aktivität im Bead-Pellet der anti-CD38-IP (Σ 1. und 2. IP) 1.[% der Gesamtaktivität] 2.[% der Ausbeute]		Aktivität im 1. Überstand der 2. anti-CD38-IP 1.[% der Gesamtaktivität] 2.[% der Ausbeute]		Aktivität im Bead-Pellet der Con.-IP (Σ 1. + 2. IP) [% der Gesamtaktivität]		Aktivität im 1. Überstand der 2. Con.-IP [% der Gesamtaktivität]	
	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH
S100 Exp. 1	100	0	70,53	-	67,02 95,01	- 100	3,52 4,99	- 0	4,55	0	95,45	(0)
S100 Exp. 2	100	100	40,35	131,00	40,35 100	131,00 100	0 0	0 0	2,27	0	97,73	100
S100 Exp. 3	100	100	56,29	136,96	48,90 86,87	136,96 100	7,38 13,113	0 0	6,12	0	93,87	100
Mittelwerte ± SD	100	100	55,72 ± 12	133,98 ± 3	52,09 ± 11 93,96 ± 5	133,98 ± 3 100	3,63 ± 3 6,04 ± 5	0 0	4,31 ± 2	0	95,69 ± 2	100
P100 Exp. 1	100	100	65,26	81,78	81,10 99,17	63,04 96,59	0,68 0,83	2,22 3,41	6,92	0	93,08	100
P100 Exp. 2	100	100	62,26	104,19	62,26 100	104,19 100	0 0	0 0	0	0	100	100
Mittelwerte ± SD	100	100	63,76 ± 2	92,99 ± 11	71,68 ± 9 99,59 ± 0,4	83,62 ± 2 98,30 ± 2	0,34 ± 0,3 0,42 ± 0,4	1,11 ± 1,1 1,71 ± 2	3,46 ± 3,5	0	96,54	100
P10 Exp. 1	100	100	66,58	129,56	63,47 95,33	125,57 96,92	3,11 4,67	3,99 3,08	2,03	0	97,97	100
P10 Exp. 2	100	100	48,46	99,27	45,52 93,93	99,27 100	2,94 6,07	0 0	1,33	0	98,67	100
Mittelwerte ± SD	100	100	57,52 ± 9	114,42 ± 15	54,50 ± 9 94,63 ± 1	112,42 ± 13 98,46 ± 2	3,03 ± 0,1 5,37 ± 1	2,00 ± 2 1,54 ± 2	1,68 ± 0,4	0	98,32 ± 0,4	100

Anmerkung: Die für die Immunpräzipitationen (je 10 µg an Protein-G-Sepharose-Beads gekoppelten Antikörpers) eingesetzte Proteinmenge lag bei 1 mg (S100-Fraktion), 100-200 µg (P100-Membranen) oder 50-100 µg (P10-Membranen). Die Durchführung der Immunpräzipitationen erfolgte entsprechend der Beschreibung im Text, bzw. im Kapitel Material & Methoden (Abschnitt 3.2.13). IP = Immunpräzipitation, Con-IP = Kontroll-IP an unbeladenen Protein-G-Sepharose-Beads, ADPRC = ADP-Ribosylcyclase, NADGH = NAD-Glykohydrolase

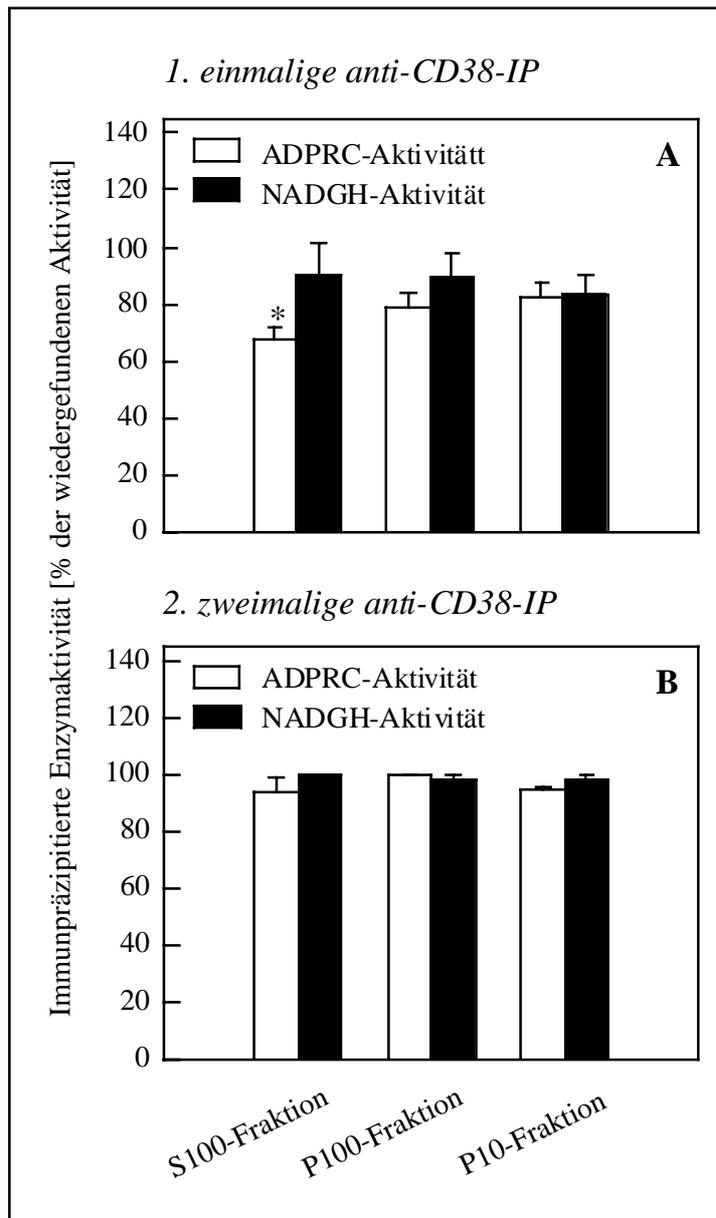


Abb. 4.24: Vergleich der Präzipitierbarkeit der in den subzellulären Fraktionen P10, P100 und S100 von Jurkat T-Lymphozyten befindlichen ADPRCs/NADGHs durch den AT1 anti-CD38 mAK Die Gewinnung der subzellulären Fraktionen P10, P100 und S100 aus Jurkat T-Lymphozyten, die Durchführung der anti-CD38-IPs unter Einsatz des AT1 anti-CD38 mAKs und die Vermessung der IP-Fractionen unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (100 μ M) im RP-HPLC-Enzymassay zum Zweck einer quantitativen Bestimmung der während des Enzymassays synthetisierten Stoffmengen der Produkte ϵ -cADPR- und ϵ -ADPR erfolgten nach den Beschreibungen in den Legenden zu Abb. 4. 21 und 4.23 und in den dort zitierten Abschnitten des Kapitels Material & Methoden. In dieser Abbildung sind als Mittelwerte \pm SD die prozentualen Anteile der durch den AT1 anti-CD38 mAK während einer einzigen IP (A), bzw. während zwei direkt nacheinander durchgeführten IPs (B) aus den Fraktionen S100, P100 und P10 immunpräzipitierten katalytischen Aktivität an der für die jeweilige IP insgesamt eingesetzten katalytischen Aktivität, die jeweils in Aktivität der ADPRCs und Aktivität der NADGHs aufgliedert wurde, dargestellt. Dabei lag die Anzahl der durchgeführten einmaligen IPs bei 4 (S100-Fraktion), bzw. 2 (P10- und P100-Fraktion) und die Anzahl der zweimaligen IPs bei 3 (S100-Fraktion), bzw. 2 (P10- und P100-Fraktion).

Demnach ist anzunehmen, daß der größte Anteil der cytosolischen ADPRCs/NADGHs der Lymphozyten zumindest in der nativen Struktur (immunologisch) Ähnlichkeit mit CD38 aufweist. Insofern ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß dieser Teil der cytosolischen ADPRCs/NADGHs auch in seiner Primärstruktur mit CD38 verwandt ist. Insgesamt legen diese Daten somit den Schluß nahe, daß wie in T-Lymphoblasten der Maus, auch in humanen T-Lymphozyten dem Ektoenzym CD38 und wahrscheinlich auch intrazellulär exprimierten Varianten dieses Proteins aus quantitativer Sicht die Hauptrolle bei der zellulären Synthese von cADPR zukommt. Im Detail steht die Charakterisierung intrazellulär lokalisierter ADPRCs/NADGHs sowohl was ihre Anordnung innerhalb der Zelle und ihre Relation zu CD38 als auch was ihre Funktion und Regulation als Komponente(n) intrazellulärer Signalwege betrifft, allerdings in vielfacher Hinsicht noch aus.

4.3.5 Versuche zur Identifizierung der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) durch Photoaffinitätsmarkierung mit [³²P]8-N₃-NAD

Mit dem Ziel einer Identifizierung der in den subzellulären Fraktionen S100, P10 und P100 der Jurkat-Lymphozyten enthaltenen ADPRCs/NADGHs im Anschluß an eine Auftrennung des Proteins in einer SDS-PAGE wurden in Kooperation mit *Prof. T. Walseth* (University of Minnesota/USA) Experimente zu einer Photoaffinitätsmarkierung der ADPRCs/NADGHs dieser Fraktionen durch [³²P]8-N₃-NAD durchgeführt. Sowohl die Synthese des [³²P]-markierten Nukleotids als auch die Experimente zur Photoaffinitätsmarkierung wurden entsprechend einer Publikation [*Walseth et al.* 1993] im Labor von *Prof. Walseth* durchgeführt. Abb. 4.25 zeigt das Ergebnis eines Experimentes der Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen der Jurkat-Lymphozyten mit [³²P]8-N₃-NAD. Am unteren Ende des dargestellten Gels ist das qualitative Ergebnis der HPLC-analytischen Untersuchung der auf das Gel aufgetragenen Proteinfractionen auf ADPRC- und NADGH-Aktivität durch Plus- und Minuszeichen dargestellt. In den beiden letzten Spuren des Gels wurde zur Kontrolle auf die Spezifität der radioaktiven Markierung von zellulärem Protein durch [³²P]8-N₃-NAD HA-gereinigtes S100 aufgetragen, das in Gegenwart von unmarkiertem NAD (Spur 11) oder cADPR (Spur 12) mit [³²P]8-N₃-NAD inkubiert worden war. Im Falle einer spezifischen Markierung von Protein durch [³²P]8-N₃-NAD wird angenommen, daß diese durch einen Überschuß an unmarkiertem NAD unterdrückt werden kann. Bei ADPRCs/NADGHs könnte eine spezifische Markierung mit [³²P]8-N₃-NAD potentiell auch durch einen Überschuß an nicht markiertem cADPR unterbunden werden, da auch diese Substanz im katalytischen Zentrum dieser Enzyme bindet (cADPR-Hydrolaseaktivität), bzw. dort entsteht und anschließend freigesetzt wird (ADPRC-Aktivität). Die Möglichkeit der Unterdrückung einer [³²P]8-N₃-NAD-Markierung dieser Enzyme durch cADPR könnte demnach eine charakteristische Eigenschaft von ADPRCs/NADGHs darstellen, die sie spezifisch von anderen NAD-metabolisierenden Enzymen und NAD-bindenden Proteinen unterscheidet und dadurch ihre Identifikation ermöglicht. Wie die Abbildung zeigt, wurden sowohl in der S100-Rohfraktion als auch in der durch HA-Chromatographie partiell aufgereinigten S100-Fraktion (der HA-Durchlaufraction) sowie in dem enzymatisch inaktiven HA-Eluat eine Reihe von Proteinen radioaktiv markiert. Weniger Proteine wurden dagegen in den Membranfraktionen P100 und P10 sowie der P100-Waschfraktion „PS100“, und der zur Solubilisierung membranassoziierter Proteine gewaschenen P100-Fraktion „P100*“ der Lymphozyten markiert.

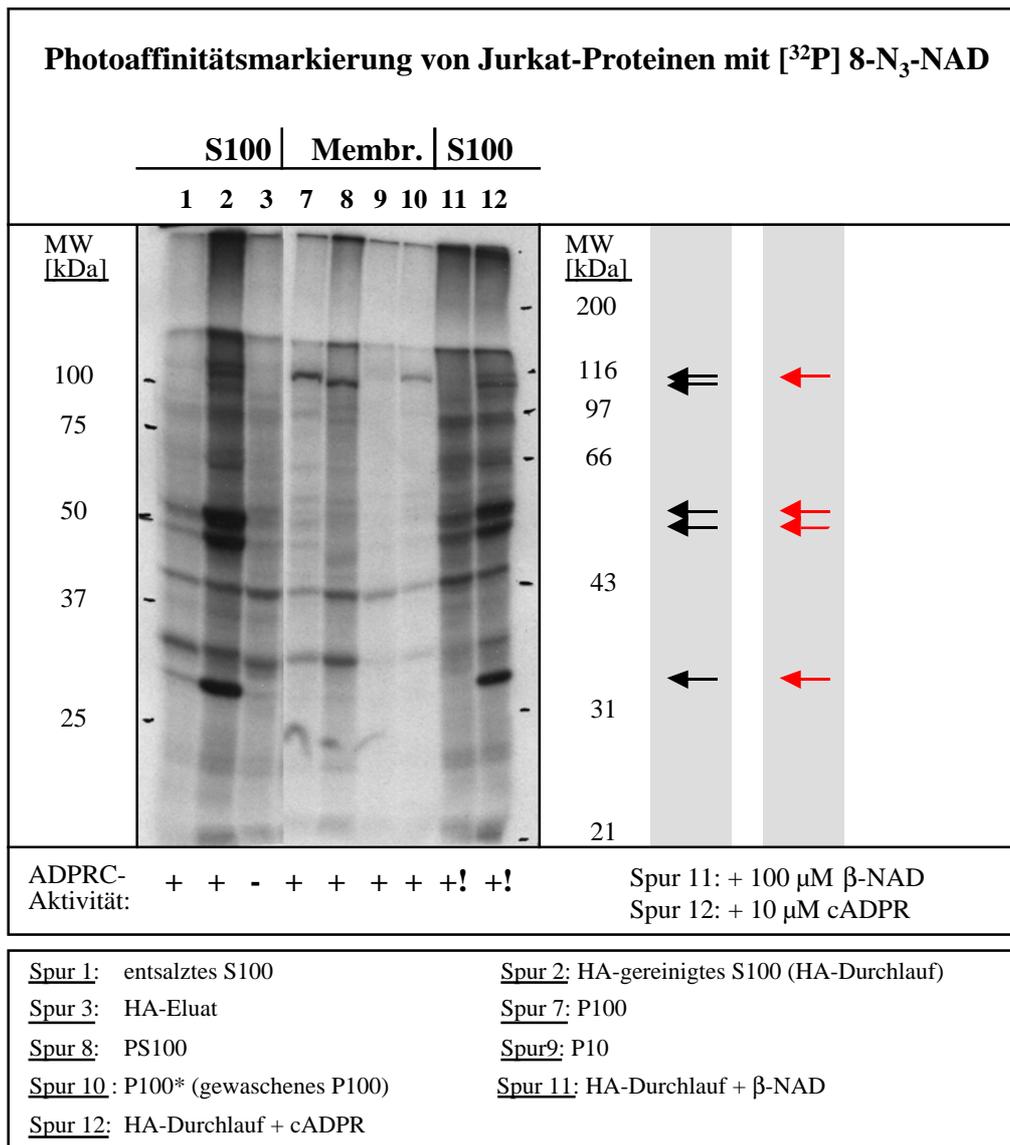


Abb. 4.25: Photoaffinitätsmarkierung von Jurkat-Proteinen der cytosolischen Fraktion S100 und der Membranfraktionen P10 und P100 durch [³²P]8-N₃-NAD. Die subzellulären Fraktionen S100, P10, P100, gewaschenes P100 (P100*) und die P100-Waschfraktion PS100 wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.3 aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnen und die S100-Fraktion zusätzlich über Sephadex G-25 superfine entsalzt (3.2.4). Eine partielle Reinigung und Anreicherung der ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion wurde durch Chromatographie an Hydroxylapatit (HA; 3.2.19.1) erreicht. Eine Überprüfung der katalytischen Aktivität aller auf das dargestellte Gel aufgetragenen Proteinfraktionen erfolgte unter Verwendung des Substrates ε-NAD (Endkonzentration 100 µM, Inkubationszeit 2000 Sek. bei RT) im RP-HPLC-Enzymassay (3.2.7.1 & 3.2.8.1). Gelspuren von Proteinfraktionen, für die ADPRC-/NADGH-Aktivität nachgewiesen wurde, wurden mit einem Plus- und solche von Proteinfraktionen, die keine ADPRC-/NADGH-Aktivität aufwiesen, mit einem Minuszeichen markiert. Alle Proteinfraktionen wurden zum Zweck einer Photoaffinitätsmarkierung mit [³²P]8-N₃-NAD inkubiert [Walseth *et al.* 1993] und anschließend durch reduzierende SDS-PAGE in einem 12,5 %igen Trenngel aufgetrennt. Zur Spezifitätskontrolle der Bindung von [³²P]8-N₃-NAD an zelluläres Protein wurde die Photoaffinitätsmarkierung des in den beiden letzten Spuren aufgetragenen HA-gereinigten S100-Proteins in Gegenwart von unmarkiertem NAD (100 µM, Spur 11) oder cADPR (10 µM, Spur 12) durchgeführt. Banden, deren Markierung mit [³²P]8-N₃-NAD durch gleichzeitige Inkubation mit nicht markiertem NAD unterdrückt wurde, wurden durch schwarze Pfeile und solche, deren Markierung durch unmarkiertes cADPR unterdrückt wurde, durch rote Pfeile markiert. Die Spuren 4-6 des dargestellten Gels wurden nachträglich entfernt, da sie irrelevante Proben enthielten. Das Gel wurde freundlicherweise von Prof. T. Walseth (University of Minnesota/USA) zur Verfügung gestellt.

Während die [^{32}P]8- N_3 -NAD-Markierung einiger Proteine in Gegenwart von nicht markiertem NAD (100 μM) deutlich zumindest partiell unterdrückt wurde (mit einem schwarzen Pfeil markierte Banden), war eine Verminderung der [^{32}P]8- N_3 -NAD-Markierung von Proteinen durch nicht markiertes cADPR (10 μM) erheblich schwächer ausgeprägt und dadurch schwerer zu erkennen (mit einem roten Pfeil markierte Banden). Möglicherweise war die eingesetzte Endkonzentration an nicht radioaktiv markiertem cADPR zu gering. Ein Protein, das in fast allen S100-Präparationen sowie in allen Membranpräparationen durch [^{32}P]8- N_3 -NAD markiert und dessen Markierung sowohl in Gegenwart von NAD als auch in Gegenwart von cADPR partiell unterbunden wurde (MW ca. 35 kDa), scheidet als Kandidat einer ADPRC/NADGH wahrscheinlich aus, da es auch im katalytisch inaktiven HA-Eluat eine intensive Bande darstellt. Obwohl insgesamt mit Hilfe der Photoaffinitätsmarkierung durch [^{32}P]8- N_3 -NAD mehrere potentielle Kandidaten einer ADPRC/NADGH detektiert werden konnten, gab es unter diesen keinen bestimmten, der auf den ersten Blick besonders vielversprechend wirkte.

Weitere Experimente hatten zum Ziel eine Photoaffinitätsmarkierung aus subzellulären Fraktionen der Jurkat-Lymphozyten immunpräzipitierter ADPRCs/NADGHs zu erreichen. Die Verwendung an Protein-G Sepharose-Beads gekoppelter Immunpräzipitate der Enzyme erwies sich für diese Experimente jedoch als problematisch. Bemühungen die immunpräzipitierten ADPRCs/NADGHs durch Inkubation der IP-Pellets mit β -ME (Endkonzentration 10-100 mM, Inkubation für 5-30 Min.) oder durch Waschen der Immunpräzipitate bei pH 2,0 (3x 2 Min.) wieder zu resolubilisieren verliefen jedoch ohne Erfolg (β -ME) oder führten zu einem starken Verlust an enzymatischer Aktivität (pH 2,0). Daher konnten mit immunpräzipitierten ADPRCs/NADGHs der Jurkat-Lymphozyten keine Ergebnisse erzielt werden. Erstaunlicherweise hatte eine Inkubation der Immunpräzipitate mit β -ME (10-100 mM) jedoch nahezu keine inhibitorische Wirkung auf ADPRC- und NADGH-Aktivität der in den beschriebenen Vorversuchen eingesetzten Membranfraktionen P10 und P100. Aufgrund der starken Inhibition dieser ADPRCs/NADGHs sowie des Ektoenzym CD38 (Abb. 4.14) durch DTT (hier nicht gezeigt) war eine Verwendung von β -ME zum Zweck der Resolubilisierung von Immunpräzipitaten eigentlich bereits im Voraus als problematisch eingeschätzt worden.

4.4 Versuch einer proteinbiochemischen Aufreinigung der löslichen ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion

Da die zuvor beschriebenen Experimente keine sichere Klarheit darüber verschafften, ob es in der cytosolischen Fraktion der Lymphozyten neben CD38 möglicherweise eine oder mehrere weitere, von diesem Protein verschiedene ADPRCs/NADGHs gibt, wurde im vierten Teil der vorliegenden Arbeit versucht, die ADPRC(s)/NADGH(s) (nachfolgend für Ein- und Mehrzahl ADPRC/NADGH genannt) dieser Fraktion proteinbiochemisch aufzureinigen.

4.4.1 Anreicherung der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion durch Chromatographie an Hydroxylapatit (HA)

Als ein erster Reinigungsschritt der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion wurde eine bereits in vorangegangenen Kapiteln mehrfach erwähnte Chromatographie dieser Proteinfraktion an Hydroxylapatit (HA) etabliert. Dazu wurde das in Phosphatpuffer (10 mM, pH 6,8) gelöste Protein auf eine mit HA-Ultrogel gefüllte Säule aufgetragen und diese anschließend mit dem Phosphatpuffer gespült. Zur Elution von HA-gebundenem Protein wurde die Säule mit einem konzentrierterem Phosphatpuffers (500 mM; pH 6,8; 100 mM KCl) gewaschen. Durchlauf- und Waschfraktion wurden routinemäßig vereinigt und wie das Eluat durch Ultrafiltration eingengt. Zur Untersuchung auf enzymatische Aktivität wurden die eingengten Fraktionen fluorimetrisch mit dem Substrat ϵ -NAD im kontinuierlichen Enzymassay vermessen und die synthetisierten Produktmengen an ϵ -cADPR- und ϵ -ADPR anschließend quantitativ durch RP-HPLC bestimmt. In Abb. 4.26 ist ein charakteristisches Beispiel einer HA-chromatographischen Anreicherung der löslichen ADPRC/NADGH der S100-Fraktion der Lymphozyten dargestellt. Abb. 4.26 (A) zeigt die bei identischer eingesetzter Proteinmenge fluorimetrisch im kontinuierlichen ϵ -NAD-Enzymassay gemessenen zeitlichen Verläufe der katalytischen Aktivität des S100-Rohextraktes und der aus dem Rohextrakt gewonnenen HA-gereinigten Fraktionen (HA-Durchlauf fraktion/HA-Waschfraktion, im Folgenden als HA-Durchlauf bezeichnet, und HA-Eluat). In Abb. 4.26 (B) sind die zugehörigen RP-HPLC-Chromatogramme dargestellt, die bei Vermessung gleicher Aliquots der fluorimetrischen Assaysätze an der HPLC erhalten wurden. Abb. 4.26 (C) zeigt schließlich das Gesamtergebnis der ausgewählten Chromatographie, das sich aus den an der HPLC erhobenen Daten berechnete. Wie regelmäßig bei diesem Reinigungsschritt festgestellt, wurde die gesamte ADPRC- und NADGH-Aktivität im Anschluß an die HA-Chromatographie in der HA-Durchlauf- und Waschfraktion vorgefunden (Abb. 4.26 A-C).

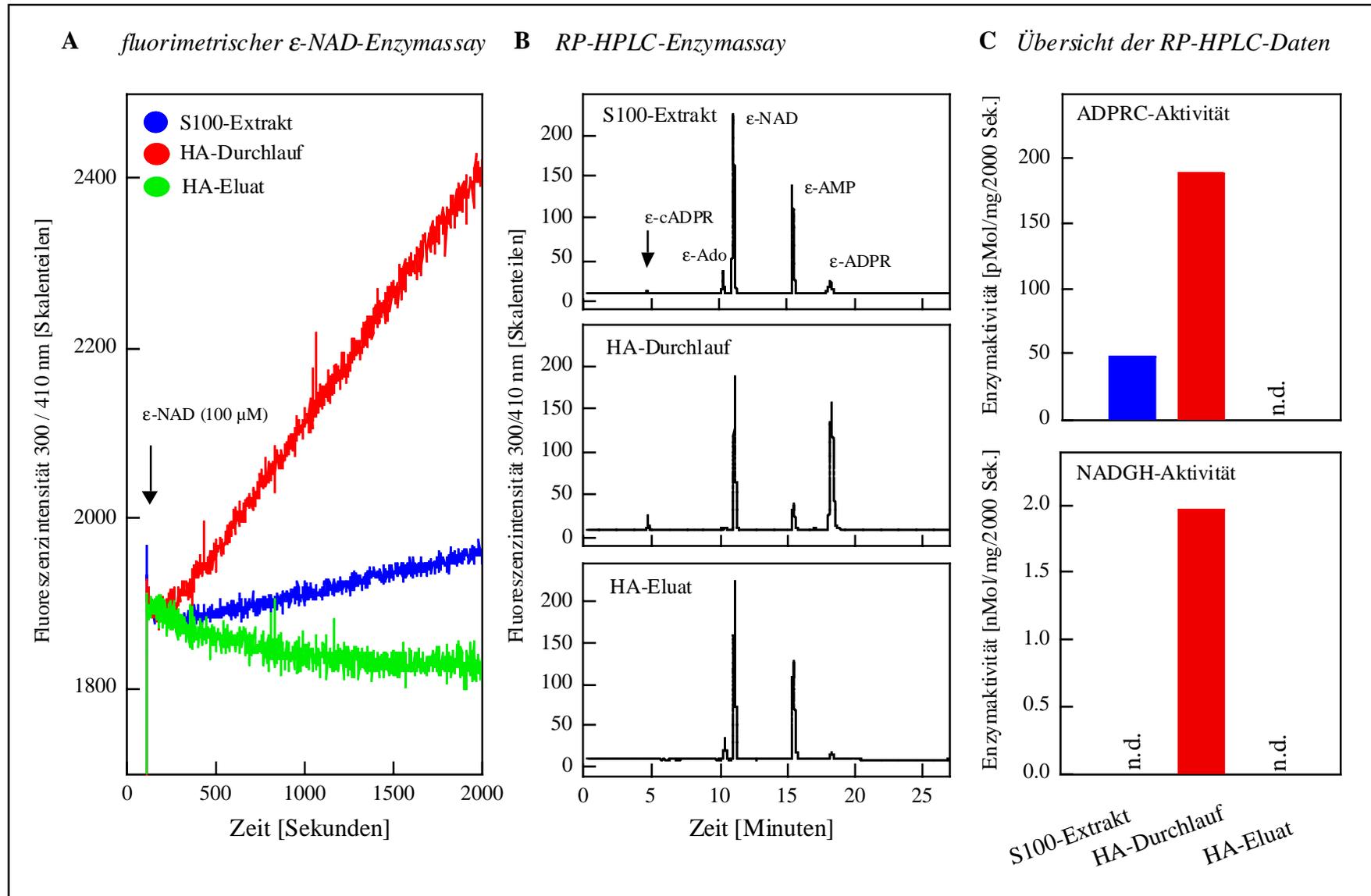


Abb. 4.26: Anreicherung der ADPRC(s)/NADGH(s) der cytosolischen Fraktion S100 durch Hydroxylapatit-Chromatographie. Legende, siehe folgende Seite.

Legende zu Abbildung 4.26

Die für die exemplarische Darstellung ausgewählte HA-Chromatographie eines aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen cytosolischen Extraktes wurde entsprechend der Beschreibung im Text und im Kapitel Material & Methoden (Abschnitt 3.2.19.1) an einer HA-Ultrogel-Säule durchgeführt. Je ml Gel wurden maximal 2 mg des in Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 6,8) aufgenommenen Proteinextraktes aufgetragen. Der S100-Rohextrakt, der eingeeengte HA-Durchlauf und das eingeeengte HA-Eluat wurden zur Durchmusterung auf ADPRC- und NADGH-Aktivität nach Aufnahme in intrazellulärem Puffer (pH 7,2; Endvolumen 1 ml) bei gleicher eingesetzter Proteinmenge (1 mg) und einer Substratkonzentration von 100 μ M ϵ -NAD entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.1 mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μ M, RT, 33 Min.) fluorimetrisch im kontinuierlichen Enzymassay vermessen (A). Aliquots der fluorimetrisch vermessenen Assayansätze (100 μ l) wurden anschließend, nach Abtrennung des Proteins durch Ultrafiltration (10 kDa MWCO), zur quantitativen Bestimmung der synthetisierten Stoffmengen der Produkte ϵ -cADPR- und ϵ -ADPR entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.8.1 durch RP-HPLC analysiert. In B) sind die mit Aliquots der Assayansätze des in A) dargestellten Experimentes erhaltenen RP-HPLC-Chromatogramme gezeigt. In C) ist die quantitative Gesamtauswertung der RP-HPLC-Daten zu der ausgewählten HA-Präparation der cytosolischen ADPRC/NADGH getrennt für die Aktivität der ADPRC (obere Teilabbildung) und die Aktivität der NADGH (untere Teilabbildung) der drei Fraktionen dargestellt. n.d., nicht detektierbar.

Dagegen wies das HA-Eluat keinerlei katalytische Aktivität in Hinblick auf eine Synthese von ϵ -cADPR und ϵ -ADPR auf (Abb. 4.26 A-C). Während im S100-Rohextrakt aufgrund einer nahezu quantitativen Verstoffwechselung von ϵ -ADPR zu ϵ -AMP durch eine PPase (Abb. 4.26 B, obere Abbildung), keine NADGH-Aktivität messbar war (Abb. 4.26 C, untere Abbildung), konnte im HA-Durchlauf infolge einer effektiven Abtrennung der PPase eine Synthese von ϵ -ADPR nachgewiesen werden (Abb. 4.26 B, mittlere Abbildung und C, untere Abbildung). Das Verhältnis von ADPRC- zu NADGH-Aktivität im HA-Durchlauf belief sich dabei regelmäßig auf einen auch für die membranständigen ADPRCs/NADGHs der P10- und P100-Fraktion der Lymphozyten charakteristischen Wert von ca. 1:10 (Abb. 4.26 C). Neben einer quantitativen Abtrennung der PPase-Aktivität, dem Hauptzweck dieses Reinigungsschrittes, wurde durch die HA-Chromatographie meist eine drei- bis sechsfache Anreicherung der spezifischen Aktivität der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion erreicht. Die Aktivität der PPase befand sich nach Durchführung der Chromatographie im HA-Eluat (Abb. 4.26 B, untere Abbildung). Geringe, kontaminierende Substanzmengen an ϵ -ADPR und ϵ -AMP waren regelmäßig bereits im ϵ -NAD-Standard vorhanden (an dieser Stelle nicht dargestellt) und wurden bei der quantitativen Auswertung von HPLC-Daten durch Korrektur berücksichtigt. In dem dargestellten Experiment ermöglichte die Kontamination des ϵ -NAD-Standards mit ϵ -ADPR jedoch die Detektion der PPase-Aktivität im HA-Eluat (Abb. 4.26 B, untere Abbildung). Wie oben bereits erwähnt, wies diese Fraktion selbst charakteristischerweise keine NADGH-Aktivität auf.

4.4.2 Ergebnisse der Vorversuche zur weiteren chromatographischen Aufreinigung der löslichen ADPRC/NADGH der S100-Fraktion an Minisäulen

Zur Vorbereitung einer weiteren chromatographischen Aufreinigung der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion wurde, zunächst im kleinen Maßstab, die Bindung des Enzyms an Säulenmatrices mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften untersucht. Da anfangs angenommen wurde, daß es sich bei der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion um ein lösliches Protein handelt, wurden die meisten dieser Versuche entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.19.2 in Abwesenheit von Detergenz durchgeführt. Die eingesetzten Säulenmatrices umfassten einen starken (SP-Sepharose) und einen schwächeren (CM-Sepharose) Kationenaustauscher, einen starken Anionenaustauscher (Q-Sepharose) sowie zusätzlich Heparin-Sepharose und Cibacron Blue-Sepharose. Bei der letztgenannten Matrix handelt es sich um eine Affinitätsmatrix für NAD(P-)/NAD(P)H-bindende Proteine [Thompson *et al.* 1975]. Die jeweils aufgetragene Proteinmenge (3-10 mg) richtete sich nach der katalytischen Aktivität der verwendeten Rohextrakte und der vom Hersteller angegebenen maximalen Bindungskapazität der eingesetzten Säule. Die Chromatographie an Cibacron Blue-Sepharose in Abwesenheit von Detergenz (20 mg aufgetragenes Protein) wurde mit der Intention einer präparativen Anreicherung der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion durchgeführt. Die zur Abtrennung zellulärer Nukleotide zuvor über Sephadex G-25 entsalzten und während der Entsalzung auf den Äquilibriumspuffer der eingesetzten Testsäule umgepufferten cytosolischen Extrakte wurden jeweils in einem Volumen von 1-2 ml, bzw. von 5,3 ml (20 mg Protein, Cibacron Blue-Sepharose) auf die Säule aufgetragen. Nach Spülen der Säule mit Äquilibriumspuffer wurde gebundenes Protein in 3 SV des Elutionspuffers eluiert. Letzterer entsprach jeweils dem durch 1M NaCl, bzw. 2 M KCl (Cibacron Blue-Sepharose) angereicherten Äquilibriumspuffer. Durchlauf- und Waschfraktion der einzelnen Experimente wurden im Pool vereinigt und wie die Eluate durch Ultrafiltration (10 kDa MWCO) eingengt. ADPRC- und NADGH-Aktivität der eingengten Fraktionen wurden schließlich unter Einsatz des Substrates ϵ -NAD (Substratkonzentration 100 μ M ϵ -NAD) im RP-HPLC-Enzymassay bestimmt. Da für diese Experimente kein HA-gereinigtes S100-Protein verwendet wurde, war die NADGH-Aktivität der eingesetzten Rohextrakte aufgrund von PPase-Aktivität oft nicht nachweisbar. In dem Teil der dargestellten Experimente, in dem eine vollständige Trennung von PPase-Aktivität und ADPRC-/NADGH-Aktivität der S100-Extrakte gelang, lag das Verhältnis von ϵ -cADPR- zu ϵ -ADPR-Synthese in den an ADPRC- und NADGH-Aktivität angereicherten Fraktionen bei $1:9 \pm 0,98$ (n=10). Tab. 4.8 zeigt eine Übersicht der in den chromatographischen Einzelexperimenten erhaltenen Ergebnisse.

Tab. 4..8: Übersicht der Vorversuche an Minisäulen zur chromatographischen Aufreinigung der cytosolischen ADP-Ribosylcyclase/NAD-Glykohydrolase der Jurkat T-Lymphozyten

Säulen & Puffer-Bedingungen	Ausbeute an Protein [%]	Gesamtausbeute an Enzymaktivität [%]		ADPRC-Aktivität [% der Ausbeute]		NADGH-Aktivität [% der Ausbeute]	
		ADPRC	NADGH	Durchlauf	Eluat	Durchlauf	Eluat
SP-Sepharose							
50 mM HEPES pH 8,0	77,97	72,51	1,06	98,58	1,42	0,00 PPase aktiv	100,00
50 mM Kaliumphosphat pH 7,0	74,80	78,48	100,00 (neu)*	99,07	0,93	97,91	2,09 PPase bindet
50 mM MES pH 6,0	73,60	75,71	100,00 (neu)*	95,09	4,91	100,00	0,00 PPase bindet
50 mM MES pH 5,5	79,88	47,41	100,00 (neu)*	100,00	0,00	100,00	0,00 PPase bindet
50 mM Natriumacetat pH 5,0	72,17	74,68	0,00	0,00 kein Protein	100,00	0,00 kein Protein	0,00 PPase bindet
Heparin-Sepharose							
50 mM HEPES pH 8,0	27,91	16,23	0,00	0,00 kein Protein	16,23	0,00 kein Protein	0,00
50 mM HEPES pH 7,0	53,66	75,12	100,00 (neu)*	93,56	6,44	100,00	0,00 PPase bindet
50 mM MES pH 6,0	76,12	50,69	100,00 (neu)*	40,24	59,76	100,00	0,00 PPase bindet
50 mM MES pH 5,5	79,96	40,28	100,00 (neu)*	89,33	10,67	100,00	0,00 PPase bindet
50 mM Natriumacetat pH 5,0	72,16	5,04	(100,00) (neu)*	0,00 kein Protein	5,04	(100,00) kein Protein	0,00 PPase bindet
CM-Sepharose							
50 mM Kaliumphosphat pH 7,0	83,84	96,09	100,00 (neu)*	99,66	0,34	99,69	0,31 PPase bindet
50 mM MES pH 6,0	77,45	64,57	100,00 (neu)*	96,02	3,98	100,00	0,00 PPase bindet
Q-Sepharose							
50 mM Tris-Cl pH 8,0	74,00	38,34	100,00 (neu)*	91,11	8,89	100,00	0,00 PPase bindet
50 mM Tris-Cl pH 8,0	76,09	32,13	74,94	93,48	6,52	100,00	0,00 PPase bindet
50 mM Bis-Tris pH 7,0	44,27	57,41	100,00 (neu)*	84,13	15,87	100,00	0,00 PPase bindet
Cibacron-Blue-Sepharose in Abwesenheit von Detergenz							
10 mM Kaliumphosphat pH 7,0	73,61	54,95	100,00 (neu)*	97,16	2,84	100,00	0,00 PPase bindet
Cibacron-Blue-Sepharose in Gegenwart von Detergenz							
10 mM Kaliumphosphat pH 7,0	95,20	1,26	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00 PPase bindet

Anmerkung: ADPRC = ADP-Ribosylcyclase; NADGH = NAD-Glykohydrolase; PPase = Pyrophosphatase; (neu)* = Aktivität war im S100-Rohextrakt aufgrund von PPase-Aktivität nicht detektierbar, konnte nach Abtrennung der PPase-Aktivität jetzt aber bestimmt werden.

Die meisten Säulenmatrices banden die ADPRC/NADGH der S100-Fraktion unter den gewählten Bedingungen nicht oder nur in geringem Umfang. Lediglich bei einem pH-Wert von 5,0 konnte eine in diesem Fall quantitative Bindung des Enzyms/der Enzyme an SP-Sepharose und Heparin-Sepharose festgestellt werden. Allerdings wurde bei diesem pH-Wert das gesamte eingesetzte Protein einschließlich der PPase an die substituierte Matrix beider Säulen gebunden. Während durch Chromatographie an SP-Sepharose bei pH 5,0 eine gute Gesamtausbeute an Protein und ADPRC-Aktivität erzielt wurde, war die Ausbeute an letzterer bei Chromatographie an Heparin-Sepharose unter den gleichen pH-Bedingungen wesentlich schlechter. Eine Chromatographie der S100-Proteine an Q-Sepharose bewirkte bereits bei weniger extremen pH-Bedingungen ebenfalls einen starken Verlust an katalytischer Aktivität in Hinsicht auf die ϵ -cADPR Synthese. Auch mit der Cibacron Blue-Sepharose-Matrix wurden keine vielversprechenden Ergebnisse erzielt. Wurden die S100-Extrakte der Lymphozyten nicht solubilisiert und während der Chromatographie kein Detergenz verwendet, konnte keine Bindung der cytosolischen ADPRC/NADGH an diese Säulenmatrix festgestellt werden. Wurde die Chromatographie jedoch mit solubilierten S100-Extrakten in Gegenwart von Detergenz (2% NP40 v/v) durchgeführt, ging die ADPRC-Aktivität der Extrakte nahezu quantitativ verloren. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei Nutzung der gleichen Matrix auch mit den membranständigen ADPRCs/NADGHs der Fraktionen P10 und P100 der Jurkat-Lymphozyten erhalten, wenn diese ebenfalls mit NP40 (2% v/v) solubilisiert und in Gegenwart von diesem Detergenz chromatographiert wurden (nicht dargestellt). Da sich die anfangs dunkelblau gefärbte Matrix unter diesen Versuchsbedingungen partiell entfärbte und Cibacron Blue Publikationen zufolge in nanomolarer Endkonzentration ein effektiver Inhibitor verschiedener NADasen ist [Schuber & Pascal 1977, Yost & Anderson 1981], blieb unklar, ob die ADPRCs/NADGHs aller drei subzellulären Fraktionen unter den Versuchsbedingungen fest an die Cibacron Blue-Matrix adsorbierten und dann selbst durch Waschen der Säule mit 2M KCl nicht mehr eluierten, oder ob sie in inhibierter Form eluierten. Unabhängig von dieser Frage erwies sich aufgrund der erzielten Ergebnisse auch diese Säulenmatrix, zumindest unter den getesteten Versuchsbedingungen, als ungeeignet, die cytosolische ADPRC/NADGH der Jurkat-Lymphozyten in aktiver Form anzureichern. Auch durch eine spezifische Elution mit β -NAD (1-20 mM) ließ sich die Ausbeute an ADPRC-Aktivität im Anschluß an die Chromatographie nicht verbessern (nicht gezeigt). Den Ergebnissen der Vorversuche zufolge stellte sich damit eine Chromatographie der S100-Proteine an einer Kationenaustauschermatrix, beispielsweise an

SP-Sepharose, als die vielversprechendste Möglichkeit zur Etablierung eines zweiten Reinigungsschrittes der löslichen ADPRC/NADGH der Jurkat-Lymphozyten dar.

4.4.3 Anreicherung unterschiedlicher ADPRCs/NADGHs durch Chromatographie an SP-Sepharose HP und Charakterisierung (partiell) aufgereinigter Enzyme

4.4.3.1 SP-Sepharose-Chromatographie von ADPRCs/NADGHs

Aufbauend auf die zuvor beschriebenen säulenchromatographischen Vorversuche wurde als zweiter Reinigungsschritt der cytosolischen ADPRC/NADGH eine Chromatographie an SP-Sepharose etabliert. Da zuvor durchgeführte Experimente zu der Annahme geführt hatten, daß die cytosolische ADPRC/NADGH in der S100-Fraktion wahrscheinlich nicht in vollständig löslicher, sondern eher in aggregierter Form vorliegt, wurde die Chromatographie in Gegenwart von Detergenz (2% v/v NP40) durchgeführt. Um die cytosolische ADPRC/NADGH der Lymphozyten im Vergleich zu den membranständigen ADPRCs/NADGHs der subzellulären Fraktionen P10 und P100 zu charakterisieren und sie gegebenenfalls von diesen abzugrenzen, wurden entsprechende Experimente auch mit den beiden Membranfraktionen durchgeführt. Da ein Teil der ADPRC-/NADGH-Aktivität der P100-Fraktion sich bei alkalischem pH (pH 8,0) und in Gegenwart von Salz (500 mM KCl) von den Membranen abwaschen ließ, Bedingungen, unter denen membranassoziierte, cytosolische Proteine in Lösung gebracht werden können, wurde angenommen, daß die P100-Fraktion zusätzlich zu einer membranständigen ADPRC/NADGH (dem Transmembranprotein CD38) auch eine lösliche, membranassoziierte Variante einer ADPRC/NADGH enthalten könnte. Bei letzterer könnte es sich um das cytosolische Enzym handeln, dessen Verteilung in der Zelle stimulationsabhängig variiert. Als Positivkontrolle für die Eignung der chromatographischen Bedingungen wurden einige Experimente auch mit der ADPRC aus *A. californica* sowie zusätzlich mit einer löslichen, rekombinanten Form von humanem CD38 (hCD38rec) als Standardproteinen durchgeführt. Von diesen beiden Proteinen konnte die ADPRC aus *A. californica* (PI 8,1-9,8) ebenfalls durch Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt werden [Hellmich & Strumwasser 1991].

Zur Durchführung der Chromatographie wurden die im Äquilibriumspuffer der Säule gelösten, zuvor solubilisierten subzellulären Fraktionen der Lymphozyten und die beiden Standardproteine auf eine SP-Sepharose-HP-Säule injiziert und in einem Salzgradienten von 0-1000 mM NaCl aufgetrennt. Gesammelte Fraktionen wurden anschließend in einem fluorimetrischen Enzymassay unter Verwendung des Substrates NGD auf ADPRC-Aktivität

(GDPRC-Aktivität) durchgemustert. Auf eine Aufzeichnung der Proteinverteilung während der chromatographischen Läufe unter Nutzung der proteinspezifischen Absorption bei 280 nm wurde in den Experimenten aufgrund der Gegenwart von NP40 (2% v/v) verzichtet, da das Detergenz bei dieser Wellenlänge ebenfalls eine starke Absorption aufwies. Abb. 4.27 zeigt charakteristische zeitliche Verläufe der GDPRC-Aktivität während der Auftrennung der verschiedenen Enzympräparationen an SP-Sepharose-HP. Der für alle dargestellten Einzelexperimente eingesetzte Gradient wurde exemplarisch nur in der obersten, linken Teilabbildung eingezeichnet. Während die ADPRC aus *A. californica* bereits bei Durchführung der Chromatographie bei einem pH von 6,0 quantitativ an die SP-Sepharose-Matrix adhärierte (Abb. 4.27 A, B), waren für eine vollständige (hCD38rec, Abb. 4.27 C) oder partielle Bindung (Abb. 4.27 D, E, F) der ADPRCs/NADGHs der anderen Enzympräparationen harschere Bedingungen (pH 5,0) erforderlich. Während ein nennenswerter Anteil der ADPRC-/GDPRC-Aktivität der HA-gereinigten S100-Fraktion (bis zu 50% der Aktivität, Abb. 4.27 D) und der P100-Fraktion (oft mehr als 50% der Aktivität, Abb. 4.27 F) der Lymphozyten unter letzteren an die SP-Sepharose-Matrix gebunden wurde, traf dies im Falle der Membranfraktion P10 (Abb. 4.27 E) wiederum (wie bei pH 6,0) nicht zu. Hier wurde der weitaus größte Anteil der GDPRC-Aktivität regelmäßig in Durchlauf- und Waschfraktionen vorgfunden (Abb. 4.27 E). In allen analysierten subzellulären Fraktionen der Lymphozyten stimmte bei dem Anteil der ADPRCs/NADGHs, der eine Bindung an die SP-Sepharose-Matrix zeigte (Abb. 4.27 D, E, F), der zeitliche Verlauf der Bindung recht gut mit dem von hCD38rec (Abb. 4.27 C) überein. Verglichen mit den ADPRCs/NADGHs der anderen subzellulären Fraktionen der Lymphozyten und den beiden Standardproteinen erwies sich für die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion in wiederholten Experimenten ein typischerweise zweigipfliger Verlauf des Aktivitätsprofils (Abb. 4.27 D) als charakteristisch. Im Falle der P100-Fraktion der Lymphozyten (Abb. 4.27 F) ließ sich der Anteil der GDPRC-Aktivität, der an die SP-Sepharose-Matrix adhärierte (Abb. 4.27 F, H), durch die zuvor bereits erwähnte Waschprozedur zur Ablösung membranassoziierter Proteine (pH 8,0; 500 mM KCl) nahezu quantitativ von dem Anteil trennen, der keine Bindung an die Matrix zeigte (Abb. 4.27 F, G) und darin der mit den gewaschenen Membranen der P100-Fraktion assoziierten ADPRC-/NADGH-Aktivität entsprach. Von der vermutlich die lösliche/membranassozierte Form der ADPRC/NADGH in angereicherter Form enthaltenden P100-Waschfraktion (PS100) verblieb ein geringer Anteil der katalytischen Aktivität während der Chromatographie an SP-Sepharose allerdings ebenfalls in der Durchlauf- und Waschfraktion (Abb. 4.27 H).

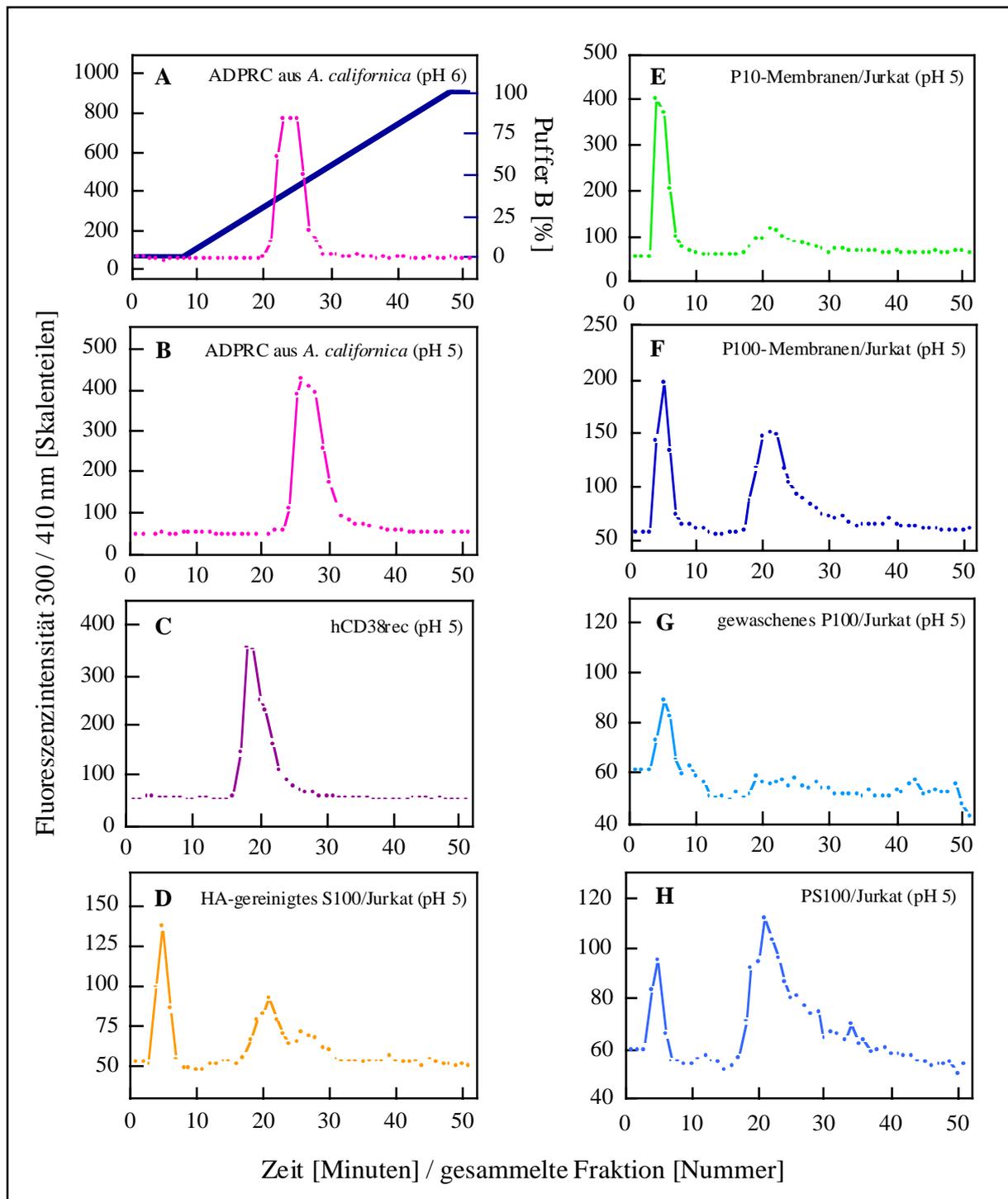


Abb. 4.27: Chromatographie verschiedener Präparationen von ADPRCs/NADGHs an SP-Sepharose-HP. Die ADPRC aus *A. californica* (450 ng Protein; A, B), eine lösliche rekombinante Form des humanen CD38 (hCD38^{rec}, 450 ng Protein, C) sowie die aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnene cytosolische Fraktion S100 (2 mg Protein, HA-gereinigt; D), die ebenfalls aus den Lymphozyten gewonnenen Membranfraktionen P10 (2 mg Protein, E), P100 (4 mg Protein; F) und gewaschenes P100 (0,6 mg Protein; G) und die P100-Waschfraktion PS100 (entsalzt; 1,6 mg Protein; H), jeweils gelöst und solubilisiert in 30 mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,0 oder pH 6,0, wie jeweils angegeben) mit 2% (v/v) NP40 und Proteaseinhibitoren-Mix (1:250), wurden in einem Gesamtvolumen von jeweils 2 ml und bei einer Flußrate von 0,5 ml/Min. auf eine SP-Sepharose-HP HiTrap-Säule (Bettvolumen 1 ml) aufgetragen und entsprechend der Beschreibung im Kapitel Material & Methoden (Abschnitt 3.2.19.3) bei einer Flußrate von 1 ml/Min. in einem Gradienten von 0-1000 mM NaCl aufgetrennt. Die Chromatographien wurden unter Verwendung eisgekühlter Puffer bei RT durchgeführt. Zur Steuerung der chromatographischen Trennungen und dem minütlichen Sammeln von Fraktionen auf Eis wurde das Äktaprime Chromatographiesystem der Firma Amersham Pharmacia Biotech genutzt. Im Anschluß an die Chromatographie

wurden alle Fraktionen parallel entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.2 fluorimetrisch im Photometriemodus ($\lambda_{\text{ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{em}}=410$ nm) auf GDPRC-Aktivität durchgemustert. Als Substrat wurde in den dargestellten Experimenten aufgrund seiner im Vergleich zu ϵ -NAD geringeren Eigenfluoreszenz NGD (50 μM , 1 Stunde Inkubation bei RT) verwendet. Gezeigt sind charakteristische, jeweils anhand der gemessenen Fluoreszenzwerte der gesammelten Fraktionen (dargestellt als Punkte) konstruierte zeitliche Verläufe der GDPRC-Aktivität der unterschiedlichen Enzympräparationen während der SP-Sepharose-Chromatographie.

Insgesamt stützt das Ergebnis die aufgestellte Hypothese, daß es in T-Lymphozyten (mindestens) zwei Formen von ADPRCs/NADGHs gibt. Die eine, vermutlich das Transmembranprotein CD38, die den zuvor dargestellten Ergebnissen der anti-CD38 Western Blots zufolge (Abb. 4.10) besonders stark in der P10-Fraktion vertreten ist, wird unter den eingesetzten Versuchsbedingungen nicht an die SP-Sepharose-Matrix gebunden. Die zweite Form des Enzyms, vermutlich kein Transmembranprotein, aber ein Protein mit hydrophoben Eigenschaften, adhärirt dagegen an die SP-Sepharose-Matrix. Dieses Protein ist in den Lymphozyten möglicherweise sowohl in löslicher (S100-Fraktion) als auch in membranassoziierter Form (P100-Fraktion) vertreten. In seinen Bindungseigenschaften entspricht es dabei weitgehend hCD38rec, und zwar besser als der ADPRC aus *A. californica*, die von Natur aus eine lösliche ADPRC ist. Ob es sich bei der löslichen ADPRC/NADGH der Jurkat-Lymphozyten um eine CD38-Variante oder um ein nicht mit CD38 identisches Protein mit dennoch ähnlichen Eigenschaften handelt, wurde nachfolgend weiter untersucht.

4.4.3.2 Charakterisierung der Proteinzusammensetzung von Fraktionen der SP-Sepharose-Chromatographie, in denen die an die Matrix bindende Form der ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion enthalten war

In weiteren Experimenten wurde die Proteinzusammensetzung von Fraktionen der SP-Sepharose-Chromatographie durch HA-Chromatographie vorgereinigten S100-Proteins, die die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH der cytosolischen Fraktion der T-Lymphozyten enthielten, unter reduzierenden [Laemmli 1970] und unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE untersucht. Charakteristische Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen sind in Abb. 4.28 dargestellt. Der obere, linke Teil der Abbildung (Abb. 4.28 A) zeigt den zeitlichen Verlauf der GDPRC-Aktivität während der für die Darstellung ausgewählten Chromatographie. Das Aktivitätsprofil läßt wieder den für die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH der durch HA-Chromatographie vorgereinigten S100-Fraktion charakteristischen, zweigipfligen Verlauf erkennen.

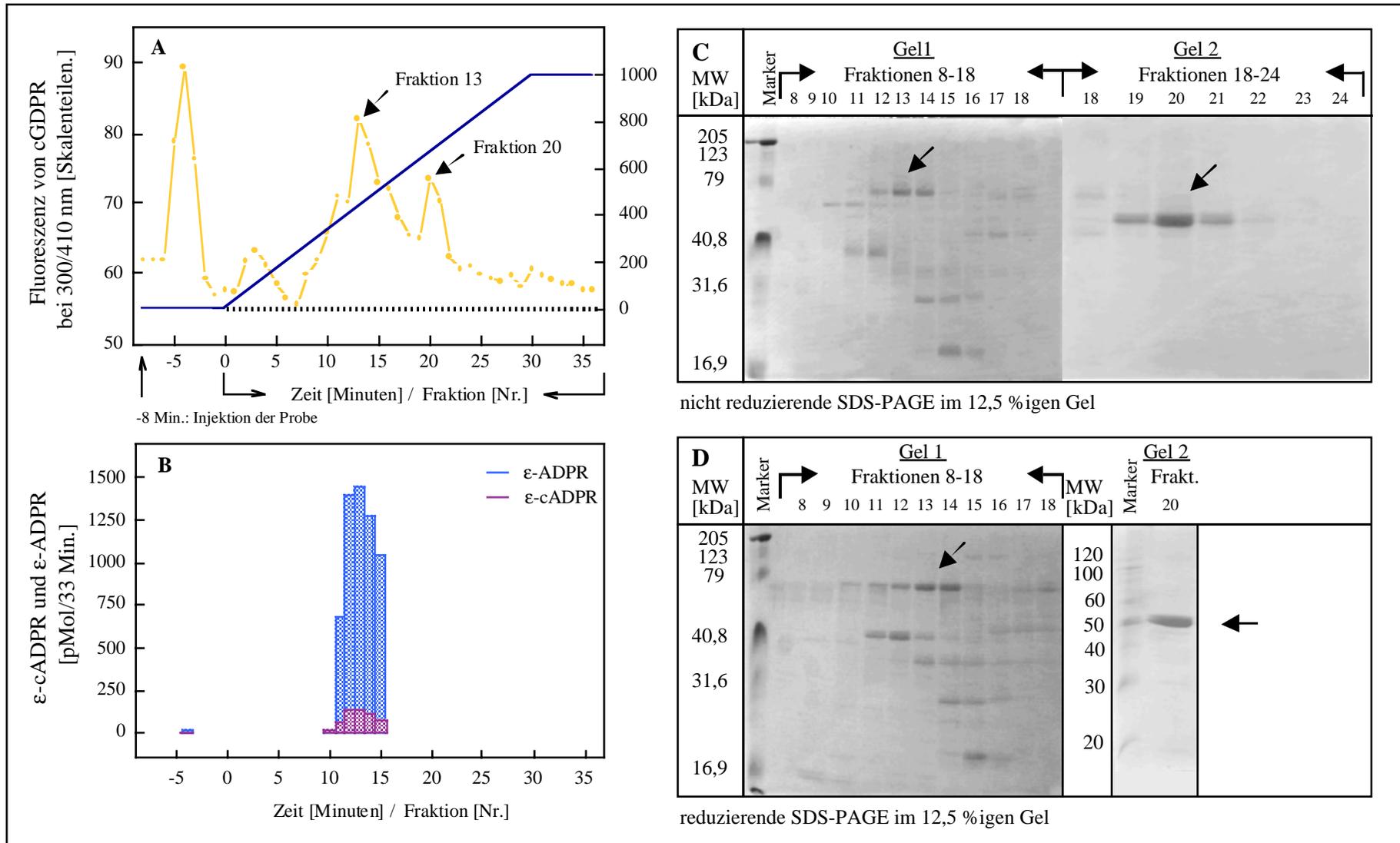


Abb. 4.28: Charakterisierung der Proteinzusammensetzung von in Hinsicht auf cGDP-, ε-cADPR- und ε-ADPR enzymatisch aktiven Fraktionen der chromatographischen Aufreinigung HA-gereinigten cytosolischen Extraktes der Jurkat-Lymphozyten an SP-Sepharose-HP. Legende, siehe folgende Seite.

Abb. 4.28: Charakterisierung der Proteinzusammensetzung von Fraktionen der chromatographischen Aufreinigung HA-gereinigter ADPRC/NADGH der cytosolischen Fraktion der Jurkat-Lymphozyten an SP-Sepharose-HP. Im oberen Teil der Abbildung (A) ist exemplarisch der zeitliche Verlauf der GDPRC-Aktivität während der chromatographischen Aufreinigung HA-gereinigter S100-Fraktion der Jurkat T-Lymphozyten an einer SP-Sepharose-HP HiTrap-Säule (Bettvolumen 1 ml) dargestellt. Dieser wurde durch Vermessung der minütlich gesammelten Fraktionen mit dem Substrat NGD (50 μ M, RT, 1 Stunde) im fluorimetrischen Enzymassay (Photometriemodus, $\lambda_{\text{Ex}}=300\text{nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=410\text{ nm}$, Abschnitt 3.2.7.2) erhalten. Ein Teil der gesammelten Fraktionen wurde zusätzlich unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (50 μ M, RT, 1 Stunde) im RP-HPLC-Enzymassay vermessen (3.2.7.1 und 3.2.8.1) und die während des Assays synthetisierte Stoffmenge der Produkte ϵ -cADPR und ϵ -ADPR quantitativ bestimmt (B). Die chromatographische Auftrennung des mit NP40 (2% v/v) solubilisierten, im Äquilibriumspuffer der Säule (30 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,0) suspendierten Proteins erfolgte unter Verwendung eisgekühlter Puffer entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.19.3 (Methode 1) bei RT in einem Gradienten von 0-1000 mM NaCl. Der Verlauf des Gradienten wurde als dunkelblaue Linie im Aktivitätsprofil (A) eingezeichnet. Im rechten Teil der Abbildung (C, D) ist das Ergebnis von SDS-PAGE-Analysen der Proteinzusammensetzung ausgewählter Fraktionen (Fraktionen 8-24) der SP-Sepharose-Chromatographie unter reduzierenden Bedingungen (C; nach Erhitzen der Proben für 5 Min. bei 95 °C in Gegenwart von 5% v/v β -ME), bzw. unter nicht reduzierenden Bedingungen (D; kein Erhitzen der Proben, Verzicht auf β -ME), in einem 12,5 %igen Trenngel dargestellt. Die Fraktionen wurden jeweils 1:2 mit 2x-Probenpuffer verdünnt für die Elektrophorese eingesetzt. Aufgrund der störenden Gegenwart von Detergenz (2% v/v NP40) in den Fraktionen wurde ihr Proteingehalt nicht bestimmt. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Gel 2 (C) hatte breitere Probentaschen als Gel 1 (D). Als MW-Standard (Marker) wurde der Kaleidoskopmarker der Firma *Bio-Rad* (16,9-205 kDa) oder ein nicht vorgefärbter Marker der Firma *Serva* (20-120 kDa) verwendet.

Um Artefakte der Aktivitätsmessung auszuschließen, wurde die katalytische Aktivität einiger Fraktionen zusätzlich unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD im RP-HPLC-Enzymassay überprüft (Abb. 4.28 B). Dabei konnte in allen durchgemusterten Fraktionen ebenfalls enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, deren Verteilung auf unterschiedliche Fraktionen weitgehend dem unter Verwendung des Substrates NGD erstellten Aktivitätsprofil (Abb. 4.28 A) entsprach. Alle Fraktionen wiesen sowohl ADPRC- als auch NADGH-Aktivität (Ratio ca. 1:10) auf (Abb. 4.28 B). Demzufolge konnten diese beiden Enzymaktivitäten durch den chromatographischen Reinigungsschritt nicht voneinander getrennt werden. In Abweichung zu dem mit dem Substrat NGD erstellten Aktivitätsprofil wies die Durchlaufraktion der SP-Sepharose-Chromatographie nur eine sehr geringe ADPRC- und NADGH-Aktivität auf (Abb. 4.28 B). Dies ist dadurch erklärbar, daß diese Fraktion den Hauptanteil des für die Chromatographie eingesetzten Proteins enthielt. Da NGD selbst kaum fluoresziert, kann die Eigenfluoreszenz von Protein, insbesondere bei hoher Proteinkonzentration, unter den Bedingungen des fluorimetrischen Enzymassays im Photometriemodus enzymatische Aktivität vortäuschen. Im rechten Teil der Abbildung ist das Ergebnis der unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 4.28 C), bzw. unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 4.28 D) durchgeführten SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen 8-24 dargestellt. Ein Vergleich des Bandenmusters der mit Coomassie gefärbten Proteine in reduzierenden *versus* nicht reduzierenden Polyacrylamid-Gelen war als Vorbereitung nachfolgender Experimente notwendig, mittels derer eine Zuordnung von ADPRC-/NADGH-

Aktivität zu distinkten Proteinbanden durch Bestimmung der NADase-Aktivität im Gel beabsichtigt war. Obwohl unter reduzierenden Bedingungen durchgeführte SDS-PAGEs tendenziell schärfer abgegrenzte Banden lieferten (Abb. 4.28 C), wurde in SDS-PAGEs unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb. 4.28 D) insgesamt ein vergleichbares Bandenmuster erhalten. Da dieses Ergebnis die Hoffnung stärkte, daß sich nachweisbare NADase-Aktivität einem oder mehreren monomeren Proteinen anstelle eines aus mehreren Proteinen zusammengesetzten Proteinkomplexes zuordnen lassen könnte, stellte es eine gute Voraussetzung für die geplanten Experimente dar. Ziel dieser Experimente war es, distinkte Banden von Proteinen, denen im Gel NADase-Aktivität (ADPRC- und/oder NADGH-Aktivität) zugeordnet wurde, anschließend durch Sequenzierung zu identifizieren. Da Proteinkomplexe unter reduzierenden SDS-PAGE-Bedingungen, die zur Vorbereitung von Proben zur Sequenzierung notwendig sind, zerstört werden, wäre ihre Charakterisierung, inklusive der Identifikation ihrer Einzelkomponenten, erheblich schwieriger gewesen.

Aufgrund der Tatsache, daß die Verteilung seiner Bandenintensität (Abb. 4.28 C, D) auf unterschiedliche Fraktionen am besten mit der Verteilung der enzymatischen Aktivität im Hauptgipfel des Aktivitätsprofils der chromatographischen Trennung (Abb. 4.28 A, B) korrelierte, wurde als bester Kandidat einer cytosolischen ADPRC/NADGH ein Protein mit einem MW von ca. 70 kDa identifiziert (in den Gelen durch einen Pfeil markiert), das am stärksten in den Fraktionen 13 und 14 vertreten war. Dieses Protein wurde daher im Folgenden näher charakterisiert. Das Verteilungsmuster aller anderen durch Coomassie angefärbten Proteine stimmte mit der katalytischen Aktivität in diesem Bereich des Aktivitätsprofils erheblich schlechter überein (Abb. 4.28 C, D). Insbesondere im Größenbereich des Ektoenzym CD38 (MW 42-46 kDa; [Jackson & Bell 1990]) war in den Gelspuren der Fraktionen, die im Enzymassay den größten Anteil der ADPRC-/GDPRC- und NADGH-Aktivität enthielten (Abb. 4.28 A, B), durch Coomassie-Färbung der Gele kein Protein nachweisbar. Der Verteilung der katalytischen Aktivität im zweiten Gipfel des Aktivitätsprofils (Abb. 4.28 A) der an die SP-Sepharose-Matrix bindenden Form der ADPRC/NADGH der cytosolischen Fraktion folgte aufgrund seines Verteilungsmusters in den Gelen (Abb. 4.28 C, D) am besten ein Protein mit einem MW von ca. 50 kDa. Dieses Protein war in Fraktion 20 am intensivsten nachweisbar. Auch dieses Protein, das in seiner Größe dem Ektoenzym CD38 recht nahe kam, wurde in nachfolgenden Experimenten weiter untersucht.

4.4.3.3 Versuch einer Identifizierung der an die SP-Sepharose-Matrix bindenden Form der ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion durch den Nachweis der katalytischen Aktivität im Gel

Zum Nachweis von ADPRC-/NADGH-Aktivität im Gel wurde ein von *Zhang et al.* [1995] publizierter Assay in leicht abgewandelter Form eingesetzt. Um die Eignung und Sensitivität des Assays unter den hier gewählten Versuchsbedingungen zu überprüfen, wurde er zunächst mit der ADPRC aus *A. californica* und der rekombinanten, löslichen Form (hCD38rec) von humanem CD38 als Standardproteinen durchgeführt. Die nach Auftrennung dieser Proteine in einer unter milden Bedingungen (siehe Legende) durchgeführten SDS-PAGE erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 4.29 (A) gezeigt. Hier wurde die nach einer Inkubation mit dem Substrat ϵ -NAD in horizontalen Gelstreifen der Spuren des Gels, in denen die Enzyme aufgetragen worden waren, fluorimetrisch gemessene Fluoreszenz neben einer intakten Spur desselben Gels dargestellt, in der MW-Standards elektrophoretisch aufgetrennt worden waren. Sowohl für die ADPRC aus *A. californica* als auch für hCD38rec konnte nach Durchführung der SDS-PAGE und im Anschluß an eine Inkubation der Gelstreifen zum Zweck einer Renaturierung darin enthaltenen Proteins im fluorimetrischen Enzymassay zweifelsfrei NADase-Aktivität nachgewiesen werden. Weiterhin ließ sich die katalytische Aktivität jeweils korrekt dem für die Proteine publizierten MW von 29 kDa (ADPRC aus *A. californica*; [Hellmich & Strumwasser 1991]), bzw. 42-46 kDa (CD38; [Jackson & Bell, 1990, Howard et al. 1993]) zuordnen. Allerdings teilte sich die NADase-Aktivität des hCD38rec aufgrund einer ungünstigen Zertrennung des Gels auf zwei Gelstreifen auf. Da 1 μ g dieses Proteins durch Gel-Färbung mit Coomassie jedoch nicht nachweisbar ist und die Aufteilung des Gels daher „zufällig“ und nicht anhand einer gefärbten Kontrollspur erfolgte, war dies allerdings in Kauf zu nehmen. Im rechten Teil der Abbildung (4.29 B) sind zeitliche Verläufe der direkten Vermessung beider Proteine im kontinuierlichen fluorimetrischen Enzymassay mit dem Substrat ϵ -NAD (oben) sowie, anhand von Chromatogrammen (darunter), Ergebnisse der Analysen eines Aliquots (100 μ l) dieser Assayansätze durch RP-HPLC dargestellt. Wurden HPLC-Ergebnisse dieser Assays quantitativ mit solchen verglichen, die mit den zuvor einer SDS-PAGE-Analyse unterzogenen Proteinen erhoben wurden, war trotz der qualitativen Eignung des Assays zum Nachweis von NADase-Aktivität im Gel eine starke Inhibition (50-60%) insbesondere von hCD38rec unter den Assay-Bedingungen im Gel feststellbar. Bei Durchmusterung verschiedener Assaybedingungen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die ADPRC- und NADGH-Aktivität von hCD38rec, erwies sich erwartungsgemäß insbesondere der alkalische pH des Trenngels (pH 8,8) als problematisch.

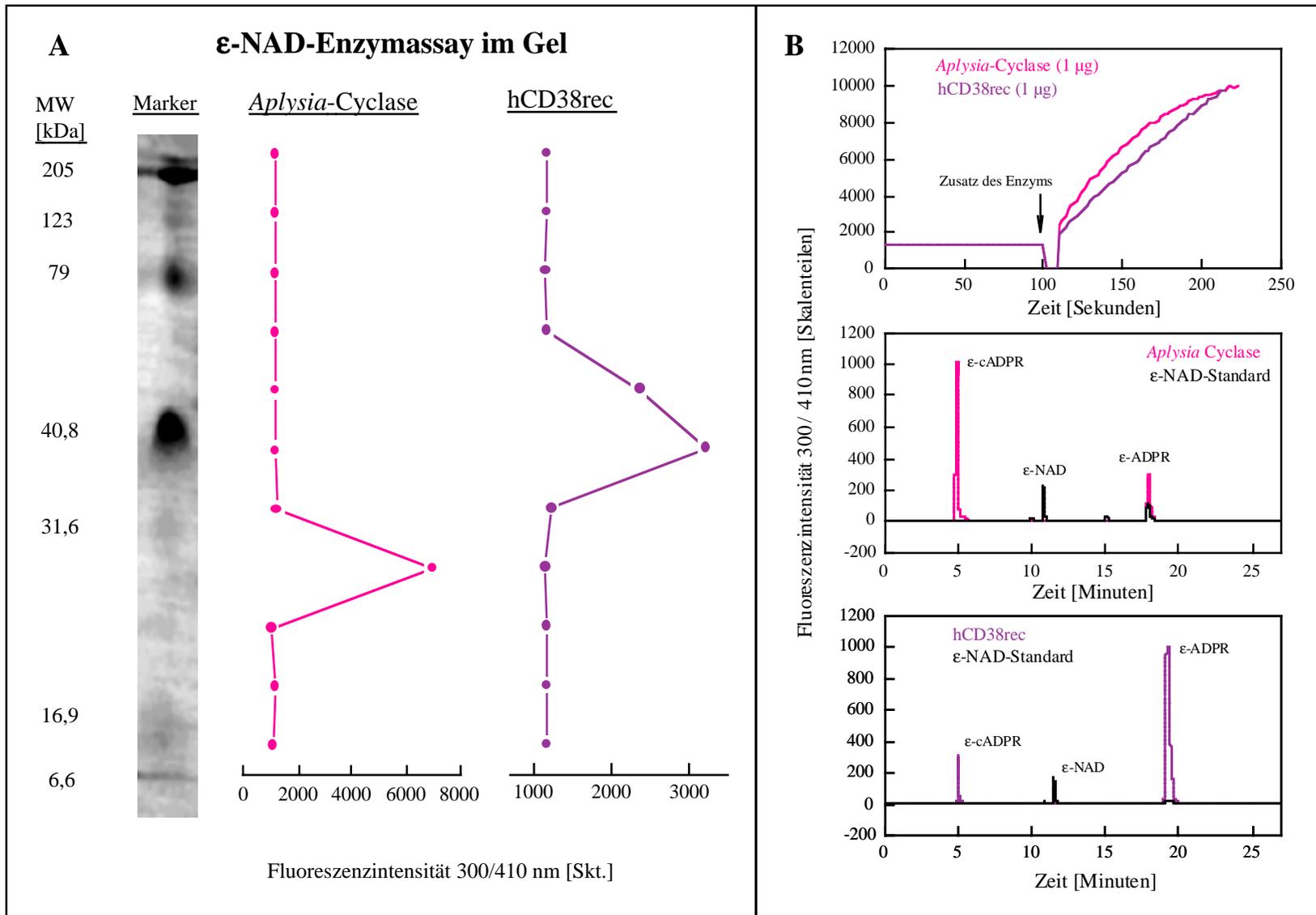


Abb. 4.29: ϵ -NAD-Enzymassay im Gel unter Verwendung der ADPRC aus *A. californica* und einer löslichen Form von humanem, rekombinatem CD38 (hCD38 rec) als Standard-Proteinen mit ADPRC-/NADGH-Aktivität. Abbildungslegende, siehe folgende Seite

Legende zu Abbildung 4.29

Fluorimetrische Enzymassays im Gel unter Verwendung der ADPRC aus *A. californica* (1 μg Protein) und einer rekombinanten löslichen Form von humanem CD38 (hCD38rec, 1 μg Protein) wurden entsprechend der Beschreibung im Text und im Kapitel Material & Methoden (Abschnitt 3.2.14) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine (Probenvolumen jeweils 50 μl) durch SDS-PAGE erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen (kein Erhitzen der Proben und Verzicht auf β -ME) in einem 12,5 %igen Trenngel. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Spuren des Gels, in denen die Proteine aufgetragen worden waren, horizontal in gleich breite Streifen zerlegt. Nach einer Inkubation der Gelstreifen zur Renaturierung des Proteins wurde ihre ADPRC-/NADGH-Aktivität qualitativ durch fluorimetrische Vermessung mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μM , 60 Min., RT) nachgewiesen. Die Vermessung der Proben erfolgte im Photometriemodus ($\lambda_{\text{Ex}}=300\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=410\text{ nm}$) entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.2. Im linken Teil der Abbildung (A) ist das Ergebnis ihrer Enzymassays im Gel gezeigt. Dort wurde die als Maß der katalytischen Aktivität in den entsprechend ihrer Anordnung im intakten Gel sortierten Gelstreifen (die Mittelpunkte der Streifen sind als Punkte dargestellt) gemessene Fluoreszenz parallel zu einer Gelspur aufgetragen, in der ein Gemisch vorgefärbter MW-Standards (Marker; Kaleidoskopmarker der Firma *Bio-Rad*) elektrophoretisch aufgetrennt worden war. Im rechten Teil der Abbildung (B) sind zeitlichen Verläufe des anhand der Fluoreszenzentwicklung gemessenen Substratumsatzes (ϵ -NAD, 100 μM) durch die ADPRC aus *A. californica* und hCD38rec (jeweils 1 μg Protein, vermessen in einem Assayvolumen von 1 ml intrazellulärem Puffer pH 7,2) im kontinuierlichen, fluorimetrischen Enzymassay (3.2.7.1) dargestellt (oben). Zusätzlich ist das Ergebnis der Analyse der während des enzymatischen Umsatzes synthetisierten Produkte (ϵ -cADPR und ϵ -ADPR) anhand von RP-HPLC-Chromatogrammen gezeigt (mittig und unten), die nach Abtrennung des Proteins durch Ultrafiltration durch Vermessung von Aliquots (100 μl) der fluorimetrischen Assayansätze an der HPLC erhalten wurden (3.2.8.1).

Zusätzlich stellte sich eine vorausgegangene Inkubation mit Substrat (NGD) und dessen Gegenwart während des Assays als ungünstig heraus. Da aufgrund des Ausmaßes der Inhibition der katalytischen Aktivität von hCD38rec insgesamt von einer starken Einschränkung der Sensitivität des Assays im Gel auszugehen war, diese aber bei einer Analyse der in weniger reiner Form verfügbaren ADPRCs/NADGHs der Jurkat-Lymphozyten als kritischer Faktor einzuschätzen war, wurde zur Vermessung dieser Präparationen eine Variante des Assays entwickelt, in der ein höher prozentiges Trenngel (15 %ig) von pH 7,45 verwendet wurde. Zusätzlich wurde zur Durchführung der Assays Protein eingesetzt, das zuvor nicht mit Substrat (NGD oder ϵ -NAD) in Berührung gekommen war. Leider konnte mit dieser modifizierten Assay-Methode jedoch keine Verbesserung der Versuchsergebnisse mit der durch HA- und SP-Sepharose-Chromatographie gereinigten ADPRC/NADGH der S100-Fraktion der Lymphozyten erreicht werden. Obwohl sich dem in Fraktion 13 enthaltenen Protein von ca. 70 kDa MW (Abb. 4.28) wiederholt geringfügig NADase-Aktivität zuordnen ließ, war die Ausbeute an katalytischer Aktivität, die verglichen mit der der Standard-Enzyme (hCD38rec und die *Aplysia*-ADPRC) ohnehin sehr niedrig war, extrem gering. Daher erschienen die erhobenen Daten in Bezug auf ihre Spezifität nicht hinreichend überzeugend. In Fraktion 20 (Abb. 4.28) konnte mit dem hier beschriebenen Assay keinerlei enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

4.4.34 Untersuchung von durch HA- und SP-Sepharose-Chromatographie gereinigten Präparationen der ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion im Western Blot zum Nachweis von CD38 und Identifizierung von Proteinen durch MS/MS-Sequenzierung

Als nächstes wurden die durch HA- und SP-Sepharose-Chromatographie gereinigten ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion in Western Blots untersucht, in denen zum spezifischen Nachweis von Protein anti-CD38 mAKs verwendet wurden. Für die Western Blot-Analysen wurden die Durchlauffraktion, Fraktion 13 und Fraktion 20 der chromatographischen Auftrennung von S100-Protein an SP-Sepharose-HP (Abb. 4.28) eingesetzt. Diese Fraktionen waren, gemessen an der katalytischen Aktivität, jeweils am stärksten für die nicht an die Matrix bindende Form (Durchlauf), bzw. für die an die Matrix bindende Form der ADPRCs/NADGHs der cytosolischen Fraktion der Lymphozyten angereichert (Fraktion 13 und Fraktion 20). Dabei repräsentierte Fraktion 13 den ersten (Hauptgipfel) und Fraktion 20 den zweiten (Nebengipfel) des in Abb. 4.28 (A, B) dargestellten Aktivitätsprofils. Als Positivkontrollen für die Detektion von CD38 wurden die S100-Rohfraktion und die HA-gereinigte S100-Fraktion sowie die Membranfraktionen P10 und P100 verwendet.

Während sowohl unter Einsatz des AT1 anti-CD38 mAKs (Abb. 4.30 A) als auch unter Einsatz des IB4 anti-CD38 mAKs (Abb. 4.30 B) in den Fraktionen P10 und P100 sowie, in geringerem Maße, auch in der S100-Rohfraktion, der HA-gereinigten S100-Fraktion und der Durchlauffraktion der SP-Sepharose-Chromatographie Banden detektiert wurden, die das für das Ektoenzym CD38 charakteristische MW (42-46 kDa) aufwiesen, konnte in den Fraktionen, die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Formen der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion enthielten, kein Protein dieser Größe nachgewiesen werden (A, B). Damit wurde die klassische Form von CD38 in letzteren Fraktionen zumindest deutlich abgereichert. Während in Fraktion 13, die dem Hauptgipfel des Aktivitätsprofil entsprach (Abb. 4.28 A) von beiden anti-CD38 mAKs gar kein Protein detektiert wurde (Abb. 4.30 A, B), wurde in Fraktion 20, die die Schulter des Aktivitätsprofils repräsentierte (Abb. 4.28 A), ein etwas größeres Protein mit einem MW von ca. 50 kDa nachgewiesen (Abb. 4.30 A, B). Dieses Protein entsprach in seinem MW genau dem Hauptprotein, das in dieser Fraktion auch durch Coomassie-Färbung nachweisbar war (Abb. 4.28 B, C). Während bei diesem Protein aufgrund seines MW die Möglichkeit bestand, daß es sich um eine CD38-Variante handeln könnte, veranlaßte das mit Fraktion 13 erhaltene Ergebnis zu der Annahme, daß es in der S100-Fraktion zusätzlich mindestens eine weitere, dem Aktivitätsprofil zufolge sogar die Haupt-

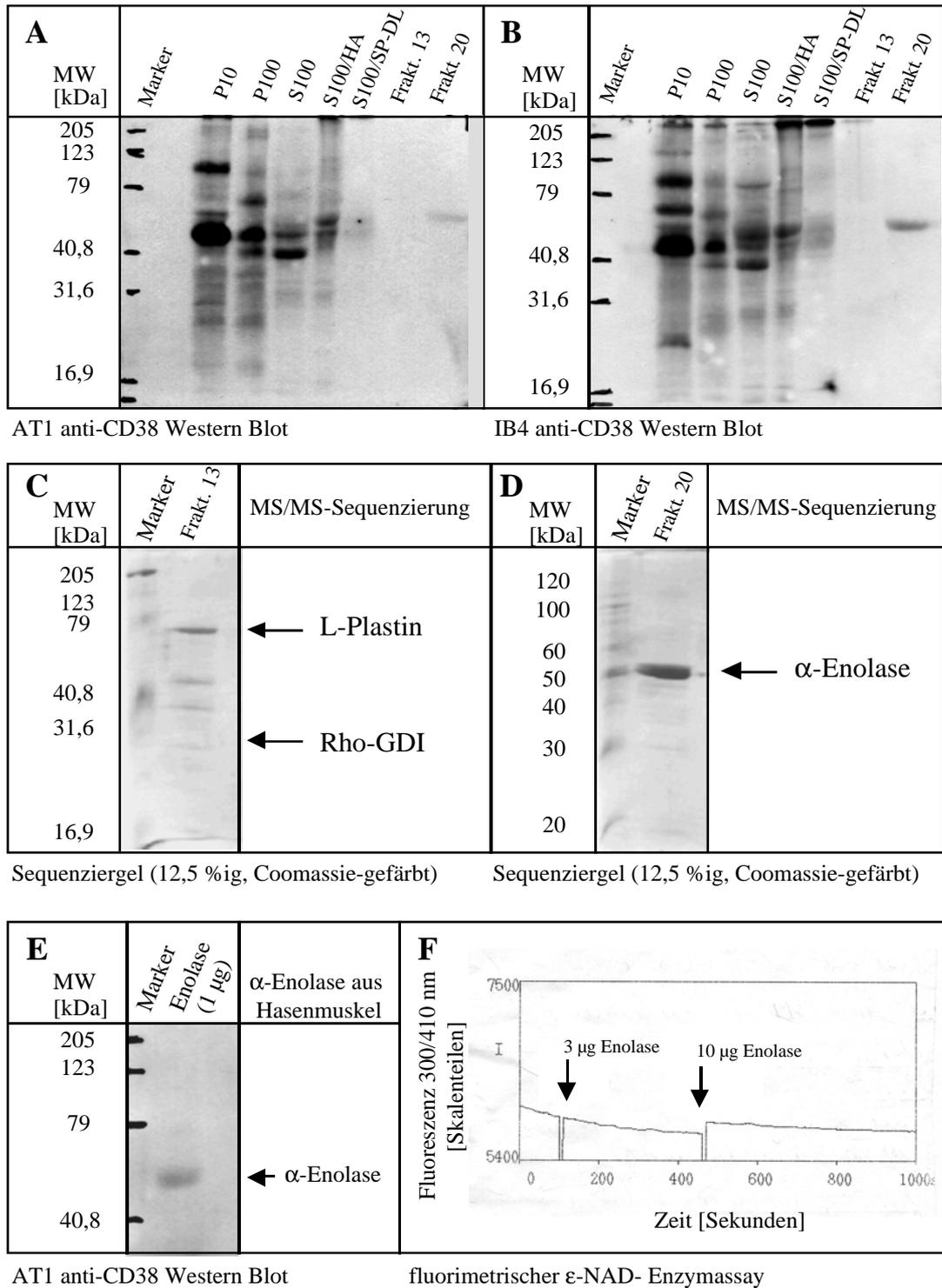


Abb. 4.30: Analyse der SP-Sepharose-gereinigten ADPRCs/NADGHs der cytosolischen Fraktion der Jurkat T-Lymphozyten im anti-CD38 Western Blot und Identifizierung von Proteinen durch MS/MS-Sequenzierung. Western Blot-Analysen zum Nachweis von CD38 (A, B, E) wurden entsprechend der Beschreibung im Kapitel Material & Methoden (Abschnitt 3.2.15) durchgeführt. Zur spezifischen Detektion von CD38 wurden die anti-CD38 mAKs AT1 und IB4, wie jeweils angegeben, in einer Endkonzentration von 1 µg/ml verwendet. Für die Entwicklung der Blots wurde das ECL-System der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* genutzt. Dabei wurde ein Peroxidase-gekoppelter, für humane Serumproteine präabsorbierter Zweitantikörper (*Santa Cruz Biotechnology*) in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt. Die für die Experimente eingesetzten Mengen an Protein lagen bei 50 µg (Membranfraktionen P10 und P100), 75 µg (S100 und HA-gereinigtes S100) und bei 3 µg (α-Enolase aus Hasenmuskel). Der Proteingehalt SP-Sepharose-gereinigter

Enzympräparationen wurde aufgrund der Gegenwart von NP40 (2% v/v) nicht bestimmt. Diese Fraktionen wurden jeweils in einer 1:2-Verdünnung mit Probenpuffer für die Elektrophorese eingesetzt. Alle SDS-PAGE-Analysen wurden in Gelen mit 12,5 %igem Trenngel durchgeführt. Das aufgetragene Volumen aller Proben lag bei 50 µl. Als MW-Standard (Marker) wurde der Kaleidoskopmarker der Firma *Bio-Rad* (16,9-250 kDa) oder ein nicht vorgefärbter Marker der Firma *Serva* (20-120 kDa) verwendet. In C) und D) sind Coomassie-gefärbte Gele mit darin enthaltenen, für eine Sequenzierung durch MS/MS bestimmten Proteinen vor dem Ausschneiden von Banden (markiert durch Pfeile) dargestellt. Die NP40 (2% v/v) enthaltenden Proben wurden 1:2 mit 2x-Probenpuffer verdünnt auf die Gele aufgetragen. Die markierten Proteine wurden durch MS/MS-Sequenzierung entsprechend den Angaben in der Abbildung identifiziert. In E) wurde käuflich erworbene, aus Hasenmuskel isolierte α -Enolase, gelöst in intrazellulärem Puffer (pH 7,2; Assayvolumen 1 ml), unter Nutzung des Substrates ϵ -NAD (100 µM) fluorimetrisch im kontinuierlichen Enzymassay vermessen (3.2.7.1). Dabei wurde das Substrat in der Messküvette vorgelegt und die enzymatische Reaktion durch Zusatz des Enzyms gestartet. Dargestellt ist der als Maß für die katalytische Aktivität aufgezeichnete, zeitliche Verlauf der Fluoreszenzentwicklung während der gesamten Messung ($\lambda_{\text{Ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm). HA = Hydroxylapatit, DL = Durchlaufaktion, SP = SP-Sepharose, geb. = Matrix-gebunden, Rho-GDI = Rho-GTP Dissoziationsinhibitor. Mit Fraktion 13 und Fraktion 20 sind Enzympräparationen/Fraktionen der SP-Sepharose-Chromatographie von HA-gereinigtem S100-Protein gemeint, die Fraktion 13, bzw. Fraktion 20, des in Abb. 4.28 (A) dargestellten zeitlichen Verlaufs der GDPRC-Aktivität während der SP-Sepharose-Chromatographie entsprachen.

form darstellende, an SP-Sepharose bindende, lösliche Variante der ADPRC/NADGH gibt, die sich vielleicht auf Proteinebene, zumindest aber immunologisch von CD38 unterscheidet. Für diese ADPRC/NADGH stellte das in Fraktion 13 in angereicherter Form enthaltene Protein von ca. 70 kDa (Abb. 4.28 C, D) aufgrund der zuvor geschilderten Daten (Abb. 4.28) zunächst den Hauptkandidaten dar. Um sowohl die Identität dieses Proteins und (zur Sicherheit) des ebenfalls in Fraktion 13 enthaltenen Proteins von ca. 30 kDa (Abb. 4.28 C, D) als auch die Identität des in Fraktion 20 detektierten Proteins von ca. 50 kDa (Abb. 30 A, B) aufzuklären, wurde eine Sequenzierung der Proteine durch Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS) durchgeführt. Bei den beiden erstgenannten Proteinen war eine Sequenzierung durch MS/MS notwendig, da sie, wie viele cytosolische Proteine, einen blockierten N-Terminus aufwiesen. Dieser verhinderte eine erfolgreiche Identifizierung der Proteine durch N-terminale Sequenzierung. Proteinsequenzierungen durch MS/MS wurden im Anschluß an einen tryptischen Verdau der Proteine im Gel von *Dr. F. Buck* (Institut für Zellbiochemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf/Hamburg) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Sequenzierung, wurden für die Proteine angereicherte Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und interessierende Banden aus Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten. Für die Sequenzierung verwendete Gele der drei genannten Proteine, jeweils vor dem Ausschneiden der Banden, sind, inklusive der nach Einschätzung von *Dr. F. Buck* eindeutigen Ergebnisse ihrer Sequenzierung, in Abb. 4.30 (C, Proteine von ca. 30 und ca. 70 kDa MW, bzw. D, Protein von ca. 50 kDa MW) dargestellt. Hinweise auf eine (zusätzliche) Präsenz von CD38 wurden trotz gezielter Suche in keiner der Proben vorgefunden.

<u>Protein / Aminosäuresequenz</u>	<u>Charakteristika</u>
<p>L-Plastin aus <i>Homo sapiens</i></p> <p>1 MARGSVSDDEE MMELREAFK VDTDNGYIS FNELNDFKA ACLPLPGYR REITENLMAT 61 GDLDQDGRIS FDEFIKIFHG LKSTDVAKTF RKAINKKEGI CAIGGTSEQS SVGTQHSYSE 121 EEKYAFVNWV NKALENDPDC RHVIPMNPNT NDLFNAVGDG IVLCKMINLS VPDITIDER TI 181 NKKKLTPTFTI QENLNALNS ASAIGCHVVN IGAEDLKEGK PYLVGLLWQ VIKIGLFADI 241 ELSRNEALIA LLREGESLED LMKLSPEELL LRWANYHLEN AGCNKIGNFS TDIKDSKAYY 301 HLLQVAPKG DEEGVPAVVI DMSGLREKDD IQR AECMLQQ AERLGCR QFV TATDVVRGNP 361 KLNLAFIANL FNRYPALHQP ENQDIDWGAL EGRETREETF RNWMSLGVN PRVNHLYSDL 421 SDALVIFQLY EKIKVPVDWN RVNKPYPKL GGNMKKLENC NYAVELGKNQ AKFSLVGIGG 481 QDLNEGRTLL TLALIWQLMR RYTLNILEEI GGGQKVNDI IVNWNVETLR EAEKSSSISS 541 FKDPKISTSL P VLDLIDAIQ PGSINYDLLK TENLNDDDEKL NNAKYAISMA RKIGAR VYAL 601 PEDI VEVNPK MVMTVFACLM GKGMKRV</p> <p>AS [Nr.] 0 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650</p>	<p>627 Aminosäuren MW [kDa]: 70,289 (theoretisch) PI: 5,20 (theoretisch) Zugriffsnummer: A35836 Phosphoprotein; potentielles Substrat von PKA, PKC und Caseinkinase II S5: Phosphorylierungsstelle ? S7: Phosphorylierungsstelle ? AS 9-41: EF1-Domäne AS 20-51 Homologie zum NAD(P)-Bindungsmotiv (Rossmann-Faltung) AS 49-81: EF2-Domäne AS 97-100: CAM-Domäne AS 119-370: Homologie zu α-Aktinin AS 146-173 schwache Homologie Zum Signaturmotiv von ADPRCs AS 193-232: ACT1-Domäne AS 393-619: Homologie zu α-Aktinin AS 460-500: ACT2-Domäne</p>
<p>Rho-GDP Dissoziationsinhibitor (Rho-GDI) aus <i>Homo sapiens</i></p> <p>1 MTEKAPEPHV EEDDDDELDS KLNYPKPPQK SLK ELOEMDK DDESLIKYK TLLGDGPVVT 61 DPKAPNVVVT RLTLVCEAP GPITMDLTGD LEALKKETIV LKEGSEYRVK IHFKVNRDIV 121 SGLKYVQHTY RTGVKVDKAT FMVGSYGRPR EEEYFLTPVE EAPKGM LARG TYHNKSFFTD 181 DDKODHLSWE WNLSIKKEWT E</p>	<p>201 Aminosäuren MW [kDa]: 22,988 (theoretisch) PI: 5,10 (theoretisch) Zugriffsnummer: A47742 Phosphoprotein; potentielles Substrat von Caseinkinase-II</p>
<p>Enolase-1 (α-Enolase) aus <i>Homo sapiens</i></p> <p>1 MSILKIHARE IFDSRGNPTV EVDLFTSKGL FR AAVPSGAS TGIYEALER DNDKTR YMGK 61 GVSKAVEHIN KTIAPALVSK KLVNTEQEK DKLMIEMDGT ENKSKFGANA ILGVSLAVCK 121 AGAVEKGVPL YRHADLAGN SEVILPVPF NVINGGSHAG NK LAMQEFMI LPVGAANFRE 181 AMRIGAEVYH NLKNVIK EY GKDATNVGDE GGFAPNILEN KEGLELLKTA IGK AGYTDKV 241 VIGMDVAASE FFRSGKYDLD FKSPDDPSRY ISPDQLADLY KSFIDYPPV SIEDPFDQDD 301 WGAWQKFTAS AGIQVVGDDL TVTNPRIAK AVNEKSCNCL LLK VNOIGSV TESLOACKLA 361 QANGWGVMS HRSGETEDTF IADLVVGLCT GQIKTGAPCR SERLAKYNQL LRIEELGSK 421 AKFAGRNFNRN PLAK</p>	<p>434 Aminosäuren MW [kDa]: 47,139 (theoretisch) PI: 6,99 (theoretisch) Zugriffsnummer: A 29170</p>

Abb. 4.31: Ergebnisse der MS/MS-Sequenzierung von Proteinen aus durch HA- und SP-Sepharose-Chromatographie für an die SP-Sepharose-Matrix bindende, lösliche ADPRCs/NADGHs der S100-Fraktion der Lymphozyten angereicherten Proben. Ergänzend zu Abb. 4.30 (C, D) sind in dieser Abbildung die detaillierten Ergebnisse der Sequenzierung der durch MS/MS identifizierten Proteine dargestellt. Die Sequenzierung wurde von Dr. F. Buck (Institut für Zellbiochemie, UKE/Hamburg) durchgeführt. Tryptische Peptide dieser Proteine, die anhand ihrer Masse und enthaltener Sequenzen während der Sequenzierung gefunden und zugeordnet wurden, sind unterstrichen und gelb unterlegt. Aufgelistete Charakteristika der Proteine wurden der Datenbank (Medline/Protein) und den unten zitierten Publikationen entnommen. Zur Struktur von L-Plastin, dem am interessantesten erscheinenden Protein (siehe Text), wurde unter Einbezug der Publikationen von Zu *et al.* [1990b], Shinomiya *et al.* [1995], Bellamacina [Review 1996] und Grimaldi *et al.* [1995] eine schematische Darstellung erstellt, in der die bekannten Domänen des Proteins und weitere Homologie-Domänen (Hom) eingezeichnet sind. EF = Calmodulin-Repeat-Homologiedomäne; CAM = putative Bindungsstelle für Calmodulin; ACT = putative Bindungsstelle für Aktin; S5 und S7 = potentielle Serinphosphorylierungsstellen für PKA, PKC und/oder Caseinkinase II (S5) oder Caseinkinase II (S7)

In detaillierterer Form sind die Ergebnisse der MS/MS-Sequenzierung tryptischer Peptide der Proteine inklusive einer schematischen Darstellung von L-Plastin, dem interessantesten der drei Proteine, in Abb. 4.31 (vorherige Seite) dargestellt. Während es sich bei L-Plastin um ein Leukozyten-spezifisches und potentiell interessantes Protein handelte (s.u.), wurden mit Rho-GDI und α -Enolase ubiquitär in Zellen exprimierte Proteine identifiziert. Von letzteren war mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß es sich nicht um Proteine mit ADPRC-/NADGH-Aktivität handelt. Um diesen Aspekt zumindest für die α -Enolase zu überprüfen und gegebenenfalls eine Kreuzreaktion dieses Proteins mit anti-CD38-mAKs nachzuweisen, wurde käuflich erworbene, aus Hasenmuskel isolierte α -Enolase sowohl im anti-CD38 Western Blot (Abb. 4.30 E) analysiert als auch fluorimetrisch im kontinuierlichen Enzymassay auf ADPRC- und NADGH-Aktivität untersucht (Abb. 4.30 F). Während bei der Vermessung des Enzyms unter Nutzung der Substrate ϵ -NAD und NGD (100 μ M, nicht gezeigt) keinerlei ADPRC-/GDPRC- und NADGH-Aktivität feststellbar war, konnte eine Kreuzreaktion von α -Enolase mit den für die Western Blot-Analysen (Abb. 4.30 A, C) eingesetzten anti-CD38 mAKs bestätigt werden (Abb. 4.30 E, gezeigt für den AT1 anti-CD38 mAK). Das Fehlen von ADPRC- und NADGH-Aktivität wurde zusätzlich durch RP-HPLC-Analyse von Aliquots (100 μ l) der fluorimetrischen Assayansätze bestätigt (nicht dargestellt). Von den beiden verbliebenen Kandidaten für die cytosolische ADPRC/NADGH war L-Plastin aufgrund seiner weiter oben dargestellten Eigenschaften das interessantere Protein (Abb. 4.28 sowie Abb. 4.30 und Abb. 4.31). Verschiedene Publikationen legten zudem nahe, daß es sich bei L-Plastin um ein spezifisch in die Signaltransduktion von T-Lymphozyten, bzw. Leukozyten, involviertes Protein handelt [Henning *et al.* 1994, Rosales *et al.* 1994].

L-Plastin ist ein speziell in hämatopoetischen Zellen (Leukozyten) exprimiertes, cytosolisches Protein [Goldstein *et al.* 1985, Lin *et al.* 1988], das in diesen Zellen in starker Abundanz vertreten ist [Lin *et al.* 1988]. Nach onkogener Transformation wird es auch in Fibroblasten und anderen Zellen solider Tumoren exprimiert [Lin *et al.* 1993]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ist der N-Terminus von L-Plastin blockiert [Matsushima *et al.* 1988, Zu *et al.* 1990a, Shinomiya *et al.* 1995]. Aufgrund seiner Struktur ist L-Plastin ein Aktin-bindendes Protein, das starke Sequenzhomologie zu anderen Proteinen (T-Plastin und I-Plastin sowie zu Fimbrin) aufweist [de Arruda *et al.* 1990, Arpin *et al.* 1995], bei denen es sich um Aktin-bündelnde Proteine mit einem von L-Plastin verschiedenem Expressionsmuster handelt. Wie diese Proteine besitzt L-Plastin in seinem C-terminalen Hauptanteil (Core) in Tandemanordnung zwei putative Aktin-Bindungsdomänen, die Homologie zu α -Aktinin zeigen [de Arruda *et al.* 1990, Zu *et al.* 1990b]. In seinem N-

terminalen Kopfstück besitzt L-Plastin jedoch zusätzlich zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen vom Helix-Loop-Helix-Typ (EF-Hand-Typ), eine putative Bindungsstelle für Calmodulin (CAM) und zwei potentielle Serinphosphorylierungsstellen (S-5 und S-7) [Zu *et al.* 1990b, Shinomiya *et al.* 1995]. Letztere weisen Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch PKA, PKC oder Caseinkinase II (CKII, S-5), bzw. CKII (S-7) auf [Shinomiya *et al.* 1995]. *In vivo* ist noch ungeklärt, welche der Phosphorylierungsstellen genutzt wird und welche Kinasen eine Phosphorylierung von L-Plastin bewirken. Bereits erhobene Daten deuten aber darauf hin, daß die im Detail noch ungeklärten physiologischen Funktionen von L-Plastin, beispielsweise in der Strukturierung des Cytoskeletts in Abhängigkeit von einer Stimulation, sowohl durch Ca^{2+} und CAM als auch durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden können. Damit besitzt L-Plastin charakteristische Eigenschaften eines in die intrazelluläre Signaltransduktion involvierten Proteins. Zusätzlich zu den beschriebenen Struktureigenschaften zeigt L-Plastin in seinem Kopfbereich auch schwache Homologie zum Signaturmotiv von CD38 und anderen ADPRCs/NADGHs [Grimaldi *et al.* 1995] sowie eine stärker ausgeprägte Homologie zum NAD(P)-Bindungsmotiv (der „Fingerprint-Region“ der Rossmannfaltung [Übersichtsartikel: Bellamacina 1996]).

4.4.3.5 Untersuchung und Charakterisierung der ADPRCs/NADGHs der Membranfraktion P100 der Jurkat T-Lymphozyten

Zusätzlich wurde in weiteren Experimenten versucht, die lösliche, an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion der Lymphozyten näher zu charakterisieren. Diese wies eine erheblich höhere spezifische Aktivität als die chromatographisch angereicherte, lösliche ADPRC/NADGH der S100-Fraktion auf. Wie zuvor schon erwähnt, wurde hypothetisch angenommen, daß es sich bei diesem Enzym um das gleiche Protein wie in der S100-Fraktion und damit eventuell um L-Plastin handeln könnte, dann allerdings in aktivierter (beispielsweise phosphorylierter) und dadurch an die Membran translozierter Form. Um diese ADPRC/NADGH der P100-Fraktion anzureichern, wurde in Natriumphosphatpuffer (30 mM) gelöstes und mit NP40 (2% v/v) solubilisiertes P100-Protein, wie zuvor HA-gereinigtes S100-Protein, zunächst an SP-Sepharose-HP chromatographiert und Aliquots der gesammelten Fraktionen auf ADPRC-/GDPRC- und NADGH-Aktivität durchgemustert. Anschließend wurden die Durchlauf- sowie Fraktionen, die die an die SP-Sepharose-Matrix bindende ADPRC/NADGH enthielten, unter reduzierenden und unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE untersucht. Ein charakteristisches Ergebnis dieser Experimente ist in Abb. 4.32 dargestellt.

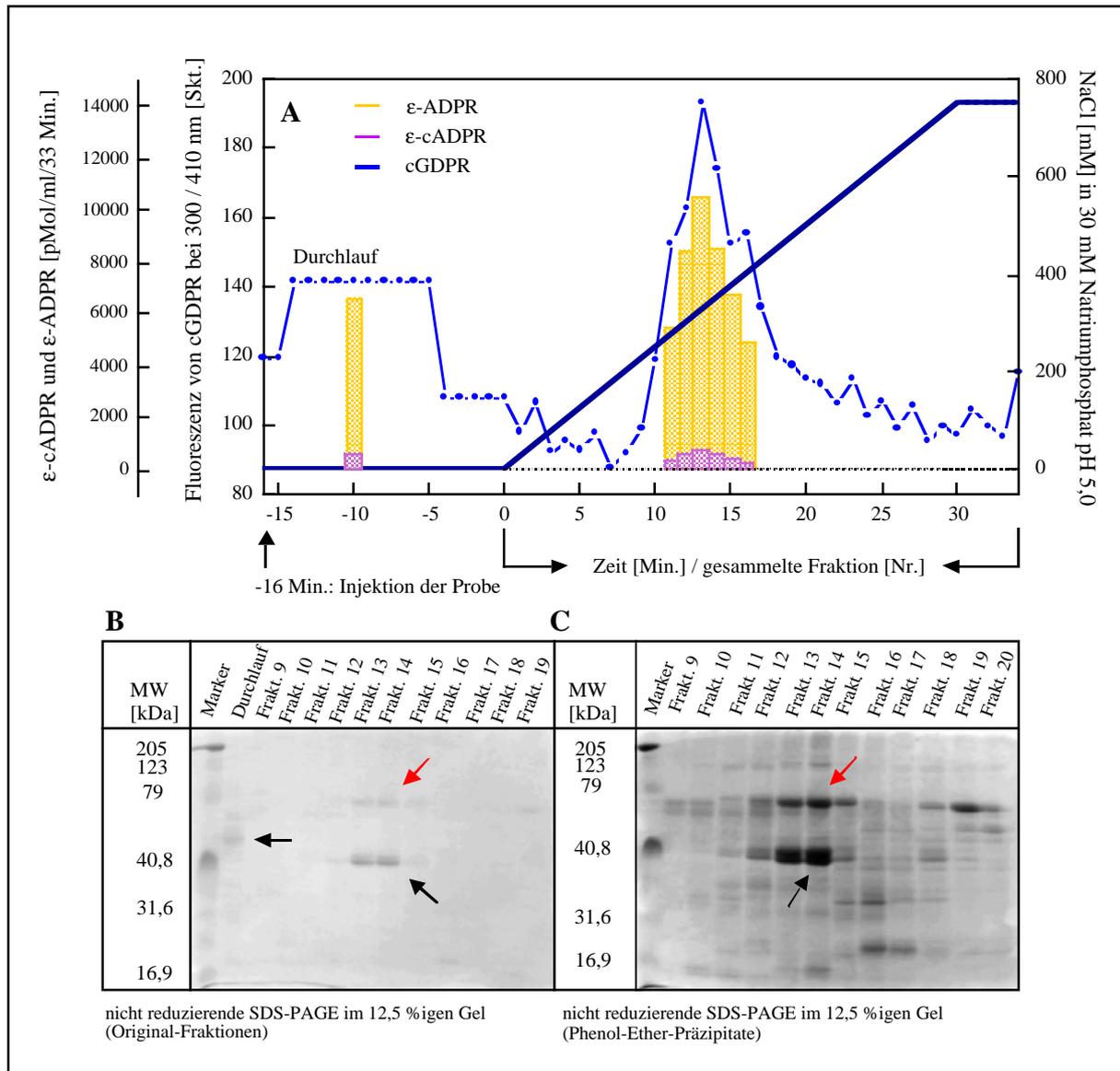


Abb. 4.32: Charakterisierung der Proteinzusammensetzung von Fraktionen der chromatographischen Aufreinigung der ADPRC/NADGHs der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen Membranfraktion P100 an einer SP-Sephrose-Matrix. Der obere Teil der Abbildung (A) zeigt einen charakteristischen zeitlichen Verlauf der ADPRC-/NADGH-Aktivität während der chromatographischen Auftrennung der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen mit NP40 (2% v/v) solubilisierten Membranfraktion P100 an einer SP-Sephrose-HP HiTrap-Säule (Bettvolumen 1 ml). Die Auftrennung des im Äquilibrierungspuffer der Säule (30 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,0) suspendierten Proteins (8,4 mg) erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/Min. in einem Gradienten von 0 bis 750 mM NaCl (3.2.19.3, Methode 2) unter Verwendung eisgekühlter Puffer bei RT. Der Verlauf des Gradienten ist in der Abbildung als dunkelblaue Linie eingezeichnet. Die Durchmusterung minütlich gesammelter Fraktionen auf katalytische Aktivität erfolgte entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.2 im fluorimetrischen Enzymassay (Photometriemodus, $\lambda_{\text{Ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm) unter Verwendung des Substrates NGD (50 μM , Inkubation für 1 Stunde bei RT). Für die Enzymassays (Assayvolumen 1 ml) wurden Aliquots der Fraktionen (200 μl) 1:5 mit intrazellulärem Puffer (pH 7,2) verdünnt. Einige Fraktionen wurden zusätzlich unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD (50 μM , RT 1 Stunde) im RP-HPLC-Enzymassay vermessen (3.2.7.1 und 3.2.8.1) und die synthetisierten Stoffmengen an ϵ -cADPR und ϵ -ADPR quantitativ bestimmt (A). Der untere Teil der Abbildung (B, C) zeigt die Ergebnisse von SDS-PAGE-Analysen der Proteinzusammensetzung ausgewählter Fraktionen der dargestellten SP-Sephrose-Chromatographie (A) unter nicht reduzierenden Bedingungen (kein Erhitzen der Proben und Verzicht auf β -ME) in einem 12,5 %igen Trenngel. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Im Gel aufgetrennt wurden entweder die 1:2 mit 2x-Probenpuffer versetzten Originalfraktionen der Chromatographie (B) oder in 1x-Probenpuffer resuspendierte, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.13.2D gewonnene Phenol-Ether-

Präzipitate der Fraktionen (C). Aufgrund des bei der Proteinbestimmung störenden Gehaltes der Fraktionen an Detergenz (2% v/v NP40) wurde der Proteingehalt nicht bestimmt. Als MW-Standard (Marker) wurde der Kaleidoskop-Marker der Firma *Bio-Rad* verwendet.

Der obere Teil der Abbildung (Abb. 4.32 A) zeigt den zeitlichen Verlauf der katalytischen Aktivität während der chromatographischen Trennung, die in den einzelnen Fraktionen fluorimetrisch unter Verwendung des Substrates NGD bestimmt wurde. Um Artefakte auszuschließen, wurden die Durchlaufraction und weitere Fraktionen, die im aufgezeichneten Aktivitätsprofil die höchste GDPRC-Aktivität aufwiesen, zusätzlich mit dem Substrat ϵ -NAD vermessen und die während der Vermessung synthetisierten Stoffmengen der Produkte ϵ -cADPR und ϵ -ADPR quantitativ durch RP-HPLC bestimmt. Dabei wurden die mit dem Substrat NGD erhobenen Daten qualitativ bestätigt (Abb. 4.32 A). Wie zuvor für das entsprechende Enzym in der S100-Fraktion der Lymphozyten, wurde auf diese Weise zusätzlich gezeigt, daß auch die durch SP-Sepharose-Chromatographie angereicherten Formen der ADPRCs/NADGHs der P100-Fraktion sowohl ADPRC- als auch NADGH-Aktivität besitzen (Ratio 1:10-1:20). Im unteren Teil der Abbildung (Abb. 4.32 B, C) ist anhand von Coomassie-gefärbten Gelen das Ergebnis von SDS-PAGE-Analyse ausgewählter Fraktionen unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. In der Durchlaufraction, nicht jedoch in den Fraktionen, die die lösliche, an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion der Lymphozyten enthielten, konnte eine in ihrem MW dem Ektoenzym CD38 entsprechende Proteinbande nachgewiesen werden (Abb. 4.32 B, durch einen Pfeil markiert). In den Fraktionen 12-15, die im Aktivitätsprofil (Abb. 4.32 A) die höchste GDPRC-Aktivität aller analysierten Fraktionen aufwiesen und die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion enthielten, wurde dagegen als Hauptbande (Doppelbande) ein kleineres Protein von ca. 40 kDa vorgefunden (schwarzer Pfeil). Zusätzlich wurde, sofern wie in dem dargestellten Beispiel genügend Protein für die Chromatographie eingesetzt wurde, deutlich schwächer ein in seiner Größe (MW ca. 70 kDa) dem L-Plastin der S100-Fraktion entsprechendes Protein detektiert (B, roter Pfeil). Wurden die Fraktionen vor der Analyse in der SDS-PAGE zur Anreicherung/Fällung des Proteins einer Phenol-Ether-Präzipitation unterzogen, einer Methode, die sich zur quantitativen Rückgewinnung von Protein auch aus verdünnten an Salz und Detergenz reichen Lösungen eignet [Sauvé *et al.* 1995], konnten beide Banden angereichert (Abb. 4.32 C), bzw. die 70 kDa-Bande auch dann im Coomassie-gefärbten Gel nachgewiesen werden, wenn weniger P100-Protein für die Chromatographie eingesetzt wurde. Weitere Proteine, deren anhand der Bandenintensität gemessene Verteilung auf unterschiedliche Fraktionen dem zeitlichen Verlauf der katalytischen Aktivität (Abb. 4.32 A) während der

Chromatographie entsprach, wurden auch nach Durchführung einer Phenol-Ether-Präzipitation nicht detektiert (Abb. 4. 32 C). Eine parallel mit den gleichen Originalfraktionen unter reduzierenden Bedingungen durchgeführte SDS-PAGE (nicht dargestellt) unterschied sich in ihrem Bandenmuster nicht von dem der unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführten SDS-PAGE (Abb. 4. 32 C). Um den Verdacht zu erhärten, daß es sich bei der in den Fraktionen mit der höchsten katalytischen Aktivität vorgefundenen Bande von ca. 70 kDa MW um die enzymatisch aktive, möglicherweise phosphorylierte Form von L-Plastin handeln könnte, wurden zunächst gleiche Aliquots einer durch SP-Sepharose-Chromatographie (a) aus solubilisiertem P100, bzw. (b) einer aus solubilisiertem und HA-gereinigtem S100 gewonnenen Fraktion, die jeweils die höchste GDPRC-Aktivität und die stärkste Intensität dieser Bande aufwies, mit dem Substrat ϵ -NAD im fluorimetrischen Enzymassay vermessen und der Substratumsatz anhand der Fluoreszenzentwicklung pro Zeit aufgezeichnet (Abb. 4.33 A). Beim Vergleich der katalytischen Aktivität beider Enzympräparationen ist die unterschiedliche Skaleneinteilung der Y-Achsen zu beachten. Diese war notwendig, um die im Vergleich zur ADPRC/NADGH der P100-Fraktion erheblich schwächere enzymatische Aktivität der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion sichtbar zu machen. Zusätzlich wurden Aliquots beider Fraktionen nebeneinander unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE in einem 12,5 %igen Gel analysiert (Abb. 4.33 B). Im scharfen Kontrast zum Verhältnis der katalytischen Aktivität beider ADPRC/NADGH-Präparationen (Abb. 4.33 A), war die Intensität der Bande von ca. 70 kDa MW (L-Plastin) in der aus der S100-Fraktion gewonnenen Enzympräparation erheblich stärker ausgeprägt als in der aus der P100-Fraktion stammenden Präparation. Außerdem erschien das MW dieser Bande in der letztgenannten Enzympräparation geringfügig größer (Abb. 4.33 B). Die Bande von ca. 40 kDa MW ließ dagegen eine genau gegensätzliche Intensitätsverteilung auf die beiden Enzympräparationen erkennen. Vereinbar mit der Hypothese, daß es sich bei L-Plastin um eine cytosolische ADPRC/NADGH handeln könnte, die stimulationsbedingt aus dem Cytosol an die Membran transloziert, ließ dieses Ergebnis damit die Möglichkeit zu, daß die aus der P100-Fraktion angereicherte Enzympräparation eine aktivierte Form des L-Plastins enthalten könnte (deutlich höhere spezifische Aktivität) und daß die Aktivierung, vereinbar mit einem leicht erhöhten MW, durch Phosphorylierung erfolgt. Auch die Bande von ca. 40 kDa MW war jedoch als Kandidat einer löslichen ADPRC/NADGH nicht auszuschließen. Potentiell konnte es sich bei dieser Bande beispielsweise auch um eine verkürzte Form von CD38 handeln.

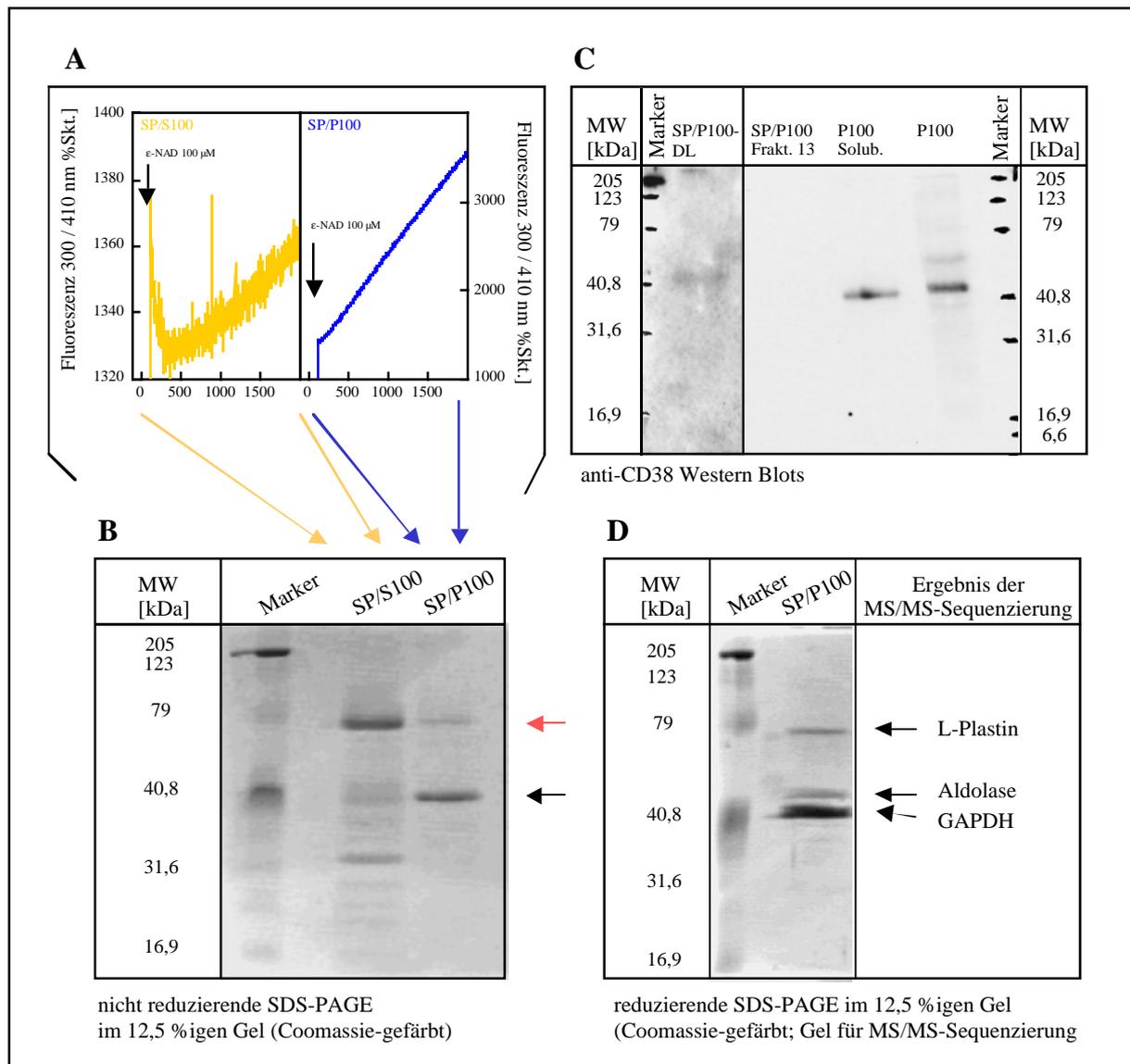


Abb. 4.33: Charakterisierung der an die SP-Sepharose-Matrix bindenden Form der ADPRC/NADGH der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen P100-Fraktion (1.) im Vergleich zur SP-Sepharose-gereinigten, löslichen ADPRC/NADGH der cytosolischen S100-Fraktion und (2.) im Vergleich zur nicht an die SP-Sepharose-Matrix bindenden Form der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion im anti-CD38 Western Blot und Identifizierung von Proteinen durch MS/MS-Sequenzierung. Gleiche Aliquots (200 μ l) der durch SP-Sepharose-Chromatographie angereicherten, an diese Matrix bindenden Formen der ADPRCs/NADGHs der HA-gereinigten S100-Fraktion und der P100-Fraktion der Jurkat-Lymphozyten wurden, suspendiert in intrazellulärem Puffer (pH 7,2; Assayvolumen 1 ml), entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.1 fluorimetrisch mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μ M, RT, 33 Min.) im kontinuierlichen Enzymassay vermessen (A). Parallel wurden gleiche Aliquots (75 μ l) derselben Enzympräparationen, 1:2 mit 2x-Probenpuffer verdünnt, nebeneinander unter nicht reduzierenden Bedingungen (kein Erhitzen der Proben, Verzicht auf β -ME) durch SDS-PAGE in einem 12,5 %igen Trenngel aufgetrennt (B). Das jeweils aufgetragene Probenvolumen lag bei 150 μ l. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Western Blots zum Nachweis von CD38 (C) wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.15 durchgeführt. Von der P100-Rohfraktion und dem mit 2% (v/v) solubilisierten P100 wurden jeweils 150 μ g Protein eingesetzt. Die Präparationen der durch SP-Sepharose-Chromatographie gereinigten ADPRCs/NADGHs der P100-Fraktion (ADPRC/NADGH der Durchlauf fraktion, SP/P100-DL; an die SP-Sepharose-Matrix bindende ADPRC/NADGH, SP/P100 geb.) wurden aufgrund des Gehaltes an Detergenz (2% v/v NP40) ohne vorherige Proteingehaltsbestimmung 1:2 mit 2x-Probenpuffer verdünnt verwendet. Das auf das Gel (Trenngel 12,5 %ig) aufgetragene Probenvolumen lag jeweils bei 150 μ l. Für die spezifische Detektion von CD38 wurde der AT1 anti-CD38 mAK (Endkonzentration 1 μ g/ml) eingesetzt. Der Peroxidase-markierte, gegen humane Serumproteine präabsorbierte Zweitantikörper (Ziege anti-Maus IgG, *Santa Cruz Biotechnology*) wurde in der Verdünnung 1:3000 verwendet. Die Entwicklung der Blots erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (*Amersham*

Pharmacia Biotech). Zum Zweck einer Sequenzierung in der Präparation enthaltener Proteine durch MS/MS wurde ein 1:2 mit Probenpuffer verdünntes Aliquot einer Präparation der durch SP-Sepharose-Chromatographie angereicherten, an die SP-Sepharose-Matrix bindenden Form der ADPRC/NADGH (aufgetragenes Probenvolumen 150 µl) unter reduzierenden Bedingungen (Erhitzen der Probe 5 Min. bei 95 °C in Gegenwart von 5% v/v β-ME) durch SDS-PAGE in einem vollständig ausgehärteten 12,5 %igen Gel aufgetrennt (3.2.16) und das Gel mit Coomassie gefärbt (3.2.17B). Die durch Pfeile markierten Banden (D) wurden ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine von *Dr. F. Buck* (Institut für Zellbiochemie, UKE/Hamburg) nach Durchführung eines tryptischen Verdau im Gel durch MS/MS-Sequenzierung entsprechend der Beschriftung in der Darstellung identifiziert. Als MW-Standard (Marker) wurde in allen dargestellten Experimenten der vorgefärbte Kaleidoskopmarker (*Bio-Rad*) verwendet.

Zum Nachweis von CD38 wurden daher sowohl die Durchlaufraction der SP-Sepharose-Chromatographie als auch Fraktion 13 (Abb. 4. 32) im Western Blot untersucht. Dabei dienten die P100-Rohfraction und mit Detergenz solubilisiertes P100 als Positivkontrollen für das Detektionssystem. Zur spezifischen Detektion von CD38 wurde der AT1 anti-CD38 mAK verwendet. Während in den beiden Kontrollfraktionen und in der SP-Sepharose-Durchlaufraction Banden detektiert wurden, deren MW dem des Ektoenzym CD38 in seiner monomeren Form entsprach, konnte in Fraktion 13, die für die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion angereichert war (Abb. 4.32 A), kein Protein nachgewiesen werden (Abb. 4.33 C). Dies legte die Interpretation nahe, daß diese Fraktion, wie die korrespondierende, durch SP-Sepharose-Chromatographie für die lösliche ADPRC/NADGH der S100-Fraktion angereicherte Fraktion, kein CD38 oder immunologisch mit diesem Enzym verwandtes Protein enthielt. Gleichzeitig stützte das Ergebnis (indirekt) L-Plastin als potentiellen Kandidaten eines von CD38 verschiedenen Proteins mit ADPRC-/NADGH-Aktivität. Um die in Fraktion 13 enthaltenen Proteine zu identifizieren, wurde wieder eine Sequenzierung durch MS/MS durchgeführt. Dabei wurden die zuvor eingehender beschriebenen Hauptproteine als Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und L-Plastin identifiziert (Abb. 4.33 D). Ein weiteres, in seinem MW im Vergleich zu GAPDH etwas größeres Protein, das nach Durchführung einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen ebenfalls in dieser Fraktion durch Coomassie-Färbung nachweisbar war, wurde als Aldolase identifiziert (Abb. 4.33 D). Damit wurden außer dem Protein L-Plastin wiederum nur zwei ubiquitär in Zellen exprimierte und in den Grundstoffwechsel der Zellen involvierte Proteine angereichert. Die detaillierten Ergebnisse der durchgeführten Sequenzierungen sind in Abb. 4.34 dargestellt. Um sicherzugehen, daß GAPDH keine Nebenaktivität als ADPRC/NADGH besitzt, wurde aus humanen Erythrocyten gewonnene GAPDH erworben und unter Nutzung des Substrates ε-NAD im fluorimetrischen Enzymassay vermessen. Unter Vermessung von 10 und 100 µg Protein konnte dabei keinerlei ADPRC- und/oder NADGH-Aktivität festgestellt werden (Abb. 4.35).

<u>Protein / Aminosäuresequenz</u>	<u>Charakteristika</u>
<p>L-Plastin aus <i>Homo sapiens</i></p> <p>1 MAR<u>GSVSD</u><u>DEF</u><u>MMELR</u>EAFAK VDTDNGNGYIS FNELNDLFK<u>A</u><u>ACLPLPGYR</u>V REITENLMAT 61 GDLDQDGRIS FDEFIKIFHG LKSTDVAKTF RKAINKK<u>EGL</u><u>CAIGGTSEOS</u><u>SVGTQHSYSE</u> 121 <u>EKRYAEVNWLNK</u>ALENDPDC RHVIPMNPNT NDLFNAVGDG IVLCK<u>MINLS</u><u>VPDTIDER</u>TI 181 NKKKLTPTFTI QENLNALNLS ASAIGCHVVN IGAEDLKEGK PYLVLGLLWQ VIKIGLFADI 241 ELSRNEALIA LLREGESLED LMK<u>L</u><u>SPEELL</u><u>LRWANYHLEN</u><u>AGCNKIGNES</u><u>TDIKDSK</u>AYY 301 HLLQVAPK<u>G</u><u>DEEGVPAVVLDMSGLR</u>EKDD IQRAECMLQQ AERLGCR<u>QEV</u><u>TATDVVRGNP</u> 361 <u>KLNLAFIANL</u><u>ENR</u>YPALHKP ENQDIDWGAL EGETREERTF R<u>NWMNSL</u><u>GVN</u><u>PR</u>VNHLYSDL 421 SDALVIFQLY EKIKVPVDWN RVNKPYPKL GGNMKLENC NYAVELGKNQ AK<u>ESI</u><u>VGIGG</u> 481 <u>ODLNEGNR</u>TL TLALIWLQMR RYTLNILEEI GGGQVNDI IVNWWNETLR EAEKSSISS 541 FKDPKISTSL P VLDLIDAIQ PGSINYDLLK TENLNDEKL NNAKYAISMA RKIGAR<u>VYAL</u> 601 <u>PEDLVEVNP</u>K MVMTVFACLM GKGMKRV</p>	<p>627 Aminosäuren MW [kDa]: 70,289 (theoretisch) PI:5,20 (theoretisch) Zugriffsnummer: A35836 Phosphoprotein Weitere Charakteristika, siehe Abb. 4.31</p>
<p>Aldolase aus <i>Homo sapiens</i></p> <p>1 <u>MPYOYPALTP</u><u>EOKKELSDIA</u><u>HRIVAPGKGI</u><u>LADESTGSI</u><u>AKR</u>LQSIGTE NTEENRRFYR 61 QLLLTADDRV NPCIGGVILF HETLYQK<u>ADD</u><u>GRPFPOVIK</u>S K GGVVIGKVD KGVVPLAGTN 121 GETTTQGLDG LSERCAQYK <u>DGADEAKWR</u>C VLK<u>IGEHTPS</u><u>ALAIMENANV</u><u>LARYASICOO</u> 181 <u>NGIVPIVEPE</u><u>ILPDGDHDLK</u><u>R</u>CQYVTEKVL AAVYKALSD H HIYLEGTLK PNMVTPGHAC 241 TQK<u>FSHEEIA</u><u>MATVTALRRT</u><u>VPPAVTGITF</u><u>LSGGQSEEEA</u><u>SINLNAINKC</u><u>PLLKPWALTE</u> 301 <u>SYGR</u>ALQASA LKAWGGKKEN LKAAQEEYVK R<u>ALANSLACO</u><u>GKYTPSGOAG</u><u>AAASESLFVS</u> 361 <u>NHAY</u></p>	<p>364 Aminosäuren MW [kDa]: 39,4 (theoretisch) PI: 8,30 (theoretisch) Zugriffsnummer: XP_058112</p>
<p>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aus <i>Homo sapiens</i></p> <p>1 MGKVK<u>GVNG</u><u>FGRIGR</u>LVTR AAFNSGKVDI VAINDPFIDL NYMVYMFQYD STHGKFHGTV 61 KAENGL<u>LVIN</u><u>GNPITIFQER</u><u>DPSK</u>IKWGDA <u>GAEYVVESTG</u><u>VFTTMEK</u>AGA HLQGGAKRVI 121 ISAPSADAPM FVMGVNHEKY DNSLK<u>ISNA</u><u>SCTTNCLAPL</u><u>AK</u>VIHDNFGI VEGLMTTVHA 181 ITATQK<u>TVDG</u><u>PSGKLWRDGR</u><u>GALQNIIPAS</u><u>TGAAK</u>AVGKV IPELNGK<u>LTG</u><u>MAFRVPTANV</u> 241 <u>SVVDLTCR</u>LE KPAKYDDIKK VVKQASEGPL KGILGYTEHQ VVSSDFNSDT HSSTFDAGAG 301 IALNDHFVKL <u>ISWYDNEFGY</u><u>SNRVVDLMAH</u><u>MASKE</u></p>	<p>335 Aminosäuren MW [kDa]: ca. 37 (theoretisch) PI: 8,27 (theoretisch) Zugriffsnummer: NP_002036</p>

Abb. 4.34: Ergebnisse der MS/MS-Sequenzierung von Proteinen einer durch SP-Sepharose-Chromatographie für die lösliche, an die SP-Sepharose-Matrix bindende ADPRC/NADGH der P100-Fraktion der Jurkat-Lymphozyten angereicherten Enzympräparation und Charakteristika der identifizierten Proteine. Ergänzend zu Abb. 4.34 (D) sind in dieser Abbildung die detaillierten Ergebnisse der Sequenzierung der identifizierten Proteine durch MS/MS dargestellt. Die Sequenzierungen wurde von *Dr. F. Buck* (Institut für Zellbiochemie, UKE/Hamburg) durchgeführt. Tryptische Peptide, die anhand ihrer Masse und enthaltener Sequenzen während der Sequenzierung gefunden und zugeordnet wurden, sind unterstrichen und gelb unterlegt. Die aufgelisteten Charakteristika der identifizierten Proteine wurden der Datenbank (Medline/Protein) entnommen. PI = isoelektrischer Punkt; AS = Aminosäure

Eine Nebenaktivität des ebenfalls ubiquitär in Zellen exprimierten Proteins Aldolase als ADPRC/NADGH wurde experimentell nicht ausgeschlossen, ist jedoch als unwahrscheinlich anzusehen.

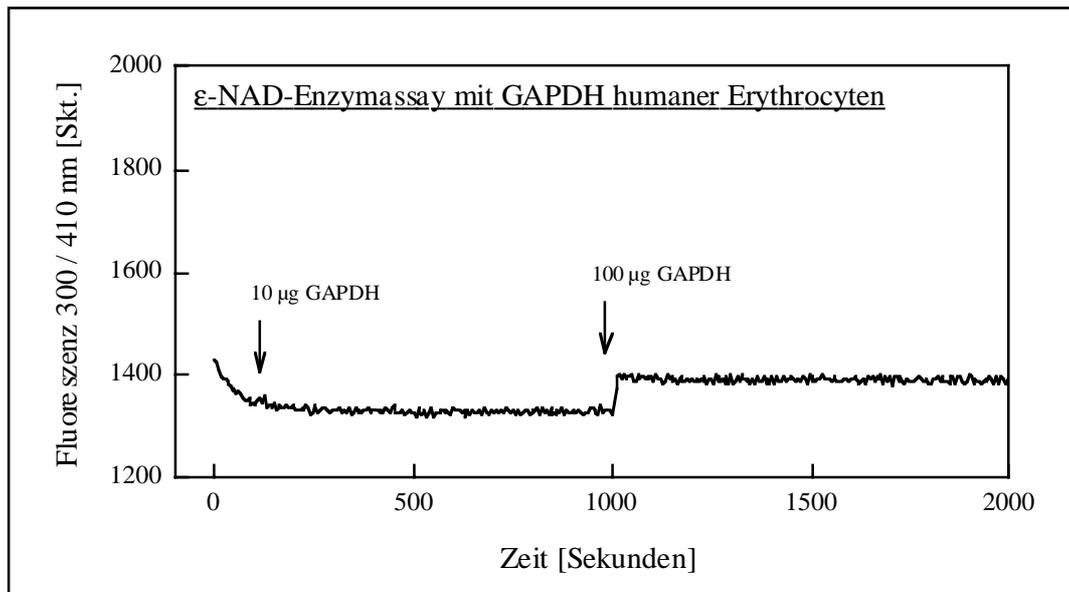


Abb. 4.35 Untersuchung aus humanen Erythrocyten gewonnener Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) auf ADPRC-/NADGH-Aktivität. In intrazellulärem Puffer (pH 7,2) suspendierte, aus humanen Erythrocyten gewonnene GAPDH (EC 1.2.1.12/*Sigma Aldrich*; 10, bzw. 100 µg Protein) wurde in einem Assayvolumen von 1 ml entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.1 fluorimetrisch bei RT im kontinuierlichen Enzymassay vermessen. Dabei wurde das Substrat (ϵ -NAD, Endkonzentration 100 µM) in der Messküvette vorgelegt und die Messung nach einem Vorlauf von ca. 100 Sek. durch Zusatz des Enzyms (GAPDH, 10 µg Protein) gestartet. Nach ca. 1000 Sek. wurde erneut GAPDH (100 µg Protein) zugesetzt. Als Maß für den Umsatz von Substrat durch ADPRC-/NADGH-Aktivität wurden die basale Fluoreszenz (100 Sek.) und die Fluoreszenzentwicklung ($\lambda_{\text{Ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm) nach Zusatz der GAPDH aufgezeichnet.

Mit dem Ziel dem L-Plastin der P100-Fraktion eindeutig ADPRC-/NADGH-Aktivität zuzuordnen, wurde mit einer Fraktion 13 (Abb. 4.32) entsprechenden, SP-Sepharose-gereinigten Enzympräparation unter Nutzung des Substrates ϵ -NAD nochmals, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.14, ein gelinterner Enzymassay durchgeführt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß der Assay unter Verwendung dieser, aus der P100-Fraktion der Lymphozyten angereicherten ADPRC/NADGH aufgrund ihrer im Vergleich zu der aus der S100-Fraktion angereicherten ADPRC/NADGH sehr viel höheren ADPRC-/NADGH-Aktivität besser funktionieren könnte. Um eine Inhibition der katalytischen Aktivität durch alkalischen pH (pH 8,8) zu verhindern, wurde für die SDS-PAGE ein 15 %iges Trenngel mit physiologischem pH (pH 7,45) verwendet. Zum Test auf die Spezifität der während der Enzymassays gemessenen Fluoreszenzwerte für die Fluoreszenz der ϵ -Adeninnukleotide ($\lambda_{\text{Ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm) wurden die Messungen zusätzlich bei Exzitation mit einer Wellenlänge von 275 nm (Anregung proteinspezifischer Fluoreszenz) durchgeführt. Das Ergebnis des Assays ist in Abb. 4.36 gezeigt. Während der Bande der GAPDH (MW ca. 40 kDa) eine geringe NADase-Aktivität zugeordnet werden konnte, wies die Bande des L-Plastins (ca. 70 kDa) in dieser Hinsicht keinerlei katalytische Aktivität auf.

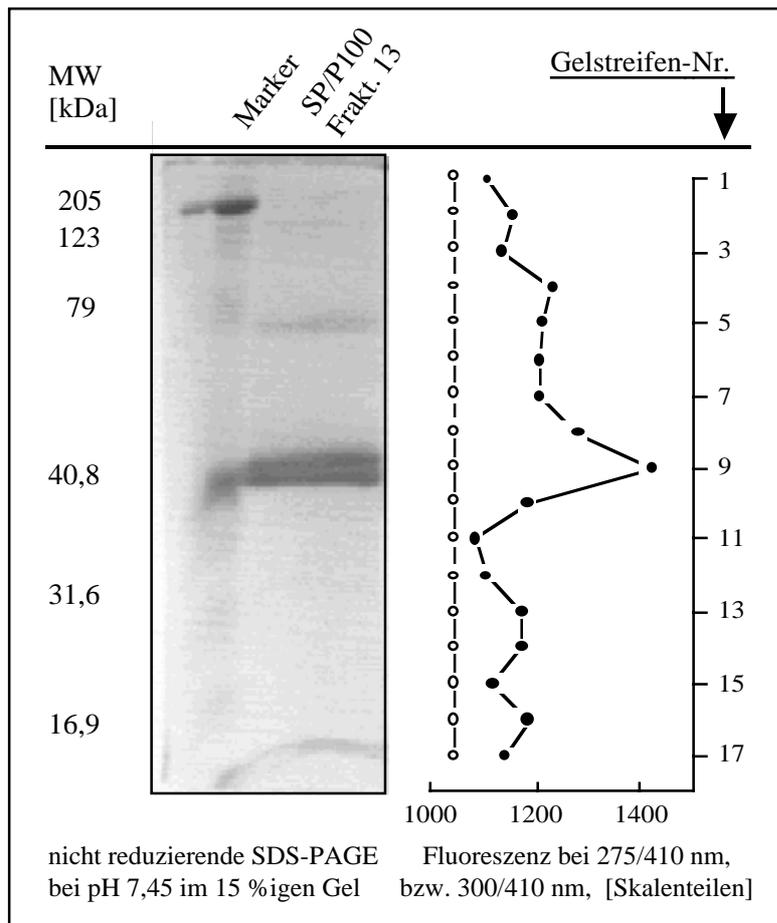


Abb. 4.36: Versuch eines Nachweises der ADPRC-/NADGH-Aktivität und des Molekulargewichts der durch SP-Sephrose-Chromatographie angereicherten, an die SP-Sephrose-Matrix bindenden ADPRC/NADGH der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen Membranfraktion P100 im Gel. Der Assay zum Nachweis von ADPRC-/NADGH-Aktivität im Gel wurde entsprechend der Beschreibung im Kapitel Material und Methoden (Abschnitt 4.2.14) durchgeführt. Die für den Assay verwendete Präparation der ADPRC/NADGH der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen Membranfraktion P100 (durch Chromatographie an SP-Sephrose gereinigte Form der ADPRC/NADGH, die an die SP-Sephrose-Matrix band) wurde nach 1:2-Verdünnung mit 2x-Probenpuffer unter nicht reduzierenden Bedingungen (kein Erhitzen der Probe, Verzicht auf β -ME) durch SDS-PAGE in einem 15 %igen Trenngel (pH 7,45) aufgetrennt. In einer Kontrollspur des Gels wurde ein Probenvolumen von 150 μ l aufgetragen und in der für den Enzymassay bestimmten präparativen Spur des Gels ein Probenvolumen von ca. 600 μ l. Als MW-Standard (Marker) wurde der vorgefärbte Kaleidoskopmarker der Firma *Bio-Rad* verwendet. In der Abbildung dargestellt ist neben der Spur des Gels, in der der MW-Standard aufgetrennt wurde, die mit Coomassie gefärbte Kontrollspur des Gels, in der ein Aliquot der gleichen Enzympräparation, die für das präparative Gel verwendet wurde, aufgetragen wurde. Diese Spur diente zur Kontrolle auf die Proteinzusammensetzung der Probe und als Vorlage für die horizontale Aufgliederung des präparativen Gels in gleich breite Gelstreifen im Anschluß an die Elektrophorese. Die für die einzelnen Gelstreifen entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.7.2 (Kapitel Material & Methoden) nach Inkubation mit dem Substrat ϵ -NAD (100 μ M, RT, 1 Stunde) im fluorimetrischen Enzymassay (Photometriemodus) als Maß der ADPRC-/NADGH-Aktivität ($\lambda_{\text{Ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm; geschlossene Symbole), bzw. der Proteinverteilung ($\lambda_{\text{Ex}}=275$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=410$ nm; offene Symbole) gemessenen Fluoreszenzwerte wurden in vertikaler Ausrichtung entsprechend der Lage der Gelstreifen im intakten Gel parallel zu den intakten Spuren des MW-Standardgemisches und der mit Coomassie gefärbten Probe (Kontrollspur) in einem Graphen aufgetragen. Dabei entsprechen die Punkte der dargestellten Graphen jeweils den Mittelpunkten der im Enzymassay vermessenen Gelstreifen.

Damit kann weitgehend ausgeschlossen werden, daß mit diesem Assay lediglich die Proteinverteilung im Gel gemessen wurde. Dennoch war die Ausbeute an katalytischer Aktivität auch in diesem Experiment wieder extrem gering. Demzufolge scheint der

gelinterne Enzymassay auf ADPRC-/NADGH-Aktivität trotz seiner nachgewiesenen Eignung zum Nachweis der katalytischen Aktivität des rekombinanten, löslichen CD38 (hCD38rec) und der ADPRC aus *A. californica* (Abb. 4.29) zum Nachweis der katalytischen Aktivität von ADPRCs/NADGHs der Jurkat T-Lymphozyten ungeeignet zu sein. Vereinbar mit dieser Auffassung, gelang es auch nicht, ADPRC- und NADGH-Aktivität der ungereinigten Membranfraktionen P10 und P100 der Lymphozyten, die das klassische CD38 enthalten (Abb. 4.10 und Abb. 4.13), mit diesem Assay nachzuweisen und einem definierten MW zuzuordnen (nicht gezeigt). Damit konnte die potentielle Aktivität von L-Plastin als ADPRC/NADGH weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Um in diesem Punkt auf andere Weise Aufschluß zu erhalten, wurde in einem Parallelprojekt (*A. Gasser & Prof. Guse*) L-Plastin als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli*-Bakterien exprimiert. Dabei diene die an den N-Terminus von L-Plastin fusionierte GST der Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins an einer Glutathion-Affinitätsmatrix in einem Schritt. Mit dem gereinigten rekombinanten Protein wurden dann wiederum fluorimetrische Enzymassays unter Verwendung der Substrate ϵ -NAD und NGD durchgeführt. Leider gelang es jedoch auch mit diesem experimentellen Ansatz bislang nicht, ADPRC- und/oder NADGH-Aktivität für rekombinantes L-Plastin nachzuweisen (nicht dargestellt). Zusammenfassend gelang es, mit L-Plastin, proteinbiochemisch einen potentiellen Kandidaten einer nicht mit CD38 identischen ADPRC/NADGH sowohl als lösliches Protein aus der cytosolischen Fraktion als auch als membranassoziiertes Protein aus der P100-Fraktion von Jurkat-Lymphozyten aufzureinigen. Durch Vermessung rekombinanten L-Plastins konnten cADPR- und/oder ADPR-Synthese durch dieses Protein bislang allerdings nicht bestätigt werden.

4.4.3.6: Immunpräzipitation von ADPRCs/NADGHs mit anti-CD38 mAKs aus SP-Sepharose-gereinigten Enzympräparationen und Analyse von IP-Fraktionen und durch Chromatographie gereinigten Enzympräparationen im anti-CD38 Western Blot

Da es nicht gelang, dem aus der S100-Fraktion und aus der P100-Fraktion der Lymphozyten aufgereinigten L-Plastin Aktivität als ADPRC/NADGH zuzuordnen, wurde in nachstehend beschriebenen Experimenten erneut versucht, die nun durch SP-Sepharose-Chromatographie weiter aufgereinigten ADPRCs/NADGHs beider Fraktionen durch Immunpräzipitation mit anti-CD38 mAKs aus für sie angereicherten Fraktionen aufzukonzentrieren. Ziel der Versuche war sicherzugehen, daß es sich bei diesen ADPRCs/NADGHs nicht doch um CD38 oder mit diesem Protein immunologisch verwandte Enzyme handelt. Charakteristische Ergebnisse der

Experimente sind in Abb. 4.37 exemplarisch für die durch SP-Sepharose-Chromatographie aus der P100-Fraktion der Lymphozyten aufgereinigten ADPRCs/NADGHs dargestellt. Sowohl mit dem IB4 anti-CD38 mAK (Abb. 4.37 A) als auch mit dem AT1 anti-CD38 mAK (Abb. 4.37 B) gelang es, in jeweils zwei direkt nacheinander durchgeführten IPs spezifisch ADPRC-/NADGH-Aktivität, die fluorimetrisch unter Verwendung des Substrates ϵ -NAD im kontinuierlichen Enzymassay nachweisbar war, an die IP-Beads zu präzipitieren. In parallel durchgeführten Kontrollexperimenten konnte keine Bindung der ADPRCs/NADGHs an zur Negativkontrolle mit anti-CD3 mAK beladene IP-Beads festgestellt werden. Bei Verwendung des AT1 anti-CD38 mAKs konnte sowohl im IP-Pellet der ersten als auch in dem der zweiten IP ADPRC-/NADGH-Aktivität nachgewiesen werden. Nach zweimalig durchgeführter IP wurde bei vergleichsweise guter Gesamtausbeute an katalytischer Aktivität der größte Teil der wiedergefundenen ADPRC-/NADGH-Aktivität in präzipitierter Form vorgefunden (Abb. 4.37 B). Auch im ersten Überstand der zweiten IP war jedoch noch eine Restaktivität messbar (Abb. 4.37 B). Wurde dagegen der IB4 anti-CD38 mAK für die IPs eingesetzt, wurde, bei Betrachtung der Daten unter quantitativem Aspekt, ein abweichendes Ergebnis erzielt (Abb. 4.37 A). Auch mit diesem anti-CD38 mAK konnte in einer ersten IP ADPRC-/NADGH-Aktivität immunpräzipitiert werden (Abb. 4.37 A). Die Ausbeute an katalytischer Aktivität war jedoch insgesamt schlecht, da im Anschluß an die zweite IP im fluorimetrischen Enzymassay weder im IP-Pellet noch im IP-Überstand Substratumsatz feststellbar war (Abb. 4.37 A). Dies ist mit einer starken Inhibition der katalytischen Aktivität der ADPRC/NADGH durch den IB4 anti-CD38 mAK vereinbar. Auch mit der enzymatisch geringer aktiven Durchlaufraction der SP-Sepharose-Chromatographie wurden (einmalige) IPs durchgeführt. Erwartungsgemäß, da angenommen wurde, daß sie das Ektoenzym CD38 enthält, war auch die ADPRC-/NADGH-Aktivität dieser Fraktion mit dem AT1 anti-CD38 mAK immunpräzipitierbar. Allerdings gelang es auch bei Verwendung dieser Enzympräparation nicht, die ADPRC/NADGH in einem IP-Schritt quantitativ im IP-Pellet anzureichern. Um eine exakte quantitative Auswertung der Daten in Hinsicht auf ADPRC- und NADGH-Aktivität zu ermöglichen, wurden Aliquots aller fluorimetrischen Assayansätze der IP-Fractionen zusätzlich durch RP-HPLC analysiert. Die Ergebnisse der Auswertung der HPLC-Analysen zu den Assayansätzen der in Abb. 4.37 (A-C) dargestellten Experimente sind in Tab. 4.9 aufgeführt. Für den IB4 anti-CD38 mAK war eine ca. 70 %ige Inhibition von ADPRC- und NADGH-Aktivität der durch SP-Sepharose-Chromatographie aus der P100-Fraktion aufgereinigten, für die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH angereicherten Enzympräparation (Fraktion 13, Abb. 4.32) feststellbar.

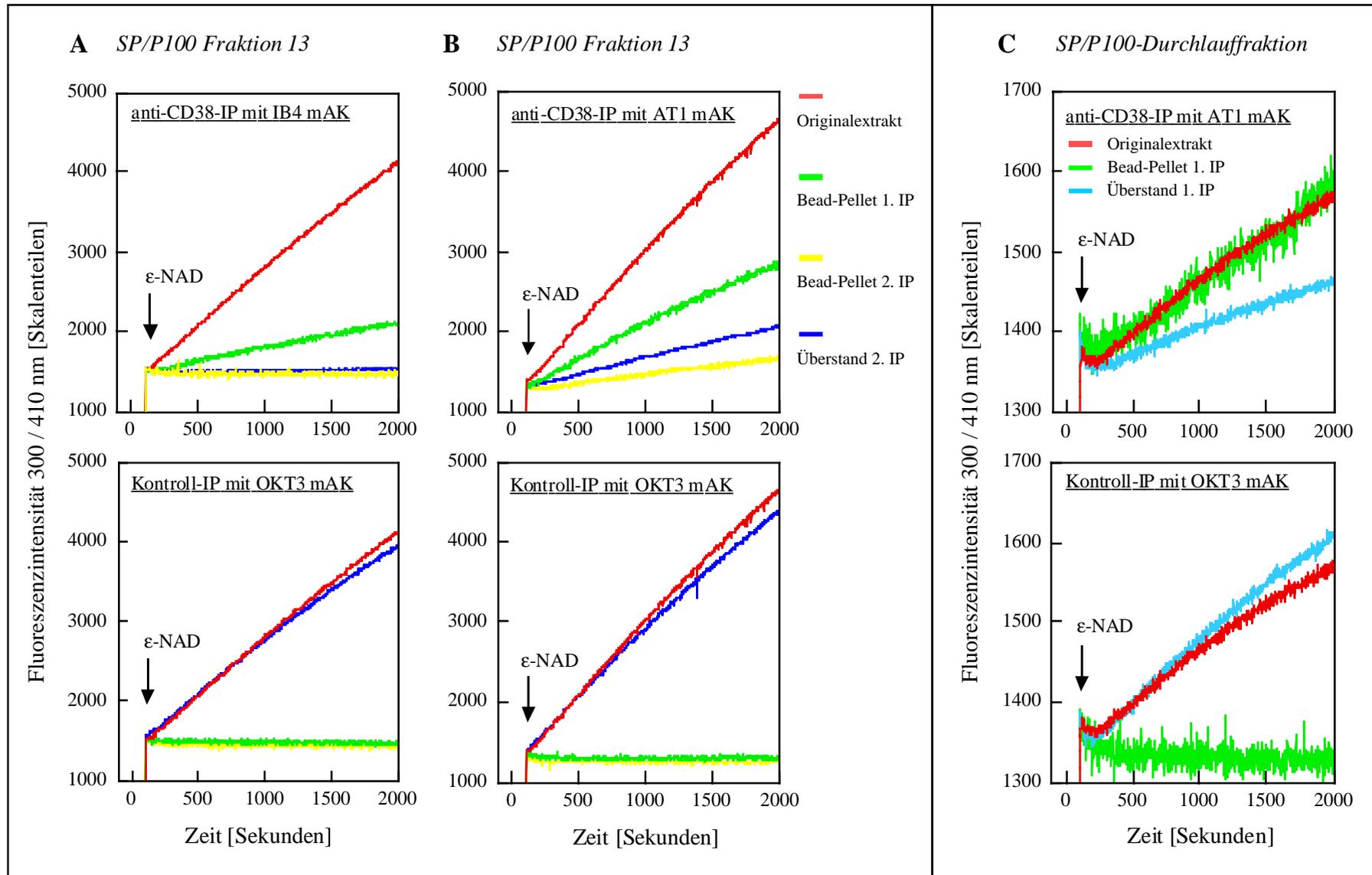


Abb. 4.37: Immunpräzipitation von SP-Sepharose-gereinigten ADPRCs/NADGHs mit den anti-CD38 mAKs IB4 und AT1. Legende, siehe folgende Seite.

Legende zu Abbildung 4.37

IPs an mit den anti-CD38 mAKs IB4 oder AT1 (10 µg), bzw. Kontroll-IPs an mit dem anti-CD3 mAK OKT3 (10 µg) beladenen Protein-G Sepharose-Beads (25 µg je Ansatz), wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.12 mit durch SP-Sepharose-Chromatographie angereicherten Präparationen der ADPRC/NADGHs der P100-Fraktion (3.2.19.3) in einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Das für die IPs eingesetzte Volumen der in 30 mM Natriumphosphatpuffer (pH 5,0) mit 2% (v/v) NP40 gelösten Enzympräparationen (entsprechend Fraktion 13, Abb. 4.32) lag bei 200 bis 350 µl, bzw. 800 µl (Durchlauf fraktion der SP-Sepharose-Chromatographie), und wurde mit IP-Puffer (pH 7,4) mit 2% (v/v) NP40, 1% (w/v) Natriumdesoxycholat und Proteaseinhibitoren-Mix (1:250) auf 1 ml ergänzt. Die Durchlauf fraktion wurde vor der Verwendung in der IP mit 1N NaOH auf pH 7,0 neutralisiert. Ein dem für die IPs eingesetztem Volumen entsprechendes Volumen der Enzympräparationen, nach einmaliger oder zweimaliger IP erhaltene 1. Überstände der IP-Pellets und die zuvor viermal in IP-Puffer ohne Detergenz gewaschenen Bead-Pellet von IPs und Kontroll-IPs wurden anschließend in einem Assayvolumen von 1 ml (eingestellt mit IP-Puffer ohne Detergenz) unter Nutzung des Substrates ε-NAD (100 µM) fluorimetrisch bei RT im kontinuierlichen Enzymassay vermessen. Während der Assays wurde die Fluoreszenzentwicklung ($\lambda_{\text{ex}}=300$ nm, $\lambda_{\text{em}}=410$ nm) als Maß für den Substratumsatz durch ADPRC- und NADGH-Aktivität aufgezeichnet (A-C). Nach Ablauf der Enzymassays (2000 Sek.) wurden die Ansätze in ein Eis-Salzbad gestellt und anschließend, zur Abtrennung von Protein und zur Vorbereitung einer quantitativen Bestimmung der synthetisierten Stoffmengen an ε-cADPR und ε-ADPR durch RP-HPLC, über Centrex UF-2-Konzentratoren ultrafiltriert (30 Min. 4 °C 3000•g). Protein-G Sepharose-Beads aus Ansätzen der IP-Pellets wurden vor der Ultrafiltration durch Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 3 Min. Hettich-Zentrifuge Mikro Rapid/K) abgetrennt. Für die Assays wurden jeweils die kompletten IP-Fraktionen eingesetzt. Bei den dargestellten Daten (A-C) handelt es sich jeweils um das Ergebnis eines repräsentativen Einzelerperimentes.

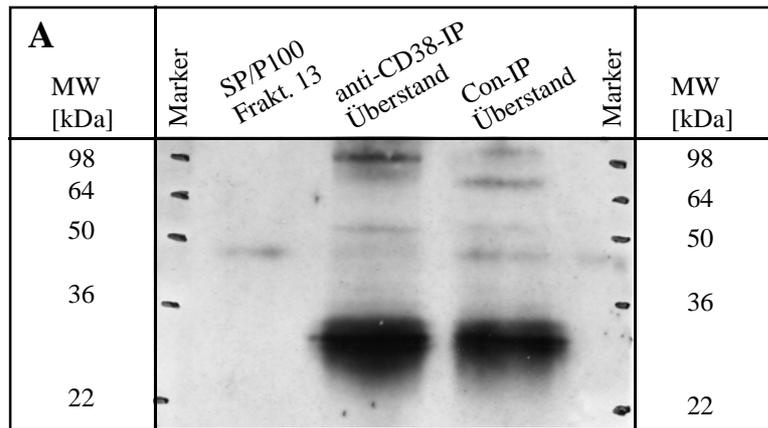
Dagegen beeinflusste der AT1 anti-CD38 mAK die NADGH-Aktivität dieser Enzympräparation kaum, bewirkte jedoch, wie zuvor bereits für die ADPRC-Aktivität der subzellulären Rohfraktionen der Lymphozyten nachgewiesen (Tab. 4.5 und Tab. 4.7), eine starke (ca. 60 %ige) Inhibition der ADPRC-Aktivität. Im Unterschied zu IPs, in denen die subzellulären Rohfraktionen verwendet wurden (Tab. 4.7), blieb auch nach Durchführung zweimaliger IPs mit dem AT1 anti-CD38 mAK noch ein beträchtlicher Teil der katalytischen Aktivität (ca. 30% der NADGH-Aktivität) im IP-Überstand zurück. Berücksichtigt man die ca. 60 %ige Inhibition der ADPRC-Aktivität durch diesen anti-CD38 mAK, die theoretisch insbesondere den im IP-Pellet gebundenen Anteil der ADPRC/NADGH betreffen sollte, ist (rechnerisch) von einer ungefähr gleich effektiven Präzipitation von ADPRC- und NADGH-Aktivität auszugehen. Bezogen auf die Effizienz der Präzipitation der katalytischen Aktivität erwies sich der IB4 anti-CD38 mAK verglichen mit dem AT1 anti-CD38 mAK bereits im Rahmen einer einmaligen IP als stärker wirksam. Entgegen den Erwartungen, die auf Daten von Western Blots zum Nachweis von CD38 gründeten (Abb. 4.33 C), deuteten die hier beschriebenen Ergebnisse darauf hin, daß die durch SP-Sepharose-Chromatographie gereinigte und an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion der Lymphozyten zumindest in ihrer nativen Form doch (immunologische) Ähnlichkeit mit CD38 aufweist. Obwohl an dieser Stelle nicht dargestellt, wurden qualitativ vergleichbare Ergebnisse auch mit der durch HA- und SP-Sepharose-Chromatographie aus der S100-Fraktion angereicherten ADPRC/NADGH (Fraktion 13 in Abb. 4.28) erzielt. Aufgrund der pro Fraktionsvolumen insgesamt sehr viel niedrigeren katalytischen Aktivität

Tab. 4.9: Ergebnisse einmaliger und zweimaliger Immunpräzipitationen von CD38 aus SP-Sepharose-gereinigten Präparationen der ADPRCs/NADGHs der aus Jurkat T-Lymphozyten gewonnenen Membranfraktion P100 unter Verwendung der anti-CD38 mAKs AT1 und IB4

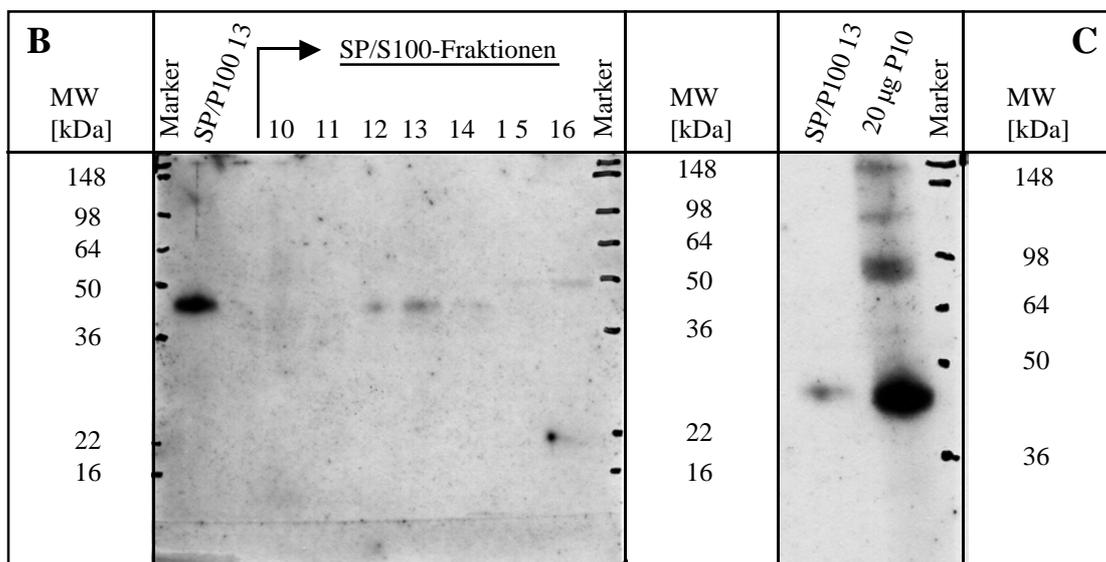
Fraktion & Experiment	für die IP eingesetzte Gesamtaktivität [%] (Aktivitätsausbeute der Con-IP = 100%)		Aktivitätsausbeute in der anti-CD38-IP [% der Gesamtaktivität]		Aktivität im Bead-Pellet der anti-CD38-IP (1. IP oder Σ 1. und 2. IP) 1.[% der Gesamtaktivität] 2.[% der Ausbeute]		Aktivität im 1. Überstand der anti-CD38-IP 1.[% der Gesamtaktivität] 2.[% der Ausbeute]		Aktivität im Bead-Pellet der Con.-IP (1. IP oder Σ 1. + 2. IP) [% der Gesamtaktivität]		Aktivität im 1. Überstand der 1. oder 2. Con.-IP [% der Gesamtaktivität]	
	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH	ADPRC	NADGH
IPs mit AT1 anti-CD38 mAK												
SP/P100 Fraktion 13 einmalige IP (Exp.1)	100	100	37,34	94,10	16,80 44,99	67,90 72,16	20,54 55,01	26,20 27,84	0,00	0,18	100,00	99,82
SP/P100 Fraktion 13 zweimalige IP (Exp.2)	100	100	41,29	86,55	13,69 33,15	62,04 71,68	27,60 66,85	24,51 28,32	0,00	2,90	100,00	97,10
SP/P100 Durchlauf einmalige IP (Exp.3)	100	100	47,40	97,82	28,52 60,17	73,87 75,52	18,88 39,83	23,95 24,48	0,00	0,00	100,00	100,00
IP mit IB4 anti-CD38 mAK												
SP/P100 Fraktion 13 zweimalige IP (Exp.4)	100	100	30,84	34,04	26,82 87,32	28,61 84,05	3,91 12,68	5,43 15,95	5,50	3,13	94,50	96,87

Anmerkung: Die Durchführung der IPs erfolgte entsprechend der Beschreibung im Abschnitt Material & Methoden (3.2.13). Die für die Einzelerperimente eingesetzte Gesamtaktivität der Extrakte/33 Min. belief sich auf folgende Werte: 688,59 pMol ϵ -cADPR und 10,84 nMol ϵ -ADPR/250 μ l Extrakt, Exp. 1; 966,17 pMol ϵ -cADPR und 15,87 nMol ϵ -ADPR/250 μ l Extrakt, Exp. 2; 46,56 pMol ϵ -cADPR und 1,25 nMol ϵ -ADPR/800 μ l Extrakt, Exp. 3 sowie 921,99 pMol ϵ -cADPR und 11,81 nMol ϵ -ADPR/350 μ l Extrakt, Exp. 4. IP = Immunpräzipitation, Con-IP = Kontroll-IP an unbeladenen Protein-G-Sepharose-Beads, ADPRC = ADP-Ribosylcyclase, NADGH = NAD-Glykohydrolase.

dieser Enzympräparation, waren die mit dieser erhobenen Daten (RP-HPLC-Daten) jedoch quantitativ schlechter auswertbar. Wurden die ersten Überstände aus Kontroll-IPs und anti-CD38 IPs durch SP-Sepharose-Chromatographie aus der P100-Fraktion der Lymphozyten gewonnener Enzympräparationen vergleichend durch SDS-PAGE analysiert, war im Coomassie-gefärbten Gel kein Unterschied im Bandenmuster feststellbar. Insbesondere eine Abnahme der Intensität der Bande, die durch Sequenzierung als L-Plastin identifiziert worden war, war nicht erkennbar (nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, daß die ADPRC/NADGH auch in für sie angereicherten Fraktionen (Fraktion 13 der SP-Sepharose-Chromatographie, Abb. 4.32) in zu geringer Menge enthalten ist, um sie durch Coomassie-Färbung des Gels nachweisen zu können. Dies auch dann, wenn in der Fraktion enthaltenes Protein zuvor durch Phenol-Ether-Präzipitation aufkonzentriert wurde. Da alle verfügbaren und im Western Blot zum Nachweis von CD38 in subzellulären Fraktionen der Lymphozyten geeigneten anti-CD38 mAKs aus einer Species (der Maus) entstammten und in Western Blot-Analysen durch den anti-Maus IgG Zweitantikörper daher neben dem zur spezifischen Detektion von CD38 eingesetzten Erstantikörper auch leichte und schwere Kette des jeweils für die IP eingesetzten CD38-spezifischen Antikörpers erkannt wurden, war der Vergleich der Bandenmuster der Immunpräzipitate aus Kontroll- und anti-CD38-IPs im Western Blot nicht aussagekräftig. Gerade in den interessanten MW-Bereichen (um 30 kDa und zwischen 45 und 60 kDa) kam es zu einer starken Überstrahlung der Blots durch die Banden der leichten und schweren Ketten der in den IPs eingesetzten Antikörper. Daher sahen die im Western Blot mit diesen IP-Fraktionen erhaltenen Bandenmuster immer nahezu identisch aus. Wurden jedoch die Bandenmuster von Western Blots verglichen, die, bei Nutzung des IB4 anti-CD38 mAKs zur spezifischen Detektion von CD38, mit den ersten IP-Überständen von Kontroll- und anti-CD38-IP erhalten wurden, war wiederholt das Fehlen einer Bande mit einem MW von knapp 50 kDa in den ersten Überständen aus anti-CD38-IPs feststellbar (Abb. 4.38, A). Wurden zusätzlich Fraktion 13 (Abb. 4.32) entsprechende Präparationen der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion analysiert, die aus einer SP-Sepharose-Chromatographie stammten, in der viel solubilisiertes Protein (gewonnen aus ca. 10^9 Zellen) aufgetrennt worden war, konnte auch hier diese Bande nachgewiesen werden (Abb. 4.38 A-C). Zusätzlich ließ sich eine dieser in ihrem MW vergleichbare Bande, bei langer Expositionszeit von Filmen auf mit dem ECL-Reagenz entwickelten Western Blots, auch in durch SP-Sepharose-Chromatographie gewonnenen Enzympräparationen nachweisen, die für die an die SP-Sepharose-Marix bindende Form der ADPRC/NADGH cytosolischen Fraktion der Lymphozyten angereichert waren (Abb. 4.38 B).



IB4 anti-CD38 Western Blot



IB4 anti-CD38 Western Blots

Abb. 4.38: Western Blots zum Nachweis von CD38 in Überständen von anti-CD38-IPs und anti-CD3-Kontroll-IPs sowie in Präparationen der ADPRCs/NADGHs der P100- und der S100-Fraktion von Jurkat-Lymphozyten, die jeweils durch SP-Sepharose-Chromatographie für die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH angereichert waren. A) Eine zweimalige IP der ADPRC/NADGH aus einer durch SP-Sepharose-Chromatographie (3.2.19.3) für die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH angereicherten Enzympräparation (entsprechend Fraktion 13 in Abb. 4.32) der P100-Fraktion wurde entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.2.12 und in der Legende zu Abb. 4.37, an mit dem IB4 anti-CD38 mAK (10 µg je Ansatz) beladenen Protein-G Sepharose-Beads (25 µg je Ansatz) durchgeführt. In einer parallel durchgeführten Kontroll-IP wurde der CD38-spezifische IB4 mAK durch anti-CD3 mAK (OKT3, 10 µg je Ansatz) ersetzt. Die ersten Überstände der zweimaligen IP/Kontroll-IP sowie die für die IP/Kontroll-IP eingesetzte Enzympräparation wurden, jeweils 1:2 mit Probenpuffer verdünnt, unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE in einem 12,5 %igen Trenngel aufgetrennt (150 µl Ansatz je Spur). Anschließend wurde das Protein im Tank-Blotverfahren (3.2.15) auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (*Amersham Pharmacia Biotech*). Zur spezifischen Detektion von CD38 wurde der IB4 anti-CD38 mAK (Endkonzentration 1 µg/ml, Inkubation bei 4 °C über Nacht) verwendet. Der Zweitantikörper, gegen humane Serumproteine präabsorbiertes Ziege anti-Maus IgG (*Santa Cruz Biotechnology*), wurde in der Verdünnung 1:3000 eingesetzt. B) Durch SP-Sepharose-Chromatographie aufgereinigte Präparationen der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion (entsprechend Fraktion 13, Abb. 4.32), bzw. der HA-gereinigten S100-Fraktion (entsprechend Fraktion 10-16, Abb. 4.28) der Lymphozyten wurden, 1:2 mit Probenpuffer verdünnt, unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE in einem 12,5 %igen Gel aufgetrennt (50 µl Probe je Spur) und das Protein anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Entwicklung des Blots unter Verwendung des IB4 anti-CD38 mAKs erfolgte wie

weiter oben (A) beschrieben. C) Eine durch SP-Sepharose-Chromatographie gereinigte Präparation der ADPRC/NADGH der P100-Fraktion (entsprechend Fraktion 13, Abb. 4.32) wurde, 1:2 mit Probenpuffer verdünnt (50 µl Ansatz/Spur), zum Vergleich des MWs der zuvor in dieser Fraktion durch Western Blot detektierten Bande von knapp 50 kDa mit dem MW von monomerem CD38, neben 10 µg von aus Jurkat Lymphozyten gewonnenem P10-Protein aufgetragen. Anschließend wurden die Proben unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE in einem 12,5 %igen Gel aufgetrennt. Western Blot und Entwicklung des Blots unter Einsatz des IB4 anti-CD38 mAKs wurden wie oben (A, B) beschrieben, durchgeführt. Als MW-Standard wurde der Sea Blue Marker (*Novex/Invitrogen*) verwendet.

Und zwar dann, wenn für die Aufreinigung durch SP-Sepharose-Chromatographie genügend durch HA-Chromatographie vorgereinigtes S100-Protein (12 mg) eingesetzt worden war. Ein Größenvergleich des MWs dieser Bande mit der des besonders stark in der P100-Fraktion der Lymphozyten vertretenen CD38-Monomers, ließ ein vergleichbares, eher jedoch etwas größeres MW der Bande in den durch SP-Sepharose-Chromatographie gereinigten Enzympräparationen erkennen (Abb. 4.38 C). Damit kann ein proteolytischer Präparationsartefakt ausgeschlossen werden. Insgesamt verleiten die in diesem Abschnitt dargestellten Daten zu dem Schluß, daß in Enzympräparationen der P100- und der S100-Fraktion der Lymphozyten, die jeweils durch SP-Sepharose-Chromatographie für die an die SP-Sepharose-Matrix bindende Form der ADPRC/NADGH angereichert waren, doch eine zumindest strukturell/immunologisch mit CD38 verwandte ADPRC/NADGH enthalten ist, die CD38 auch in ihrem MW ähnelt. Daß diese ADPRC/NADGH trotz ihrer hohen katalytischen Aktivität (aus der P100-Fraktion angereicherte Variante; Abb. 4.37 A, B) und einer ca. sechsfachen Anreicherung durch SP-Sepharose-Chromatographie (aus P100- und S100-Fraktion angereicherte Varianten) im Western Blot unter Einsatz von anti-CD38 mAKs nur schwach nachweisbar ist, könnte darauf hindeuten, daß dieses Enzym trotz seiner CD38 ähnelnden Eigenschaften nicht vollständig mit dem klassischen CD38-Protein identisch ist. Um dieses Enzym eindeutig zu identifizieren und den Grad seiner Verwandtschaft mit CD38 aufzuklären, müßte es allerdings zunächst in größerer Menge aufgereinigt und im Anschluß daran sequenziert werden. Obgleich L-Plastin aufgrund der derzeitigen Datenlage als potentieller Kandidat einer löslichen/membranassoziierten Form einer ADPRC/NADGH der Jurkat-Lymphozyten steht, ist aufgrund der hier beschriebenen Daten (IPs und Western Blots) nicht auszuschließen, daß in den gereinigten Enzympräparationen außer L-Plastin in Spuren auch katalytisch aktives CD38, bzw. eine CD38-Variante, enthalten ist. Spekulativ könnte es sich bei L-Plastin auch um ein mit CD38 assoziiertes und daher gemeinsam aufreinigendes Protein ohne eigene ADPRC-/NADGH-Aktivität handeln, das die katalytische Aktivität von CD38 (einer CD38-Variante) in ungeklärter Weise moduliert.

5. Diskussion

5.1 Methoden zum Nachweis und einer quantitativen Bestimmung von cADPR und ADPRC-Aktivität

Seit der Entdeckung von cADPR und seinen Calcium freisetzenden Eigenschaften im Seeigeelei [Clapper *et al.* 1987, Lee *et al.* 1989] wurde ein endogenes Vorkommen von cADPR und cADPR-sensitiver intrazellulärer Calciumspeicher in einer Vielzahl von Zellsystemen pflanzlicher und tierischer Herkunft beschrieben [Reviews, Lee 1997 & 1999, Guse 1999]. Die Ubiquität des Vorkommens dieses Botenstoffs läßt darauf schließen, daß es sich bei dem cADPR-vermittelten Signalweg ebenso wie bei dem IP₃-vermittelten Signalweg um ein ubiquitär in Zellen etabliertes Signalsystem zur Regulation/Modulation der [Ca²⁺]_i handelt, in dem cADPR die Rolle eines intrazellulären sekundären Botenstoffs zukommt. Zellsysteme der Vertebraten, in denen die charakteristischen Eigenschaften dieses Signalweges ausführlich untersucht wurden, sind Insulin-produzierende β-Zellen des Pankreas [Takasawa *et al.* 1993a], Azinuszellen des Pankreas [Thorn *et al.* 1994, Cancela *et al.* 2000] und der Parotis [Looms *et al.* 2001] sowie humane T-Lymphozyten [Guse *et al.* 1999]. Kennzeichnende Eigenschaften eines intrazellulären Botenstoffs („Second Messengers“) sind seine Rezeptor-vermittelte Synthese/Freisetzung sowie sein kontrollierter Abbau (seine Inaktivierung) und damit eine Variabilität seiner intrazelluläre Konzentration, die sich stimulationsabhängig dem physiologischen Zustand der Zelle anpaßt. Um diesen Nachweis für cADPR erbringen zu können, wurden verschiedene Methoden zum qualitativen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von cADPR in Zellextrakten sowie der Bestimmung der ADPRC-, NADGH- und cADPR-Hydrolaseaktivität von zellulären Enzympräparationen etabliert. Diese umfassen als indirekte Messmethoden Bioassays zum Nachweis der Ca²⁺-Freisetzung an Oozyten (Seeigeelei-Homogenat) [Clapper *et al.* 1985 & 1987] oder permeabilisierten Zellen [Kuemmerle & Makhlouf 1995], einen Radioimmunoassay (RIA) [Takahashi *et al.* 1995] und neuerdings einen gekoppelten optischen Test („Cycling Assay“) [Graeff & Lee 2002] sowie als direktere Nachweismethoden HPLC mit UV-Detektion [da Silva *et al.* 1998a] und HPLC mit [³²P]cADPR als internem Standard zur Identifikation des cADPR-Peaks [Walseth *et al.* 1991]. Zur sicheren Detektion und einer quantitativen Bestimmung von durch PCA-Extraktion aus Zellextrakten gewonnenem cADPR wurde die HPLC-Methode mit Radioisotopendetektion für [³²P]cADPR mit einem Bioassay zum Nachweis der Ca²⁺-Freisetzung kombiniert [Walseth *et al.* 1991]. Dabei läßt sich die Freisetzung von Calcium durch cADPR mit Standard-cADPR kalibrieren. Zur Messung von

ADPRC-Aktivität wurde zusätzlich unter Nutzung des Ersatzsubstrates NGD und der fluoreszierenden Eigenschaften von cGDPR ein fluorimetrischer Enzymassay etabliert [Graeff *et al.* 1994]. Obgleich die indirekten Methoden zur quantitativen Bestimmung von cADPR mit einer Nachweisgrenze unter 10 pMol (Bioassays und radioaktive HPLC-Methode) bzw. > 100 fMol (RIA) eine geringfügig bis deutlich bessere Sensitivität als die nicht radioaktive HPLC-Methode (Nachweisgrenze für cADPR ca. 10 pMol) aufweisen, stellt der indirekte Nachweis von cADPR potentiell einen Nachteil dar, da die Spezifität mit indirekten Methoden erhaltener Messergebnisse jeweils durch einen Ausschluß unerwünschter Kreuzreaktionen oder Störeffekte nachgewiesen werden muß. Daher sind solche Methoden generell, sofern nicht bereits etabliert und evaluiert, experimentell aufwendig. Einen zusätzlichen Aufwand stellt die Nutzung radioaktiver Verbindungen dar. Für die bislang sensitivste Nachweismethode für cADPR, den RIA, wird neben radioaktiv markiertem cADPR hoher spezifischer Aktivität außerdem ein cADPR-spezifisches Antiserum benötigt, das mit anderen Nukleotiden, die wie β -NAD oder ATP zum Teil in hoher Konzentration (bis ca. 1mM) vorliegen, nicht oder nur geringfügig kreuzreagiert. Nukleotide, die in diesem Konzentrationsbereich (bis niedrig millimolar) nachgewiesenermaßen kreuzreagieren, wie beispielsweise β -NAD, β -NMN und Guaninnukleotide [Takahashi *et al.* 1995], müssen vor Durchführung von Assays unter Einsatz von alkalischer Phosphatase und Phosphodiesterase, Enzymen gegenüber denen cADPR stabil ist, zu den die cADPR-Detektion nicht störenden Basen Adenosin und Guanosin umgesetzt werden. Da die Neu-etablierung indirekter Nachweismethoden inklusive ihrer Validierung aus den oben beschriebenen Gründen aufwendig ist und direkte Nachweismethoden diesen gegenüber als vorteilhaft eingeschätzt wurden, wurden erstere nur mit geringerer Priorität zur Nutzung für die Etablierung eines sensitiven Assays auf ADPRC-Aktivität in Betracht gezogen. Dennoch stellte die geringere Sensitivität der etablierten, auf UV-Detektion basierenden HPLC-Methode [da Silva *et al.* 1998a] zum Nachweis von cADPR ein ernsthaftes Problem sowohl bei der Durchmusterung subzellulärer Fraktionen und partiell gereinigter Enzympräparationen der T-Lymphozyten auf ADPRC-Aktivität als auch bei der pharmakologischen Charakterisierung unterschiedlicher Enzympräparationen mit Hilfe von Inhibitoren der ADPRC-Aktivität dar. Auch der fluorimetrische Enzymassay mit NGD als Substrat bot zur Vermessung zellulärer Extrakte (im Gegensatz zu intakten Zellen) keine Alternative, da die ohnehin nur schwache Fluoreszenz von cGDPR in Gegenwart hoher Konzentrationen an Protein (100 μ g-1 mg) in erheblichem Umfang beeinträchtigt wurde und damit keine exakte Bestimmung der ADPRC-Aktivität von Zellextrakten zuließ. Eine geeignete Alternative

wurde schließlich mit dem RP-HPLC-Enzymassay [Schweitzer *et al.* 2001] erschlossen, der im Ergebnisteil ausführlich beschrieben wurde. Im Rahmen dieses Assays wurde anstelle von β -NAD das selbst bereits fluoreszierende Analogon ϵ -NAD als Substrat der enzymatischen Reaktion verwendet. Zum Nachweis des Substrates und der aus diesem synthetisierten stark fluoreszierenden Produkte wurde Fluoreszenzdetektion eingesetzt. Die Nachweisgrenze dieses Assays für cADPR belief sich auf ca. 1 pMol und lag damit in einem vergleichbaren Sensitivitätsbereich wie die Bioassays und die mit einem Bioassay gekoppelte radioaktive HPLC-Methode (s.o.). Zusätzlich ermöglichte das Fehlen eines unspezifischen Hintergrundes durch (nicht fluoreszierende) zelluläre Nukleotide eine sehr zuverlässige Interpretation der Daten. Nachteile dieser Methode betreffen neben einer fehlenden Eignung zum hier nicht angestrebten Nachweis von zellulärem cADPR prinzipiell die Nutzung eines unphysiologischen Substrates, das zumindest theoretisch nicht unbedingt als Substrat aller potentiell existierenden ADPRCs geeignet sein muß, sowie den Ersatz der PCA-Extraktion von Nukleotiden durch eine Trennung von Nukleotiden und Protein der Assaysansätze durch Ultrafiltration. Letztere erlaubt möglicherweise trotz eines schnellen Herunterkühlens der Reaktionsansätze (bei 0 °C oder -5 °C) keinen exakten Stop der enzymatischen Reaktion zu definierten Zeitpunkten. Da die geringe Substratspezifität jedoch ein charakteristisches Merkmal aller bislang beschriebenen ADPRCs/NADGHs darstellt, in der vorliegenden Arbeit keine kinetischen Untersuchungen des Substratumsatzes von ADPRCs/NADGHs vorgesehen waren und eine bessere methodische Alternative fehlte, wurden diese Nachteile als akzeptabel angesehen. Einen wesentlichen, neben den bereits genannten positiven Eigenschaften besonders herauszustellenden Vorzug dieses Enzymassays gegenüber anderen Assaymethoden stellte angesichts der Tatsache, daß alle bislang bekannten ADPRCs der Vertebraten multifunktionelle Enzyme sind, die Möglichkeit dar, in einer einzigen Analyse neben der ϵ -cADPR-Synthese durch Zellextrakte gleichzeitig auch die ϵ -ADPR-Synthese und die Synthese von ϵ -AMP und ϵ -Adenosin (PPase-Aktivität) quantitativ bestimmen zu können. Die cADPR-Hydrolaseaktivität der ADPRCs/NADGHs der Jurkat T-Lymphozyten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Zur Bestimmung des intrazellulären Gehaltes an endogenem cADPR vor und nach einer spezifischen Stimulation von Zellen könnte sich in Zukunft der kürzlich publizierte gekoppelte optische Test (Cycling-Assay) durchsetzen [Graeff & Lee 2002], obwohl auch dieser eine indirekte Nachweismethode für cADPR ist. Bemerkenswerte und bislang einzigartige Eigenschaften dieses Assays, der trotz eines Verzichts auf Radioaktivität eine dem RIA vergleichbare Sensitivität aufweist (Nachweisgrenze ca. 50 fMol), sind seine simple Handhabbarkeit sowie die Möglichkeit ihn

im Mikromaßstab zur gleichzeitigen Analyse einer Vielzahl von Proben auf einer Mikrotiterplatte einzusetzen. Die Bandbreite der Nutzbarkeit dieses Assays außer zur Bestimmung des endogenen cADPR-Gehaltes in Zellen und Geweben muß sich allerdings noch zeigen. Von Interesse ist hier zum Beispiel, ob seine Spezifität ausreicht und seine Störanfälligkeit gering genug ist, um ihn auch (routinemäßig) zur Durchmusterung von Testsubstanzen auf eine die cADPR-Synthese modulierende Wirkung einsetzen zu können, oder ob die Gegenwart von Fremdsubstanzen seine Spezifität und/oder Sensitivität erheblich mindert.

5.2 Subzelluläre Verteilung von ADPRCs/NADGHs in Jurkat T-Lymphozyten und anderen Zellen

Unter Nutzung des RP-HPLC-Enzymassays konnte sowohl an der Oberfläche intakter Zellen als auch in allen subzellulären Fraktionen der Lymphozyten, den Membranfraktionen P2 (wahrscheinlich für Zellkerne angereichert), P10 (für Mitochondrien angereichert) und P100 (Mikrosomen inklusive der PM) sowie der cytosolischen S100-Fraktion ADPRC- und NADGH-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.2, 4.5 und 4.6). Von den P100-Membranen, nicht jedoch von den P10-Membranen, konnte ein Teil ihrer ADPRC-/NADGH-Aktivität nach einem Protokoll zur Ablösung membranassoziierter, cytosolischer Proteine heruntergewaschen werden (Abb. 4.2). Diese Daten deuteten bereits darauf hin, daß es neben dem Ektoenzym CD38 wahrscheinlich auch eine oder mehrere intrazellulär lokalisierte membranständige und lösliche/membranassozierte ADPRC(s)/NADGH(s) gibt. Die weitaus höchste spezifische Aktivität wurde bemerkenswerterweise nicht in der PM, also in der das Ektoenzym CD38 enthaltenden P100-, sondern in der P10-Fraktion vorgefunden (Abb. 4.6). Ein ähnliches Verteilungsmuster der ADPRC-Aktivität nach subzellulärer Fraktionierung wurde für glatte Muskelzellen der Pulmonararterien beschrieben [Wilson *et al.* 2001]. Durch Western Blot-Analyse konnte in allen Membranfraktionen sowie, sehr schwach, in der S100-Fraktion CD38 nachgewiesen werden. Dieses entsprach in seinem MW exakt dem des Ektoenzym CD38 (42-46 kDa). Zusätzlich wurde in den Fraktionen P10 und P100 (vermutlich) dimeres CD38 (ca. 85 kDa) detektiert (Abb. 4.10, 4.12 und 4.13). Das Vorkommen von CD38-Oligomeren wurde aufgrund seiner von States *et al.* [1992] entdeckten Sequenzhomologie zu den ADPRCs aus *Aplysia spec.*, deren katalytisch aktive Form ein Homodimer ist, vorhergesagt [Prasad *et al.* 1996] und anschließend auch tatsächlich mehrfach durch Western Blot-Analyse in der mikrosomalen Fraktion von Zellen nachgewiesen [Khoo & Chang 1998 und 2002, Chidambaram *et al.* 1998]. Ein Nachweis

katalytisch aktiver CD38-Oligomere wurde in HeLa-Zellen erbracht [Umar *et al.* 1996, Bruzzone *et al.* 1998]. Demnach erscheint es wahrscheinlich, daß CD38 nativ (zumindest auch) als funktionell aktives Oligomer existiert. Überraschend war das Ergebnis, daß zwar rekombinantes CD38, jedoch keine der CD38-Varianten der subzellulären Fraktionen der Jurkat-Lymphozyten durch die gegen C- und N-Terminus von humanem CD38 gerichteten polyklonalen Antiseren detektiert wurde (Abb. 4.12). Dies könnte entweder bedeuten, daß natives CD38 in Lymphozyten in posttranslational modifizierter und deshalb nicht detektierbarer Form vorliegt, oder daß es möglicherweise CD38-Varianten mit einer von der des Ektoenzym abweichenden Primärstruktur gibt. Daß es sich bei den ADPRCs/NADGHs der Lymphozyten aus quantitativer Sicht hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, um CD38 selbst oder (immunologisch) eng mit diesem verwandte Proteine handelt, wird durch die Präzipitierbarkeit dieser Enzyme mit unterschiedlichen anti-CD38 mAKs (Kapitel 4.34) und den in CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten der Maus festgestellten, starken Verlust an ADPRC- und NADGH-Aktivität (Abb. 4.19 und 4.20) gestützt. Allerdings war die ADPRC-Aktivität der S100-Rohfraktion, vereinbar mit der schlechten Detektierbarkeit im Western Blot (Abb. 4.10 und 4.12), in der Tendenz schlechter präzipitierbar als die der Fraktionen P10 und P100. Auch die durch SP-Sepharose-Chromatographie aufgereinigten, an die SP-Sepharose-Matrix bindenden Formen der ADPRC/NADGH der S100 und der P100-Fraktion der Lymphozyten, bei denen es sich (wahrscheinlich) um ein lösliches, bzw. membranassoziertes, aber kein membranintegriertes Enzym handelt, ließen sich schlechter immunpräzipitieren (Abb. 4.37, Tab. 4.8). Auch in subzellulären Fraktionen der CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten der Maus war eine signifikante Restaktivität von ADPRC und NADGH nachweisbar. In Einklang mit den Daten der CD38-Immunpräzipitationen wurde diese insbesondere in der S100-Fraktion (3,4% der spezifischen ADPRC-Aktivität verglichen mit Wildtyp-T-Lymphoblasten) und der für membranassozierte Proteine angereicherten Fraktion PS100 (6,2% der spezifischen ADPRC-Aktivität und 10,5% der spezifischen NADGH-Aktivität der Wildtyp-T-Lymphoblasten) vorgefunden. Damit sind Hinweise darauf gegeben, daß es in den Zellen neben dem mengenmäßig überwiegenden Transmembranprotein CD38, von dem als ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit gezeigt wurde, daß es außer an der Zelloberfläche auch an intrazellulären Membransystemen exprimiert wird, zusätzlich ein weiteres, lösliches/membranassoziertes Protein mit ADPRC-/NADGH-Aktivität gibt, das sich strukturell/immunologisch sowie in einigen weiteren, später diskutierten Aspekten von dem Transmembranprotein unterscheidet. Diese Hinweise werden zusätzlich dadurch gestützt, daß durch Northern Blot-Analysen sowie durch exonspezifische, reverse Transkription mit

nachfolgender Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und rascher Amplifikation der 5'-cDNA-Enden (5'-RACE) keine Anzeichen auf das Vorkommen verkürzter Varianten von CD38 erbracht werden konnten, denen der Transmembrananker fehlt. Alle erhaltenen Amplifikate stimmten mit der mRNA des klassischen CD38-Proteins überein [Gasser 2001].

In welcher Kombination und Weise subzellulär unterschiedlich angeordnete ADPRCs/NADGHs in unterschiedliche, konvergierende oder miteinander verflochtene Signalwege involviert sind, ist zur Zeit noch nicht geklärt. Das intrazelluläre Vorkommen von ADPRCs/NADGHs legt jedoch den Schluß nahe, daß diese Enzyme und nicht das Ektoenzym CD38 für eine stimulierte Synthese des intrazellulär wirksamen Second Messengers cADPR direkt vor Ort verantwortlich sind. Damit ist das in der Literatur als „topologisches Paradox“ beschriebene Problem [Review: *De Flora et al.* 1998] einer extrazellulären Synthese aber intrazellulären Wirkung von cADPR als Ca^{2+} -freisetzender Botenstoff zumindest in seiner generellen Gültigkeit in Frage zu stellen. Wie in der Einleitung bereits angedeutet, wurden intrazellulär lokalisierte, immunologisch zum Teil als CD38 identifizierte ADPRCs/NADGHs inzwischen auch in einer Reihe anderer Zelltypen nachgewiesen. CD38 oder molekular noch nicht identifizierte, cADPR synthetisierende Enzyme wurden beispielsweise in der Kernhülle von Hepatozyten [Khoo *et al.* 2000], Fibroblasten [Adebanjo *et al.* 1999], Neuronen und Epithelzellen des Vertebratenauges [Khoo & Chang 1999] und Zellen der Milz [Khoo & Chang 2002], in Mitochondrien der Leber [Ziegler *et al.* 1997], am Sarkoplasmatischen Retikulum [Mészáros *et al.* 1997], sowie in Assoziation mit verschiedenen Organellen (ER, Mitochondrien, Kern) von Neuronen des ZNS [Mizoguchi *et al.* 1995, Yamada *et al.* 1997] beschrieben. An isolierten Zellkernen wurde zusätzlich eine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von cADPR [Gerasimenko *et al.* 1995] und IP_3 [Nicotera *et al.* 190] nachgewiesen. Auch der IP_3R [Humbert *et al.* 1996] und der RyR [Kern, Adebanjo *et al.* 1999], bzw. nur der RyR [Mitochondrien, Beutner *et al.* 2001], wurden immunologisch in der (inneren) Kernhülle und der inneren Mitochondrienmembran des Rattenherzens detektiert. Für die ADPRC/NADGH der inneren Kernhülle wurde eine Topologie aufgezeigt, bei der das katalytische Zentrum des Enzyms, anders als aufgrund der Topologie des in der PM exprimierten CD38 erwartet, im Nukleoplasma gelegen ist [Adebanjo *et al.* 1999, Khoo *et al.* 2000]. Demzufolge ist hier eindeutig kein topologisches Problem gegeben. Topologie und Expressionsort der mitochondrialen ADPRC/NADGH in der inneren [Lötscher *et al.* 1980, Moser *et al.* 1983, Ziegler *et al.* 1997] oder der äußeren Mitochondrienmembran [Boyer *et al.* 1993] sind dagegen bisher noch nicht mit Sicherheit geklärt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden auch von anderen Autoren nie Unterschiede im MW von intrazellulär

detektiertem CD38 zu dem des Ektoenzym festgestellt. Von daher ist anzunehmen, daß auch die intrazellulären, membranständigen CD38-Varianten glykosyliert sind. Für kernständiges CD38 wurde durch den Nachweis seiner Interaktion mit dem Lektin Concanavalin A auch experimentell ein Hinweis darauf erbracht, daß es sich um ein Glykoprotein handelt [Khoo *et al.* 2000]. Obgleich Glykosylierung lange Zeit als eine für sezernierte Proteine, Proteine der Zelloberfläche und einiger Organellen spezifische Modifikation angesehen wurde, sind O-glykosylierte Proteine inzwischen zahlreich [Review: Haltiwanger *et al.* 1992] und N-glykosylierte Proteine direkt [Pedemonte *et al.* 1990] oder indirekt anhand der Bindung von Lektinen [Review: Willemer *et al.* 1990] vereinzelt auch im Cytosol und im Kernplasma von Zellen nachgewiesen worden. Von daher erscheint eine intrazelluläre Expression von glykosyliertem CD38 durchaus denkbar. Zugunsten dieser Möglichkeit spricht auch, daß anhand von Mutageneseexperimenten, in denen die einzelnen putativen Glykosylierungsstellen selektiv entfernt wurden, sowohl für CD38 [Chidambaram & Chang 1998] als auch für CD157 [Yamamoto-Katayama *et al.* 2001] gezeigt wurde, daß ihr Vorhandensein für die korrekte Faltung, den Transport und die katalytische Aktivität des Proteins wichtig ist.

Insgesamt zeigen die verfügbaren Daten insoweit überzeugend, daß die strukturellen Voraussetzungen für eine intrazelluläre Synthese von cADPR in räumlicher Nähe zu den im Cytosol gelegenen, cADPR-sensitiven Ca²⁺-Speichern nicht nur gestützt durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in T-Lymphozyten postuliert werden, sondern auch in einer Vielzahl anderer Zellen prinzipiell gegeben und zumindest potentiell funktionstüchtig sind. Leider wurde bislang noch keine intrazellulär lokalisierte ADPRC/NADGH aufgrund von Sequenzdaten identifiziert und auf molekularer Ebene im Vergleich zu CD38 charakterisiert. Die immunologische Verwandtschaft der meisten an intrazellulären Membranen lokalisierten ADPRCs/NADGHs mit CD38 und die Tatsache, daß ihre subzelluläre Anordnung und ihre katalytischen Eigenschaften sehr gut mit denen der bereits sehr viel früher im Kern [Green & Dobrjansky 1972, Ueda *et al.* 1975] und in den Mitochondrien [Lötscher *et al.* 1980, Moser *et al.* 1983] nachgewiesenen, ausführlich charakterisierten und zum Teil proteinbiochemisch aufgereinigten NADGHs [Moser *et al.* 1983] übereinstimmen, legen nahe anzunehmen, daß es sich bei vielen dieser Enzyme entweder um authentisches CD38 oder um Varianten dieses Proteins handelt. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurde eine der bestuntersuchten „klassischen (PM-ständigen) NADasen“, die der Rindermilz, inzwischen proteinbiochemisch aufgereinigt und kloniert sowie funktionell und anhand ihrer Primärsequenz eindeutig als bovine Form von CD38 (also als ADPRC/NADGH) identifiziert [Muller-Steffner *et al.* 1996, Augustin *et al.* 2000].

5.3 Pharmakologische und funktionelle Charakterisierung der cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) der T-Lymphozyten

5.3.1 Pharmakologische Charakterisierung der ADPRC(s)/NADGH(s) der S100-Fraktion im Vergleich zum Ektoenzym CD38 und dem membranständigen CD38 der P10-Fraktion

Anhand eines Vergleichs der Wirkung dreier für das Ektoenzym CD38 inhibitorischer Bedingungen auf die katalytische Aktivität der ADPRC/NADGH an der Zelloberfläche intakter Lymphozyten, bzw. in der aus den Lymphozyten gewonnenen HA-gereinigten S100-Fraktion, wurden charakteristische Eigenschaften des cytosolischen Enzyms festgestellt. Während ADPRC- und NADGH-Aktivität beider Enzyme durch araF-NAD gleichermaßen wirksam inhibiert wurden, erwies sich das cytosolische Enzym gegenüber einer (parakatalytischen) Inaktivierung durch alkalischen pH signifikant weniger sensitiv und in Hinblick auf seine ADPRC-Aktivität gegenüber einer Inaktivierung durch DTT sogar nahezu resistent (Abb. 4.14 A, B, D, E). Obgleich beide Unterschiede als Hinweis zu werten sind, daß sich die beiden Proteine unterscheiden, ist insbesondere das selektive Fehlen der inhibitorischen Wirkung von DTT auf die ADPRC-, nicht aber auf die NADGH-Aktivität des Enzyms der S100-Fraktion bemerkenswert. Die NADGH-Aktivität beider Enzyme wurde durch DTT vergleichbar effizient inhibiert. Oberflächlich weist dieses Ergebnis zunächst auf einen möglicherweise unterschiedlichen Gehalt oder eine unterschiedliche Zugänglichkeit von Cysteinen in den beiden Proteinen und auf eine unterschiedliche Bedeutung von Cysteinen in der Struktur und Funktion ihres katalytischen Zentrums hin. Gleichzeitig läßt es jedoch auch eine Möglichkeit zur selektiven Regulation der katalytischen Aktivität des cytosolischen Enzyms in der Weise erkennen, daß das Verhältnis von ADPRC- und NADGH-Aktivität dieses Enzyms unter verstärkt reduzierenden Bedingungen zugunsten der cADPR-Synthese verschoben werden kann. In der Wirkung kommt dies einer Aktivierung der cADPR-Synthese gleich. Als physiologischer cytosolischer Regulator könnte anstelle von DTT reduziertes Glutathion (GSH) dienen. Eine Redoxregulation der katalytischen Aktivität einer ADPRC/NADGH wurde interessanterweise auch schon in einem anderen Zellsystem beschrieben: In glatten Muskelzellen der Pulmonararterie wird die cADPR-Hydrolaseaktivität einer intrazellulären ADPRC/NADGH durch β -NADH, bzw. eine Hypoxie-vermittelte Abnahme des Ratios von β -NAD/ β -NADH inhibiert. Gleichzeitig bewirkt eine Hypoxie in diesen Zellen eine etwa 10-fache Zunahme des sekundären Botenstoffs cADPR, der über den RyR Ca^{2+} aus dem ER/SR freisetzt. Dieser Mechanismus wurde als Ursache für das medizinisch relevante Syndrom der Vasokonstriktion der Pulmonararterie unter hypoxischen

Bedingungen interpretiert [Wilson *et al.* 2001]. Auch in β -Zellen des Pankreas wurde eine Beeinflussung/Steigerung der cytosolischen cADPR-Synthese über den Reduktionsstatus der Zellen und eine dadurch vermittelte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und Sekretion von Insulin indirekt nahegelegt [Han *et al.* 2002]. Die Auffassung der Autoren dieser Arbeit, daß der cytosolischen Synthese von cADPR zunächst eine Sekretion von intrazellulär synthetisiertem GSH, dessen Synthese zuvor pharmakologisch stimuliert wurde, vorausgeht, das dann eine Internalisierung des katalytisch aktiven Ektoenzym CD38 bewirkt, wird von mir allerdings nicht geteilt. Eher ist in oben geschilderter, direkterer Weise von einer Aktivierung der cADPR-Synthese einer intrazellulär lokalisierten ADPRC/NADGH durch GSH auszugehen, bei der es sich um eine Variante von CD38 handeln könnte.

Ein Vergleich der Wirkung der drei für das membranständige CD38 inhibitorischen Bedingungen auf die ADPRC aus *A. californica* mit der auf die cytosolische ADPRC/NADGH der T-Lymphozyten erbrachte keine nennenswerten Erkenntnisse, da das als Prototyp einer löslichen ADPRC eingesetzte *Aplysia*-Enzym in seinen Eigenschaften mehr Ähnlichkeit mit dem CD38-Ektoenzym als mit der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion der Lymphozyten zeigte (Abb. 4.14 A-F). Insofern ist die *Aplysia*-ADPRC, bei der es sich außerdem um die bislang einzige vollständig gereinigte und klonierte ADPRC/(NADGH) mit eindeutig nachgewiesener, die NADGH-Aktivität bei weitem überwiegender ADPRC-Aktivität handelt, auch in diesem Zusammenhang als ein eigenständiger Vertreter der Enzymklasse der ADPRCs/NADGHs mit für dieses Protein charakteristischen Eigenschaften anzusehen. Die Eigenständigkeit der *Aplysia*-ADPRC in ihrem pharmakologischen Profil kommt zusätzlich auch darin zum Ausdruck, daß hochwirksame Inhibitoren dieses Enzyms (Bp_2A , Ip_2I und Ap_2A) mit IC_{50} -Werten von 189 nM (Bp_2A) bis 12 μ M (Ip_2I) [Migaud *et al.* 1999] zur Inhibition aller (auch der membranständigen) ADPRCs/NADGHs der Jurkat-Lymphozyten bis zu einer Endkonzentration von 100 μ M vollkommen unwirksam waren. Letzteres kann als Beispiel dafür betrachtet werden, daß sich auf molekularer Ebene nachgewiesenermaßen eng verwandte Enzyme (membranständiges CD38 und die lösliche *Aplysia*-ADPRC) in ihrem pharmakologischen Profil dennoch stark unterscheiden können. Bei einem nachfolgend weiter ausgedehnten Vergleich der Wirkung diverser Testsubstanzen auf cADPR- und ADPR-Synthese von membranständigem CD38 der P10-Fraktion einerseits und der löslichen ADPRC/NADGH der S100-Fraktion andererseits, wurden überwiegend starke Ähnlichkeiten aber auch einige weitere Unterschiede in den pharmakologischen Eigenschaften dieser Enzyme aufgezeigt (Abb. 4.15-4.17). So wurde das cytosolische Enzym im Gegensatz zu CD38 schwach, jedoch signifikant durch den PARP-Inhibitor 3-

Aminobenzamid inhibiert (Abb. 4.15 und 4.16 E, F). Dagegen beschränkte sich eine schwache inhibitorische Wirkung einer hohen Konzentration (1 mM) an ADPR ausschließlich auf das membranständige CD38 (Abb. 4.15 und 4.16 G, H). Beide Enzyme wurden vergleichbar effektiv durch NHD ($IC_{50}=9-43 \mu\text{M}$), Nikotinamid ($IC_{50}=70-90 \mu\text{M}$) und β -NMN ($IC_{50}=0,85-1 \text{ mM}$) inhibiert (Abb. 4.15 und 4.16 A-D). Die zusätzlich durchgemusterten Varianten des effektivsten Inhibitors NHD (6-Thio-NHD, 7-Deaza-NHD und 8-Br-NHD; Abb. 5.1 B) waren, wenngleich deutlich schwächer, ebenfalls inhibitorisch wirksam (Abb. 4.15, 4.16 und 4.17 A, B.). Von letzteren war insbesondere 8-Br-NHD (Abb. 4.17 A, B) interessant, da es sich bei dieser Substanz um eine membranpermeante Verbindung handelt. Bei allen dieser wirksamen Testsubstanzen stimmte das Ausmaß der inhibitorischen Wirkung auf cADPR- und ADPR-Synthese jeweils näherungsweise überein.

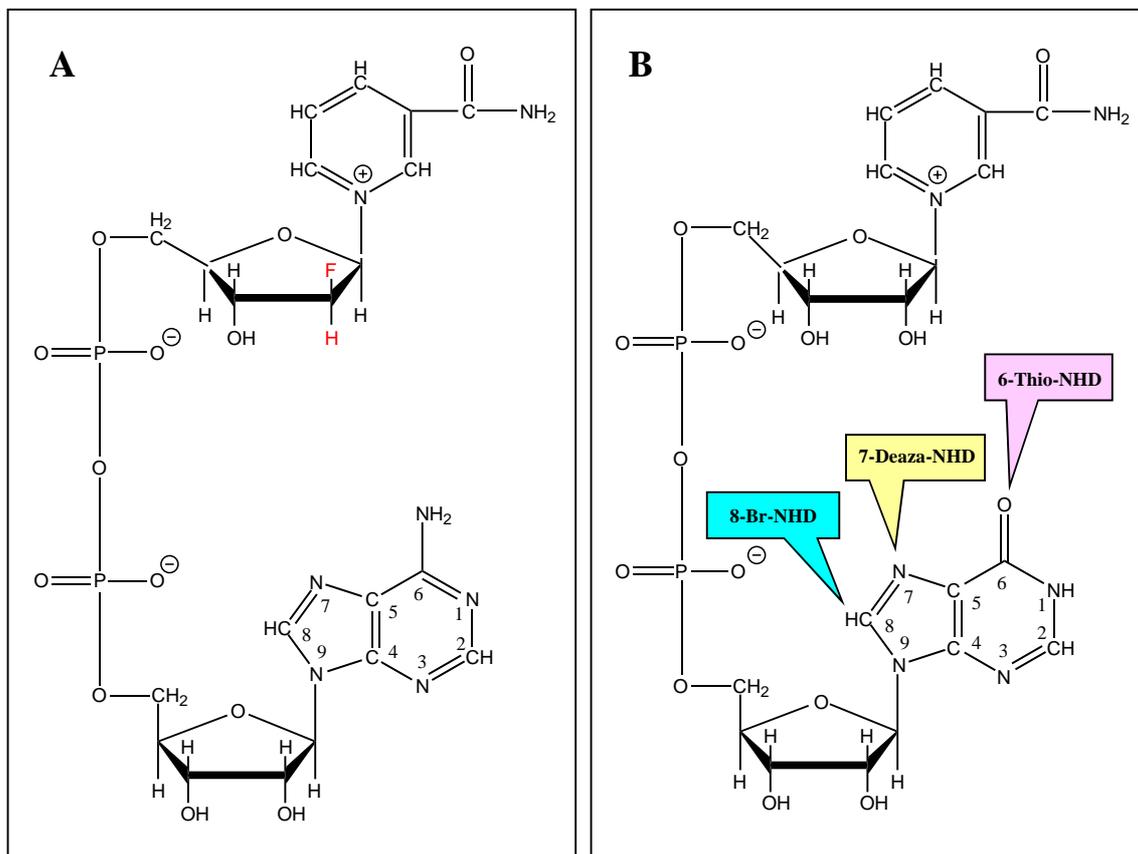


Abb. 5.1: Struktur der ADPRC- und NADGH-Inhibitoren araF-NAD und NHD. (A) Struktur von araF-NAD, einem nicht membranpermeanten effizienten ($IC_{50}=1,69 \text{ nM}$) und reversiblen Inhibitor der ADPRC- und NADGH-Aktivität von Säugetier-NADasen, der langsame Bindungseigenschaften aufweist [Sleath et al. 1991, Muller-Steffner et al. 1992]. (B) Struktur von NHD, einem ebenfalls wirksamen, ($IC_{50}=9-43 \mu\text{M}$) nicht membranpermeanten Inhibitor der cADPR- und ADPR-Synthese durch ADPRCs/NADGHs der Jurkat T-Lymphozyten. Zusätzlich sind ebenfalls auf ihre Wirksamkeit als Inhibitoren hin untersuchte Varianten von NHD dargestellt. Dabei handelt es sich bei 6-Thio-NHD ($IC_{50}=95->100 \mu\text{M}$) und 7-Deaza-NHD ($IC_{50}>100 \mu\text{M}$), wie bei NHD, um nicht membranpermeante Verbindungen, wohingegen 8-Br-NHD ($IC_{50}=85-190 \mu\text{M}$) ein membranpermeanter Inhibitor von ADPRC- und NADGH-Aktivität der Lymphozyten ist. Die NHD-Derivate wurden chemoenzymatisch synthetisiert und freundlicherweise von Prof. Potter (University of Bath/UK) zur Verfügung gestellt. Weitere Angaben im Text sowie in den Abb. 4.7, 4.14, 4.15 (A, B), 4.16 (A, B) und 4.17.

Eine schwache Inhibition der katalytischen Aktivität beider Enzyme zeigte weiterhin ATP (Abb. 4.15 und 4.16 G, H). Auch für ATP wurde im untersuchten Konzentrationsbereich (10-100 μM) jedoch keine Selektivität in der Wirkung auf ADPRC- und NADGH-Aktivität festgestellt. Die fehlende Selektivität der inhibitorischen Wirkung von ATP und ADPR auf cADPR- und ADPR-Synthese durch die ADPRCs/NADGHs der Jurkat-Lymphozyten steht im Gegensatz zu Daten, die mit ADPRCs/NADGHs anderer Zellen erhoben wurden. Im Seeigelei wurde eine selektive Inhibition der ADPR-Synthese durch geringe Konzentrationen an ADPR (10-100 μM) gezeigt. Bei höheren Konzentrationen an ADPR ($\text{IC}_{50}=500 \mu\text{M}$) wurde eine Freisetzung von Ca^{2+} aus cADPR-sensitiven Ca^{2+} -Speichern festgestellt [Genazzani *et al.* 1996]. In Hinblick auf ADPRCs/NADGHs höherer Organismen wurde bislang keine der beiden Wirkungen von ADPR beschrieben. In β -Zellen des Pankreas wurde eine selektive Inhibition der ADPR-Synthese durch hohe Konzentrationen (1-10 mM; $\text{IC}_{50}=5 \text{ mM}$) an ATP nachgewiesen [Takasawa *et al.* 1993b]. Allerdings ist die intrazelluläre Konzentration an ATP, die normalerweise bei ca. 1 mM liegt [Gribble *et al.* 2000], in diesen Zellen im Zuge der Verstoffwechslung von Glukose mit 2-8 mM [Takasawa *et al.* 1993b], bzw. 3-5 mM [Gribble *et al.* 2000] auch unter physiologischen Bedingungen hoch. Insofern könnte es sich bei der Regulation der katalytischen Aktivität von CD38 durch ATP um einen für diesen Zelltyp spezifischen Mechanismus handeln. Einem etablierten Modell zufolge resultiert der glykolytische und oxidative Abbau aus dem Blut aufgenommener Glukose in β -Zellen des Pankreas zunächst in einer Steigerung der cytosolischen Konzentration an ATP. Durch Stimulation von Ca^{2+} -Einstrom (Inhibition von K^+ -Kanälen, dadurch bedingte Öffnung von VOCCs) und cADPR-vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Stimulation der cADPR-Synthese durch Inhibition der NADGH-Aktivität von CD38) bewirkt ATP eine Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Letztere bewirkt dann eine Sekretion von Insulin [Review: Okamoto 1999]. In β -Zellen einer etablierten CD38 (-/-)-Maus [Kato *et al.* 1999] wurden unter den Bedingungen einer hohen Blutkonzentration an Glukose eine um ca. 93% verminderte Synthese von cADPR sowie ein verminderter Glukose-stimulierter Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und eine reduzierte Insulinsekretion nachgewiesen [Kato *et al.* 1999]. Diese Daten legen nahe, daß es sich bei der in die Insulinsekretion pankreatischer β -Zellen involvierten ADPRC/NADGH um eine Form von CD38 handelt. Wie in T-Lymphoblasten (Ergebnis der vorliegenden Arbeit) war jedoch auch in den β -Zellen dieser Maus verglichen mit aus Wildtyp-Mäusen gewonnenen Zellen noch eine Restaktivität an cADPR- (ca. 7%) und ADPR-Synthese (ca. 4%) nachweisbar. Damit sind auch diese Daten mit der Existenz einer weniger abundanten, aber von CD38 unabhängigen ADPRC/NADGH vereinbar, der

allerdings im Rahmen der Steuerung der Insulinsekretion keine herausragende Bedeutung zuzukommen scheint [Kato *et al.* 1999]. Zusammenfassend konnten trotz vieler gemeinsamer Eigenschaften der ADPRC/NADGH der S100-Fraktion der Lymphozyten mit membranständigem CD38 einige charakteristische Eigenschaften des cytosolischen Enzyms aufgezeigt werden. Diese Eigenschaften stellten einen weiteren Hinweis, jedoch keinen Beweis dafür dar, daß dieses Enzym möglicherweise nicht mit CD38 identisch ist.

5.3.2 Untersuchung der Bedeutung des Ektoenzym, bzw. intrazellulär lokalisierter ADPRCs/NADGHs für die TCR/CD3-Komplex vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und die Proliferation von T-Lymphozyten

In Übereinstimmung mit den Daten einer vorangegangenen Publikation [da Silva *et al.* 1998b], in der gezeigt worden war, daß durch das Ektoenzym CD38 an der Oberfläche intakter Lymphozyten extrazellulär synthetisiertes cADPR außerhalb der Zellen verbleibt und keinen Zugang zu intrazellulär gelegenen cADPR-sensitiven Ca^{2+} -Speichern besitzt, zeigte eine wirksame Inhibition/Inaktivierung des Ektoenzym durch DTT, araF-NAD, oder parakatalytische Inaktivierung bei alkalischem pH (pH 8,5; Abb. 4.7 A-C) keinerlei signifikante Wirkung auf die durch OKT3 (anti-CD3 mAK) stimulierte, über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 4.9 A, C). Insbesondere auch nach einer mehr als 95 %igen Inhibition der katalytischen Aktivität des Ektoenzym durch den potentesten verfügbaren Inhibitor araF-NAD (500 nM, Abb. 4.7 A; Struktur von araF-NAD, Abb. 5.1 A) war keine signifikante Minderung des durch spezifische Stimulation der Lymphozyten ausgelösten, biphasischen Ca^{2+} -Signals feststellbar (Abb. 4.9 A, C). Eine Stimulation der Lymphozyten mit β -NAD, dem Substrat des Ektoenzym für die extrazelluläre cADPR-Synthese, war, wie zuvor beschrieben [da Silva *et al.* 1998b], ungeeignet, um mittels einer potentiellen Internalisierung von cADPR, bzw. ADPRC-Aktivität, eine signifikante Steigerung der globalen $[Ca^{2+}]_i$ der Zellen zu bewirken (Abb. 4.9 B, D). Im Kontext der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte Internalisierung des katalytisch aktiven Ektoenzym CD38 unter den zur Inhibition seiner katalytischen Aktivität eingesetzten experimentellen Bedingungen zudem als Erklärung für das Fehlen der inhibitorischen Wirkung dieser Bedingungen auf das über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Ca^{2+} -Signal ausgeschlossen werden. Infolge einer Inaktivierung des Ektoenzym bei pH 8,5 oder der Inhibition seiner katalytischen Aktivität durch araF-NAD, war seine Oberflächenexpression, nachgewiesen durch FACS-Analyse, in keiner Weise beeinträchtigt (Abb. 4.8). Im Anschluß an eine Vorinkubation der Zellen mit DTT war in Übereinstimmung

mit den Daten verschiedener Publikationen [Zocchi *et al.* 1995, 1996 und 1999] zwar eine Abnahme der Oberflächenexpression von CD38 nachweisbar (Abb. 4.8). Diese wurde aber in gleichzeitiger Gegenwart von β -NAD ohne Wiederherstellung der katalytischen Aktivität des Ektoenzym in nennenswertem Umfang unterdrückt (Abb. 4.8). Von daher war auch nach Vorbehandlung der Zellen mit DTT und einer anschließenden Stimulation der Zellen mit OKT3 keine Korrelation zwischen der Internalisierung des (inhibierten) Ektoenzym, das intrazellulär auf noch ungeklärte Weise reaktiviert werden könnte [Zocchi *et al.* 1996], und der Ausprägung des cytosolischen Ca^{2+} -Signals gegeben. Damit stützten diese Daten insgesamt die Hypothese, daß das über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Ca^{2+} -Signal nicht von der Fähigkeit des an der Zelloberfläche exprimierten CD38 zur cADPR-Synthese abhängig ist und daß an der cADPR-vermittelten Komponente dieses Ca^{2+} -Signals somit eine oder mehrere intrazellulär lokalisierte ADPRs/NADGHs beteiligt sind. In diesem Zusammenhang weisen neuere, bereits publizierte Daten darauf hin, daß über das Zelloberflächenmolekül CD38 vermittelte Signale, von denen gezeigt wurde, daß sie an der Steuerung von Zellfunktionen wie Proliferation *versus* Apoptose, Differenzierung und der Sekretion von Cytokinen beteiligt sind, von der katalytischen Aktivität des Proteins unabhängig sind [Lund *et al.* 1999]. Durch Einführung unterschiedlicher Mutationen in CD38 der Maus und Analyse dieser Mutanten in einem Modellsystem für B-Lymphozyten wurde in der zitierten Arbeit nachgewiesen, daß die extrazelluläre Domäne von CD38 zur Weiterleitung von Signalen ins Zellinnere zwar notwendig ist, daß dies aber nicht mit der Fähigkeit des Proteins korreliert, cADPR oder ADPR zu synthetisieren. Daraus wurde abgeleitet, daß eine durch Bindung von Liganden, beispielsweise β -NAD, ausgelöste Konformationsänderung von CD38 ein Signal darstellen könnte, das dann durch Interaktion des in diesem Fall als Korezeptor fungierenden Enzyms mit Signalkomplexen, wie dem B-Zell-Rezeptorkomplex [Lund *et al.* 1996 und 1999], weitergeleitet wird. Eine strukturelle Interaktion von CD38 mit Zelloberflächenrezeptoren wurde außer für den B-Zell-Rezeptorkomplex (s.o.) auch für den TCR/CD3-Komplex [Zubiaur *et al.* 1999] und für CD16 der NK-Zellen [Deaglio *et al.* 2002] nachgewiesen. Im Rahmen einer solchen Signalgebung könnte Internalisierung von CD38 eine Möglichkeit zur (negativen) Regulation, bzw. zur Regenerierung des Rezeptormoleküls (CD38) darstellen, wie es von Funaro *et al.* [1998] vorgeschlagen wurde. Um eine Beteiligung intrazellulär lokalisierter ADPRs/NADGHs an der Ausbildung des über den TCR/CD3-Komplex vermittelten Ca^{2+} -Signals nachzuweisen, wurde die membranpermeante Verbindung 8-Br-NHD synthetisiert und genutzt, die mit vergleichbarer Effizienz (IC_{50} zwischen 85 und 190 μM) ADPR- und NADGH-Aktivität

sowohl des CD38-Ektoenzym und des membranständigen CD38 der P10-Fraktion als auch der cytosolischen ADPRC/NADGH der Lymphozyten inhibierte (Abb. 4.17 A, B). Wurden intakte T-Lymphozyten nach Vorinkubation in Gegenwart dieser Substanz mit OKT3 mAK über den TCR/CD3-Komplex stimuliert, war in Abhängigkeit von der eingesetzten 8-Br-NHD-Dosis und in klarem Gegensatz zu Experimenten, in denen ausschließlich das CD38-Ektoenzym inhibiert wurde (Abb. 4.9 A, C), eine deutliche Abnahme in der Intensität des ausgelösten biphasischen Ca^{2+} -Signals ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ [nM]) feststellbar (Abb. 4.17 C-E). Während die initiale Peakphase der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nur schwach, im Anschluß an eine Vorinkubation der Zellen in Gegenwart von 500 μM 8-Br-NHD jedoch ebenfalls signifikant inhibiert wurde, war die inhibitorische Wirkung auf die langanhaltende Plateauphase der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stärker ausgeprägt und bereits in signifikanter Weise nachweisbar, wenn 8-Br-NHD in einer Endkonzentration von 250 μM eingesetzt wurde (Abb. 4.17 D, E). In ihrem Ausmaß entsprach die inhibitorische Wirkung von 8-Br-NHD auf die anhaltende Phase des Ca^{2+} -Signals sehr gut derjenigen, die unter Einsatz des ebenfalls membranpermeanten cADPR-Antagonisten 7-Deaza-8-Bromo-cADPR [Sethi et al. 1997] auf die gleiche Phase des Ca^{2+} -Signals erzielt wurde [Guse et al. 1999]. Dies stützt die Annahme, daß die inhibitorische Wirkung beider Substanzen auf die über den TCR/CD3-Komplex vermittelte Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tatsächlich auf eine selektive Inhibition des cADPR/ Ca^{2+} -Signalweges zurückzuführen ist. Im einen Fall wird diese durch Konkurrenz um die Bindungsstelle am cADPR Rezeptor (RyR; 7-Deaza-8-Bromo-cADPR) und im anderen Fall durch Inhibition der cADPR-Synthese durch eine oder mehrere intrazellulär exprimierte ADPRCs/NADGHs erreicht (8-Br-NHD). Daß es sich bei der inhibitorischen Wirkung von 8-Br-NHD nicht um einen unspezifischen Effekt oder eine toxische Wirkung handelt, wurde jeweils durch eine zweite Stimulation mit 8-Br-NHD vorinkubierter und unbehandelter Kontrollzellen mit Thapsigargin im Anschluß an die erste Stimulation mit OKT3 belegt (Abb. 4.17 C, F, G). Da zwischen unbehandelten und mit 8-Br-NHD vorinkubierten Zellen kein signifikanter Unterschied in der durch Inhibition der SERCAs vermittelbaren Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, daß auch die Ca^{2+} -Speicher der vorbehandelten Zellen prinzipiell intakt und depletierbar waren. In Verbindung mit den zuvor diskutierten Daten, denen zufolge nach einer effektiven aber ausschließlichen Inhibition der katalytischen Aktivität des Ektoenzym CD38 keine Wirkung auf das über den TCR/CD3-Komplex stimulierte Ca^{2+} -Signal festgestellt werden konnte, belegen die mit 8-Br-NHD als dem ersten wirksamen membranpermeanten Inhibitor aller ADPRCs/NADGHs der Lymphozyten erzielten Ergebnisse erstmals in direkter Weise schlüssig, daß an der Ausbildung dieses Ca^{2+} -Signals nicht das

Ektoenzym sondern intrazelluläre ADPRC(s)/NADGH(s) beteiligt sind. Bei diesen kann es sich prinzipiell sowohl um CD38-Varianten als auch um nicht mit diesem Protein verwandte, andere Enzyme handeln. In Abgrenzung zur vollständigen Inhibition der Proliferation der Lymphozyten, die verglichen mit einer nur ca. 50 %igen Inhibition der Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 4.17 E) bereits bei einer ca. 5-fach niedrigeren Endkonzentration (100 μM) an 8-Br-NHD erzielt wurde (Abb. 4.18), war eine komplette Inhibition des OKT3-stimulierten Ca^{2+} -Signals auch nicht zu erwarten, da an dessen Ausbildung bekanntermaßen mehrere verschiedene Signalwege und Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoffe (mindestens IP_3 , cADPR und NAADP) in konzertierter Weise beteiligt sind [Guse *et al.* 1999, Berg *et al.* 2000]. Insofern sind prozentuale Angaben zur inhibitorischen Wirkung von 8-Br-NHD auf die $[Ca^{2+}]_i$ mit Vorbehalt zu sehen. Das von Guse *et al.* [1999] und Berg *et al.* [2000] vorgeschlagene Modell zur zeitlich abgestuften, sequentiellen Wirkung der Botenstoffe NAADP, cADPR und IP_3 bei der Ausbildung des TCR/CD3-Komplex-stimulierten, biphasischen Ca^{2+} -Signals in T-Lymphozyten wurde bereits in der Einleitung beschrieben. In wesentlichen Aspekten stimmt dieses Modell mit dem überein, das die Entstehung des durch Cholecystokinin stimulierten Ca^{2+} -Signals in Azinuszellen des Pankreas beschreibt [Cancela *et al.* 2000]. Eine Erklärung für die verglichen mit der Inhibition der katalytischen Aktivität der ADPRCs/NADGHs zur Inhibition des Ca^{2+} -Signals benötigten hohen Endkonzentrationen an 8-Br-NHD ($IC_{50}=500$ μM , bzw. 85-190 μM ; Abb. 4.17 A-E, Tab. 4.4) ist damit gegeben, daß die Substanz zur Ausübung ihrer Wirkung auf das Ca^{2+} -Signal zunächst in die intakten Zellen hineindiffundieren muß. Die Effizienz der Aufnahme von 8-Br-NHD in die Zellen und seine durch Vorinkubation erzielte intrazelluläre Endkonzentration sind bislang nicht bekannt. Bei der Inhibition der Proliferation, die sich trotz der notwendigen Aufnahme des Inhibitors in die Zellen als sehr effizient erwies, handelt es sich dagegen um eine Langzeitwirkung, was als Ursache für den für die Inhibition der Proliferation ermittelten, niedrigen IC_{50} -Wert von 19 μM gewertet werden kann. Zudem kann in Bezug auf diese Wirkung nicht ausgeschlossen werden, daß neben intrazellulären Signalwegen, an denen cADPR beteiligt ist, zusätzlich noch weitere inhibiert werden, die für die Proliferation und das Überleben der Zellen von essentieller Bedeutung sind. Hier ist insbesondere an eine potentielle Nebenwirkung auf solche Signalwege zu denken, an denen mit den ADPRCs/NADGHs verwandte Enzyme, wie die PARPs oder ARTs beteiligt sind. Für PARP wurde bereits nachgewiesen, daß sie durch verschiedene Purinbasen, darunter auch Hypoxanthin, inhibiert wird [Virág & Szabó 2001]. Da verschiedene Publikationen nahelegen, daß auch NAADP durch ADPRCs/NADGHs synthetisiert wird [Aarhus *et al.* 1995, Sauve *et al.* 1998, Chini *et al.* 2002, Review: Lee

1999], kann weiterhin zur Zeit nicht ausgeschlossen werden, daß eine Inhibition der cADPR- und ADPR-Synthese dieser Enzyme auch gleichzeitig eine Inhibition der NAADP-Synthese bewirkt. Letzteres gilt insbesondere in Anbetracht der Tatsache, daß für CD38 gezeigt wurde, daß die beiden Botenstoffe cADPR(P) und NAADP sowie das cADR(P)-/ β -NAD(P)-Hydrolyseprodukt ADPR(P) beim katalytischen Umsatz des Substrates β -NAD(P) mechanistisch als prinzipiell gleichwertige Reaktionsprodukte aus einem gemeinsamen Zwischenprodukt entstehen [Sauve et al. 1998]. Eine (essentielle?) Funktion von cADPR/ einer ADPRC bei der Regulation des Zellzyklus (der Proliferation) wurde aber außer in T-Lymphozyten zum Beispiel auch in *Euglena gracilis* beschrieben [Masuda et al. 1997].

5.3.3 Modelle der funktionellen Bedeutung intrazellulärer ADPRCs/NADGHs, bzw. des Ektoenzym CD38

Insgesamt sprechen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten klar für eine Existenz intrazellulär gelegener ADPRCs/NADGHs und eine essentielle Bedeutung dieser Enzyme oder eines dieser Enzyme bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der über den TCR/CD3-Komplex stimulierten Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$, die eine der Voraussetzungen der Proliferation und Aktivierung von Effektorfunktionen der T-Lymphozyten darstellt. Dabei sind die exakte subzelluläre Anordnung verschiedener ADPRCs/NADGHs, beispielsweise im Kern, im ER/SR, in den Mitochondrien oder im Cytosol, und ihr molekulares Verhältnis zu CD38 noch ungeklärt. Als ein entscheidendes Ergebnis dieser Arbeit kann jedoch als sicher gelten, daß membranständige Varianten von CD38 (oder authentisches, membranständiges CD38) gemessen an ihrer Abundanz auch intrazellulär den Hauptanteil der ADPRCs/NADGHs der Lymphozyten stellen. Anhand der bislang erhobenen Daten kann daher noch nicht entschieden werden, ob diese Enzyme und/oder ein cytosolisches/membranassoziertes Enzym noch ungeklärter Identität an der Ausbildung des über den TCR/CD3-Komplex vermittelten Ca^{2+} -Signal beteiligt sind/ist. Prinzipiell ist eine funktionelle Bedeutung intrazellulärer ADPRCs/NADGHs aber mit einer Reihe von Daten vereinbar, die in anderen Zellsystemen, beispielsweise an β -Zellen des Pankreas, glatten Muskelzellen der Pulmonararterie sowie an Azinuszellen des Pankreas und der Parotis erhoben wurden. Obgleich für manche dieser Zellsysteme das Vorkommen intrazellulärer ADPRCs/NADGHs nicht direkt postuliert (β -Zellen und Azinuszellen des Pankreas) oder schlüssig nachgewiesen wurde (β -Zellen des Pankreas und Azinuszellen der Parotis), sind die in diesen Zellen beschriebenen cADPR-vermittelten Signalwege jeweils ebenfalls besser mit einer intrazellulären cADPR-Synthese als einer solchen durch das Ektoenzym CD38 vereinbar (Abb. 5.2).

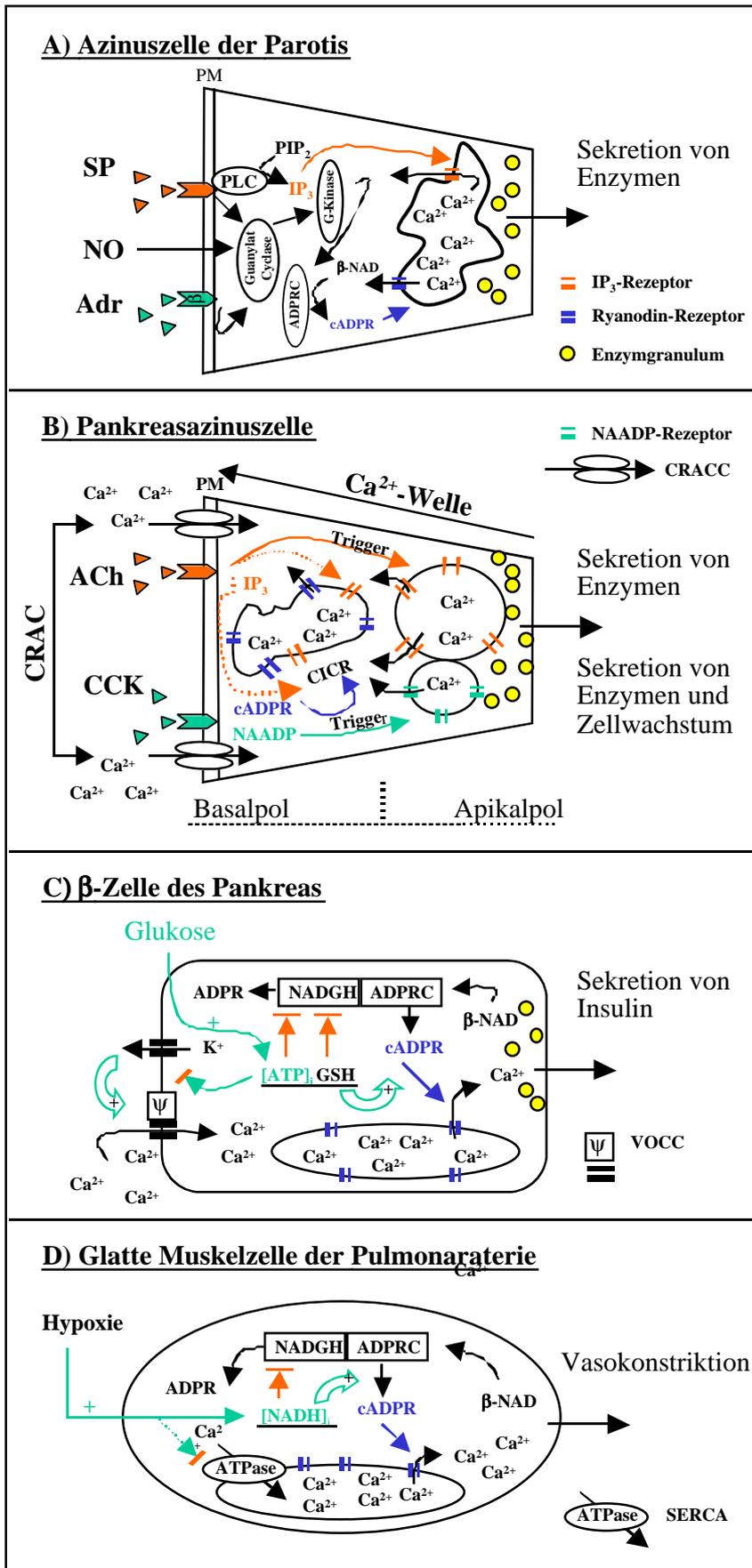


Abb. 5.2: cADPR-vermittelte Signalwege in Zellen. A) Enzymsekretion durch Azinuszellen der Parotis. Durch membranpermeantes Stickstoffmonoxid (NO) oder durch Stimulation von Zelloberflächenrezeptoren für Substanz P (SP), bzw. Adrenalin (Adr), wird über Guanylatcyclase, cGMP und G-Kinase (PKG) eine ADPRC aktiviert. cADPR und IP₃, dessen Synthese durch SP ebenfalls stimuliert wird, setzen Ca²⁺ aus dem ER frei und fördern so die Sekretion [Looms et al. 2001]. B) Enzymsekretion durch Azinuszellen des Pankreas. Durch Rezeptorstimulation mit Acetylcholin (ACh) oder Cholecystokinin (CCK) wird Trigger-Ca²⁺ durch IP₃ (ACh), bzw. NAADP (CCK), aus cytosolischen Ca²⁺-Speichern freigesetzt. Das Trigger-Ca²⁺ erleichtert in Kooperation mit den Rezeptoragonisten IP₃ und cADPR die CICR-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung über IP₃- und Ry-(cADPR-)Rezeptoren. Die jeweils generierten lokalen (ACh) oder globalen (CCK) Ca²⁺-Signale fördern die Sekretion von Enzymen (ACh und CCK) und das Wachstum der Zellen (CCK) [Cancela et al. 2000]. C) Insulinsekretion durch beta-Zellen des Pankreas. Glukoseaufnahme aus dem Blut und intrazellulärer Abbau von Glukose bewirken einen Anstieg der cytosolischen Konzentration an ATP. ATP inhibiert einen K⁺-Kanal und fördert dadurch, mittels einer Depolarisation der Zellen, den Einstrom von Ca²⁺ über die PM. Zusätzlich wird durch Stimulation einer ADPRC/NADGH zur cADPR-Synthese (Inhibition der NADGH-Aktivität) Ca²⁺-Freisetzung im Cytosol bewirkt. Der Anstieg der [Ca²⁺]_i fördert die Insulinsekretion [Review: Okamoto 1999; Han et al. 2002]. D) Hypoxie-vermittelte Vasokonstriktion der Pulmonararterie. Hypoxie bewirkt einen Anstieg der intrazellulären NADH-Konzentration zu Lasten von NAD. Dadurch wird eine intrazelluläre ADPRC/NADGH zur cADPR-Synthese aktiviert. Durch cADPR freigesetztes Ca²⁺ bewirkt eine Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen und infolgedessen Vasokonstriktion. Zusätzlich werden durch Hypoxie direkt die SERCAs inhibiert. [Wilson et al. 2001]

Weitere Abkürzungen: CRAC(C); durch Ca²⁺-Freisetzung aktivierter Ca²⁺-Einstrom(kanal); CICR, Ca²⁺-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung; GSH, reduziertes Glutathion; PLC, Phospholipase C; PIP₂, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; PM, Plasmamembran; SERCAs, Ca²⁺-ATPasen des ER/SR; VOCC, spannungsabhängiger Ca²⁺-Einstromkanal

Dabei steht eine im Zellinneren erfolgende cADPR-Synthese durch topologisch möglicherweise korrekt orientierte, intrazellulär lokalisierte ADPRs/NADGHs, deren katalytisches Zentrum direkt in cytosolischen Kompartimenten oder mit diesen in Verbindung stehenden subzellulären Bereichen (z.B. im Zwischenraum zwischen den beiden mitochondrialen Membranen) gelegen ist, möglicherweise nur scheinbar im Widerspruch zu von *De Flora et al.* [Review 2002] publizierten, schon in der Einleitung erwähnten Daten, die eine intrazelluläre Wirkung von extrazellulär synthetisiertem cADPR betreffen. Im Zuge einer Inkubation mit extrazellulärem cADPR wurde in verschiedenen Zelltypen, darunter hämatopoetische Vorläuferzellen [*Podesta et al.* 2000, *Zocchi et al.* 2001a], 3T3-Fibroblasten [*Franco et al.* 2001a], Astrozyten des Hippocampus [*Verderio et al.* 2001] und glatte Muskelzellen der Trachea [*Franco et al.* 2001b], eine Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ sowie eine Förderung der Proliferation oder anderer zellspezifischer Funktionen nachgewiesen. Vergleichbare Effekte wurden durch Transfektion von CD38 in CD38-negative 3T3 Fibroblasten und HeLa-Zellen [*Zocchi et al.* 1998] und durch eine durch die Bindung von Liganden forcierte Internalisierung des Ektoenzym CD38 erzielt [*Zocchi et al.* 1999]. Zusammenfassend legten diese Daten anfänglich die Interpretation nahe, daß das Ektoenzym CD38 (auch) aufgrund seiner extrazellulären cADPR-Synthese regulär an intrazellulären Signalwegen beteiligt ist. Bei Gesamtbetrachtung der Daten [Review: *De Flora et al.* 2002] wird jedoch klar, daß diese lediglich spezielle Signalwege zur basalen Regulation der $[Ca^{2+}]_i$, Proliferationsrate und Reaktionsbereitschaft von Zellen betreffen, die von über Rezeptoren wie dem TCR/CD3-Komplex stimulierten Ca^{2+} -Signalen weitgehend unabhängig sind. Für diese Auffassung spricht, daß sich die Amplitude der über eine autokrine/parakrine Wirkung von cADPR bewirkten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in einem Bereich von maximal 100 nM bewegt [Review: *De Flora et al.* 2002]. Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ dieser Amplitude reichen zur Ausbildung globaler Ca^{2+} -Signale, wie beispielsweise während der T-Zell-Aktivierung (Amplitude mehrere 100 nM), jedoch nicht aus. Die kleine Amplitude basaler Ca^{2+} -Signale wird dadurch erreicht, daß eine Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ über die Aktivierung von PKC und eine durch dieses Enzym vermittelte Serinphosphorylierung von Connexin(Cx) 43 ein Verschließen der β -NAD-transportierenden Cx 43-Halbkanäle bewirkt [*Bruzzone et al.* 2001b]. Neben einer toxischen Überladung mit Ca^{2+} verhindert das regulierte Schließen der Halbkanäle gleichzeitig einen übermäßigen Verlust an β -NAD. Insgesamt ist damit eine Koexistenz dieses Signalweges mit solchen, an denen intrazellulär lokalisierte ADPRs/NADGHs beteiligt sind, nicht grundsätzlich auszuschließen. Die physiologische Relevanz und Ubiquität der Expression autokriner/parakriner

Signalwege von cADPR in unterschiedlichen Zellsystemen bleibt allerdings weiterhin zu klären.

5.4 Versuch einer proteinbiochemischen Aufreinigung der löslichen cytosolischen ADPRC(s)/NADGH(s) der Jurkat T-Lymphozyten

Die proteinbiochemische Aufreinigung/Anreicherung der löslichen, cytosolischen und durch HA-Chromatographie vorgereinigten ADPRC/NADGH der T-Lymphozyten erwies sich als unerwartet schwierig, da es mit kaum einer der durchgemusterten Chromatographiemethoden und Säulenmatrices gelang, einen größeren Anteil der ADPRC- und/oder NADGH-Aktivität der cytosolischen Fraktion zu binden. Verglichen mit der Abtrennung adhärerender Proteine war die Bindung des Enzyms selbst wünschenswerter, da letztere in der Regel in einem besseren Anreicherungsfaktor resultiert. Obwohl sich die ADPRC/NADGH der S100-Fraktion auch nach diesem Reinigungsschritt quantitativ in der Durchlauffraktion befand, war eine zunächst durchgeführte Chromatographie an HA dennoch nützlich, da mit ihrer Hilfe eine nahezu vollständige Abtrennung ADPR degradierender Nukleotid-Pyrophosphatasen gelang. Ausgehend von der zunächst bestehenden Annahme, daß die S100-Fraktion zum überwiegenden Teil das lösliche Enzym enthält, stellte ein wesentliches Kriterium zur Auswahl weiterer chromatographischer Reinigungsmethoden anfangs ihre Eignung zur Anreicherung des Hauptanteils der ADPRC-Aktivität dieser Fraktion dar. Mit guter Gesamtausbeute an eingesetzter katalytischer Aktivität (Tab. 4.8) wurde dieses Kriterium eigentlich nur durch Chromatographie unter sauren pH-Bedingungen (pH 5) an SP-Sepharose-HP erfüllt. Da unter diesen Bedingungen, auch bei Einsatz von Detergenz, außer der ADPRC/NADGH auch ein Großteil anderer S100-Proteine an diese Säulenmatrix band, fiel der Anreicherungsfaktor der spezifischen Aktivität (ca. 6) auch bei diesem Reinigungsschritt nur relativ gering aus. Obwohl auch bei der Chromatographie an SP-Sepharose-HP keine Trennung von ADPRC- und NADGH-Aktivität gelang, ein Indiz dafür, daß beide katalytischen Aktivitäten auf ein bifunktionelles/multifunktionelles Enzym wie CD38 zurückzuführen sind, konnten unter Einsatz dieser Chromatographie-Methode zwei Formen von ADPRCs/NADGHs unterschieden werden, von denen nur eine, nämlich die lösliche ADPRC/NADGH der cytosolischen Fraktion, bzw. die wahrscheinlich mit dieser identische, membranassoziierte ADPRC/NADGH der P100-Fraktion an die Säulenmatrix band. Das in den Membranfraktionen P10 und P100 enthaltene CD38-Transmembranprotein verblieb dagegen in der Durchlauffraktion. Eine zur weiteren Aufreinigung des löslichen Enzyms zunächst für vielversprechend gehaltene Affinitätschromatographie an Cibacron Blue-

Sepharose, einer Affinitätsmatrix für NAD(P)/NAD(P)H-bindende Proteine [Thompson & Stellwagen 1975], stellte sich unter den eingesetzten Versuchsbedingungen als unbrauchbar heraus, da während dieser Chromatographie nahezu die gesamte katalytische Aktivität des Enzyms verloren ging. Dieses Ergebnis überraschte, da bereits verschiedene NADasen erfolgreich an dieser Affinitätsmatrix angereichert wurden [Schuber & Pascal 1977, Yost & Anderson 1981, Kim et al. 1993a und b, Muller-Steffner et al. 1993, Masuda et al. 1999]. Mindestens zwei Möglichkeiten zur Optimierung dieser Methode stehen allerdings noch offen: Geht man von einer sehr starken Bindung des Enzyms an die Cibacron Blue-Affinitätsmatrix aus, könnten stringendere Elutionsbedingungen, beispielsweise unter Einsatz von KCN anstelle von KCl zur Elution der katalytischen Aktivität erforderlich sein (Dr. M. Ziegler/Berlin, persönliche Mitteilung). Bei Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber hohem Salzgehalt könnte außerdem eine biospezifische Elution mit β -NADH (10 mM) [Schuber & Pascal 1977], das im Gegensatz zu β -NAD kein Substrat bekannter ADPRCs/NADGHs ist, und für das, anders als für β -NAD keine inhibitorischen Eigenschaften auf die ADPRC-Aktivität beschrieben sind, erfolgreich sein. Andererseits ließ die beobachtete Entfärbung der Affinitätsmatrix in Gegenwart von Detergenz, dessen Einsatz zur Solubilisierung der ADPRC/NADGH notwendig war, auf ein Ausbluten des Liganden (Cibacron Blue) schließen, der in nanomolarer Konzentration ein hochwirksamer Inhibitor verschiedener multifunktionaler NADGHs wie CD38 ist [Schuber & Pascal 1977, Yost & Anderson 1981, Kim et al. 1993a]. Im Falle einer zwar erfolgreichen Elution der cytosolischen ADPRC/NADGH mit β -NAD (1-20 mM) oder KCl (2 M), aber einer gleichzeitigen, mit dem Nachweis des Enzyms interferierenden Inhibition seiner katalytischen Aktivität durch freies Cibacron Blue, wäre als Lösung des Problems daher die Verwendung einer anderen Matrix denkbar, an die der Farbstoff in irreversibler oder zumindest stabilerer Weise gekoppelt ist. Die starke Interaktion von CD38, beispielsweise bovines CD38 [Schuber & Pascal, 1977, Muller-Steffner et al. 1993, Augustin et al. 2000] und membranständiges CD38 der Jurkat-Lymphozyten (eigene Daten), mit Cibacron Blue ist als solche bemerkenswert, da CD38 zwar eine noch nicht identifizierte (atypische) Dinukleotidbindungsstelle besitzen muß, diese aber nicht der bekannten „Rossmann-Faltung“ [Rossmann et al. 1974; Review: Bellamacina et al. 1996] entspricht, von der angenommen wird, daß sie für die spezifische Bindung von Proteinen an Cibacron Blue verantwortlich ist [Thompson & Stellwagen 1975].

Insgesamt erwies sich die Hypothese als falsch, daß sowohl die cytosolische als auch die für cytosolische, membranassoziierte Proteine angereicherte Fraktion der Jurkat-Lymphozyten, gemessen an der katalytischen Gesamtaktivität, überwiegend eine lösliche und von CD38

verschiedene ADPRC/NADGH enthält. Wie die mit CD38 (-/-) T-Lymphoblasten der Maus erhobenen Daten zeigen (Abb. 4.20 A), ist auch in diesen Fraktionen der Hauptanteil der ADPRC- und NADGH-Aktivität auf CD38 zurückzuführen. In Hinsicht auf humane T-Lymphozyten, werden diese Daten durch die Ergebnisse von CD38-IPs mit dem AT1 anti-CD38 mAK gestützt: Sowohl aus den nicht weiter aufgereinigten Rohfraktionen (komplettes P100 und S100; Abb. 4.23, Tab. 4.7) als auch aus der durch HA- und SP-Sepharose-Chromatographie gereinigten S100-Fraktion (nicht gezeigt) und der nur durch SP-Sepharose-Chromatographie gereinigten P100-Fraktion (Abb. 4.37 B, Tab. 4.9) konnte der überwiegende Teil (Abb. 4.23, Tab. 4.7), bzw. ein Großteil der ADPRC- und NADGH-Aktivität (Abb. 4.37 B, Tab. 4.9), an mit dem anti-CD38 mAK beladenen Protein G-Sepharose Beads angereichert werden. Dennoch konnte sowohl in CD38 (-/-) T-Lymphoblasten der Maus als auch in durch IP an CD38 depletierten Proteinextrakten der Jurkat-Lymphozyten reproduzierbar eine signifikant meßbare Restaktivität der cADPR- und ADPR-Synthese nachgewiesen werden. Insbesondere die an CD38 (-/-) T-Lymphoblasten der Maus erhobenen Daten deuten stark darauf hin, daß diese Restaktivität auf ein oder mehrere von CD38 verschiedene Enzyme zurückzuführen ist. Wie bereits zuvor erwähnt, wurde eine Restaktivität der gleichen Größenordnung auch in pankreatischen β -Zellen einer anderen CD38 (-/-)-Maus nachgewiesen [Kato *et al.* 1999]. In verschiedenen Geweben der in der vorliegenden Arbeit verwendeten CD38 (-/-)-Maus wurde ebenfalls ein nennenswerter Gehalt an cADPR nachgewiesen [Partida-Sánchez *et al.* 2001]. Dieser belief sich verglichen mit dem in aus wt-Mäusen gewonnenen Geweben auf Werte zwischen 10% in der Milz, bzw. 40-50% in Thymus, Knochenmark und Lunge und ca. 80% in Niere, Herz und Hirn [Partida-Sánchez *et al.* 2001]. Auch dies kann als Hinweis gewertet werden, daß es neben CD38 und dem eng mit diesem verwandten Ektoenzym CD157 noch eine oder mehrere andere ADPRC(s) /NADGH(s) gibt.

Der starke Hintergrund an katalytischer Aktivität von CD38 in allen subzellulären Fraktionen der Lymphozyten, auch in denen, die für lösliche cytosolische oder membranassoziierte cytosolische Proteine angereichert sind, macht deutlich, daß ein spezifischer Nachweis der katalytischen Aktivität einer nicht mit CD38 identischen ADPRC/NADGH in Rohfraktionen schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, und daß eine selektive Aufreinigung eines solchen Enzyms außerordentlich schwierig ist. Offensichtlich ist es in unstimulierten Zellen entweder in nur geringer Abundanz vertreten oder aber mit einer nur sehr schwachen basalen Aktivität versehen. Auch wenn das Ausmaß der katalytischer Aktivität von CD38 in cytosolischen Extrakten der Lymphozyten unerwartet war, ist zur Erklärung eine (Rest-)Kontamination der

lediglich durch differentielle Zentrifugation gewonnenen Extrakte mit Membranen und intrazellulären Transportvesikeln vorstellbar. Auch von letzteren ist bekannt, daß sie CD38 enthalten [Zocchi *et al.* 1996, Funaro *et al.* 1998, Zocchi *et al.* 1999]. Weiterhin kann eine proteolytische Freisetzung der katalytisch aktiven extrazellulären Domäne von CD38 trotz des Einsatzes von Proteaseinhibitoren und der kontinuierlichen Kühlung von Zellhomogenaten und subzellulären Fraktionen während der Gewinnung der cytosolischen Extrakte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies insbesondere vor dem Hintergrund, daß in der Literatur bereits ein unter physiologischen Bedingungen auftretendes und wahrscheinlich durch eine Metallo- oder eine Serinprotease katalysiertes Abstreifen der extrazellulären Domäne von CD38 beschrieben wurde [Funaro *et al.* 1996]. Eine in ihrem MW der mono- oder dimeren extrazellulären Domäne von CD38 entsprechende, lösliche und katalytisch aktive Form von CD38 konnte unter physiologischen und pathologischen Bedingungen in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden [Funaro *et al.* 1996, Mallone *et al.* 1998]. Vorläufige an Jurkat-Lymphozyten erhobene Daten lassen erkennen, daß ein proteolytisches Abstreifen des Ektoenzym auch auf diesen Zellen unter physiologischen Bedingungen, bzw. während der Inkubation der Zellen bei 37 °C im Vorwege einer subzellulären Fraktionierung, stattfindet und daß dieses kaum durch die im Rahmen der subzellulären Fraktionierung der Zellen verwendeten Proteaseinhibitoren inhibiert wird (Daten nicht gezeigt). Von dem artifiziellen Vorkommen einer verkürzten, löslichen Form von CD38 in den cytosolischen Extrakten ist demnach prinzipiell auszugehen. Obwohl ein Protein der erwarteten Größe (ca. 39 kDa [Funaro *et al.* 1996]) durch Western Blot-Analyse auch schwach in Überständen intakter Lymphozyten nachweisbar war (Daten nicht gezeigt), lieferte es in Western Blots mit cytosolischen Proteinextrakten niemals eine intensive Bande. In weiter aufgereinigten für ADPRC- und NADGH-Aktivität angereicherten Proteinfractionen wurde in keinem Fall eine Bande dieses MWs detektiert. Demnach stellte proteolytisch solubilisiertes, eigentlich membranständiges CD38 bei der Aufreinigung der (in ihrer Existenz postulierten) physiologisch löslichen, cytosolischen ADPRC/NADGH der Lymphozyten zumindest kein besonders schwerwiegendes Problem dar.

Vor dem Hintergrund der jetzt vorliegenden Daten erscheinen grundsätzlich zwei Strategien sinnvoll, um trotz der geschilderten Schwierigkeiten eine proteinbiochemische Reinigung und molekulare Identifikation der löslichen, wahrscheinlich nicht mit CD38 identischen ADPRC/NADGH zu erreichen. Die in gewisser Hinsicht einfachere und aufgrund ihrer Aussagekraft wahrscheinlich überzeugendere Strategie wäre eine proteinbiochemische Aufreinigung des Enzyms aus CD38 (-/-) T-Lymphozyten der Maus, die von vorneherein kein

CD38 exprimieren. Ein Problem stellt hier jedoch die Gewinnung einer für die Aufreinigung und molekulare Identifizierung des Enzyms ausreichenden Zellzahl ($> 2 \cdot 10^9$ Zellen) dar. Diese kann nicht direkt aus Mäusen gewonnen, jedoch durch eine Expansion aus Milzen isolierter Zellen in Primärkultur (Material und Methoden, Abschnitt 3.2.2) erreicht werden. Der konventionellere, auf der weiteren Nutzung von Jurkat-Lymphozyten basierende Ansatz, hätte zunächst eine effiziente proteinbiochemische Abtrennung von CD38 aus cytosolischen Zellextrakten zum Ziel. Da CD38 ein Glykoprotein ist, eine cytosolische ADPRC/NADGH aber mit einiger Wahrscheinlichkeit nicht, könnte eine Vorreinigung der Extrakte an einer Lektinsäule, beispielsweise an einer mit Concanavalin A substituierten Säulenmatrix [Muller-Steffner *et al.* 1993, Kim *et al.* 1993b], sinnvoll sein. Eine weitere spezifische Eigenschaft von CD38, die möglicherweise im Rahmen einer Affinitätschromatographie genutzt werden könnte, ist der Besitz dreier funktioneller Bindungsmotive für Hyaluronat [Nishina *et al.* 1994]. Die lösliche *Aplysia*-ADPRC besitzt beispielsweise nur ein solches Bindungsmotiv, das außerdem funktionell inaktiv ist [Nishina *et al.* 1994]. In Anbetracht der in der vorliegenden Arbeit gezeigten, verglichen mit membranständigem CD38 nur schwachen Inhibition der löslichen, ADPRC/NADGH der Lymphozyten durch DTT, die auf einen geringeren Gehalt oder eine schlechtere Zugänglichkeit von Cysteinresten dieses Enzyms verglichen mit CD38 hindeutet, könnte zu einer Trennung dieses Enzyms von CD38 auch eine Chromatographie an einer Säule mit immobilisiertem Kupfer (Cu^{2+}) hilfreich sein. Für CD38 wurde eine zur chromatographischen Reinigung nutzbare Affinität zu immobilisiertem Cu^{2+} nachgewiesen [Zocchi *et al.* 1993]. Diese wurde ursächlich auf den hohen Gehalt an Cysteinen im CD38-Protein zurückgeführt, die für eine koordinative Bindung divalenter Kationen, neben Cu^{2+} beispielsweise auch Zn^{2+} , in geeigneter Weise angeordnet sind [Zocchi *et al.* 1993]. Für beide Ionen wurde außerdem eine steigernde Wirkung auf die ADPRC-Aktivität von CD38 festgestellt [Zocchi *et al.* 1993, Kukimoto *et al.* 1996]. Schließlich wurde auch unter einigen in der vorliegenden Arbeit eingesetzten chromatographischen Methoden und Bedingungen eine partielle Bindung der ADPRC-Aktivität der S100-Fraktion an unterschiedlich substituierte Säulenmatrices festgestellt, was potentiell auf eine Eignung dieser Methoden/Bedingungen zur Trennung der löslichen, cytosolischen ADPRC/NADGH von CD38 hindeuten könnte. Insofern könnte auch eine erneute Überprüfung dieser Methoden und Bedingungen, zu denen eine Chromatographie an Q-Sepharose bei pH 7,0 und eine Chromatographie an Heparin-Sepharose im pH-Bereich zwischen 5,5 und 7 gehören (Tab. 4.8), sinnvoll sein. Allerdings war die Gesamtausbeute an ADPRC-Aktivität bei Nutzung dieser Säulenmatrices mit meist nur ca. 50% der eingesetzten katalytischen Aktivität eher

gering (Tab. 4.8, Ergebnisteil). Eine Abwägung der unterschiedlichen Möglichkeiten zur Fortführung der Aufreinigung und die Erarbeitung eines besseren, unabhängigen oder eines erweiterten Reinigungsschemas für die lösliche und die membranassoziierte Form der cytosolischen, wahrscheinlich nicht mit CD38 identischen ADPRC/NADGH werden Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Dabei ist die Resistenz löslicher ADPRCs/NADGHs gegenüber einer proteinbiochemischen Aufreinigung auch aus anderen Zellsystemen bekannt. So konnte beispielsweise die lösliche ADPRC des Seeigels, die eines der zuerst entdeckten Enzyme dieser Kategorie ist, trotz intensiver Bemühungen bislang nicht in reiner Form gewonnen und anhand von Sequenzdaten charakterisiert werden (*Prof. H.C. Lee*, persönliche Mitteilung über *Prof. Guse*). Ein aus dem in der vorliegenden Arbeit etablierten, mit Sicherheit suboptimalen Reinigungsprotokoll hervorgegangener Kandidat für das in T-Lymphozyten zur Identifizierung und molekularen Charakterisierung gesuchte, lösliche Enzym, für den der definitive Nachweis seiner Fähigkeit zur cADPR-Synthese noch aussteht, ist das cytosolische Protein L-Plastin. Dieses wird nachstehend als Kandidat einer löslichen ADPRC/NADGH diskutiert.

5.5 L-Plastin und andere Kandidaten einer cytosolischen, löslichen oder membranassoziierten ADPRC/NADGH in T-Lymphozyten

Mit dem Protein L-Plastin wurde im Rahmen des Versuchs die lösliche/membranassoziierte cytosolische Variante einer ADPRC/NADGH der Lymphozyten auf proteinbiochemischem Wege aufzureinigen ein Kandidat gefunden, der viele der aufgrund von experimentellen Daten für dieses Enzym postulierten Eigenschaften aufweist. Zu diesen gehören eine gewisse Hydrophobizität, die als Erklärung für die festgestellte Notwendigkeit des Einsatzes von Detergenz dienen kann, ein saurer IEP unter pH 6 (IEP = 5,3 [*Lin et al.* 1988], bzw. 5,6 [*Rosales et al.* 1994]) und die Tatsache, daß L-Plastin ein cytosolisches Protein ist [*Goldstein et al.* 1985, *Lin et al.* 1988], das in Abhängigkeit von Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ im physiologischen Bereich (nM bis μ M) sowohl in löslicher als auch in unlöslicher, mit filamentösem Aktin (F-Aktin) assoziierter Form vorliegen kann [*Pacaud & Harricane* 1987, *Namba et al.* 1992, *Pacaud & Derancourt* 1993] und somit translozierende Eigenschaften aufweist. Dabei bewirkt ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ eine Ablösung von L-Plastin von F-Aktin [*Namba et al.* 1992, *Pacaud & Derancourt* 1993]. Die im Rahmen der zur Identifizierung des aufgereinigten Proteins durchgeführten Proteinsequenzierungen festgestellte Tatsache, daß das gereinigte Protein am N-Terminus blockiert ist, stimmt ebenfalls mit Literaturdaten zu L-Plastin überein [*Matsushima et al.* 1988, *Zu et al.* 1990a, *Shinomiya et al.* 1995]. Weiterhin ist

L-Plastin ein leukozytenspezifisches Protein, das bereits in normalen Zellen, insbesondere aber in leukämischen Zell-Linien konstitutiv in starker Abundanz vertreten ist [Lin *et al.* 1988, Zu *et al.* 1990a]. Letzteres wurde zunächst als Indiz dafür gewertet, daß dieses Protein eher keine ADPRC/NADGH ist. Alle anderen aufgereinigten und zur Sicherheit ebenfalls durch Sequenzierung identifizierten Proteine erwiesen sich aber als deutlich schlechtere Kandidaten, da ihr Elutionsprofil bei der Chromatographie an SP-Sepharose nicht, wie bei L-Plastin gegeben, exakt mit der Elution der katalytischen Aktivität übereinstimmte und es sich bei diesen Proteinen zudem mit Ausnahme von Rho-GDI, das immerhin ein in intrazelluläre Signalwege involviertes Protein ist, um ubiquitär exprimierte Proteine/Enzyme handelte, die an grundlegenden zellulären Stoffwechselwegen beteiligt sind (GAPDH und α -Enolase). Für GAPDH und für α -Enolase, die eine immunologische Kreuzreaktion mit CD38 aufwies, wurde durch Vermessung der käuflich erworbenen, reinen Enzyme im Enzymassay außerdem gezeigt, daß sie keine Fähigkeit zur cADPR- und/oder ADPR-Synthese aufweisen. Auch wenn dies als Beweis möglicherweise nicht ausreicht, da es verschiedene Isoformen beider Enzyme gibt, legt der negative Nachweis der genannten katalytischen Aktivitäten zumindest nahe, daß diese Enzyme keine bislang unerkannte Nebenfunktion als ADPRC/NADGH ausüben. Da die aus Jurkat-Lymphozyten gereinigten Proteinfractionen nur in Coomassiegefärbten Gelen analysiert wurden, diese Proteinfärbung in ihrer Sensitivität jedoch begrenzt ist (Nachweisgrenze 0,1-2 μ g Protein je Bande) [Dechert 1999], ist allerdings prinzipiell nicht auszuschließen, daß unter den detektierten und durch Sequenzierung identifizierten Banden oder an anderer Stelle im Gel weitere, nicht nachgewiesene/identifizierte Proteine verborgen waren, von denen eines (oder mehrere) für die ADPRC- und NADGH-Aktivität der Proteinfractionen verantwortlich war(en). Auch eine erfolgreiche Identifizierung einer Proteinbande durch MS-Sequenzierung schließt die Gegenwart weiterer Proteine in derselben Bande nicht sicher aus, sofern diese Proteine beim zuvor durchgeführten tryptischen Verdau im Gel keine zur Sequenzierung geeigneten Peptide lieferten. Aufgrund der Tatsache, daß bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Dr. F. Buck durchgeführten Sequenzierungen jeweils nahezu alle sequenzierbaren Peptide dem jeweils identifizierten Protein zugeordnet werden konnten und auch bei gezielt durchgeführter Suche in keinem Fall Peptide gefunden wurden, die von CD38 hätten stammen können, sind diese Daten als hochgradig sicher anzusehen. Allerdings sind in der Literatur Hinweise zu finden, daß CD38 zu den Proteinen gehören könnte, die sich einem tryptischen Verdau im Gel entziehen [Alessio *et al.* 1990]. Unabhängig davon erwies sich L-Plastin als ein interessantes und als Kandidat der bislang unidentifizierten löslichen ADPRC/NADGH potentiell vielversprechendes Protein. So wurde

von diesem Protein bereits gezeigt, daß es in humanen T-Lymphozyten [Henning *et al.* 1994], in humanen Neutrophilen [Rosales *et al.* 1994] und in Makrophagen der Maus [Shinomiya *et al.* 1991 & 1994] auf bisher ungeklärte Weise in intrazelluläre Signalwege involviert ist, die mit zellulären Funktionen wie Proliferation [Henning *et al.* 1994], Zellaktivierung im Sinne des Erwerbs von Effektorfunktionen [Henning *et al.* 1994, Rosales *et al.* 1994, Shinomiya *et al.* 1991] und einer Adhäsion mittels Integrinen in Zusammenhang stehen [Jones *et al.* 1998, Wang & Brown 1999, Wang *et al.* 2001]. Auf in diesem Kontext interessante strukturelle Eigenschaften von L-Plastin, zusammenfassend in Abb. 4.31 dargestellt, die neben zwei putativen Aktin-Bindungsdomänen, die im Zentralbereich des Proteins gelegen sind, in seinem Kopfstück zwei Bindungsstellen des EF-Hand-Typs für Ca^{2+} , ein Calmodulin-Bindungsmotiv sowie drei potentielle Serinphosphorylierungsstellen umfassen, wurde bereits im Ergebnisteil eingegangen. In ruhenden humanen T-Lymphozyten wurde Serinphosphorylierung von L-Plastin als ein in der frühen Phase der Lymphozytenaktivierung einsetzendes Ereignis beschrieben, das im Sinne der Vermittlung eines Zweitsignals für eine erfolgte Kostimulation des TCR/CD3-Komplexes charakteristisch ist und dessen Eintritt sowohl über das Oberflächenmolekül CD2 als auch über die mit dem TCR/CD3-Komplex quervernetzten Corezeptoren CD4 oder CD8 vermittelt werden kann [Henning *et al.* 1994]. Eine das Hauptsignal (Erstsignal) für die Lymphozytenaktivierung darstellende Stimulation des TCR/CD3-Komplexes alleine bewirkte den Daten der zitierten Autoren zufolge dagegen keine Serinphosphorylierung von L-Plastin. Hervorzuheben ist dabei, daß eine alleinige Stimulation über den TCR/CD3-Komplex kein neutrales Ereignis darstellt, sondern in Abwesenheit eines Zweitsignals eine Anergie, der Lymphozyten bewirkt. Diese beinhaltet, das die Zellen auf eine erneute Stimulation nicht mehr reagieren, auch wenn diese Erst- und Zweitsignal umfaßt. Demzufolge stellt die Serinphosphorylierung von L-Plastin in T-Lymphozyten möglicherweise ein spezifisches Ereignis über Korezeptoren des TCR/CD3-Komplexes stimulierter Signalwege dar. Die Kinetik der Phosphorylierung von L-Plastin, die den Daten der Autoren zufolge erstmals 10-15 Min. nach erfolgter Stimulation nachweisbar war, korrelierte gut mit funktionellen Merkmalen der späten Phase der Lymphozytenaktivierung, zu denen die Aufnahme von Effektorfunktionen, darunter die Sekretion von IL-2, und eine Steigerung der Proliferation der T-Lymphozyten gehören [Henning *et al.* 1994]. Damit wurde eine besondere Bedeutung von L-Plastin/phosphoryliertem L-Plastin in der langanhaltenden Phase der Aktivierung von T-Lymphozyten nahegelegt, in der auch dem Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoff cADPR durch seine steigernde Wirkung auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine wichtige Bedeutung in diesen Zellen zukommt [Guse *et al.* 1999]. In humanen Neutrophilen

wurde gezeigt, daß ein von dem intrazellulären Botenstoff IP_3 unabhängiges, über den IgG $F_c\gamma$ -Rezeptor stimuliertes Ca^{2+} -Signal zeitgleich mit einer selektiven Alkylierung von L-Plastin durch die Substanz Bromphenacylbromid (BPB) und seine vermutlich dadurch bedingte Inaktivierung inhibiert werden kann [Rosales *et al.* 1994]. Parallel zur Inhibition des über den IgG $F_c\gamma$ -Rezeptor vermittelten Ca^{2+} -Signals und der Alkylierung von L-Plastin bewirkt BPB in Neutrophilen auch eine Inhibition der über den IgG $F_c\gamma$ -Rezeptor vermittelter Effektorfunktionen wie Phagozytose, Degranulation und Adhäsion der Zellen [Rosales *et al.* 1994]. Damit weisen diese Daten indirekt auf eine in ihrem Mechanismus noch ungeklärte Funktion von L-Plastin bei der Entstehung IP_3 -unabhängiger intrazellulärer Ca^{2+} -Signale hin, zu denen unter anderen auch die durch cADPR vermittelten Ca^{2+} -Signale gehören.

Ein in der vorliegenden Arbeit auf die beschriebenen Daten hin durchgeführter Sequenzvergleich von L-Plastin mit CD38 und CD157 zeigte, daß L-Plastin in zwei Abschnitten seiner Aminosäuresequenz (AS 84-168 und AS 235-242) Homologie zu den beiden ADPRCs/NADGHs aufweist, wobei die Homologie zu CD157 stärker ausgebildet ist (Abb. 5.3). Bemerkenswerterweise umfaßt der größere der beiden Sequenzbereiche in CD38 und CD157, zu denen Homologie besteht, neben einem Teil der von Exon 2 des CD38-Gens codierten Aminosäuresequenz den gesamten von Exon 3 codierten Sequenzabschnitt, von dem bekannt ist, daß er für die katalytische Aktivität des Ektoenzym von wesentlicher Bedeutung ist (Abb. 4.11 mit Legende). In diesem Abschnitt der Primärsequenz ist auch das Signaturmotiv von CD38 gelegen [Grimaldi *et al.* 1995], das in den ADPRCs aus *Aplysia* fast vollständig [Glick *et al.* 1991, States *et al.* 1992, Nata *et al.* 1995] und in CD157 zumindest partiell erhalten ist [Itoh *et al.* 1994]. Auch ein Großteil distinkter Aminosäurereste, von denen gezeigt wurde, daß sie im CD38-Enzym für die Positionierung des Substrates, den katalytischen Umsatz von β -NAD oder die Struktur des katalytischen Zentrums bedeutsam sind (Abb. 5.3 mit Legende), finden sich neben zwei in CD38 wie auch in CD157 konservierten, in diesem Sequenzabschnitt gelegenen Cysteinen auch in dem homologen Sequenzabschnitt von L-Plastin in korrekter Anordnung wieder (Abb. 5.3). Auch der Sequenzbereich um Glutamat-226, in CD38 die Aminosäure, die als der katalytische Rest identifiziert wurde [Munshi *et al.* 2000], ist in homologer Form in der Primärsequenz von L-Plastin (AS 235-224) enthalten. Neben der gemeinsamen Aufreinigung von L-Plastin mit der katalytischen Aktivität der löslichen, cytosolischen ADPRC/NADGH der Jurkat-Lymphozyten können diese Daten als weiterer Hinweis gewertet werden, daß L-Plastin neben einer Funktion in der Strukturierung des Cytoskelets und in der strukturellen Etablierung von Signalkomplexen auch katalytische Aktivität als ADPRC/NADGH aufweisen könnte.

1. CD38		2. CD157		3. L-Plastin	
1.	47	RQQWSGPGTTKRFPE	TVLARC	VKYTEI	-HPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHP--CNI TEED 105
2.	31	RARWRAEGTSAHLRDI	FLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFKVA-LDKDP--CSVLP	SD 89	
3.	84	_____ TDVAKTFRKA-INKKEGICAI GGTS 107			
1.	106	YQPLMKLGTQTVP	CNKILL--	WSRIKDLAHQFTQVQRDMF	TLED TLLGYLADDLTWCGEFNT 165
2.	90	YDLFI	NLSRHSIPRDKSLF--	WENSHLLVNSFADNTRRFM	PLSDVLYGFRVADFLSWCRQKND 149
3.	108	EQSSVGTQHSYSEE	EKYAFVNWINKALENDPDCRHV	IPMNPNTN	DLFN AVGDGIVLCKMIN_ 168
1.	166	SKINYQSCP	DWRKDCSNNPVS	VFWKTVSRRFAEAACDVVH	VMLNGSR-SKIFDKNSTFGS 224
2.	150	SGLDYQSCPT-SEDCEN	NPVDSFWKRASIQYSK	DSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIK	GFFAD 208
3.	235	_____ GLFAD 239			
1.	225	VEVHN	LQPEKVQ	TLEAWVIHGGREDSRDL	CQDPTIKELESIIISKRN
2.	209	YEI	PNLQKEKITRIE	IWVMEIGGPNVESC	GEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKL 268
3.	240	IEL	_____ 242		
1.	285	LQCVKN	PE	DSSC 296	
2.	269	LQCV	DHSTHPDC 280		
3.		_____			

Abb. 5.3 Aligement von L-Plastin mit CD38 und CD157/BST-1. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von CD38 (1.) und CD157 (2.) durch Blast zeigt eine ausgeprägte Homologie beider Proteine, die sich nahezu über die gesamte Extrazellulärdomäne von CD38 (AS 45-300) erstreckt. Im verglichenen Bereich der Primärstruktur sind die Aminosäuresequenzen beider Proteine zu 36% identisch und zu 53% konserviert. Beim Vergleich der Sequenz von L-Plastin (3.) mit den Sequenzen der beiden ADPRCs/NADGHs lassen sich zwei Sequenzabschnitte (Homologiebereiche 1 und 2) in L-Plastin nachweisen, die (mäßige) Homologie zu beiden Enzymen, in stärkerem Maße aber zu CD157, aufweisen (Homologiebereich 1, 18% identische und 38% konservierte Aminosäuren; Homologiebereich 2, 62% identische und 74% konservierte Aminosäuren). Identische Aminosäuren sind jeweils blau und konservierte Aminosäuren grün gekennzeichnet. Die Aminosäuren des Signaturmotivs von CD38 [Grimaldi et al. 1995] sind rot hervorgehoben und der diesem Motiv entsprechende Sequenzbereich aller Proteine durch eine Box markiert. Der ausgedehntere Sequenzabschnitt von L-Plastin, Homologiebereich 1 (AS 84-168), zeigt bezeichnenderweise Homologie zu einem Sequenzabschnitt von CD38 und dem korrespondierenden Sequenzabschnitt in CD157, der in CD38 partiell von Exon 2, überwiegend aber von Exon 3 des zugehörigen Gens codiert wird [Ferrero et al. 1997]. Letzterer ist für die katalytische Aktivität von CD38 von besonderer Bedeutung und enthält auch das bereits erwähnte Signaturmotiv. Der Beginn des durch Exon 3 des CD38-Gens codierten Sequenzabschnitts (AS 123-167) ist mit einem Pfeil markiert. Aminosäurereste, für die eine bestimmte Funktion nachgewiesen wurde sind mit Rhomben und zwei in allen drei Proteinen konservierte Cysteine mit Dreiecken markiert. Als katalytischer Rest wurde in CD38 E226 identifiziert [Munshi et al. 2000]. Diese Aminosäure ist in CD157 und dem zweiten kleineren Homologiebereich von L-Plastin (As 235-242) ebenfalls konserviert. Bedeutung mit Rhomben markierter Aminosäuren in CD38: W125 und W189, Substratpositionierung [Munshi et al. 2000]; E146 und D147, Regulation der ADPRC- versus NADGH- und cADPR-Hydrolaseaktivität [Munshi et al. 2000]; D155, Regulation der GDPRC-Aktivität [Munshi et al. 2000].

Daß es sich bei L-Plastin um ein NAD(P)-bindendes, bzw. -metabolisierendes Enzym handeln könnte, wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, daß es in seinem N-terminal gelegenen Sequenzabschnitt (AS 20-50) ausgeprägte Homologie zur Fingerprint-Region des als „Rossmannfaltung“ [Rossmann *et al.* 1974] bekannten, klassischen NAD(P)-Bindungsmotivs aufweist (Abb. 5.4), das eine Konsensussequenz (GXGXXG) für die Diphosphatbindung enthält [Review: Bellamacina 1996]. Lediglich an drei Positionen dieser Region (Positionen Z⁸-Z¹⁰), die Teil eines aus mehreren α -Helices (α B, α C) und β -Faltblättern (β A- β D) bestehenden Sekundärstrukturmotivs ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$ - β) ist [Review: Bellamacina 1996], weist L-Plastin der Konsensussequenz zufolge unerlaubte Aminosäurereste auf (Abb. 5.4). Wird die Konsensussequenz um die Aminosäuren erweitert, die in L-Plastin an diesen Positionen seiner Aminosäuresequenz stehen, finden sich in der Datenbank neben L-Plastin und mehreren in ihrer Funktion noch unbekanntem Proteinen, weitere Proteine, die eine bekanntermaßen intakte, funktionell aktive NAD(P)-Bindungsstelle aufweisen, jedoch an einer der drei Positionen (Z⁸-Z¹⁰) L-Plastin entsprechen (Abb. 5.4). Demnach steht ein derartiger Aminosäureaustausch an diesen Positionen der diagnostischen Region des NAD(P)-Bindungsmotivs der Ausbildung seiner korrekten Faltung nicht unbedingt entgegen. Lediglich für eine Position (Z⁹) läßt sich in der Datenbank bislang kein seiner Funktion nach bekanntes Protein finden, das an dieser Stelle mit L-Plastin übereinstimmt und dennoch eine intakte Bindungsstelle für NAD(P) besitzt. Allerdings können an dieser Stelle in Übereinstimmung mit der Konsensussequenz (Abb. 5.4) neben den hydrophoben Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin auch andere Aminosäuren wie Glycin oder Serin stehen, so daß prinzipiell auch ein Tyrosin erlaubt sein könnte. Auch wenn diese Daten insgesamt mit Sicherheit nicht beweisen, daß L-Plastin ein NAD(P)-bindendes Enzym und eventuell eine ADPRC/NADGH ist, erscheint es immerhin zulässig den Schluß zu ziehen, daß dieses zum jetzigen Zeitpunkt auch keineswegs auszuschließen ist. Ein erster Versuch, mit Hilfe des rekombinant als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST-Fusionsprotein) in *E. coli* exprimierten L-Plastins den direkten Nachweis seiner Fähigkeit zur cADPR-Synthese zu erbringen (A. Gasser & Prof. Guse) verlief erfolglos, indem das rekombinante Protein bei Durchmusterung verschiedener potentieller Substrate (β -NAD, ϵ -NAD, NGD) keinerlei fluorimetrisch oder im RP-HPLC-Enzymassay nachweisbare ADPRC- und/oder NADGH-Aktivität aufwies (A. Gasser, K. Schweitzer & Prof. Guse). Ausgehend von der Annahme, daß Serinphosphorylierung von L-Plastin eine Voraussetzung für seine katalytische Aktivität als ADPRC/NADGH darstellen könnte, wurde zusätzlich versucht L-Plastin *in vitro* unter Einsatz der katalytischer Untereinheit von PKA zu phosphorylieren.

		β A-Strang				α B-Helix				β B-Strang																							
Struktur		Δ	‡	‡	*	*	*	‡	‡	‡	‡	\diamond																					
LDH	22N	K	I	T	V	V	G	C	D	A	V	G	M	A	D	A	I	S	V	L	M	K	D	L	A	D	E	V	A	L	V	D	
MDH		2K	V	A	V	L	G	AA	G	I	G	Q	A	L	A	L	L	L	K	T	Q	L	P	S	-	G	S	D	L	S	L		
GAPDH		2K	I	G	I	N	G	F	G	R	I	G	R	L	V	L	R	A	A	L	S	C	G	A	Q	-	V	V	A	V	N	D	
ADH	194	T	C	A	V	F	G	L	G	G	V	G	L	V	S	I	M	G	S	K	A	A	G	A	A	-	R	I	I	G	V	D	
DHPR	9R	V	L	V	Y	G	G	R	G	A	L	G	S	R	C	V	Q	A	F	R	A	-	R	N	W	-	W	V	A	S	I	D	
UDPGP	2R	V	L	V	T	G	G	S	G	Y	I	G	S	H	T	C	V	Q	L	L	Q	N	G	H	-	-	D	V	I	I	L	D	
GR	188	G	R	S	V	I	V	G	A	G	Y	I	A	V	E	M	A	G	I	L	S	A	L	G	S	-	-	K	T	S	L	M	I
TR	189	K	R	A	L	C	V	G	G	G	Y	I	S	I	D	F	A	G	I	F	N	A	Y	K	A	R	-	-	G	G	Q	V	E
NPX	150	N	V	V	V	I	G	S	G	Y	I	G	I	E	A	A	E	A	F	A	K	A	G	K	-	-	K	V	T	V	I	D	
LIPODH	172	Q	H	L	V	V	V	G	G	G	Y	I	G	L	E	L	G	I	A	V	R	K	L	G	A	-	-	Q	V	S	V	V	E
MER	334	N	R	L	T	V	I	G	S	G	R	I	G	M	E	L	G	Q	L	F	H	N	L	G	S	-	-	E	V	T	I	Q	R
PDR	114	F	I	L	V	A	G	G	I	G	I	T	P	M	L	S	M	A	R	Q	L	R	A	E	G	L	R	S	F	R	L	Y	Y
<u>Konsensus</u>		Z ¹	Z ² X	Z ³	X	G	X	Z ⁴ X	X	Z ⁵	X	X	X	Z ⁶	X	X	Z ⁷	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Z ⁸	X	Z ⁹ X	Z ¹⁰		
L-Plastin		K	V	D	T	D	G	N	G	Y	I	S	F	N	E	L	N	D	L	F	K	A	A	C	L	P	L	P	G	Y	R	V	
SucDH	220	T	C	T	G	D	G	G	G	M	V	A	R	A	G	L	P	L	Q	D	M	E	F	V	Q	F	H	P	T	G	I	Y	
SorDH	173	K	V	V	V	F	G	A	G	P	V	G	L	L	T	G	A	V	A	R	A	F	G	A	T	D	V	I	F	V	D	V	
Nit.Red.	5R	L	A	I	I	G	N	G	M	V	G	H	R	F	I	E	D	L	L	D	K	S	D	A	A	N	F	D	I	t	V		
Pant.Red.	2K	I	T	V	L	G	C	G	A	L	G	Q	L	W	L	T	A	L	C	K	Q	G	H	E	V	Q	G	W	L	R	V		

Δ konservierter positiver Rest, Stabilisierung von β A und β D
 ‡ hydrophober Rest, Stabilisierung von Sekundärstruktur
 * konservierter Glycinrest, Teil des Phosphatbindungsmotivs
 \diamond konservierter negativer Rest, Bindung der Ribose 2'OH-Gruppe

Konsensussequenz:
 X: beliebige Aminosäure
 Z¹, [KTVRNHI]; Z², [IVCLFSA]; Z³, [VIYTCA]; Z⁴, [GD]; Z⁵, [GASP];
 Z⁶, [ALIVCGM]; Z⁷, [VLASFQ]; Z⁸, [VSITGF]; Z⁹, [LVGSIQ]; Z¹⁰, [DLIERV]

Abb. 5.4: Sequenzvergleich von L-Plastin mit der Fingerprint-Region des klassischen NAD(P)-Bindungsmotivs (Rossmann-Faltung). Im oberen Teil der Abbildungen sind Aminosäuresequenzen der Fingerprint-Regionen zweier Gruppen verschiedener NAD(P)-bindender Proteine dargestellt, die eine NAD(P)-Bindungsstelle des klassischen Typs besitzen [Review: *Bellamacina* 1996]. Alle diese Proteine entsprechen an allen Positionen ihrer Aminosäuresequenz der dargestellten Konsensussequenz. In dieser steht X für einen beliebigen Aminosäurerest, während Z¹-Z¹⁰ (gelb oder grün markiert) jeweils für bestimmte Aminosäuren stehen, die an diesen Positionen erlaubt sind und im unteren Teil der Abbildung aufgeführt sind. Die grün markierten Positionen bilden die Phosphatbindungsstellen der Enzyme, die jeweils Teil des Strukturmotivs der NAD(P)-Bindungsstelle sind [Review: *Bellamacina* 1996]. L-Plastin weist einen N-terminal in seinem Kopfstück gelegenen Sequenzabschnitt auf, der an vielen Positionen, inklusive denen, die die Phosphatbindungsstelle des NAD(P)-Bindungsmotivs definieren, Übereinstimmung mit der Konsensussequenz der Fingerprint-Region dieses Strukturmotivs auf. An drei Positionen (blau markiert) weist dieser Abschnitt allerdings abweichende Aminosäuren auf. In Hinsicht auf zwei dieser Positionen (Z⁸ und Z¹⁰) finden sich in der Datenbank jedoch bekannte Proteine, die an diesen Positionen L-Plastin entsprechen und dennoch eine biologisch aktive NAD(P)-Bindungsstelle aufweisen. Lediglich die Aminosäure an Position Z¹⁰ von L-Plastin wäre für ein Enzym mit einer funktionell intakten NAD(P)-Bindungsstelle des klassischen Typs bislang einzigartig. Abkürzungen: LDH,

Laktat-Dehydrogenase; MDH, Malat-Dehydrogenase; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; ADH, Alkohol-Dehydrogenase; DHPR, Dihydropteridin-Reduktase; UDPGE, UDP-Galaktose-Epimerase; GR, Glutathion-Reduktase; TR, Trypanothion-Reduktase; NPX, NADH-Peroxidase; LIPODH, Dihydrolipoamid-Dehydrogenase; MER, Quecksilberionen-Reduktase; PDR, Phtalat-Dioxygenase-Reduktase; SucDH, Succinat-Dehydrogenase; SorDH, Sorbitol-Dehydrogenase; Nit.Red., Nitrit-Reduktase; Pant.Red, Dihydropanthoat-Reduktase

Für PKA war bereits gezeigt worden, daß sie humanes L-Plastin *in vitro* phosphorylieren kann und wahrscheinlich auch *in vivo* in einen Signalweg involviert ist, der zur Phosphorylierung von L-Plastin an Serin-5 führt [Wang & Brown 1999]. Aber auch das *in vitro* zur Phosphorylierung vorinkubierte L-Plastin-GST-Fusionsprotein war in Hinblick auf cADPR- und ADPR-Synthese katalytisch inaktiv (A. Gasser, K. Schweitzer & Prof. Guse). Neben der zunächst naheliegenden Interpretation, daß L-Plastin diesen Daten zufolge also keine ADPRC/NADGH ist, bleibt allerdings auch Möglichkeit, daß durch das Anfügen von GST an den N-Terminus von L-Plastin die freie Zugänglichkeit des letzteren blockiert und sehr wahrscheinlich eine Einschränkung der Beweglichkeit der N-terminalen Domäne des Proteins bewirkt wird. Gerade in diesem Bereich des Proteins sind aber die Struktur motive gelegen, die neben seiner bekannten Funktion als Strukturprotein (Strukturierung von F-Aktin) zusätzlich eine aktive Funktion von L-Plastin als signalgebendes Protein nahelegen, deren Ausübung eine Konformationsänderung des Proteins, beispielsweise nach einer Bindung von Ca^{2+} oder Calmodulin, erfordern könnte. Die Fähigkeit zur Konformationsänderung könnte jedoch durch das an den N-Terminus des Proteins angefügte GST unterbunden oder zumindest eingeschränkt werden. Daß der freie N-Terminus von L-Plastin Bedeutung für die Wahrnehmung seiner biologischen Funktion haben kann, wurde bereits in neutrophilen Zellen gezeigt. In diesen Zellen verloren N-terminale Peptide [Jones *et al.* 1998], wie auch das komplette Kopfstück von L-Plastin [Wang *et al.* 2001], vollständig ihre sonst nachweisbare, fördernde Wirkung auf die Avidität der Integrine und die Integrin-vermittelte Adhärenz, wenn der N-Terminus der Peptide oder des Kopfstücks des Proteins durch das Anfügen eines Fremdpeptids modifiziert wurde. Gleichzeitig wurde nahegelegt, daß eine Phosphorylierung von L-Plastin an Serin-5 zur Ausübung seiner aktivierenden Wirkung auf die Integrine der Neutrophilen notwendig ist [Jones *et al.* 1998, Wang *et al.* 2001]. Obgleich die Wahl des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Konstruktes bewußt erfolgte und auf der Überlegung gründete, daß N-terminal fusioniertes GST die Löslichkeit rekombinant in *E. coli* exprimierter Fusionsproteine und damit die Ausbeute an diesen Proteinen erhöht und gleichzeitig ihre korrekte Faltung erleichtert, erscheint es aufgrund der oben geschilderten Daten und Erwägungen durchaus sinnvoll zusätzlich noch weitere Konstrukte auf katalytische Aktivität hin durchzumustern. Auch eine erneute Analyse des bereits vorhandenen L-Plastin-

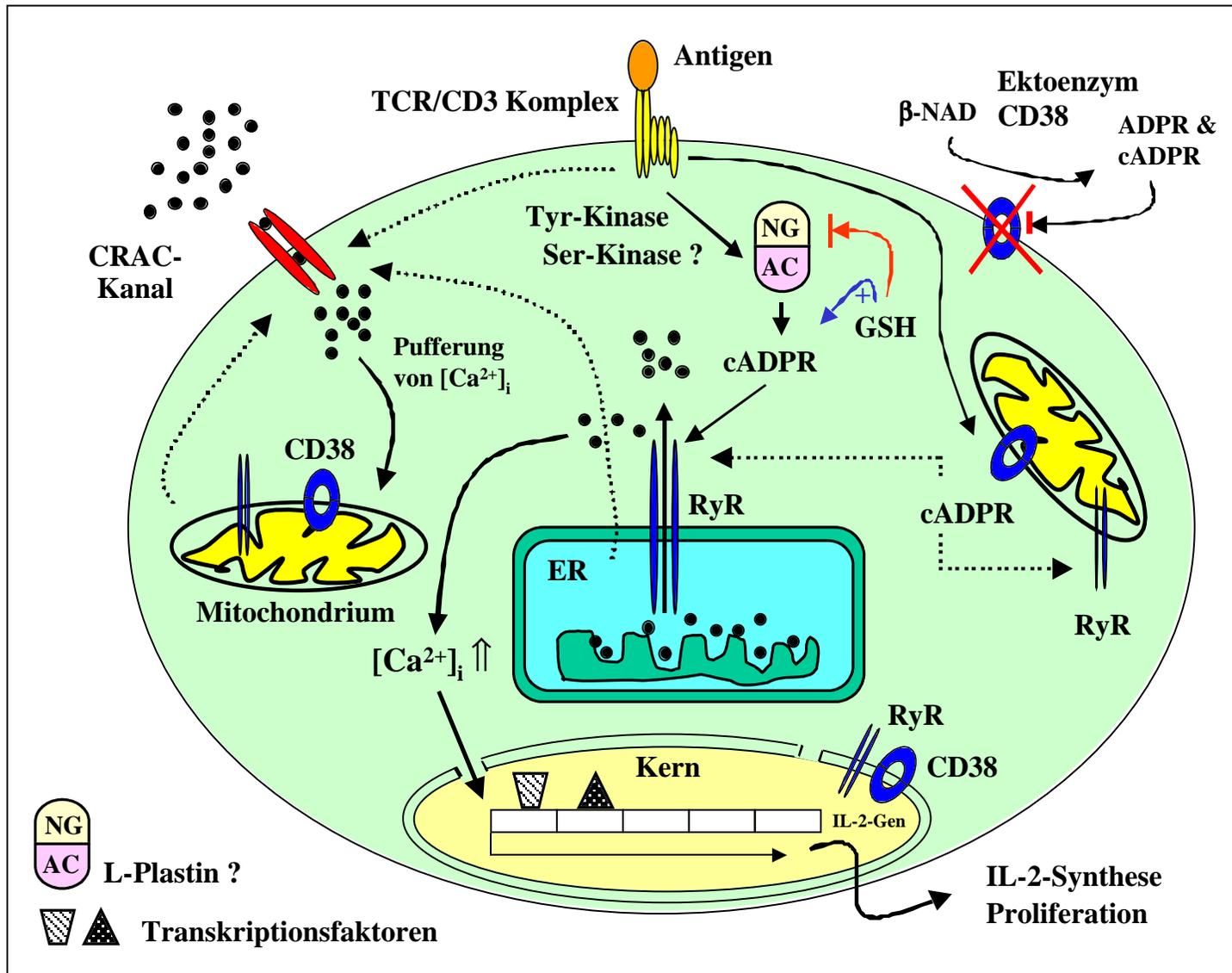
Fusionsprotein könnte nach einer vorherigen Abspaltung der GST sinnvoll sein. Andererseits könnte zum Gewinn von funktionell aktivem L-Plastin auch eine aufwendigere rekombinante Expression des Proteins in eukariotischen Zellen anstelle von Bakterien erforderlich sein. Insgesamt bleibt L-Plastin vorerst als ein in mehreren Aspekten plausibler Kandidat der nicht mit CD38 identischen cytosolischen, löslichen und membranassoziierten ADPRC/NADGH der T-Lymphozyten bestehen, dessen Validität jedoch im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit auch mit Hilfe eines molekularbiologischen Ansatzes, der parallel zusammen mit A. Gasser & Prof. Guse bearbeitet wurde, nicht abschließend geklärt werden konnte.

Einen weiteren Kandidaten stellt das Protein von 45-50 kDa dar, das in anti-CD38 Western Blots durch SP-Sepharose-Chromatographie gereinigter P100- und durch HA-Chromatographie vorgereinigter S100-Extrakte der Jurkat-Lymphozyten detektiert wurde, sofern das gereinigte Protein in hinreichender Konzentration vorlag (Abb. 4.38). Dieses Protein, das gemessen an seinem MW eher etwas größer, keinesfalls jedoch kleiner als das klassische CD38 ist, konnte jedoch bislang nicht in ausreichender Menge für eine Identifizierung durch Sequenzierung gewonnen werden. Es war in Coomassie-gefärbten Gelen nicht nachweisbar. Somit könnte es sich bei diesem sowohl um ein mit CD38 verwandtes oder identisches als auch um ein mit diesem Enzym kreuzreagierendes Protein handeln. Für letztere Annahme spricht, daß es in den gegenüber den subzellulären Rohfraktionen erheblich an ADPRC-/NADGH-Aktivität angereicherten gereinigten Proteinextrakten nur sehr schwach nachgewiesen werden konnte, obwohl CD38 in den Rohfraktionen problemlos detektierbar war. In seinem MW stimmt dieses Protein mit einem Protein überein, das in der S100-Rohfraktion und der HA-gereinigten S100-Fraktion der Lymphozyten spezifisch durch Photoaffinitätsmarkierung mit [³²P]8-N₃-NAD nachgewiesen werden konnte (Abb. 25). Damit könnte es sich auch hier um ein als potentieller Kandidat einer ADPRC/NADGH interessantes Protein handeln.

5.6 Erweitertes Modell des cADPR-vermittelten Signalweges zur Erhöhung der [Ca²⁺]_i in T-Lymphozyten

Unter Einbezug der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten läßt sich für den cADPR-vermittelten Signalweg der über den TCR/CD3-Komplex stimulierten Steigerung der [Ca²⁺]_i das nachfolgend beschriebene, in einigen Punkten noch hypothetische Modell ableiten, das zur Übersicht in Abb. 5.5 dargestellt ist. Diesem Modell zufolge bewirkt die spezifische Stimulation des TCR/CD3-Komplexes durch Antigen einerseits die Aktivierung einer cytosolischen ADPRC/NADGH. Diese synthetisiert daraufhin direkt im Cytosol den

Botenstoff cADPR, der seinerseits Ca^{2+} aus einem Subkompartiment des ER- Ca^{2+} -Speichers der Lymphozyten freisetzt. Da die Inhibition von Tyrosin-Phosphatasen durch den spezifischen Inhibitor Dephostatin in T-Lymphozyten eine Steigerung der ADPRC-Aktivität im Cytosol bewirkt [Guse *et al.* 1999] und die Aktivierung von Tyrosinkinase eines der ersten und zentralen Ereignisse der Aktivierung des TCR/CD3-Komplexes darstellt [Review: Crabtree und Clipstone 1994], ist die Annahme einer Beteiligung von Tyrosinkinase an der Aktivierung der cytosolischen ADPRC naheliegend. Allerdings ist bislang ungeklärt, ob diese das Enzym direkt oder aber nur indirekt, durch einen weiter oben in der Signalkaskade gelegenen Schritt der Tyrosinphosphorylierung aktivieren. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten legen weiterhin eine Regulation des cytosolischen Enzyms in der Weise nahe, daß ein reduzierendes cytosolisches Milieu eine Inhibition seiner NADGH- und damit eine stärkere Betonung seiner ADPRC-Aktivität bewirkt. Als Kandidat für dieses möglicherweise nicht mit CD38 identische oder verwandte Enzym wurde das Protein L-Plastin identifiziert. Für dieses Protein als Kandidaten einer ADPRC/NADGH sprechen in positiver Weise seine nachgewiesene Fähigkeit zur Translokation zwischen Cytosol und Aktin-Cytoskelett [Namba *et al.* 1992, Pacaud & Derancourt 1993], insbesondere seine stimulationsbedingte Assoziation mit in den strukturellen Aufbau von Signalkomplexen involviertem Cytoskelett [Rosales *et al.* 1994, Jones & Brown 1996], weiterhin die Abhängigkeit seiner Verteilung (und Aktivität?) von Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im physiologischen Bereich (100, bzw. 300 nM bis 1, bzw. 3 μM) [Namba *et al.* 1992, Pacaud & Derancourt 1993] sowie nicht zuletzt die gemeinsamen proteinbiochemische Eigenschaften des Proteins mit der cytosolischen ADPRC/NADGH der Lymphozyten, nachgewiesene Sequenzhomologien mit CD38 und CD157 (Abb. 5.3) und der mögliche Besitz einer intakten Dinukleotid-Bindungsstelle (Abb. 5.4). Auch eine möglicherweise direkte Regulation seiner Signalgebungsfunktion durch Serinphosphorylierung, ein Ereignis, das mit langsamer Kinetik nachgewiesen wurde [Henning *et al.* 1994, Jones and Brown 1996], steht einer potentiellen Wirkung dieses Proteins als ADPRC/NADGH in T-Lymphozyten nicht entgegen, da es sich bei der Serinphosphorylierung verglichen mit der zuvor erwähnten Tyrosinphosphorylierung, vereinbar mit ihrem zeitlich verzögerten Eintritt, um einen weiter distal in der über den TCR/CD3-Komplex stimulierten Signalkaskade gelegenen Aktivierungsschritt des Enzyms handeln könnte. Das Vorkommen einer Aktivierung von ADPRCs/NADGHs durch Serinphosphorylierung ist bereits aus anderen Zellsystemen bekannt.



Durch spezifische Stimulation des TCR/CD3-Komplexes von T-Lymphozyten wird unter direkter/indirekter Beteiligung einer Tyrosinkinase (sowie zusätzlich einer Serinkinase?) eine cytosolische ADPRC/NADGH (L-Plastin?) zur cADPR-Synthese aktiviert. Dieses Enzym wird in seiner katalytischen Aktivität wahrscheinlich außerdem durch den Reduktionsstatus der Zelle (mittels GSH?) reguliert. cADPR setzt Ca²⁺ aus einem für diesen Second Messenger sensitiven ER-Kompartiment frei und trägt dadurch zu einer anhaltenden Steigerung der [Ca²⁺]_i bei, die eine essentielle Voraussetzung für die Transkription von Ca²⁺ abhängiger Gene, beispielsweise des IL-2-Gens, darstellt. Eine (zusätzliche?) funktionelle Bedeutung der cADPR-Synthese durch intrazellulär in Organellen lokalisiertes CD38 bei der Regulation der [Ca²⁺]_i ist ebenfalls vorstellbar. Die Entleerung des ER-Ca²⁺-Speichers und die Stimulation des TCR/CD3-Komplexes bewirken über CRAC-Kanäle Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran. Dieser wird vermutlich durch Mitochondrien reguliert. Ein direkter Nachweis des RyR in Kern und Mitochondrien von T-Lymphozyten wurde bislang noch nicht erbracht. AC, ADPRC; NG, NADGH; Tyr, Tyrosin; Ser, Serin; GSH, reduziertes Glutathion; ER, Endoplasmatisches Retikulum; RyR, Ryanodin-Rezeptor.

Abb. 5.6: Hypothetisches Modell des Antigen-stimulierten cADPR/Ca²⁺-Signalweges in T-Lymphozyten. Legende, siehe rechts.

So wurde eine in Abhängigkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und cyclischem GMP (cGMP) durch Proteinkinase G (PKG) katalysierte derartige Aktivierung funktionell vergleichbarer Enzyme beispielsweise im Seeigeelei [Galione et al. 1993a, Willmott et al. 1996, Graeff et al. 1998, Review: Lee 1994], in Phäochromozytom(PC12)-Zellen [Clementi et al. 1996] und in Azinuszellen der Parotis [Looms et al. 2001] beschrieben.

Andererseits wird durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahegelegt, daß es neben einer cytosolischen ADPRC/NADGH der Lymphozyten, deren sicherer Nachweis noch aussteht, in T-Lymphozyten zusätzlich auch intrazellulär exprimiertes, membranständiges CD38 gibt. Von diesem ist aufgrund seiner Verteilung bei der subzellulären Fraktionierung und in Anbetracht publizierter Daten [Ziegler et al. 1997, Khoo & Chang 2002] anzunehmen, wengleich noch nicht erwiesen, daß es in den Mitochondrien (P10) und möglicherweise im Kern (P2) der Zellen angesiedelt ist. Auch intrazellulär lokalisierten, membranständigen CD38-Varianten könnte damit mittels der Synthese von cADPR eine Funktion beim Aufbau und Erhalt einer über den TCR/CD3-Komplex vermittelten langanhaltenden Plateauphase der $[Ca^{2+}]_i$ zukommen, deren Ausbildung wie in der Einleitung beschrieben, zur Aktivierung der Lymphozyten notwendig ist (Abb. 1.1). Diese Annahme wird maßgeblich von Daten gestützt, die mit dem membranpermeanten ADPRC-/NADGH-Inhibitor 8-Br-NHD erhoben wurden. Eine herauszustellende Wirkung dieser im Zuge der vorliegenden Arbeit neu entwickelten Substanz, war, neben einer möglicherweise durch mehrere Faktoren bedingten Inhibition der Proliferation der Lymphozyten (Abb. 4.18), ihre ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf das über den TCR/CD3-Komplex stimulierte, langanhaltende Ca^{2+} -Signal (Abb. 4.17), die aufgrund der in vorangegangenen Experimenten nachgewiesenen Wirkungslosigkeit einer ausschließlichen Inhibition des an der Zelloberfläche exprimierten Ektoenzym (CD38, Abb. 4.9), auf eine effiziente Inhibition der katalytischen Aktivität intrazellulär exprimierter ADPRCs/NADGHs zurückgeführt werden konnte. Eine vielleicht gesonderte physiologische Bedeutung in subzellulären Organellen exprimierter ADPRCs/NADGHs wird durch die Tatsache nahegelegt, daß in Kern [Adebanjo et al. 1999] und Mitochondrien [Beutner et al. 2001] außer cADPR-synthetisierenden Enzymen (CD38) inzwischen auch die zur Ca^{2+} -Freisetzung benötigten cADPR-sensitiven Rezeptoren (RyR) nachgewiesen wurden. Ob es sich hierbei um ein generelles Phänomen handelt, ist allerdings noch ungeklärt. Wie zuvor bereits erwähnt, ist die Topologie der mitochondrialen ADPRC/NADGH noch ungeklärt [Moser et al. 1983, Boyer et al. 1993]. Das in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigte Ergebnis, daß eine Solubilisierung der P10-Membranen mit Detergenz keine Steigerung ihrer ADPRC-/NADGH-Aktivität bewirkt, legt in Hinblick auf Mitochondrien der T-Lymphozyten jedoch die

Hypothese nahe, daß das katalytische Zentrum des Enzyms entweder an der Oberfläche der Organellen oder, wie von *Boyer et al.* [1993] postuliert, im Zwischenraum zwischen äußerer und innerer Membran gelegen ist, zu dem kleine Moleküle ($MW \leq 1000$ Da), darunter auch cADPR, der derzeitigen Auffassung zufolge uneingeschränkter Zugang haben [Review: *Pozzan & Rizzuto* 2000]. Damit könnte die Freisetzung von Ca^{2+} durch hier synthetisiertes cADPR potentiell sowohl am Mitochondrium als auch an cytosolischen Ca^{2+} -Speichern erfolgen. Eine Beteiligung von Mitochondrien an der Ausbildung und aktiven Modulation intrazellulärer Ca^{2+} -Signale ist inzwischen durch eine Vielzahl von Daten in verschiedenen Zellsystemen, darunter auch in T-Lymphozyten [Reviews: *Rizzuto et al.* 2000; *Rutter und Rizzuto* 2000] belegt. Auf aktuelle Daten und Vorstellungen zu diesem Thema und auf Modellvorstellungen zur in ihrem Mechanismus noch ungeklärten Regulation des Ca^{2+} -Einstroms, beides Themen, die in der vorliegenden Arbeit nicht direkt bearbeitet wurden, wurde in der Einleitung ausführlicher eingegangen. Die Bedeutung des Zellkerns bei der Ausbildung zellulärer, möglicherweise auch kernspezifischer Ca^{2+} -Signale ist noch weitgehend ungeklärt.

Im Gegensatz zu der durch die Daten der vorliegenden Arbeit gestützten Annahme, daß intrazellulär lokalisiertes CD38 aufgrund seiner cADPR-Synthese an der Ausbildung über den TCR/CD3-Komplex stimulierter Ca^{2+} -Signale beteiligt sein könnte, konnte eine funktionelle Bedeutung der cADPR-Synthese durch das Ektoenzym CD38 in Jurkat-Lymphozyten, die reifen humanen T-Lymphozyten entsprechen, im Kontext der diese Ca^{2+} -Signale vermittelnden Signalkaskade als weiteres zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit mit Hilfe pharmakologischer Untersuchungen (Abb. 4.9 *versus* Abb. 4.17) weitgehend ausgeschlossen werden.

5.7 Schlußbetrachtungen und Ausblick

Unter der Gesamtzielsetzung, den quantitativen Nachweis der katalytischen Aktivität von ADPRCs/NADGHs methodisch zu optimieren, neben dem Ektoenzym CD38 zusätzlich postulierte, intrazellulär lokalisierte ADPRCs/NADGHs der Lymphozyten nachzuweisen und zu charakterisieren sowie die proteinbiochemische Aufreinigung eines zuvor bereits in der cytosolischen Fraktion der Zellen detektierten Enzyms dieser Kategorie [*Heyer* 1998, *Guse et al.* 1999] voranzutreiben, wurden mit der Etablierung eines sensitiven und zuverlässigen RP-HPLC-basierten Enzymassays auf ADPRC- NADGH- und PPase-Aktivität, dem Nachweis von membranständigem CD38 an intrazellulären Membransystemen (P10, Mitochondrien und P2, möglicherweise Zellkerne) und der Aufreinigung von L-Plastin als Kandidaten der

löslichen/membranassoziierten cytosolischen ADPRC/NADGH der Lymphozyten, in allen Bereichen wichtige Etappenziele erreicht. Trotz vieler Ähnlichkeiten und Gemeinsamkeiten im pharmakologischen Profil von CD38 einerseits und der cytosolischen, wahrscheinlich von CD38 verschiedenen ADPRC/NADGH andererseits, konnte selektiv für das cytosolische Enzym ein potentiell physiologisch relevanter Regulationsmechanismus seiner katalytischen Aktivität über den Reduktionsstatus der Zelle aufgezeigt werden. Durch einen Vergleich der Wirkung nicht membrangängiger und membranpermeanter Inhibitoren auf das über den TCR/CD3-Komplex stimulierbare, biphasische Ca^{2+} -Signal der Lymphozyten, konnte zudem, ergänzend zu bereits publizierten, den gleichen Schluß auf indirekte Weise nahelegenden Daten [*da Silva et al.* 1998b], ein direkterer Nachweis dafür erbracht werden, daß intrazellulär lokalisierte ADPRCs/NADGHs, möglicherweise auch an intrazellulären Membranen exprimiertes CD38, nicht aber an der Zelloberfläche der Lymphozyten exprimierte CD38-Moleküle mittels ihrer cADPR-Synthese an der Ausbildung dieses Ca^{2+} -Signals beteiligt sind. Viele Fragen zur Enzymologie der intrazellulären Synthese von cADPR, ihrer Regulation, Kompartimentierung und Integration in gegeneinander abgegrenzte oder miteinander verzahnte Signalwege bedürfen jedoch weiterhin der Klärung und bilden damit Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Ein zentrales Ziel, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erreicht wurde, bleibt die vollständige Aufreinigung der cytosolischen ADPRC/NADGH inklusive ihrer molekularen Charakterisierung in Abgrenzung zu CD38. Dieses Ziel beinhaltet auch eine intensive Überprüfung von L-Plastin, als dem ersten Kandidaten für dieses Enzym. Offen ist weiterhin, ob es sich bei intrazellulärem, membranständigem CD38 um modifizierte Varianten des Ektoenzym oder tatsächlich um vollständig mit dem Ektoenzym identische Proteine handelt. Hier stellen sich Fragen nach dem intrazellulären Transport und der Verteilung des Enzyms auf unterschiedliche Kompartimente, nach der Topologie des Enzyms an seinen Expressionsorten und nach distinkten biologischen Funktionen subzellulär an unterschiedlichen Orten exprimierter ADPRCs/NADGHs im Kontext definierter Signalwege. Auch der physiologische Sinn der die cADPR-Synthese bei Weitem überwiegenden ADPR-Synthese der bislang ausschließlich multifunktionalen ADPRCs/NADGHs der Vertebraten ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt völlig unverstanden. Dies trotz der Tatsache, daß inzwischen verschiedene, möglicherweise zellspezifische Regulationsmechanismen der Aktivität dieser Enzyme beschrieben wurden, die einer Anpassung des Ausmaßes von cADPR- und ADPR-Synthese an die jeweils vorherrschenden physiologischen Bedürfnisse der Zellen dienen könnten, in denen die Enzyme exprimiert werden (Tab. 1.5 & 1.6, Einleitung).

6. Zusammenfassung

Im Zentrum des Interesses der vorliegenden Arbeit standen die molekulare und pharmakologische Charakterisierung intrazellulär lokalisierter ADPRCs/NADGHs humaner T-Lymphozyten im Vergleich zum Zelloberflächenmolekül CD38 sowie insbesondere eine proteinbiochemische Aufreinigung der löslichen ADPRC, deren katalytische Aktivität zuvor in cytosolischen Extrakten von Jurkat-Lymphozyten nachgewiesen worden war. Ein weiteres zentrales Ziel bildete der Nachweis der funktionellen Bedeutung der cADPR-Synthese dieser Enzyme bei der Etablierung und Aufrechterhaltung des langanhaltenden, biphasischen durch Stimulation über den TCR/CD3-Komplex vermittelten Ca^{2+} -Signals. Im Rahmen dieser gesteckten Ziele wurden die nachfolgend beschriebenen Hauptergebnisse erzielt. Erstens wurde ein sensitiver und zuverlässiger RP-HPLC-Enzymassay auf ADPRC-, NADGH- und Pyrophosphataseaktivität entwickelt. Dieser Assay ermöglicht den Nachweis und die quantitative Bestimmung aller drei genannten Enzymaktivitäten im Rahmen einer einzigen Messung. Unter Nutzung dieses Assays konnten ADPRC- und NADGH-Aktivität sowohl an der Zelloberfläche (Ektoenzym CD38) und im Cytosol der Lymphozyten als auch in für intrazelluläre Membranen angereicherten Fraktionen, nämlich in P10-Fraktion (angereichert für Mitochondrien) und der P2-Fraktion (möglicherweise für Zellkerne angereichert), nachgewiesen werden. Durch pharmakologische Charakterisierung des cytosolischen Enzyms im Vergleich zu membranständigen ADPRCs/NADGHs, die durch Western Blot-Analyse als CD38 identifiziert wurden, konnte unter Einsatz dieses Assays weiterhin der zelluläre Redoxstatus als möglicherweise selektiver Regulationsmechanismus für die katalytische Aktivität des cytosolischen Enzyms identifiziert werden. Zweitens wurde durch Inhibition nur der katalytischen Aktivität des an der Zelloberfläche der Lymphozyten exprimierten Ektoenzym CD38 einerseits, bzw. durch Inhibition der cADPR-Synthese aller, also auch der intrazellulär lokalisierten ADPRCs/NADGHs andererseits im Vorwege einer Stimulation der Zellen über den TCR/CD3-Komplex, mit pharmakologischen Mitteln ein direkter Nachweis dafür erbracht, daß intrazellulär lokalisierte ADPRCs/NADGHs funktionell an der Ausbildung des durch die Stimulation vermittelten Ca^{2+} -Signals beteiligt sind. Gleichzeitig wurde eine funktionelle Bedeutung der cADPR-Synthese durch das Ektoenzym für die Entstehung des Ca^{2+} -Signals widerlegt. Um diesen Nachweis führen zu können, wurde ausgehend von der Substanz NHD, die zuvor als wirksamer Antagonist der katalytischen Aktivität aller ADPRCs/NADGHs der Lymphozyten identifiziert worden war, erstmals ein membranpermeanter Inhibitor dieser Enzyme (8-Br-NHD) entwickelt und hergestellt. Drittens wurde als ein erster plausibler Kandidat einer löslichen/membranassoziierten, cytosolischen

und von CD38 verschiedenen ADPRC/NADGH das leukozytenspezifische, cytosolische Protein L-Plastin proteinbiochemisch aufgereinigt und durch massenspektrometrische Sequenzierung identifiziert. Dieses weist nennenswerte Sequenzhomologien zu katalytisch relevanten Sequenzabschnitten von CD38 und CD157 auf. Zusätzlich deutet eine ausgeprägte Homologie eines N-terminal gelegenen Abschnitts der Primärsequenz von L-Plastin mit der Fingerprint-Region des klassischen Dinukleotid-Bindungsmotivs (Rossmann-Faltung) stark darauf hin, daß es sich bei L-Plastin um ein NAD-bindendes/-metabolisierendes Protein/Enzym handeln könnte. Der direkte Nachweis einer cADPR-Synthese durch dieses Protein konnte mit rekombinant exprimiertem L-Plastin bislang allerdings nicht erbracht werden. Viertens wurde die Hypothese, daß es in T-Lymphozyten neben CD38 eine auf molekularer Ebene von diesem verschiedene ADPRC/NADGH geben könnte, maßgeblich gestützt, indem in subzellulären Fraktionen von CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten der Maus, insbesondere in der cytosolischen (S100) und in der für membranassoziierte cytosolische Proteine angereicherten Fraktion (PS100), eine Restaktivität zur cADPR- und ADPR-Synthese nachgewiesen werden konnte. Ob L-Plastin tatsächlich ADPRC- und/oder NADGH-Aktivität besitzt und auf welche Weise subzellulär an unterschiedlichen Orten exprimierte ADPRCs/NADGHs der T-Lymphozyten mittels ihrer Synthese von cADPR in voneinander abgegrenzte oder miteinander quervernetzte Signalwege involviert sind, ist noch ungeklärt.

7. Abstract

The main subject of the present work was the molecular and pharmacological characterization of human T cell ADP-ribosyl cyclases (ADPRC)/NAD glycohydrolases (NADGH) localized intracellularly compared to the ectoenzyme CD38 and the elucidation of their role in Ca^{2+} -signaling stimulated by TCR/CD3 complex ligation. Major interest was also dedicated to the purification of the soluble ADPRC which had previously been detected in the cytosolic fraction of Jurkat T cells. A further aim was to provide direct evidence for a functional role of cyclic ADP-ribose (cADPR) synthesized intracellularly by the former enzymes during TCR/CD3 complex-stimulated elevation of $[Ca^{2+}]_i$, as opposed to such a role of cADPR synthesized extracellularly by the cell surface protein CD38.

Considering these goals, the following main results were obtained: (i) A sensitive and reliable RP-HPLC enzyme assay to determine ADPRC, NADGH and pyrophosphatase activity was established. This assay was suitable to analyze and quantify all three enzyme activities during a single analytical run. By the usage of this enzyme assay, ADPRC and NADGH activity could be detected on the cell surface and in the cytosol of the lymphocytes as well as in subcellular fractions of the cells enriched for intracellular membranes, namely the P10 (enriched for mitochondria) and P2 fraction (probably enriched for nuclei). Additionally, by pharmacological profiling of the cytosolic enzyme *versus* membrane-bound ADPRCs/NADGHs, the latter of which were identified as CD38 by western blot analysis, evidence could be obtained for a selective regulation of the soluble enzyme catalytic activity by the redox state of the cells. (ii) By means of pharmacological tools it was directly proven that cADPR synthesis by intracellular localized ADPRCs/NADGHs, but not by the ectoenzyme CD38, is involved in TCR/CD3 complex mediated Ca^{2+} -signaling. If intact cells were preincubated to inhibit/inactivate cell surface CD38 enzyme activity and then stimulated via the TCR/CD3, no change in the Ca^{2+} -signal was observed compared to untreated control cells. However, if intracellular ADPRCs/NADGHs were inhibited, the Ca^{2+} -signal in response to TCR/CD3 complex stimulation of the cells was strongly reduced. In order to be able to inhibit the latter enzymes, starting from NHD, which was shown before to be a potent inhibitor of all ADPRCs/NADGHs of Jurkat T cells *in vitro*, a membrane permeant derivative (8-Br-NHD) was developed and synthesized. (iii) As a considerable candidate for the soluble/membrane attached cytosolic ADPRC of T cells the leucocyte specific protein L-plastin was chromatographically purified and identified based on primary protein sequence data. This protein showed remarkable sequence homology to stretches of the primary protein sequence of CD38 and CD157, which in case of CD38 are known to be important for the catalytic

activity of the enzyme. Additionally strong homology of a N-terminal sequence stretch of L-plastin to the sequence of the fingerprint region of the classical dinucleotide fold (Rossmann fold) was detected, indicating that L-plastin might be a NAD(P) binding protein or NAD(P) metabolizing enzyme. However no direct proof could be provided yet for L-plastin ADPRC or NADGH activity by analyzing the recombinant protein. (iii) The expression of cADPR synthesizing enzymes molecularly different from CD38 in T cells was confirmed by analysis of CD38 (-/-) mouse T lymphoblasts, which still showed considerable ADPRC and NADGH activity in the cytosolic fraction (S100) and a subcellular fraction enriched for cytosolic membrane attached proteins (PS100). Whether L-plastin indeed is an ADPRC/NADGH and how ADPRCs/NADGHs expressed at different subcellular locations are involved in different or converging signaling pathways still needs to be clarified.

8. Literaturverzeichnis

- Aarhus, R., Graeff, R.M., Dickey, D.M., Walseth, T.F., und Lee, H.C.** (1995). ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP⁺. *J. Biol. Chem.* **270**: 30327-30333
- Adebanjo, O.A., Shankar, V.S., Pazlanas, M., Simon, B.J., Lai, F.A., Huang, C.L.-H., und Zaidi, M.** (1996). Extracellularly applied ruthenium red and cyclic ADP-ribose elevate cytosolic Ca²⁺ in isolated rat osteoclasts. *Am. J. Physiol.* (Renal Fluid electrolyte Physiol. 39) **270**: F469-F475
- Adebanjo, O.A., Anandatheerthavarada, H.K., Koval, A.P., Moonga, B.S., Biswas, G., Sun, L., Sodam, B.R., Bevis, P.J.R., Huang, C.L.-H., Epstein, S., Lai, F.A., Avadhani, N.G., und Zaidi, M.** (1999). A new function of CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis. *Nature Cell Biol.* **1**: 409-414
- Adebanjo, O.A., Koval, A., Moonga, B.S., Wu, X.B., Yao, S., Bevis, P.J.R., Kumegawa, M., Zaidi, M., und Sun, Li.** (2000). Molecular cloning, expression, and functional characterization of a novel member of the CD38 family of ADP-ribosyl cyclases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**: 884-889
- Albrieux, M., Sardet, C., und Villaz, M.** (1997). The two intracellular Ca²⁺ release channels, ryanodine receptor and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, play different roles during fertilization in ascidiens. *Dev. Biol.* **189**: 174-185
- Alessio, M., Roggero, S., Funaro, A., de Monte, L.B., Peruzzi, L., Geuna, M., und Malavasi, F.** (1990). CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes and plasma cells. *J. Immunol.* **145**: 878-884
- Allen, G.J., Muir, S.R., und Sanders, D.** (1995). Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both IP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**: 735-737
- Amadou, A., Nawrocki, A., Best-Belpomme, M., Pavoine, C., und Pecker, F.** (2002). Arachidonic acid mediates dual effect of TNF- α on Ca²⁺ transients and contraction of adult rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C1339-C1347
- Arpin, M., Friederich, E., Algrain, M., Vernel, F., und Louvard, D.** (1995). Functional differences between l- and t-plastin isoforms. *J. Cell Biol.* **127**: 1995-2008
- Augustin, A., Muller-Steffner, H., und Schuber, F.** (2000). Molecular cloning and functional expression of bovine spleen ecto-NAD⁺-glycohydrolase: structural identity with human CD38. *Biochem. J.* **345**: 43-52
- Ayabe, T., Kopf, G.S., und Schultz, R.M.** (1995). Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP-ribose on uniseminated and inseminated eggs. *Development* **121**: 2233-2244
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M., und Ueda, K.** (1992). Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 1569-1575
- Barritt, G.J.** (1999). Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signalling requirements. *Biochem. J.* **337**: 153-169
- Bauvois, B., Durant, L., Laboureaux, J., Barthélémy, E., Rouillard, D., Boulla, G., und Deterre, P.** (1999). Upregulation of CD38 gene expression in leukemia B cells by interferon types I and II. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**: 1059-1066
- Beers, K.W., Chini, E.N., und Dousa, T.P.** (1995). All-trans-retinoic acid stimulates synthesis of cyclic ADP-ribose in renal LLC-PK₁ cells. *J. Clin. Invest.* **95**: 2385-2390
- Bellamacina, C.R.** (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.* **10**: 1257-1269
- Bennett, D.L., Cheek, D.R., Berridge, M.J., Smedt, H.D., Parys, J.B., Missiaen, L., und Bootman, M.D.** (1996). Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 6356-6362

- Berg, I., Potter, B.V.L., Mayr, G.W., und Guse, A.H.** (2000). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca²⁺-signaling. *J. Cell Biol.* **150**: 581-588
- Bernardi, P.** (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79**: 1127-1155
- Bernofsky, C.** (1990). Physiologic aspects of pyridine nucleotide regulation in mammals. *Mol. Cell. Biochem.* **33**: 135-143.
- Berridge, G., Cramer, R., Galione, A., und Patel, S.** (2002a). Metabolism of the novel Ca²⁺-mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via 2'-specific Ca²⁺-dependent phosphatase. *Biochem. J.* **365**: 295-301
- Berridge, G., Dickinson, G., Parrington, J., Galione, A., und Patel, S.** (2002b). Solubilization of receptors for the novel Ca²⁺ mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). Abstract-Band der European Calcium Society(ECS)-Tagung in Brüssel (12.-15. Juni 2002), p: 271
- Berridge, M.J.** (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325
- Berridge, M.J.** (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* **312**: 1-11
- Berridge, M.J.** (1997a). Lymphocyte activation in health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* **17**: 155-178
- Berridge, M.J.** (1997b). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.* **499**: 291-306
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., und Lipp, P.** (1998). Calcium – a life and death signal. *Nature* **395**: 645-648
- Berridge, M.J., Lipp, P., und Bootman, M.D.** (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 11-21
- Berry, N., und Nishizuka, Y.** (1990). Protein kinase C and T cell activation. *Eur. J. Biochem.* **189**: 205-214
- Berthelie, V., Tixier, J.M., Muller-Steffner, H., Schuber, F., und Deterre, P.** (1998). Human CD38 is an authentic NAD(P)⁺ glycohydrolase. *Biochem. J.* **330**: 1383-1390
- Berthelie, V., Laboureau, J., Boulla, G., Schuber, F., und Deterre, P.** (2000). Probing ligand-induced changes of human CD38. *Eur. J. Biochem.* **267**: 3056-3064
- Betto, R., Teresi, A., Turcato, F., Salviati, G., Sabbadini, R.A., Krown, K., Glembotski, C.C., Kindman, L.A., Dettbarn, C., Pereon, Y., Yasui, K., und Palade, T.P.** (1997). Sphingosylphosphocholine modulates the ryanodine receptor/calcium-release channel of cardiac sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem. J.* **322**: 327-333
- Beutner, G., Sharma, V.K., Giovanucci, D.R., Yule, D.I., und Sheu, S.S.** (2001). Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**: 21482-21488
- Bock, K.W., Sieckevitz, P., und Palade, G.E.** (1971). Localization and turnover studies of membrane nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase in rat liver. *J. Biol. Chem.* **246**: 188-195
- Bootman, M.D., und Berridge, M.J.** (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell* **83**: 675-678
- Bourguignon, L.Y., Chu, A., Jin, H., und Brandt, N.R.** (1995). Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca²⁺ release in mouse T-lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 17917-17922
- Boyer, C.S., Moore, G.A., und Moldeus, P.** (1993). Submitochondrial localization of the NAD⁺ glycohydrolase. Implications for the role of pyridine nucleotide hydrolysis in mitochondrial calcium fluxes. *J. Biol. Chem.* **268**: 4016-4020
- Braittmayer, J.-P., Aussel, C., Farahifar, D., Cousin, J.L., und Fehlmann, M.** (1991). A phosphatidic acid sensitive intracellular pool of calcium is released by anti-CD3 in Jurkat T cells. *Immunol.* **73**: 134-139

- Bröker, B.M., Tsygankov, A.Y., Müller-Fleckenstein, I., Guse, A.H., Chitaev, N.A., Biesinger, B., Fleckenstein, B., und Emmrich, F.** (1993). Immortalization of human T cell clones by Herpesvirus saimiri. Signal transduction analysis reveals functional CD3, CD4 and IL-2 receptors. *J. Immunol.* **151**: 1184-1192
- Bruzzo, S., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Corte, G., und De Flora, A.** (1998). Dimeric and tetrameric forms of catalytic active transmembrane CD38 in transfected HeLa cells *FEBS Lett.* **433**: 275-278
- Bruzzo, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., und De Flora, A.** (2001a). Connexin 43 hemichannels mediate Ca^{2+} -regulated transmembrane NAD^+ fluxes in intact cells. *FASEB J.* **15**: 10-12
- Bruzzo, S., Franco, L., Guida, L., Zocchi, E., Contini, P., Bisso, A., Usai, C., und De Flora, A.** (2001b). A self restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD^+ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**: 48300-48308
- Cancela, J.M., Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., und Petersen, O.H.** (2000). Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca^{2+} release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *EMBO J.* **19**: 2549-2557
- Cancela, J.M., Coppenolle, F.V., Galione, A., Tepikin, A.V., und Petersen, O.H.** (2002). Transformation of lokal Ca^{2+} spikes to global Ca^{2+} transients: the combinatorial roles of multiple Ca^{2+} releasing messengers. *EMBO J.* **21**: 909-919
- Chidambaram, N., Wong, E.T., und Chang, C.F.** (1998). Differential oligomerization of membrane-bound CD38/ADP-ribosyl cyclase in porcine heart microsomes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**: 1225-1233
- Chidambaram, N., und Chang, C.F.** (1998). Functional role of glycosylation on the recombinant CD38/ADP-ribosyl cyclase in CHO cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30**: 1011-1018
- Chidambaram, N., und Chang, C.F.** (1999). NADP^+ -dependent internalization of recombinant CD38 in CHO cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**: 267-272
- Chini, E.N., und Dousa, T.P.** (1995). Enzymatic synthesis and degradation of nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP), a Ca^{2+} -releasing agonist, in rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**: 167-174
- Chini, E.N., De Toledo, F.G.S., Thompson, M.A., und Dousa, T.P.** (1997). Effect of estrogen upon cyclic ADP-ribose metabolism: β -estradiol stimulates ADP-ribosyl cyclase in rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5872-5876
- Chini, E.N., Chini, C.C.S., Kato, I., Takasawa, S., und Okamoto, H.** (2002). CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem. J.* **362**: 125-130
- Chini, E.N., und De Toledo, F.G.S.** (2002). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new intracellular messenger?. *Am J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C1191-C1198
- Christensen, K.A., Myers, J., und Swanson, J.A.** (2002). pH dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell Sci.* **115**: 599-607
- Christian, E.P., Spence, K.T., Togo, J.A., Dargis, P.G., und Patel, J.** (1996). Calcium-dependent enhancement of depletion-activated calcium current in Jurkat T lymphocytes. *J. Membrane Biol.* **150**: 63-71
- Churchill, G.C., und Galione, A.** (2001). NAADP induces Ca^{2+} oscillations via a two-pool mechanism by priming IP_3 - and cADPR-sensitive Ca^{2+} stores. *EMBO J.* **20**: 2666-2671
- Cifuentes, F., González, C.E., Fiordeliso, T., Guerrero, G., Lai, F.A., und Hernández-Cruz, A.** (2001). A ryanodine fluorescent derivative reveals the presence of high-affinity ryanodine binding sites in the Golgi complex of rat sympathetic neurons, with possible functional roles in intracellular Ca^{2+} signaling. *Cell. Signal.* **13**: 353-362
- Clapper, D.L., und Lee, H.C.** (1985). Inositol trisphosphate induces calcium release from nonmitochondrial stores in sea urchin egg homogenates. *J. Biol. Chem.* **260**: 13947-13954

- Clapper, D.L., Walseth, T.F., Dargie, P.J., und Lee, H.C.** (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **262**: 9561-9568
- Clementi, E., Riccio, M., Sciorati, C., Nistico, G., und Meldolesi, J.** (1996). The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of nitric oxide/cGMP pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 17739-17745
- Cockayne, D.A., Muchamuel, T., Grimaldi, J.C., Muller-Steffner, H., Randall, T.D., Lund, F.E., Murray, R., Schuber, F., und Howard, M.** (1998). Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune response. *Blood* **92**: 1324-1333
- Corbett, E.F., und Michalak, M.** (2000). Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum?. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 307-311
- Crabtree, G.R., und Clipstone, N.A.** (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 1045-1083
- Currie, K., Swann, K., Galione, A., und Scott, R.H.** (1992). Activation of Ca²⁺-dependent currents in cultured neurons by a sperm factor and cyclic ADP-ribose. *Mol. Biol. Cell* **3**: 1415-1422
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., und Poirier, G.G.** (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* **342**: 249-268
- da Silva, C.P., Potter, B.V.L., Mayr, G.W., und Guse, A.H.** (1998a). Quantification of intracellular levels of cyclic ADP-ribose by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **701**: 43-50
- da Silva, C.P., Schweitzer, K., Heyer, P., Malavasi, F., Mayr, G.W., und Guse, A.H.** (1998b). Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca²⁺-signalling activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related. *FEBS Lett.* **439**: 291-296
- da Silva, C.P., und Guse, A.H.** (2000). Intracellular Ca²⁺ release mechanisms: multiple pathways having multiple functions within the same cell type?. *Biochim. Biophys. Acta* **1498**: 122-133
- Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C.M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., und Malavasi, F.** (1998). Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J. Immunol.* **160**: 395-402
- Deaglio, S., Zubiaur, M., Gregorini, A., Bottarel, F., Ausiello, C.M., Dianzani, U., Sancho, J., und Malavasi, F.** (2002). Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood* **99**: 2490-2498
- de Arruda, M.V., Watson, S., Lin, C.-S., Leavitt, J., und Matsudaira, P.** (1990). Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic protein plastin and has domains homologues with calmodulin and actin gelation proteins. *J. Cell. Biol.* **111**: 1069-1079
- Dechert, D.** (1999). Gelektrophoresen. In: *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (Gassen, H.G. und Schrimpf, G. eds.), 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Kapitel 2.2.1, p: 41
- De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Pestarino, M., Usai, C., Marchetti, C., Fedele, E., Fontana, G., und Raiteri, M.** (1996). Ectocellular *in vitro* and *in vivo* metabolism of cADP-ribose in cerebellum. *Biochem. J.* **320**: 665-672
- De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Bruzzone, S., Benatti, U., Damonte, G., und Lee, H.C.** (1997). CD38 and ADP-ribose cyclase catalyze the synthesis of a dimeric ADP-ribose that potentiates the calcium mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* **272**: 12945-12951
- De Flora, A., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., und Zocchi, E.** (1998). Ectocellular synthesis and intracellular Ca²⁺-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *Cell Biochem. Biophys.* **28**: 45-62

- De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S., und Zocchi, E.** (2002). Subcellular and extracellular trafficking of NAD⁺ and cyclic ADP-ribose: a new way for regulating intracellular calcium homeostasis. In: *Cyclic ADP-Ribose and NAADP. Structures, Metabolism and Functions* (Lee, H.C. ed.), Dodrecht Kluwer, im Druck
- Deterre, P., Gelman, L., Gary-Gouy, H., Arrieumerlou, C., Berthelie, V., Tixier, J.-M., Ktorza, S., Goding, J., Schmitt, C., und Bismuth, G.** (1996). Coordinated regulation in human T cells of nucleotide-hydrolyzing ecto-enzymatic activities, including CD38 and PC-1. Possible role in the recycling of nicotinamide adenine dinucleotide metabolites. *J. Immunol.* **157**: 1381-1388
- Deterre, P., Berthelie, V., Bauvois, B., Dalloul, A., Schuber, F., und Lund, F.** (2000). CD38 in T- and B-cell functions. *Chem. Immunol.* **75**: 146-168
- De Toledo, F.G.S., Cheng, J., und Dousa, T.P.** (1997). Retinoic acid and triiodothyronine stimulate ADP-ribosyl cyclase activity in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**: 847-850
- De Toledo, G.S., Cheng, J., Liang, M., Chini, E.N., und Dousa, T.P.** (2000). ADP-ribosyl cyclase in rat vascular smooth muscle cells: properties and regulation. *Circ. Res.* **86**: 1153-1159
- Dogan, S., White, T.A., Desphande, D., Murtaugh, M.P., Walseth, T.F., und Kannan, M.S.** (2002). Estrogen increases CD38 gene expression and leads to differential regulation of adenosine diphosphate (ADP)-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities in rat myometrium. *Biol. Reprod.* **66**: 596-602
- Dong, C., Wang, J., Neame, P., und Cooper, M.** (1994). The murine BP-3 gene encodes a relative of the CD38/NAD glycohydrolase family. *Int. Immunol.* **6**: 1353-1360
- Dousa, T.P., Chini, E.N., und Beers, K.W.** (1996). Adenine nucleotide diphosphates: emerging second messengers acting via intracellular Ca²⁺ release. *Am. J. Physiol.* **271**: C1007-C1024
- Drach, J., Zhao, S., Malavasi, F., und Mehta, K.** (1993). Rapid induction of CD38 antigen on myeloid leucemia cells by all-*trans*-retinoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 545-550
- D'Santos, C.D., Communi, D., Ludgate, M., Vanveyenber, V., Takazawa, K., und Erneux, C.** (1994). Identification of high molecular weight forms of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in rat thymus and human lymphocytes. *Cell. Signal.* **6**: 335-344
- Ebihara, S., Sasaki, T., Hida, W., Kikuchi, Y., Oshiro, T., Shimura, S., Takasawa, S., Okamoto, H., Nishiyama, A., Akaike, N., und Shirato, K.** (1997). Role of cyclic ADP-ribose in ATP-activated potassium currents in alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* **272**: 16023-16029
- Fanger, C.M., Rauer, H., Neben, A.L., Miller, M.J., Rauer, H., Wulff, H., Rosa, J.C., Ganellin, C.R., Chandy, K.G., und Cahalan, M.D.** (2001). Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **276**: 12249-12256
- Fernandez, J.E., Deaglio, S., Donati, D., Svoboda, I., Beusan, F., Corno, F., Aranega, A., Forni, M., Falini, B., und Malavasi, F.** (1998). Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **12**:81-91
- Ferrero, E., und Malavasi, F.** (1997). Human CD38, a leucocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eucariotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide⁺-converting enzymes. *J. Immunol.* **159**: 3858-3865
- Fliegert, R.** (1999). Untersuchungen zur Wirkung von Nukleotidanaloga auf den cADPR/Ca²⁺-Signalweg in T-Lymphozyten. *Diplomarbeit* an der Universität Hamburg
- Fomina, A.F., Fanger, C.M., Kozak, J.A., und Cahalan, M.D.** (2000). Single channel properties and regulated expression of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels in human T cells. *J. Cell Biol.* **150**: 1435-1444
- Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E., Usai, C., und De Flora, A.** (1998). The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB J.* **12**: 1507-1520

- Franco, L., Zocchi, E., Usai, C., Guida, L., Bruzzone, S., Costa, A., und De Flora, A.** (2001a). Paracrine roles of NAD⁺ and cyclic ADP-ribose in increasing intracellular calcium and enhancing cell proliferation of 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**: 21642-21648
- Franco, L., Bruzzone, S., Song, P., Guida, L., Zocchi, E., Walseth, T.F., Crimi, E., Usai, C., De Flora, A., und Brusasco, V.** (2001b). Extracellular cyclic ADP-ribose potentiates ACh-induced contraction in bovine tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* **280**: L98-L106
- Fukushi, Y., Kato, I., Takasawa, S., Sasaki, T., Ong, B.H., Sato, M., Ohsaga, A., Sato, K., Shirato, K., Okamoto, H., und Maruyama, Y.** (2001). Identification of cyclic ADP-ribose-dependent mechanisms in pancreatic muscarinic Ca²⁺ signaling using CD38 knockout mice. *J. Biol. Chem.* **276**: 649-655
- Funaro, A., de Monte, L.B., Dianzani, U., Forni, M., und Malavasi, F.** (1993). Human CD38 is associated to distinct molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2407-2411.
- Funaro, A., Horenstein, A.L., Calosso, L., Morra, M., Tarocco, R.P., Franco, L., De Flora, A., und Malavasi, F.** (1996). Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids. *Int. Immunol.* **8**: 1643-1650
- Funaro, A., Reinis, M., Trubiani, O., Santi, S., Di Primo, R., und Malavasi, F.** (1998). CD38 functions are regulated through an internalization step. *J. Immunol.* **160**: 2238-2247
- Funaro, A., Ferrero, E., Mehta, K., und Malavasi, F.** (2000). Schematic portrait of human CD38 and related molecules. *Chem. Immunol.* **75**: 256-273
- Furuya, Y., Takasawa, S., Yonekura, H., Tanaka, T., Takahara, J., und Okamoto, H.** (1995). Cloning of a cDNA encoding rat bone marrow stromal cell antigen 1 (BST-1) from the islets of Langerhans. *Gene* **165**: 329-330
- Galione, A., White, A., Willmott, N., Turner, M., Potter, B.V.L., und Watson, S.P.** (1993a). cGMP mobilizes intracellular Ca²⁺ in sea urchin egg by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature* **365**: 456-459
- Galione, A., McDonald, A., Busa, W.B., Wilmott, N., Gillot, I., und Whitaker, M.** (1993b). Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. *Science* **261**: 384-352
- Galione, A.** (1993). Cyclic ADP-ribose: a new way to control calcium. *Science* **259**: 325-326
- Galione, A., und White, A.** (1994). Ca²⁺-release induced by cyclic ADP-ribose. *Trends Cell Biol.* **4**: 431-436
- Galione, A., Patel, S., Parrington, J., und Churchill, G.C.** (2002). NAADP receptors: new channels for calcium release. Abstract-Band der European Calcium Society(ECS)-Tagung in Brüssel (12.-15. Juni 2002), pp: 72-73
- Gasser, A.** (2001). Analyse von ADP-Ribosylcyclasen in humanen T-Lymphozyten. *Diplomarbeit an der Universität Hamburg*
- Gelman, L., Deterre, P., Gouy, H., Boumsell, L., Debré, P., und Bismuth, G.** (1993). The lymphocyte surface antigen CD38 acts as a nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **23**: 3361-3364
- Genazzani, A.A., Bak, J., und Galione, A.** (1996). Inhibition of cADPR-hydrolase by ADP-ribose potentiates cADPR synthesis from β -NAD⁺. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**: 502-507
- Genazzani, A.A., und Galione, A.** (1996). Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-insensitive pool. *Biochem. J.* **315**: 721-725
- Genazzani, A.A., und Billington, R.A.** (2002). NAADP: an atypical Ca²⁺-release messenger?. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 165-167

- Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., und Petersen, O.H.** (1995). ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope. *Cell* **80**: 439-444
- Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Belan, P.V., und Petersen, O.H.** (1996). Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose mediated release of Ca^{2+} from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell* **84**: 473-480
- Glick, D.L., Hellmich, M.R., Beushausen, S., Tempst, P., Bayley, H., und Strumwasser, F.** (1991). Primary structure of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell. Regul.* **2**: 211-218
- Goldstein, D.J., Djeu, J., Latter, J., Burbeck, S., und Leavitt, J.** (1985). Abundant synthesis of the transformation-induced protein of neoplastic human fibroblasts, plastin, in normal lymphocytes. *Cancer Res.* **45**: 5643-5647
- Ghosh, T.K., Bian, J., und Gill, D.L.** (1990). Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science* **248**: 1653-1656
- Ghosh, T.K., Bian, J., und Gill, L.** (1994). Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J. Biol. Chem.* **269**: 22628-22635
- Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., und Scrobogna, M.** (1995). The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J. Cell Biol.* **128**: 893-904
- Goodwin, G.H.** (1995). Isolation of nuclei. In: *Protein Purification Methods - A Practical Approach* (Harris, E.L.V., und Angal, S. eds.), 1. Auflage, Kapitel 4.1, Information Press Ltd., Oxford (UK), pp: 97-101
- Graeff, R.M., Walseth, T.F., Fryxell, K., Branton, W.D., und Lee, H.C.** (1994). Enzymatic synthesis and characterization of cyclic GDP-ribose. A procedure for distinguishing enzymes with ADP-ribosyl cyclase activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 30260-30267
- Graeff, R.M., Walseth, T.F., Hill, H.K., und Lee, H.C.** (1996). Fluorescent analogs of cyclic ADP-ribose: synthesis, spectral characterization and use. *Biochemistry* **35**: 379-386
- Graeff, R., Franco, L., De Flora, A., und Lee, H.C.** (1998). Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J. Biol. Chem.* **273**: 118-125
- Graeff, R., Munshi, C., Aarhus, R., Johns, M., und Lee, H.C.** (2001). A single residue at the active site of CD38 determines its NAD cyclizing and hydrolyzing activities. *J. Biol. Chem.* **276**: 12169-12173
- Graeff, R., und Lee, H.C.** (2002). A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar sensitivity. *Biochem. J.* **361**: 379-384
- Grafton, G., und Thwaite, L.** (2001). Calcium channels in lymphocytes. *Immunology* **104**: 119-126
- Green, S., und Dobrjansky, A.** (1972). Nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolases from Ehrlich Ascites tumor cell nuclei: isolation, partial purification, and properties. *Biochemistry* **11**: 4108-4113
- Gribble, F.M., Loussouarn, G., Tucker, S.J., Zhao, C., Nichols, C.G., und Ashcroft, F.M.** (2000). A novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *J. Biol. Chem.* **275**: 30046-30049
- Grimaldi, J.C., Balasubramanian, S., Kabra, N.H., Shanafelt, A., Bazan, J.F., Zurawski, G., und Howard, M.C.** (1995). CD38-mediated ribosylation of proteins. *J. Immunol.* **115**: 811-817
- Gromada, J., Jorgensen, T.D., und Dissing, S.** (1995a). Cyclic ADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate mobilize Ca^{2+} from distinct intracellular pools in permeabilized lacrimal acinar cells. *FEBS Lett.* **360**: 303-306
- Gromada, J., Jorgensen, T.D., und Dissing, S.** (1995b). The release of intracellular Ca^{2+} in lacrimal acinar cells by α -, β -adrenergic and muscarinic cholinergic stimulation: the roles of inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *Eur. J. Physiol.* **429**: 751-761

- Grynciewicz, G., Peonie, M., und Tsien, R.Y.** (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450
- Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., und De Flora, A.** (1995). Structural role of disulfide bridges in the cyclic ADP-ribose related bifunctional ectoenzyme CD38. *FEBS Lett.* **368**: 481-484
- Guse, A.H., Greiner, E., Emmrich, F., und Brand, K.** (1993). Mass changes of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate during cell cycle progression in rat thymocytes. *J. Biol. Chem.* **268**: 7129-7133.
- Guse, A.H., da Silva, C.P., Emmrich, F., Ashamu, G.A., Potter, B.V.L., und Mayr, G.W.** (1995). Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca^{2+} release in T lymphocyte cell lines. *J. Immunol.* **155**: 3353-3359
- Guse, A.H., Berg, I., da Silva, C.P., Potter, B.V.L., und Mayr, G.W.** (1997). Ca^{2+} entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 8546-8550
- Guse, A.H.** (1998). Ca^{2+} -signaling in T lymphocytes. *Crit. Rev. Immunol.* **18**: 419-448
- Guse, A.H., da Silva, C.P., Berg, I., Skapenko, A.L., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger, M., Ashamu, G.A., Schulze-Koops, H., Potter, B.V.L., und Mayr, G.W.** (1999). Regulation of calcium signaling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* **398**: 70-73
- Guse, A.H.** (1999). Cyclic ADP-ribose: a novel Ca^{2+} -mobilizing second messenger. *Cell. Signal.* **11**: 309-316
- Guse, A.H.** (2000a). Cyclic ADP-ribose. *J. Mol. Med.* **78**: 26-35
- Guse, A.H.** (2000b). The Ca^{2+} -mobilizing messenger cyclic ADP-ribose. In: *calcium: The molecular basis of calcium action in biology and medicine* (Pochet, R., Donato, R., Haiech, J., Heizmann, C., and Gercke, V. eds.), Kluwer Academic Publishers, pp: 109-128
- Hakamata, Y.S., Nishimura, J., Nakai, J., Nakashima, Y., Kita, T., und Imoto, K.** (1994). Involvement of the brain type of ryanodine receptor in T-cell proliferation. *FEBS Lett.* **352**: 206-210
- Haltiwanger, R.S., Kelly, W.G., Roquemore, E.P., Blomberg, M.A., Dong, L.-Y.D., Kreppel, L., Chou, T.-Y., und Hart, G.W.** (1992). Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins is ubiquitous and dynamic. *Biochem. Soc. Trans.* **20**: 264-269
- Han, M.-K., Cho, Y.-S., Kim, Y.S., Yim, C.-Y., und Kim, U.-H.** (2000). Interaction of two classes of ADP-ribosyl transfer reactions in immune signaling. *J. Biol. Chem.* **275**: 20799-20805
- Han, M.-K., Kim, S.-J., Park, J.-R., Shin, Y.-M., Park, H.J., Park, K.-J., Park, K.-H., Kim, H.-K., Jang, S.-I., An, N.-H., und Kim, U.-H.** (2002). Antidiabetic effect of a prodrug of cysteine, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, through CD38 dimerization and internalization. *J. Biol. Chem.* **277**: 5315-5321
- Harada, N., Santos-Argumedo, L., Chang, R., Grimaldi, J.C., Lund, F.E., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Heath, A.W., Parkhouse, R.M.E., und Howard, M.** (1993). Expression cloning of a cDNA encoding a novel murine B cell activation marker. Homology to human CD38. *J. Immunol.* **151**: 3111-3118
- Hara-Yokoyama, M., Kukimoto, I., Nishina, H., Kontani, K., Hirabayashi, Irie, F., Sugiyama, H., Furuyama, S., und Katada, T.** (1996). Inhibition of NAD^+ glycohydrolase and ADP-ribosyl cyclase activities of leucocyte cell surface antigen CD38 by gangliosides. *J. Biol. Chem.* **271**: 12951-12955
- Hara-Yokoyama, M., Nagatsuka, Y., Katsumata, O., Irie, F., Kontani, K., Hoshino, S.-I., Katada, T., Ono, Y., Yoshigaki, J.F., Sugiyama, H., Furuyama, S., und Hirabayashi, Y.** (2001). Complex gangliosides as cell surface inhibitors for the ecto- NAD^+ glycohydrolase of CD38. *Biochemistry* **30**: 888-895
- Harmer, A.R., Gallacher, D.V., und Smith, P.M.** (2001). Role of $\text{ins}(1,4,5)\text{P}_3$, cADP-ribose and nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in Ca^{2+} signalling in mouse submandibular acinar cells. *Biochem. J.* **353**: 555-560

- Harnick, D.J., Jayaraman, T., Ma, Y., Mulieri, P., Go, L.O., und Marks, A.R.** (1995). The human type inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T lymphocytes. Structure, localization, and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **270**: 2833-2840
- Harper, S., und Speicher, D.W.** (1995). Detection of proteins on blot membranes. In: *Current protocols in protein science*, John Wiley & Sons Inc., Kapitel 10.8.3
- Harteneck, C., Plant, T.D., und Schultz, G.** (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* **23**: 159-166
- Hellmich, M.R., und Strumwasser, F.** (1991). Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second messenger enzyme. *Cell. Regul.* **2**: 193-202
- Henning, S.W., Meuer, S.C., und Samstag, Y.** (1994). Serine phosphorylation of a 67-kDa protein in human T lymphocytes represents an accessory receptor-mediated signaling event. *J. Immunol.* **152**: 4808-4815
- Heyer, P.** (1998). Untersuchungen zur ADP-Ribosylcyclase in T-Lymphozyten. *Diplomarbeit an der Universität Hamburg*
- Higashida, H., Robbins, J., Egorova, A., Noda, M., Taketo, M., Ishizaka, N., Takasawa, S., Okamoto, H., und Brown, D.A.** (1995). Nicotinamide-adenine dinucleotide regulates muscarinic receptor-coupled K⁺ (M) channels in rodent NG108-15 cells. *J. Physiol.* **482**: 317-323
- Higashida, H.** (1997). ADP-ribosyl cyclase coupled with receptors via G proteins. *FEBS Lett.* **418**: 355-356
- Higashida, H., Yokoyama, S., Hashii, M., Taketo, M., Higashida, M., Takayasu, T., Ohshima, T., Takasawa, S., Okamoto, H., und Noda, M.** (1997). Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes. *J. Biol. Chem.* **272**: 31272-31277
- Higashida, H., Egorova, A., Higashida, C., Zhong, Z.-G., Yokoyama, S., Noda, M., und Zhang, J.-S.** (1999). Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 33348-33354
- Higashida, H., Zhang, J.-S., Hashii, M., Shintaku, M., Higashida, C., und Takeda, Y.** (2000). Angiotensin II stimulates cyclic ADP-ribose formation in neonatal rat cardiac myocytes. *Biochem. J.* **352**: 197-202
- Hirata, Y., Kimura, N., Sato, K., Ohsugi, Y., Takasawa, S., Okamoto, H., Ishikawa, J., Kaisho, T., Ishihara, K., und Hirano, T.** (1994). ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett.* **356**: 244-248
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., und Gudermann, T.** (2000). Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J. Mol. Med.* **78**: 14-25
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R., Drobny, H., und Zidar, A.** (2002). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP, activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem. J.*: im Druck (Online-Manuskript BJ20020584)
- Horenstein, A.L., Stockinger, H., Imhof, B.A., und Malavasi, F.** (1998). CD38 binding of human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31. *Biochem. J.* **330**: 1129-1135
- Hoshino, S.-I., Kukimoto, I., Inoue, S.-I., Kanda, Y., Malavasi, F., und Katada, T.** (1997). Mapping of the catalytic and epitopic sites of human CD38/NAD⁺ glycohydrolase to a functional domain in the carboxyl terminus. *J. Immunol.* **158**: 741-747
- Hosoi, E., Nishizaka, C., Gallagher, K.L., Wyre, H., Matsuo, Y., und Sei, Y.** (2001). Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells. *J. Immunol.* **167**: 4887-4894
- Hotta, T., Asai, K., Fujita, K., Kato, T., und Higashida, H.** (2000). Membrane-bound form of ADP-ribosyl cyclase in rat cortical astrocytes in culture. *J. Neurochem.* **74**: 669-675

- Hoth, M. und Penner, R.** (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**: 353-356
- Howard, M., Grimaldi, J.C., Bazan, J.F., Lund, F.E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R.M.E., Walseth, T.F., und Lee, H.C.** (1993). Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* **262**: 1056-1059
- Hua, S.-Y., Tokimasa, T., Takasawa, S., Furuya, Y., Nohmi, M., Okamoto, H., und Kuba, K.** (1994). Cyclic ADP-ribose modulates Ca^{2+} release channels for activation by physiologic Ca^{2+} entry in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* **12**: 1073-1079
- Humbert, J.-P., Matter, N., Artault, J.-C., Köppler, P., und Malviya, N.** (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J. Biol. Chem.* **271**: 478-485
- Inageda, K., Takahashi, K., Tokita, K., Nishina, K.-I., Kanaho, Y., Kukimoto, I., Kontani, K., Hoshino, S.-I., und Katada, T.** (1995). Enzyme properties of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase: comparison with NAD glycohydrolase of CD38 antigen. *J. Biochem.* **117**: 125-131
- Itoh, M., Ishihara, K., Tomizawa, H., Tanaka, H., Kobune, Y., Ishikawa, J., Kaisho, T., und Hirano, T.** (1994). Molecular cloning of murine BST-1 having homology with CD38 and *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 1309-1317
- Jackson, D.G., und Bell, J.I.** (1990). Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J. Immunol.* **144**: 2811-2815
- Jayaraman, T., Ondriasova, E., Ondrias, K., Harnick, D.J., und Marks, A.R.** (1995). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6007-6011
- Jones, S.L., und Brown, E.J.** (1996). Fc γ RII-mediated adhesion and phagocytosis induce l-plastin phosphorylation in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271**: 14623-14630
- Jones, S.L., Wang, J., Turck, C.W., und Brown, E.J.** (1998). A role for the actin bundling protein l-plastin in the regulation of leucocyte integrin function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9331-9336
- Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., Inazawa, J., Tomizawa, H., Muraoka, O., Ochi, T., und Hirano, T.** (1994). BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5325-5329
- Kannan, M.S., Fenton, A.M., Prakash, Y.S., und Sieck, G.C.** (1996). Cyclic ADP-ribose stimulates sarcoplasmic reticulum calcium release in porcine coronary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.* **39**) **270**: H801-H806
- Kato, I., Yamamoto, Y., Fujimura, M., Noguchi, N., Takasawa, S., und Okamoto, H.** (1999). CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, $[Ca^{2+}]_i$, and insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **274**: 1869-1872
- Khoo, K.M., und Chang, C.F.** (1998). Purification and characterization of CD38/ADP-ribosyl cyclase from rat lung. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**: 841-850
- Khoo, K.M., und Chang, C.F.** (1999). Characterization and localization of CD38 in the vertebrate eye. *Brain Res.* **821**: 17-25
- Khoo, K.M., Han, M.-K., Park, J.B., Chae, S.W., Kim, U.-H., Lee, H.C., Bay, B.H., und Chang, C.F.** (2000). Localization of the cyclic ADP-ribose-dependent calcium signaling pathway in hepatocyte nucleus. *J. Biol. Chem.* **275**: 24807-24817
- Khoo, K.M., und Chang, C.F.** (2002). Identification of nuclear CD38 in the rat spleen. *Int. J. Biochem.* **34**: 43-54

- Kim, U.-H., Kim, M.-K., Kim, J.-S., Han, M.-K., Park, B.-H., and Kim, H.-R.** (1993a). Purification and characterization of NAD glycohydrolase from rabbit erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**: 147-152
- Kim, H., Jacobson, E.L., and Jacobson, M.K.** (1993b). Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD-glycohydrolases. *Science* **261**: 1330-1332
- Kim, S., Lakhani, V., Costa, D.J., Sharara, A.I., Fitz, J.G., Huang, L.W., Peters, K.G., and Kindman, L.A.** (1995). Sphingolipid-gated Ca^{2+} release from intracellular stores of endothelial cells is mediated by a novel Ca^{2+} -permeable channel. *J. Biol. Chem.* **270**: 5266-5269
- Kim, H., Jacobson, E.L., and Jacobson, M.K.** (1996). Position of cyclization in cyclic ADP-ribose. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **194**: 1143-1146
- Kindman, L.A., Kim, S., McDonald, T.V., and Gardner, P.** (1994). Characterization of a novel intracellular sphingolipid-gated Ca^{2+} -permeable channel from rat basophilic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 13088-13091
- Kiselyov, K., Shin, D.M., Shcheynikov, N., Kurosaki, T., and Muallem, S.** (2001). Regulation of Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} current (I_{crac}) by ryanodine receptors in inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-deficient DT40 cells. *Biochem. J.* **360**: 17-22
- Klebl, B.M., and Pette, D.** (1996). A fluorometric assay for measurement of mono-ADP-ribosyltransferase activity. *Anal. Biochem.* **239**: 145-152
- Kontani, K., Nishina, H., Ohoka, Y., Takahashi, K., and Katada, T.** (1993). NAD glycohydrolase specifically induced by retinoic acid in human leucemic HL-60 cells. Identification of the NAD glycohydrolase as leucocyte cell surface antigen CD38. *J. Biol. Chem.* **268**: 16895-16898
- Kontani, K., Kukimoto, I., Kanda, Y., Inoue, S.-I., Kishimoto, H., Hoshino, S.-I., and Katada, T.** (1996). Induction of CD38/NADase and its monoclonal antibody-induced tyrosine phosphorylation in human leukemia cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**: 466-471
- Koshiyama, H., Lee, H.C., and Tashjian, A.H. Jr.** (1991). Novel mechanism of intracellular calcium release in pituitary cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 16985-16988
- Kuemmerle, J.F., and Makhlof, G.M.** (1995). Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in intestinal longitudinal muscle. *J. Biol. Chem.* **270**: 25488-25494
- Kukimoto, I., Hoshino, S.-I., Kontani, K., Inageda, K., Nishina, H., Takahashi, K., and Katada, T.** (1996). Stimulation of ADP-ribosyl cyclase activity of the cell surface antigen CD38 by zinc ions resulting from inhibition of its NAD⁺ glycohydrolase activity. *Eur. J. Biochem.* **239**: 177-182
- Kuroda, R., Kontani, K., Kanda, Y., Katada, T., Nakano, T., Satoh, Y.-I., Suzuki, N., and Kuroda, H.** (2001). Increase of cGMP, cADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate preceding Ca^{2+} transients in fertilization of sea urchin eggs. *Development* **128**: 4405-4414
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lambert, N.** (1995). Isolation of microsomes. In: *Protein Purification Methods - A Practical Approach* (Harris, E.L.V., and Angal, S. eds.), 1. Auflage, Kapitel 4.2, Information Press Ltd., Oxford (UK), pp: 101-108
- Ledbetter, M.W., Preiner, J.K., Louis, C.F., and Mickelson, J.R.** (1994). Tissue distribution of ryanodine receptor isoforms and alleles determined by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* **269**: 31544-31551
- Lee, H.C., Walseth, T.F., Bratt, G.T., Hayes, R.N., and Clapper, D.L.** (1989). Structural determination of cyclic metabolites of NAD⁺ with intracellular Ca^{2+} -mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* **264**: 1608-1615
- Lee, H.C., and Aarhus, R.** (1991). ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD⁺ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell. Regul.* **2**: 2093-2099

- Lee, H.C., Aarhus, R., und Walseth, T. F.** (1993). Calcium mobilization by dual receptors during fertilization of sea urchin eggs. *Science* **261**: 352-355
- Lee, H.C.** (1994). A signaling pathway involving cyclic ADP-ribose, cyclic GMP and nitric oxide. *News Physiol. Sci.* **9**: 134-138
- Lee, H.C., Aarhus, R., und Levitt, D.** (1994). The crystal structure of cyclic ADP-ribose. *Nature Struct. Biol.* **1**: 143-144
- Lee, H.C., und Aarhus, R.** (1995). A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* **270**: 2152-2157
- Lee, H.C.** (1996). Cyclic ADP-ribose and calcium signaling in eggs. *Biol. Signals* **5**: 101-110
- Lee, H.C.** (1997). Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol. Rev.* **77**: 1133-1164
- Lee, H.C., Aarhus, R., Gee, K.R., und Kestner, T.** (1997). Caged nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. Synthesis and use. *J. Biol. Chem.* **272**: 4172-4178
- Lee, H.C.** (1999). A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol. Chem.* **380**: 785-793
- Lee, H.C.** (2000). Enzymatic functions and structures of CD38 and homologs. *Chem. Immunol.* **77**: 39-59
- Lewis, R.S.** (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **19**: 497-521
- Li, Y.L., Shiels, A., Maszak, G., und Byron, K.L.** (2001). Vasopressin-stimulated Ca²⁺ spiking in vascular smooth muscle cells involves phospholipase D. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H2658-H2664
- Li, S.W., Westwick, J., und Poll, C.T.** (2002). Receptor-operated Ca²⁺ influx channels in leucocytes: a therapeutic target? *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 63-69
- Lin, C.-S., Aebersold, R.H., Kent, S.B., Varma, M., und Leavitt, J.** (1988). Molecular cloning and characterization of plastin: a human leucocyte protein expressed in transformed human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4659-4668
- Lin, C.-S., Park, T., Chen, Z.P., und Leavitt, J.** (1993). Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 2781-3792
- Linden, D.J., Dawson, T.M., und Dawson, V.L.** (1995). An elevation of the nitric oxide/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in the induction of cerebellar long-term depression in culture. *Neurosci.* **15**: 5908-5106
- Lötscher, H.R., Winterhaller, K.H., Carafoli, E., und Richter, C.** (1980). Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **255**: 9325-9330
- Looms, D., Nauntofte, B., und Dissing, S.** (1998). ADP ribosyl cyclase activity in rat parotid acinar cells. *Eur. J. Morphol.* **36**: 181-185
- Looms, D.K., Tritsaris, K., Nauntofte, B., und Dissing, S.** (2001). Nitric oxide and cGMP activate Ca²⁺-release processes in rat parotid acinar cells. *Biochem. J.* **355**: 87-95
- Lund, F.E., Yu, N., Kim, K.-M., Reth, M., und Howard, M.C.** (1996). Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *J. Immunol.* **157**: 1455-1467
- Lund, F.E., Muller-Steffner, H.E., Yu, N., Stout, D., Schuber, F., und Howard, M.C.** (1999). CD38 signaling in B lymphocytes is controlled by its ectodomain but occurs independently of enzymatically generated ADP-ribose or cyclic ADP-ribose. *J. Immunol.* **162**: 2693-2702

- Mackrill, J.J.** (1999). Protein-protein interactions in intracellular Ca²⁺-release channel function. *Biochem. J.* **337**: 345-361
- Mallone, R., Ferrua, S., Morra, M., Zocchi, E., Mehta, K., Notarangelo, L., and Malavasi, F.** (1998). Characterization of a CD38-like 78-kilodalton soluble protein released from B cell lines derived from patients with X-linked agammaglobulinemia. *J. Clin. Invest.* **101**: 1-10
- Mallone, R., Funaro, A., Zubiaur, M., Baj, G., Ausiello, C.M., Tacchetti, C., Sancho, J., Grossi, C., and Malavasi, F.** (2001). Signaling through CD38 induces NK cell activation. *Int. Immunol.* **13**: 397-409
- Mao, C., Kim, S.H., Almenoff, J.S., Rudner, X.L., Keamey, D.M., and Kindman, L.A.** (1996). Molecular cloning and characterization of SCaMPER, a sphingolipid Ca²⁺ release-mediating protein from endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1993-1996
- Masuda, W., Takenaka, S., Inageda, K., Nishina, H., Takahashi, K., Katada, T., Tsuyama, S., Inui, H., Miyatake, K., and Nakano, Y.** (1997). Oscillation of ADP-ribosyl cyclase activity during the cell cycle and function of cyclic ADP-ribose in a unicellular organism, *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.* **405**: 104-106
- Masuda, W., Takenaka, S., Tsuyama, S., Inui, H., Miyatake, K., and Nakano, Y.** (1999). Purification and characterization of ADP-ribosyl cyclase from *Euglena gracilis*. *J. Biochem.* **125**: 449-453
- Matsumura, N., and Tanuma, S.-I.** (1998). Involvement of cytosolic NAD⁺ glycohydrolase in cyclic ADP-ribose metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**: 246-252
- Matsushima, K., Shiroo, M., Kung, H.-F., and Copeland, T.** (1988). Purification and characterization of a 65-kilodalton phosphoprotein in human leucocytes whose phosphorylation is augmented by stimulation with interleukin 1. *Biochemistry* **27**: 3765-3770
- Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, S.A., Shepel, P.N., and Geiger, J.D.** (2000). Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* **23**: 222-229
- McNagny, K.M., Cazenave, P.A., and Cooper, M.D.** (1988). A cell surface glycoprotein that marks early B lineage cells and mature myeloid lineage cells in mice. *J. Immunol.* **141**: 2551-2556
- McNagny, K.M., Bucy, R.P., and Cooper, M.D.** (1991). Reticular cells in peripheral lymphoid tissues express the phosphatidylinositol-linked BP-3. *Eur. J. Immunol.* **21**: 509-515
- McPherson, P.S., and Campbell, K.** (1993). The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J. Biol. Chem.* **268**: 13765-13768
- Mehta, K., Umar, S., and Malavasi, F.** (1996). Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J.* **10**: 1408-1407
- Meldolesi, J., and Pozzan, T.** (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 10-14
- Mészáros, L.G., Bak, J., and Chu, A.** (1993). Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor channel. *Nature* **364**: 76-79
- Mészáros, L.G., Wrenn, R.W., and Váradi, G.** (1997). Sarcoplasmic reticulum-associated and protein kinase C-regulated ADP-ribosyl cyclase in cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**: 252-256
- Migaud, M.E., Pederick, P. R., Bailey, V., and Potter, B.V.L.** (1999). Probing *Aplysia californica* adenosine 5'-diphosphate ADP-ribosyl cyclase for substrate binding requirements: design of potent inhibitors. *Biochemistry* **38**: 9105-9114
- Mignen, O., and Schuttlerworth, T.J.** (2001). Permeation of monovalent cations through the non-capacitative arachidonate-regulated Ca²⁺ channels in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 21365-21374
- Mikoshiba, K.** (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**: 86-89

- Mizoguchi, M., Otsuka, N., Sato, M., Ishii, Y., Kon, S.-I., Yamada, M., Nishina, H., Katada, T., und Ikeda, K. (1995). Neuronal localization of CD38 antigen in the human Brain. *Brain Res.* **697**: 235-240
- Morissette, J., Heisermann, G., Cleary, J., Ruoho, A., und Coronado, R. (1993). Cyclic ADP-ribose induced Ca^{2+} release in rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **330**: 270-274
- Morita, K., Kitayama, S., und Dohi, T. (1997). Stimulation of cyclic ADP-ribose synthesis by acetylcholine and its role in catecholamine release in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 21002-21009
- Morra, M., Zubiaur, M., Terhorst, C., Sancho, J., und Malavasi, F. (1998). CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. *FASEB J.* **12**: 581-592
- Moser, B., Winterhaller, K.H., und Richter, C. (1983). Purification and properties of a mitochondrial NAD^+ glycohydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**: 358-364
- Muir, S.R., und Sanders, D. (1996). Pharmacology of Ca^{2+} release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants. *FEBS Lett.* **395**: 39-42
- Muller-Steffner, H.M., Malver, O., Hosie, L., Oppenheimer, N.J., und Schuber, F. (1992). Slow-binding inhibition of NAD^+ -glycohydrolase by arabino analogues of beta-NAD. *J. Biol. Chem.* **267**: 9606-9611
- Muller-Steffner, H., Schenherr-Gusse, I., Tarnus, C., und Schuber, F. (1993). Calf spleen NAD^+ glycohydrolase: solubilization, purification, and properties of the intact form of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**: 154-162
- Muller-Steffner, H., Augustin, A., und Schuber, F. (1996). Mechanism of cyclization of pyridine nucleotides by bovine spleen NAD^+ glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* **271**: 23967-23972
- Munshi, C., Thiel, D.J., Mathews, I.I., Aarhus, R., Walseth, T.F., und Lee, H.C. (1999). Characterization of the active site of ADP-ribosyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **274**: 30770-30777
- Munshi, C., Aarhus, R., Graeff, R., Walseth, T.F., Levitt, D., und Lee, H.C. (2000). Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 21566-21571
- Musso, T., Deaglio, S., Franco, L., Colosso, L., Badolato, R., Garbarino, G., Dianzani, U., und Malavasi, F. (2001). CD38 expression and functional activities are up-regulated by $\text{IFN-}\gamma$ on human monocytes and monocytic cell lines. *J. Leucoc. Biol.* **69**: 605-612
- Namba, Y., Ito, M., Zu, Y., Shigesada, K., und Maruyama, K. (1992). Human T cell I-Plastin bundles actin filaments in a calcium dependent manner. *J. Biochem.* **112**: 503-507
- Nata, K., Sugimoto, T., Tohgo, A., Takemura, T., Noguchi, N., Matsuoka, A., Numakunai, T., Shikama, K., Yonekura, H., Takasawa, S., und Okamoto, H. (1995). The structure of the *Aplysia kurodai* gene encoding ADP-ribosyl cyclase a second-messenger enzyme. *Gene* **158**: 213-218
- Nata, K., Takamura, T., Karasawa, T., Kumagai, T., Hashioka, W., Tohgo, A., Yonekura, H., Takasawa, S., Nakamura, S., und Okamoto, H. (1997). Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing. *Gene* **186**: 285-292
- Niki, I., Yokokura, H., Sudo, T., Kato, M., und Hidaka, H. (1996). Signaling and intracellular Ca^{2+} binding proteins. *J. Biochem.* **120**: 685-698
- Nilius, B., und Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* **81**: 1415-1450
- Nicotera, P., Orrenius, S., Nilsson, T., und Berggren, P.-O. (1990). An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6858-6862
- Nishina, H., Inageda, K., Takahashi, K., Hoshino, S.-I., Ikeda, K., und Katada, T. (1994). Cell surface antigen CD38 identified as ecto-enzyme of NAD^+ glycohydrolase has hyaluronate-binding activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 1318-1323

- Nusco, G.A., Lim, D., Sabala, P., und Santella, L.** (2002). Ca^{2+} response to cADPr during maturation and fertilization of starfish oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**: 1015-1021
- Okamoto, H.** (1999). Cyclic ADP-ribose-mediated insulin secretion and Reg, regenerating gene. *J. Mol. Med.* **77**: 74-78
- Okazaki, I.J., und Moss, J.** (1999). Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 485-509
- Okuyama, Y., Ishihara, L., Kimura, N., Sato, K., Itoh, M., Byung, L., und Hirano, T.** (1996). Human BST-1 expressed on myeloid cells functions as a receptor molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**: 838-845
- Olivera, A. und Spiegel, S.** (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* **365**: 557-560
- Pacaud, M., und Harricane, M.C.** (1987). Calcium control of macrophage cytoplasmic gelation: evidence for the involvement of the 70 000 M_r actin bundling protein. *J. Cell Sci.* **88**: 81-94
- Pacaud, M., und Derancourt, J.** (1993). Purification and further characterization of macrophage 70-kDa protein, a calcium-regulated, actin-binding protein identical to I-plastin. *Biochemistry* **32**: 3448-3455
- Parekh, A.B., und Penner, R.** (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* **77**: 901-930
- Partida-Sánchez, S., Cockayne, D.A., Monard, S., Jacobson, E.L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T.D., und Lund, F.E.** (2001). Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance *in vivo*. *Nature Med.* **11**: 1209-1216
- Patel, S., Churchill, G.C., und Galione, A.** (2001). Coordination of Ca^{2+} signalling by NAADP. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 482-489
- Pedemonte, C., Sachs, G., und Kaplan, J.H.** (1990). An intrinsic membrane glycoprotein with cytosolically oriented N-linked sugars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9789-9793
- Pezzati, R., Bossi, M., Podini, P., Meldolesi, J., und Grohovaz, F.** (1997). High-resolution calcium mapping of the endoplasmic reticulum-Golgi-exocytic membrane system. *Mol. Biol. Cell* **8**: 1501-1512
- Pfister, M., Ogilvie, A., da Silva, C.P., Grahert, A., Guse, A.H., und Hauschildt, S.** (2001). NAD degradation and regulation of CD38 expression by human monocytes/macrophages. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5601-5608
- Pinton, P., Pozzan, T., und Rizzuto, R.** (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} -store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **17**: 5298-5308
- Podestà, M., Zocchi, E., Pitto, A., Usai, C., Franco, L., Bruzzone, S., Guida, L., Bacigalupo, A., Scadden, D.T., Walseth, T.F., De Flora, A., und Daga, A.** (2000). Extracellular cyclic ADP-ribose increases intracellular free calcium concentration and stimulates proliferation of human hemopoietic progenitors. *FASEB J.* **14**: 680-690
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., und Meldolesi, J.** (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular Ca^{2+} stores. *Physiol. Rev.* **74**: 595-636
- Pozzan, T., und Rizzuto, R.** (2000). The renaissance of mitochondrial calcium transport. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5269-5273
- Prakash, Y.S., Kannan, M.S., Walseth, T.F., und Sieck, G.C.** (2000). cADP-ribose and $[Ca^{2+}]_i$ regulation in rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* **279**: H1482-H1489
- Prasad, G.S., McRee, D.E., Stura, E.A., Levitt, D.G., Lee, H.C., und Stout, C.D.** (1996). Crystal structure of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase, a homologue of the bifunctional ectoenzyme CD38. *Nature Struct. Biol.* **3**: 957-964

- Putney Jr., J.W.** (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**: 1-12
- Putney Jr., J.W., Broad, L.M., Braun, F.-J., Lievremont, J.-P., und Bird, G.S.J.** (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J. Cell Sci.* **114**: 2223-2229
- Ramaschi, G., Torti, M., Festetics, E.T., Sinigaglia, F., Malavasi, F., und Balduini, C.** (1996). Expression of cyclic ADP-ribose-synthesizing CD38 molecule on human platelet membrane. *Blood* **87**: 2308-2313
- Rankin, P., Jacobson, E.L., Benjamin, R.C., Moss, J., und Jacobson, M.K.** (1989). Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **264**: 4312-4317
- Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H., und Schlossmann, S.F.** (1980). Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leucemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1588-1592
- Reyes-Harde, M., Empson, R., Potter, B.V.L., Galione, A., und Stanton, P.K.** (1999). Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in long-term synaptic depression in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4061-4066
- Rizzuto, R., Bernardi, P., und Pozzan, T.** (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J. Physiol.* **529**: 37-47
- Rosales, C., Jones, S., McCourt, D., und Brown, E.J.** (1994). Bromphenacyl bromide binding to the actin-bundling protein I-plastin inhibits inositol trisphosphate-independent increase in Ca^{2+} in human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 3534-3538
- Rossmann, M.G., Moras, D., und Olsen, K.W.** (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* **250**: 194-199
- Rusinko, N., und Lee, H.C.** (1989). Widespread occurrence in animal tissues of an enzyme catalyzing the conversion of NAD^+ into a cyclic metabolite with intracellular Ca^{2+} -mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* **264**: 11725-11731
- Rutter, G.A., und Denton, R.M.** (1988). Regulation of NAD^+ -linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca^{2+} -ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. *Biochem. J.* **252**: 181-189
- Rutter, G.A., und Rizzuto, R.** (2000). Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca^{2+} release: an intimate connection. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 215-219
- Sabbadini, R.A., Betto, R., Teresi, A., Fatechi-Cassano, G., und Salviati, G.** (1992). The effects of sphingosine on sarcoplasmic reticulum membrane calcium release. *J. Biol. Chem.* **267**: 15475-15484
- Sauvé, D.M., Ho, D.T., und Roberge, M.** (1995). Concentration of dilute protein for gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **226**: 382-383
- Sauve, A.A., Munshi, C., Lee, H.C., und Schramm, V.L.** (1998). The reaction mechanism for CD38. A single intermediate is responsible for cyclization, hydrolysis, and base-exchange chemistries. *Biochemistry* **37**: 13239-13249
- Schuber, F., und Pascal, M.** (1977). Interaction of Blue Dextran and Cibacron Blue F3GA with calf spleen NAD^+ -glycohydrolase. *Biochimie* **59**: 735-737
- Schweitzer, K., Mayr, G.W., und Guse, A.H.** (2001). Assay for ADP-ribosyl cyclase by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **299**: 218-226
- Sethi, J.K., Empson, R.M., Bailey, V.C., Potter, B.V.L., und Galione, A.** (1997). 7-Deaza-8-bromo-cyclic ADP-ribose, the first membrane-permeant hydrolysis-resistant cyclic ADP-ribose antagonist. *J. Biol. Chem.* **272**: 16358-16363

- Shinomiya, H., Hirata, H., und Nakano, M.** (1991). Purification and characterization of the 65-kDa protein phosphorylated in murine macrophages by stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **146**: 3617-3625
- Shinomiya, H., Hirata, H., Saito, S., Yagisawa, H., und Nakano, M.** (1994). Identification of the 65-kDa phosphoprotein in murine macrophages as a novel protein: homology with human l-plastin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**: 1631-1638
- Shinomiya, H., Hagi, A., Fukuzumi, M., Mizobuchi, M., Hirata, H., und Utsumi, S.** (1995). Complete primary structure and phosphorylation site of the 65-kDa macrophage protein phosphorylated by stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **154**: 3471-3478
- Shubinsky, G., und Schlesinger, M.** (1997). The CD38 lymphocyte differentiation marker: new insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. *Immunity* **7**: 315-324
- Siegel, G., Sternfeld, L., Gonzáles, A., Schulz, I., und Schmid, A.** (2001). Arachidonic acid modulates the spatiotemporal characteristics of agonist-evoked Ca^{2+} waves in mouse pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 16986-16991
- Sitsapesan, R., und Williams, A.J.** (1995). Cyclic ADP-ribose and related compounds activate sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 37)* **268**: C1235-C1240
- Sleath, P.R., Handlon, A.L., und Oppenheimer, N.J.** (1991). Pyridine coenzyme analogues. 3. synthesis of three NAD^+ -analogues containing a 2'-deoxy-2'-substituted nicotinamide arabinofuranosyl moiety. *J. Org. Chem.* **56**: 3608-3613
- Spiegel, S.** (1999). Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J. Leucoc. Biol.* **65**: 341-344
- Spiegel, S., und Milstien, S.** (2000). Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.* **476**: 55-57
- States, D.J., Walseth, T.F., und Lee, H.C.** (1992). Similarities in amino acid sequences of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 495
- Stoekler, J.D., Stoekler, H.A., Kouttab, N., und Maizel, A.L.** (1996). $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 modulates CD38 expression on human lymphocytes. *J. Immunol.* **157**: 4908-4917
- Straub, S.V., Giovannucci, D.R., und Yule, D.** (2000). Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells. Functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J. Gen. Physiol.* **116**: 547-559
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., und Schulz, I.** (1983). Release of Ca^{2+} from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**: 67-68
- Sun, L., Adebajo, O.A., Moonga, B.S., Corisdeo, S., Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Arakawa, T., Hakeda, Y., Koval, A., Sodam, B., Bevis, P.J.R., Moser, A.J., Lai, F.A., Epstein, S., Troen, B.R., Kumegawa, M., und Zaidi, M.** (1999). CD38/ADP-ribosyl cyclase: a new role in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J. Cell Biol.* **146**: 1161-1171
- Takahashi, K., Kukimoto, I., Tokita, K.-I., Inageda, K., Inoue, S.-I., Kontani, K., Hoshino, S.-I., Nishina, H., Kanaho, Y., und Katada, T.** (1995). Accumulation of cyclic ADP-ribose measured by a specific radioimmunoassay in differentiated human leucemic HL-60 cells with all-*trans*-retinoic acid. *FEBS Lett.* **371**: 204-208
- Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H., und Okamoto, H.** (1993a). Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic β cells. *Science* **259**: 370-373
- Takasawa, S., Tohgo, A., Noguchi, N., Koguma, T., Nata, K., Sugimoto, T., Yonekura, H., und Okamoto, H.** (1993b). Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leucocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP. *J. Biol. Chem.* **268**: 26052-26054

- Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H., und Okamoto, H.** (1993c). Cyclic ADP-ribose in β -cells. *Science* **262**: 585-586
- Takasawa, S., Ishida, K., Nata, K., Natagawa, K., Noguchi, N., Tohgo, A., Kato, I., Yonekura, H., Fujisawa, H., und Okamoto, H.** (1995). Requirement of calmodulin-dependent protein kinase II in cyclic ADP-ribose-mediated intracellular Ca^{2+} mobilization. *J. Biol. Chem.* **270**: 30257-30259
- Takasawa, S., Akiyama, T., Nata, K., Kuroki, M., Tohgo, A., Noguchi, N., Kobayashi, S., Kato, I., Katada, T., und Okamoto, H.** (1998). Cyclic ADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate as alternate second messengers for intracellular Ca^{2+} mobilization in normal and diabetic β -cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 2497-2500
- Takazawa, K., Lemos, M., Delvaux, A., Lejeune, J., Dumont, J.E., und Erneux, C.** (1990). Rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. Ca^{2+} -sensitivity, purification and antibody production. *Biochem. J.* **268**: 213-217.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., und Dawson, A.P.** (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2466-2470
- Thomas, A.P., und Delaville, F.** (1991). The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic free calcium concentration in cell populations and single cells. In: *Cellular calcium – A Practical Approach* (Mc Cormack, J.G., and Cobbold, P.H. eds.), *Oxford University Press, N.Y.*, pp: 1-54
- Thompson, S.T., Cass, K.H., und Stellwagen, E.** (1975). Blue-Dextran-Sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**: 669-672
- Thorn, P., Gerasimenko, O., und Petersen, O.H.** (1994). Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca^{2+} oscillations in pancreatic acinar cells. *EMBO J.* **13**: 2038-2043
- Tohgo, A., Takasawa, S., Noguchi, N., Koguma, T., Nata, K., Sugimoto, T., Furuya, Y., Yonekura, H., und Okamoto, H.** (1994). Essential cysteine residues for cyclic ADP-ribose synthesis and hydrolysis by CD38. *J. Biol. Chem.* **269**: 28555-28557
- Towbin, M., Staehlin, T., und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
- Treves, S., di Virgilio, F., Cerundolo, V., Zanovello, P., und Pozzan, T.** (1987). Calcium and inositolphosphates in the activation of T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **166**: 33-42
- Ueda, K., Fukushima, M., Okayama, H., und Hayaishi, O.** (1975). Nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase from rat liver nuclei. Isolation and characterization of a new enzyme. *J. Biol. Chem.* **250**: 7541-7546
- Umar, S., Malavasi, F., und Mehta, K.** (1996). Post-translational modification of CD38 protein into a high molecular weight form alters its catalytic properties. *J. Biol. Chem.* **271**: 15922-15927
- Verderio, C., Bruzzone, S., Zocchi, E., Fedele, E., Schenk, U., De Flora, A., und Matteoli, M.** (2001). Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* **78**: 646-657
- Verjans, B., Moreau, C., und Erneux, C.** (1994). The control of intracellular signal molecules at the level of their hydrolysis: the example of inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Mol. Cell. Endocrinol.* **98**: 167-171
- Vicari, A.P., Bean, A.G.D., und Zlotnik, A.** (1996). A role for BP-3/BST-1 antigen in early T cell development. *Int. Immunol.* **8**: 183-191
- Virág, L., und Szábo, C.** (2001). Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J.* **15**: 99-107
- Vu, C.Q., Lu, P.-J., Chen, C.-S., und Jacobson, M.K.** (1996). 2'-phospho-cyclic ADP-ribose, a calcium mobilizing agent derived from NADP. *J. Biol. Chem.* **271**: 4747-4754

- Walseth, T.F., Aarhus, R., Zeleznikar, R.J., und Lee, H.C.** (1991). Determination of endogenous levels of cyclic ADP-ribose in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **1094**: 113-120
- Walseth, T.F., Aarhus, R., Kerr, J.A., und Lee, H.C.** (1993). Identification of cyclic ADP-ribose-binding proteins by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* **268**: 26686-26691
- Wang, J., und Brown, E.J.** (1999). Immune complex-induced integrin activation and l-plastin phosphorylation require protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **274**: 22349-22356
- Wang, J., Chen, H., und Brown, E.J.** (2001). L-plastin peptide activation of $\alpha_v\beta_3$ -mediated adhesion requires integrin conformational change and actin filament disassembly. *J. Biol. Chem.* **276**: 14474-14481
- Weiss, A.** (1989). T lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology*, (Paul, W.E. ed.), 2. Auflage, Raven Press Ltd., N.Y., pp: 359-383.
- White, T.A., Johnson, S., Walseth, T.F., Lee, H.C., Graeff, R.M., Munshi, C.B., Prakash, Y.S., Sieck, G.C., und Kannan, M.S.** (2000). Subcellular localization of cyclic ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities in porcine airway smooth muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1498**: 64-71
- Wilson, H.L., und Galione, A.** (1998). Differential regulation of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate and cADP-ribose production by cAMP and cGMP. *Biochem. J.* **331**: 337-343
- Wilson, H., Dipp, M., Thomas, J.M., Lad, C., Galione, A., und Evans, A.M.** (2001). ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. A primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J. Biol. Chem.* **276**: 11180-11188
- Willemer, S., Köhler, H., Kern, H.F., und Adler, G.** (1990). Glycoconjugate pattern of membranes in the acinar cell of the rat pancreas. *Histochemistry* **93**: 319-326
- Williams, A.J., West, D.J., und Sitsapesan, R.** (2001). Light at the end of the Ca^{2+} release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Quarterly Reviews of Biophysics* **34**: 61-104
- Willmott, N., Walseth, T.F., Lee, H.C., White, A.M., Sethi, J., und Galione, A.** (1996). Nitric-oxide induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 3699-3705
- Wolf, S.** (1999). Proteinsequenzierung. In: *Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (Gassen, H.G., und Schrimpf, G. eds.), 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, pp: 83-103,
- Wu, Y., Kuzma, J., Maréchal, E., Graeff, R., Lee, H.C., Foster, R., und Chua N.-H.** (1997). Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* **278**: 2126-2130
- Yamada, M., Mizuguchi, M., Otsuka, N., Ikeda, K., und Takahashi, H.** (1997). Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain. *Brain Res.* **756**: 52-60
- Yamamoto-Katayama, S., Sato, A., Ariyoshi, M., Suyama, M., Ishihara, K., Hirano, T., Nakamura, H., Morikawa, K., und Jingami, H.** (2001). Site-directed removal of N-glycosylation sites in BST-1/CD157: effects on molecular and functional heterogeneity. *Biochem. J.* **357**: 385-392
- Yamauchi J., und Tanuma, S.-I.** (1994). Occurrence of an NAD^+ glycohydrolase in bovine brain cytosol. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**: 327-329
- Yost, D.A., und Anderson, B.M.** (1981). Purification and properties of the soluble NAD glycohydrolase from *Bungarus fasciatus* venom. *J. Biol. Chem.* **256**: 3647-3653
- Yue, C., White, K.L., Reed, W.A., und Bunch, T.D.** (1995). The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development* **121**: 2645-2654

- Yusufi, A.N.K., Cheng, J., Thompson, M., Dousa, T.P., Warner, G.M., Walker, H.J., und Grande, J.P.** (2001). cADP-ribose/ryanodine channel/ Ca^{2+} -release signal transduction pathway in mesangial cells. *Am. J. Renal Physiol.* **281**: F91-F102
- Zhang, J., Ziegler, M., Schneider, R., Klocker, H., Auer, B., und Schweiger, M.** (1995). Identification and purification of bovine liver mitochondrial NAD^+ -glycohydrolase. *FEBS Lett.* **377**: 530-534
- Zhang, F.-J., Gu, Q.-M., und Sih, C.J.** (1999). Bioorganic chemistry of cyclic ADP-ribose (cADPR). *Bioorg. Med. Chem.* **7**: 653-664
- Ziegler, M., Jorcke, D., Zhang, J., Schneider, R., Klocker, H., Auer, B., und Schweiger, M.** (1996). Characterization of detergent solubilized beef liver mitochondrial NAD^+ glycohydrolase and its truncated hydrosoluble form. *Biochemistry* **35**: 5207-5212
- Ziegler, M., Jorcke, D., und Schweiger, M.** (1997). Identification of bovine liver NAD^+ glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem. J.* **326**: 401-405
- Ziegler, M.** (2000). New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1150-1564
- Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Benatti, U., Bargellsei, A., Malavasi, F., Lee, H.C., und De Flora, A.** (1993). A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD^+ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**: 1459-1465
- Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Calder, L. und De Flora, A.** (1995). Self-aggregation of purified and membrane-bound erythrocyte CD38 induces extensive decrease of its ADP-ribosyl cyclase activity. *FEBS Lett.* **359**: 35-40
- Zocchi, E., Franco, L., Piccini, D., Tracchetti, C., und De Flora, A.** (1996). NAD^+ -dependent internalization of the transmembrane glycoprotein CD38 in human Namalva B cells. *FEBS Lett.* **396**: 327-332
- Zocchi, E., Daga, A., Usai, C., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Costa, A., Marchetti, C., und De Flora, A.** (1998). Expression of CD38 increases intracellular calcium concentration and reduces doubling time in HeLa and 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 8017-8024
- Zocchi, E., Usai, C., Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S., Passalacqua, M., und De Flora, A.** (1999). Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca^{2+} mobilization: role of NAD^+ transport across cell membranes. *FASEB J.* **13**: 273-283
- Zocchi, E., Podestà, M., Pitto, A., Usai, C., Bruzzone, S., Franco, L., Guida, L., Bacigalupo, A., und De Flora, A.** (2001a). Paracrinically stimulated expansion of early human hemopoietic progenitors by stroma-generated cyclic ADP-ribose. *FASEB J* **15**: 1610-1612
- Zocchi, E., Carpaneto, A., Cerrano, C., Bavistrello, G., Giovine, M., Bruzzone, S., Guida, L., Franco, L., und Usai, C.** (2001b). The temperature-signaling cascade in sponges involves a heat-gated cation channel, abscisic acid, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14859-14864
- Zu, Y., Kohno, M., Kubota, I., Nishida, E., Hanaoka, M., und Namba, Y.** (1990a). Characterization of interleukin 2 stimulated 65-kilodalton phosphoprotein in human T cells. *Biochemistry* **29**: 1055-1062
- Zu, Y., Shigesada, K., Nishida, E., Kubota, M., Kohno, M., Hanaoka, M., und Namba, Y.** (1990b). 65-kilodalton protein phosphorylated by interleukin 2 stimulation bears two putative actin-binding sites and two calcium-binding sites. *Biochemistry* **29**: 8319-8424
- Zubiaur, M., Guirado, M., Terhorst, C., Malavasi, F., und Sancho, J.** (1999). The CD3- $\gamma\delta\epsilon$ transducing module mediates CD38-induced protein-tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 20633-20642
- Zweifach, A., und Lewis, R.S.** (1993). Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6295-6299

Zweifach, A., und Lewis, R.S. (1995). Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J. General Physiol.* **105**: 209-226

Zweifach, A. und Lewis, R.S. (1996). Calcium-dependent potentiation of store-operated calcium channels in T lymphocytes. *J. General Physiol.* **107**: 597-610

9. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. A.H. Guse für die Überlassung des interessanten und sehr facettenreichen Arbeitsthemas, die Bereitstellung sämtlicher Mittel zur Bearbeitung des Projektes, die Eröffnung verschiedener, hilfreicher Kooperationen mit internationalen Forschungsgruppen sowie für fachkompetente Beratung und Unterstützung sowohl während des experimentellen Teils als auch während der schriftlichen Verfassung der vorliegenden Dissertation. Herrn Prof. L. Renwrantz möchte ich für die bereitwillige Übernahme der Zweitgutachterschaft und die Vertretung des Arbeitsthemas am biologischen Fachbereich sowie für kompetente Beratung, sein wissenschaftliches Interesse an meiner Arbeit und eine inhaltliche Diskussion der Dissertation danken. Herr Prof. G.W. Mayr hat durch die Bereitstellung eines geeigneten Arbeitsplatzes sowie durch wertvolle Ratschläge und Ideen zur praktischen und strategischen Durchführung des Projektes und die hilfreiche Diskussion experimenteller Daten im Rahmen von Abteilungsseminaren zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen. Frau K. Weber möchte ich für tatkräftige Unterstützung und gute Zusammenarbeit in verschiedenen Teilprojekten, für zahlreiche praktische Tips und für die vollständige Durchführung einiger Experimente danken, deren Ergebnisse mir von ihr und Herrn Prof. Guse zur Darstellung im Rahmen der Dissertation zur Verfügung gestellt wurden. Herrn A. Gasser habe ich für sein Engagement bei der Klonierung und für Unterstützung bei der (vorläufigen) funktionellen Charakterisierung von L-Plastin zu danken. Für ihre Geduld und ihr Engagement bei der Durchführung von Proteinsequenzierungen möchte ich mich weiterhin bei Herrn Dr. F. Buck und Herrn S. Harder bedanken. Für Unterstützung im Rahmen von Kollaborationen mit Herrn Prof. Guse sei ebenso Herrn Prof. B.V.L. Potter (Entwicklung, chemische Synthese und Bereitstellung verschiedener Inhibitoren), Herrn Prof. P. Deterre (praktische und beratende Unterstützung bei der funktionellen Charakterisierung von ADPRCs), Frau Dr. F.E. Lund (Bereitstellung von wt- und CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten der Maus), Herrn Prof. T.F. Walseth (Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen) und Herrn Prof. N. Oppenheimer (Überlassung von araF-NAD) gedankt. Ohne die von diesen Kollaboratoren geleisteten Beiträge wäre die Durchführung meiner Arbeit so nicht möglich gewesen. Bei der Optimierung der Western Blots zum Nachweis und der Immunpräzipitation von CD38 haben mir Herr Prof. P. Deterre, Frau D.H. Arlt und Frau B. Wagner durch wertvolle Tips geholfen. Allen nicht namentlich Genannten, die durch Ideen, Ratschläge oder auf andere Weise zur Durchführung und/oder Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, sei ebenfalls recht herzlich gedankt. Bei meinen Eltern möchte ich mich schließlich für finanzielle Unterstützung während der schriftlichen Verfassung der Dissertation bedanken.

10. Anhang

10.1 Publikationen und Abstracts

10.1.1 Publikationen

Guse, A.H., de Wit, C., Klokow, T., Schweitzer, K., und Mayr, G.W. (1997). Unique properties of the capacitative Ca^{2+} -entry antagonist LU 52396: its inhibitory activity depends on the activation state of the cells. *Cell Calcium* 22: 91-97

da Silva, C.P., Schweitzer, K., Heyer, P., Malavasi, F., Mayr, G.W., und Guse, A.H. (1998). Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca^{2+} -signalling activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related. *FEBS Letters* 439: 291-296

Schweitzer, K., Mayr, G.W., und Guse, A.H. (2001). Assay for ADP-ribosyl cyclase by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 299: 218-226

Schweitzer, K., Weber, K., Boulla, G., Lund, F.E., Migaud, M.E., Oppenheimer, N.J., Mayr, G.W., Deterre, P., Potter, B.V.L., und Guse, A.H. (2002). Involvement of intracellular ADP-ribosyl cyclases in T cell receptor/CD3 complex mediated Ca^{2+} signaling. Manuskript in Vorbereitung.

10.1.2 Abstracts und/oder Posterpräsentationen

da Silva, C.P., Schweitzer, K., Heyer, P., Malavasi, F., Mayr, G.W., und Guse, A.H. (1999). Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca^{2+} -signaling activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related. Tagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM) vom 04.09.-05.09. 1999 in Hamburg

Schweitzer, K., Boulla, G., Weber, K., Oppenheimer, N.J., Mayr, G.W., Deterre, P., und Guse, A.H. (2000). A novel soluble ADP-ribosyl cyclase, but not the ectoenzyme CD38 is involved in T-lymphocyte Ca^{2+} signaling. Tagung der European Calcium Society (ECS) vom 14.06.-17.06. 2000 in Paris / Frankreich

Guse, A.H., Schweitzer, K., Berg, I., Gasser, A., da Silva, C., Mayr, G.W., Potter, B.V.L., Shuto, S.S., Deterre, P.; Oppenheimer, N., Schuber, F., Cakir-Kiefer, C., Lund, F.E., und Walseth, T.F. (2001). Calcium signaling by cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in T-lymphocytes. 13. internationales Symposium über ADP-Ribosylierung vom 08.06.-11.06. 2001 in New York / USA

Gasser, A., Schweitzer, K., Mayr, G.W., und Guse, A.H. (2001). Analysis of CD38 expression in Jurkat T-lymphocytes. Tagung der Scandinavian Physiology Society vom 26.10-28.10. 2001, Universität Arhus / Dänemark

Schweitzer, K., Weber, K., Deterre, P., Potter, B.V.L., Oppenheimer, N., Mayr, G.W., und Guse, A.H. (2002). Evidence for the intracellular expression of ADP-ribosyl cyclases and their functional role in T-lymphocyte activation and proliferation. Tagung der European Calcium Society (ECS) vom 12.06.-15.06. 2002 in Brüssel / Belgien

10.2 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und die Arbeit nicht bereits an anderer Stelle eingereicht habe. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Dies gilt ebenso für Daten, die von anderen Personen oder unter Mitwirkung anderer Personen erhoben und mir zur Darstellung überlassen, bzw. zur Verfügung gestellt wurden. An der Datenerhebung oder an der Bearbeitung von Teilprojekten auf andere Weise beteiligte Dritte wurden an entsprechender Stelle jeweils namentlich genannt.

Katrin Schweitzer

10.3 Lebenslauf

Katrin Schweitzer

e-mail: katrin_schweitzer@web.de



Persönliche Daten

Katrin Schweitzer

geboren am 06.01.1967 in Hamburg

aktueller Beruf: Diplombiologin

Schulabschluß

06/1986

Abitur in Hamburg-Volksdorf

Berufsausbildung

10/1986-09/1989

Ausbildung zur Krankenschwester im
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

09/1989

Abschluß mit dem Krankenpflegediplom

Berufspraxis als Krankenschwester

10/1989-02/1992

in der Abteilung für Nephrologie im UKE

03/1992-11/1997

in den Abteilungen für Hepatologie und für
Endokrinologie im UKE

seit 12/1997

in der Abteilung für Endokrinologie im UKE

Hochschulstudium

10/1991-07/1998

Studium der Biologie an der Universität Hamburg

Hauptfach: Zoologie (Physiologie, Immunbiologie)

Nebenfächer: Botanik (Physiologie, Zellbiologie)
und Mikrobiologie

Zusatzfach: Biochemie

- 10/1996-12/1996 Projektstudie im UKE:
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie (IMBM), Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion (Arbeitskreis Prof. A.H. Guse)
Thema der Projektstudie:
Untersuchungen zum inhibitorischen Potential des Calciumantagonisten LU 52396 in Jurkat T-Lymphozyten
- 10/1997-07/1998 Diplomarbeit im UKE:
IMBM, Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion (Arbeitskreis Prof. A.H. Guse)
Thema der Diplomarbeit
Bestimmung der intrazellulären Konzentration an cyclischer ADP-Ribose in immunkompetenten Zellen nach exogener Stimulation
- 09/1998-11/2002 Promotionsstudium am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg
- 22.11. 2002 Abschluß der Promotion mit der Disputation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg
Thema der Dissertation und der Disputation
Untersuchungen zu ADP-Ribosylcyclasen in humanen immunkompetenten Zellen

Berufspraxis als Biologin

- 09/1998-01/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im UKE:
IMBM, Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion (Arbeitskreis Prof. A.H. Guse)

Wissenschaftliche Publikationen

- Guse, A.H., de Wit, C., Klokow, T., Schweitzer, K., und Mayr, G.W.** (1997). Unique properties of the capacitative Ca^{2+} -entry antagonist LU 52396: its inhibitory activity depends on the activation state of the cells. *Cell Calcium* 22: 91-97
- da Silva, C.P., Schweitzer, K., Heyer, P., Malavasi, F., Mayr, G.W., und Guse, A.H.** (1998). Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca^{2+} -signalling activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related. *FEBS Letters* 439: 291-296
- Schweitzer, K., Mayr, G.W., und Guse, A.H.** (2001). Assay for ADP-ribosyl cyclase by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 299: 218-226