

**Das cyclische ADP-Ribose Analogon
cyclische 8-Br-IDP-Ribose:
Darstellung, Stabilität und Charakterisierung
in T-Lymphozyten des Menschen (*H. sapiens*)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Department Biologie der Fakultät
für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Tanja Kirchberger
aus Hamburg
2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. A. H. GUSE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 18. Januar 2008

Hamburg, den 20. Dezember 2007



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	iii
1 Einleitung.....	1
1.1 T-Lymphozyten im Immunsystem	1
1.2 Aktivierung und Signaltransduktion von T-Lymphozyten.....	3
1.3 Calciumsignale in T-Lymphozyten	5
1.3.1 Effektorfunktionen von Calcium	7
1.3.2 Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern	9
1.3.3 Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum.....	17
1.4 CD38: eine ADP-Ribosyl Cyclase	21
2 Problemstellung	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Medien und Puffer.....	27
3.1.2 Chemikalien und Lösungen	28
3.1.3 Geräte und Material	29
3.2 Methoden	31
3.2.1 Zellkultur von Jurkat T-Lymphozyten	31
3.2.2 Synthese und Aufreinigung von 8-Br-M1-cIDPR	31
3.2.3 Bestimmung der metabolischen Stabilität von cADPR und Derivaten mit Hilfe der RP-HPLC	36
3.2.4 Proliferationsassay von Jurkat T-Lymphozyten.....	37
3.2.5 Messung von Calciumsignalen mit Hilfe des Calcium-Imaging- Systems	38
4 Ergebnisse.....	46
4.1 Synthese und Aufreinigung von 8-Br-M1-cIDPR	46
4.1.1 Synthese von 8-Br-M1-cIDPR	46
4.1.2 Entwicklung einer Aufreinigungsmethode für 8-Br-M1-cIDPR.....	47
4.2 Stabilität von M1-cIDPR und Derivaten im Vergleich zu cADPR	55
4.2.1 Stabilität von cADPR gegenüber CD38, ADP-Ribosyl Cyclase und NADase.....	55

4.2.2	Stabilität von <i>N1</i> -cIDPR gegenüber CD38	58
4.2.3	Stabilität von 8-Br- <i>N1</i> -cIDPR, <i>N1</i> -cIDPRE und <i>N1</i> -cIDP-DE gegenüber CD38	61
4.3	Zelluläre Effekte von cADPR, <i>N1</i> -cIDPR und Analoga auf T-Lymphozyten	63
4.3.1	Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten in Anwesenheit von cADPR, <i>N1</i> -cIDPR und Analoga	63
4.3.2	Cytokinexpression und Proliferation von primären Ratten T-Lymphozyten in Anwesenheit von <i>N1</i> -cIDPR und <i>N1</i> -cIDPRE	66
4.4	Charakterisierung des 8-Br- <i>N1</i> -cIDPR vermittelten Calciumsignals.....	68
4.4.1	8-Br- <i>N1</i> -cIDPR vermittelte Calciumsignale	68
4.4.2	Mechanismus des 8-Br- <i>N1</i> -cIDPR vermittelten Calciumsignals.....	73
5	Diskussion	82
5.1	Synthesestrategien für cADPR-Derivate	82
5.2	Stabilität der Analoga von cADPR und <i>N1</i> -cIDPR.....	91
5.3	cADPR Analoga: Struktur und Rolle als zellbiologisches Tool	94
5.4	Zelluläre Effekte der Analoga von <i>N1</i> -cIDPR	98
6	Zusammenfassung.....	106
7	Abstract.....	108
8	Literaturverzeichnis	110
9	Eigene Publikationen	127
9.1	Veröffentlichungen	127
9.2	Abstracts und Posterpräsentationen	127
10	Danksagung	128

Abkürzungen

$[Ca^{2+}]_{ex}$	freie extrazelluläre Calciumionenkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	freie intrazelluläre Calciumionenkonzentration
8-Br-N1-cIDPR	cyclische 8-Br-Inosin-5'-diphosphoribose cyclische 8-Br-IDP-Ribose
ADPR	Adenosin Diphosphoribose ADP-Ribose
ADPRC	ADP-Ribosyl Cyclase
APC	antigenpräsentierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin
cADPR	cyclische Adenosin Diphosphoribose cyclische ADP-Ribose
CaM	Calmodulin
CCD-Kamera	(<i>charge coupled device</i>)-Kamera
CICR	Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (<i>Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release</i>)
CRAC-Kanal	durch Calcium-Freisetzung aktivierter Calcium-Kanal (<i>Ca^{2+}-release-activated Ca^{2+}-channel</i>)
DAG	1,2-Diacylglycerol
EGTA	Ethylenglycol-(N,N,N',N')-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Fura-2/AM	Acetoxymethylester des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IDPR	Inosin Diphosphoribose IDP-Ribose
IFN- γ	Interferon γ
IL-2-	Interleukin-2
IL-2R	IL-2 Rezeptor
IP ₃	D- <i>myo</i> -Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IP ₃ R	D- <i>myo</i> -Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
LAT	<i>linker of activation in T-cells</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)

N1-cIDP-DE	N1-[(Phosphoryl-O-ethoxy)-methyl]-N9-[(phosphoryl-O-ethoxy)-methyl]-Hypoxanthin cyclisches Pyrophosphat
N1-cIDPR	cyclische Inosin Diphosphoribose cyclische IDP-Ribose
N1-cIDPRE	N1-ethoxymethyl substituierte cIDPR oder N1-[(5''-O-Phosphorylethoxy)-methyl]-5'-O-phosphoryl-Inosin-5',5'' cyclisches Pyrophosphat
NAADP	β -Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotidphosphat
NAD	β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NCS	Serum neonataler Kälber
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
ROI	<i>Region(s) of interest</i>
RP-HPLC	Umkehrphasen Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>Reversed phase – high pressure liquid chromatography</i>)
RyR	Ryanodinrezeptor
TBAHP	Tetrabutylammonium-Dihydrogenphosphat
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β ,	<i>transforming growth factor-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPM2	<i>transient receptor potential -melastatin like type 2</i>
ZAP70	ξ -Ketten-assoziiertes Protein

1 Einleitung

1.1 T-Lymphozyten im Immunsystem

Das Immunsystem ist das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen gegen Krankheitserreger wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten und stellt ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Molekülen, Zelltypen und Organen dar. Die Grundlage der Abwehr von Krankheitserregern besteht in der Fähigkeit des Immunsystems zwischen „selbst“ und „fremd“ unterscheiden zu können, so dass körperfremde Pathogene erkannt und eliminiert werden können. Das Immunsystem ist aber auch in der Lage, körpereigene transformierte Zellen zu erkennen und zu entfernen (Janeway et al., 2002).

Aufgrund seiner Funktionsweise und Art des Erwerbs kann das Immunsystem in zwei Bereiche unterteilt werden. Man unterscheidet zwischen angeborener oder unspezifischer und adaptiver oder spezifischer Immunität. Die angeborene Immunität ist insbesondere in der frühen Phase einer Infektion von Bedeutung und beruht auf Erkennung konservierter Eigenschaften wie z.B. bakterieller Oberflächenstrukturen von pathogenen Mikroorganismen. Dieser Teil des Immunsystems wird durch Granulozyten, Makrophagen und das Komplementsystem repräsentiert. Da das angeborene Immunsystem nicht über ein „Gedächtnis“ verfügt, kommt es nicht zu einer dauerhaften Immunität. Statt dessen verläuft die Immunreaktion bei erneuter Infektion mit dem selben Pathogen mit gleicher Stärke (Janeway et al., 2002).

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich im Vergleich zur angeborenen Immunität durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Für die adaptive Immunität spielen Lymphozyten eine entscheidene Rolle. Sie weisen auf ihrer Oberfläche einen Antigen-Rezeptor auf, mit dessen Hilfe sie körperfremde Moleküle erkennen. Diese Rezeptoren werden von Genen codiert, die während der Entwicklung der Lymphozyten durch somatische Rekombination verändert werden und einzigartig für jeden Lymphozyten sind. So kann eine Aktivierung nur durch das für die jeweilige Zelle spezifische Antigen erfolgen. Lymphozyten, die selbstreaktive Rezeptoren tragen, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, werden im Thymus durch klonale Deletion eliminiert. Nach Bindung eines Antigens an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung der Zelle und zur klonalen Expansion. Ein Teil der bei der klonalen Expansion gebildeten aktiven und spezifischen Lymphozyten differenziert zu Effektorzellen, die

die Infektion bekämpfen können und zu Gedächtniszellen, die eine dauerhafte Immunität vermitteln und bei wiederholter Infektion mit dem gleichen Pathogen schnell reaktiviert werden (Janeway et al., 2002).

Die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems werden weiter in B- und T-Lymphozyten unterteilt. B-Lymphozyten sind bei der Vermittlung der humoralen Immunantwort von Bedeutung und exprimieren auf ihrer Oberfläche als Antigenrezeptor membranständige Antikörper. Nach Kontakt von B-Lymphozyten mit ihrem spezifischen Antigen kommt es zur klonalen Expansion und zur Sezernierung ihres spezifischen Antikörpers. Diese löslichen Antikörper sind gegen Pathogene im extrazellulären Raum gerichtet und vermitteln nach Bindung an ihr Antigen, z. B. durch Aktivierung des Komplementsystems, die Zerstörung des zugehörigen Pathogens (Janeway et al., 2002).

T-Lymphozyten sind an der Vermittlung der zellulären Immunität beteiligt, die insbesondere gegen intrazelluläre Pathogene und maligne Zellen gerichtet ist. Als Antigenrezeptor exprimieren sie den T-Zellrezeptorkomplex auf ihrer Oberfläche, der als Antigen Peptidfragmente erkennt, die durch spezialisierte Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex-(MHC)-Moleküle auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. MHC-Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt, wobei MHC I-Moleküle von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, während MHC II-Moleküle von Zellen des Immunsystems, vor allem den antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie B-Lymphozyten und Makrophagen exprimiert werden. Die T-Lymphozyten werden weiter unterteilt in cytotoxische T-Zellen und T-Helfer-Zellen. Cytotoxische T-Zellen sind durch das Oberflächenmolekül CD8 gekennzeichnet. Sie erkennen Antigene die durch MHC I präsentiert werden und töten infizierte und transformierte Zellen ab. T-Helfer-Zellen weisen das Oberflächenmolekül CD4 auf. Sie erkennen über MHC II präsentiertes Antigen. T-Helfer-Zellen können weiter unterteilt werden in T_H1 - und T_H2 -Zellen. T_H1 -Zellen sezernieren hauptsächlich IL-2 und IFN- γ und führen zu einer Aktivierung von Makrophagen. T_H2 -Zellen sezernieren hauptsächlich IL-4 und führen zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten, die zu Plasmazellen differenzieren und dann große Mengen eines spezifischen Antikörpers freisetzen. T_H2 -Zellen tragen somit zur Bekämpfung von extrazellulären Pathogen bei (Janeway et al., 2002; Randriamampita & Trautmann, 2004).

1.2 Aktivierung und Signaltransduktion von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den T-Zellrezeptorkomplex (TCR-Komplex). Dieser TCR-Komplex besteht aus dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem CD3-Komplex. Der TCR setzt sich aus einer α - und einer β -Kette zusammen, die jeweils eine nur kurze cytoplasmatische Sequenz aufweisen. Der extrazelluläre Teil des TCR ist deutlich größer und besitzt eine variable Region, die für jede T-Zelle einzigartig ist und der spezifischen Erkennung des Antigens dient. Sie wird von Genen codiert, die während der Entwicklung der T-Lymphozyten einer somatischen Rekombination unterliegen. Dieser Vorgang führt zur Expression verschiedenster TCR in Bezug auf die T-Zellpopulation und ermöglicht dem Immunsystem so die Erkennung vieler unterschiedlicher Antigene. Als Antigene werden Peptidfragmente erkannt, die auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, gebunden an MHC-Moleküle, lokalisiert sind. Bei Antigenerkennung spielen des weiteren die Corezeptoren CD4 und CD8 eine wichtige Rolle. Sie werden auf der Oberfläche von T-Lymphozyten exprimiert und führen zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit von T-Zellen gegenüber ihrem spezifischen Antigen (Janeway et al., 2002).

Der CD3-Komplex ist an der Signalweiterleitung ins Innere der Zelle beteiligt und wird wie der TCR von Transmembranproteinen gebildet. Er setzt sich aus vier Untereinheiten (γ , δ und zwei ϵ) sowie einem ξ : ξ -Dimer zusammen. Während die γ , δ und ϵ - Untereinheiten überwiegend in den extrazellulären Raum ragen, ist das ξ : ξ -Dimer hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert (Janeway et al., 2002).

Nach Ligation des TCR mit dem Komplex aus antigenem Peptid und MHC-Molekül kommt es zu mehreren Tyrosin-Phosphorylierungen von konservierten Motiven des CD3-Komplexes, die auch als ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) bezeichnet werden. Die Phosphorylierung dieser Motive wird von den Tyrosin-Kinasen $p56^{lck}$ und $p59^{fyn}$, die zur Familie der src-Kinasen gehören, durchgeführt. Die Tyrosinkinase ZAP70 (ξ -Ketten-assoziiertes Protein) lagert sich aufgrund ihrer SH2-(Src Homologie 2)-Domänen an die phosphorylierten ITAMs der ξ -Ketten an, wird aber noch nicht aktiviert. Die Aktivierung erfolgt durch die $p56^{lck}$ -Kinase, die mit den Corezeptoren CD4 oder CD8 assoziiert ist und durch Bindung des Antigens in die räumliche Nähe des TCR/CD3 Komplexes kommt und dann ZAP70 phosphorylieren kann. ZAP70 spielt bei der Aufrechterhaltung der Signalübertragung des T-Zell-Rezeptors eine wichtige Rolle, da sie weitere Adapterproteine, wie LAT (linker of activation in T-cells), phosphoryliert, die dann zur

Rekrutierung wichtiger Signalproteine an die Membran führen. Bei diesen Signalproteinen handelt es sich u. a. um den Grb2/SOS-Komplex, die p85-Untereinheit der PI3-Kinase und die PLC- γ , die weitere Signalwege aktivieren.

Der Grb2/SOS-Komplex besteht aus dem Adapterprotein Grb2 und dem Guaninnucleotidaustauschfaktor SOS und führt durch den Austausch von GDP zu GTP zur Aktivierung des membranassoziierten kleinen G-Proteins Ras. GTP-Ras ist ein Aktivator der Raf Proteinkinase, die das erste Glied einer Kinasekaskade (MAP-Kinasen) darstellt, an deren Ende die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Elk stehen (Janeway et al., 2002).

Des Weiteren kommt es durch die Rekrutierung der regulatorischen p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) an die enzymatische p110-Untereinheit des Enzyms zur Aktivierung der PI3K. Die PI3K phosphoryliert im Folgenden ihr Substrat, das Membran-Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), unter Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat. Dieses Produkt dient als Bindungsstelle für Proteine mit einer Plekstrin-Homologie-(PH)-Domäne, wie z.B. die Serin/Threonin-Kinase Akt. Die Akt vermittelt dann die Aktivierung weiterer Signalwege (Janeway et al., 2002).

Die PLC- γ spaltet das Membran-Phospholipid PIP_2 in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). IP_3 geht in das Cytosol über und bindet an IP_3 -Rezeptoren, wodurch es zur Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) kommt (Berridge, 1993; Lewis, 2001). Calcium wird aber auch durch die nach T-Zell-Aktivierung gebildeten second messenger cyclische ADP-Ribose (cADPR) (Guse et al., 1999) und Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAADP) (Berg et al., 2000; Gasser et al., 2006a) aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Zusätzlich werden in der Plasmamembran Calciumkanäle geöffnet, so dass es zum Einstrom von Calcium kommt und die intrazelluläre Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) steigt. Die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert die cytosolische Proteinphosphatase Calcineurin, die daraufhin den cytosolisch lokalisierten Transkriptionsfaktor NF-AT (nuclear factor of activated T cells) dephosphoryliert (Beals et al., 1997; Crabtree & Olson, 2002). Dieser kann dann in den Zellkern transportiert werden. Dort bindet er an AP1 und bildet den aktiven Transkriptionsfaktor NF-AT, der mit weiteren Faktoren wie NF κ B zur Regulation der Expression von Genen wie Interleukin-2 (IL-2) beiträgt (Cantrell, 1996; Rao, 1994). Die Expression von IL-2 trägt zur klonalen Expansion und Differenzierung bei und ist essentiell für eine effektive Immunantwort. Für die

optimale Aktivierung der IL-2-Genexpression wird aber noch ein weiteres stimulatorisches Signal benötigt, dass z. B. von B-Lymphozyten vermittelt wird. So kommt es nach Bindung eines Antigens an den Antigen-Rezeptor des B-Lymphozyten zur Expression des Oberflächenproteins CD80/86, das an einen weiteren Corezeptor CD28 des T-Lymphozyten bindet. Die Aktivierung von CD28 führt auf Seite der T-Lymphozyten zu einer Stabilisierung der IL-2 codierenden mRNA, sowie zur Expression des IL-2-Rezeptors (Powell et al., 1998; Ragheb et al., 1999). Dadurch kommt es zu einer autokrinen Stimulation, da das von der T-Zelle sezernierte IL-2 zur ihrer eigenen Stimulation über den IL-2-Rezeptor führt (Janeway et al., 2002).

1.3 Calciumsignale in T-Lymphozyten

Die Stimulation von T-Lymphozyten kann durch Kontakt des TCR mit antigenpräsentierenden Zellen, aber auch durch Quervernetzen des TCR mit Lektinen oder durch Anti-TCR-Komplex Antikörper erfolgen (Lewis, 2001). Durch diese Stimulation kommt es zur Bildung der second Messenger IP_3 (Guse et al., 1993), cADPR (Guse et al., 1999) und NAADP (Gasser et al., 2006a), die zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen (Abb. 1.1). Bei nicht aktivierten T-Lymphozyten beträgt die $[Ca^{2+}]_i$ ungefähr 100 nM, die nach einer Stimulation innerhalb kurzer Zeit auf eine Konzentration von 500 nM bis 1000 nM ansteigt (Berridge et al., 2000; Gardner, 1989; Gasser et al., 2006a). Diesem kurzzeitigen Peak, der nur ein bis zwei Minuten andauert, folgt der Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf eine Konzentration von 150 bis 300 nM (Gasser et al., 2006a). Diese auch als Plateau bezeichnete Phase des Calciumsignals kann über mehrere Stunden andauern (Imboden & Weiss, 1987). Es konnte festgestellt werden, dass sich die frühe Peakphase nicht durch Chelatisierung des extrazellulären Calciums, durch Calciumkanalblocker oder Depolarisierung inhibieren lässt, während die $[Ca^{2+}]_i$ der Plateauphase unter diesen Bedingungen vermindert ist (Gelfand et al., 1984). Aufgrund dieser Feststellungen wurde vermutet, dass der initiale Calciumpeak durch eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern erfolgt, während die späte Phase durch den Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum getragen wird (Premack & Gardner, 1992). Diese Beobachtungen wurden bei Untersuchungen an großen Zellpopulationen gemacht. Bei Einzelluntersuchungen mittels Calcium-Imaging wurde beobachtet, dass die T-Lymphozyten sehr heterogen auf die Stimulation des TCR reagieren. So konnte

gezeigt werden, dass das Calciumsignal von einzelnen T-Lymphozyten biphasisch, mit nur einem Calciumpeak ohne Plateauphase oder oszillierend verlaufen kann (Berridge, 1990; Tsien & Tsien, 1990). Der aus vielen Einzelzellmessungen erhaltene Mittelwert zeigt aber wieder das oben beschriebene biphasische Signal, das bei Messungen großer Zellzahlen beobachtet wurde. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Art des Calciumsignals vom Typ und Reifungsgrad der T-Zelle, sowie der APC und den Eigenschaften des Antigens, also dem immunologischen Kontext, abhängt und so die weitere Entwicklung der T-Lymphozyten in Richtung Aktivierung, Anergie oder Zelltod beeinflusst (Berridge et al., 1998; Donnadieu et al., 1994; Lewis & Cahalan, 1989; Lewis, 2001).

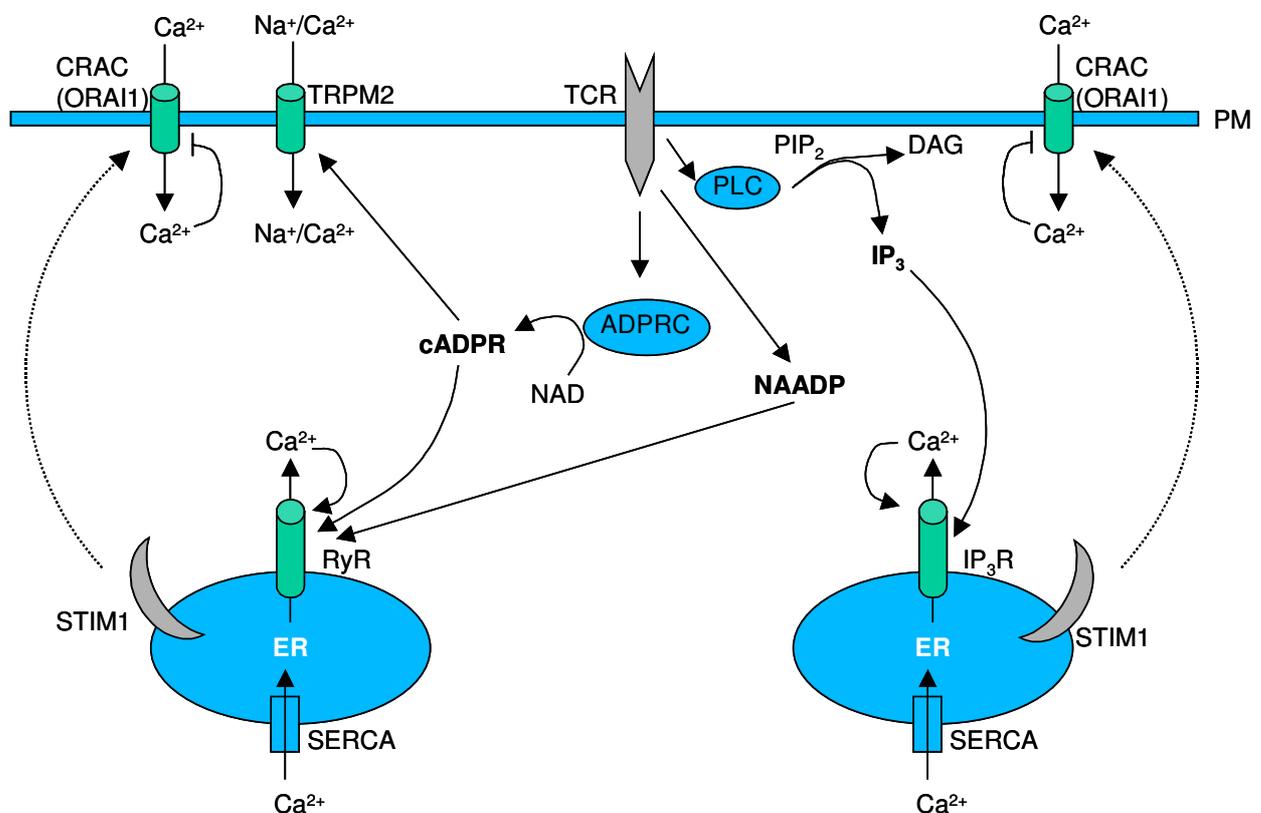


Abb. 1.1: Schema der Calciumsignalwege in T-Lymphozyten.

Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird während der T-Zellaktivierung aber nicht nur durch die Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom sondern auch durch ein System von Proteinen reguliert, die das cytosolische Calcium wieder entfernen. Die Hauptkomponenten dieses Systems sind Calcium-ATPasen in der Plasmamembran und in der Membran des ER, sowie mitochondriale Pumpen (Abb. 1.1). In T-Lymphozyten dient die Calcium-ATPase des ER (SERCA) dem langsamen Auffüllen der Calciumspeicher, während die Calcium-ATPase der Plasmamembran (PMCA) durch den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert wird und für den schnellen Abtransport des

Calciums sorgt. Ihre Aktivierung erlaubt die Etablierung der Plateauphase, wobei die Höhe der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Aktivität der PMCA bestimmt wird (Donnadieu et al., 1992). Neben den Calcium-ATPasen sind auch mitochondriale Calcium-Uniporter an der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ beteiligt. So sind die Mitochondrien in der Lage, schnell große Mengen Calcium aufzunehmen und es anschließend langsam wieder abzugeben (Hoth et al., 1997; Makowska et al., 2000). Auf diese Weise reduzieren die Mitochondrien die $[Ca^{2+}]_i$ und verhindern so die calciumabhängige Inaktivierung von CRAC-Kanälen (Hoth et al., 2000). Mitochondrien verhalten sich also wie Calciumpuffer, die die Calciumpeaks abdämpfen aber die Dauer der erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ verlängern (Randriamampita & Trautmann, 2004).

1.3.1 Effektorfunktionen von Calcium

Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ hat vielfältige Auswirkungen die unmittelbar, wie z. B. die Aktivierung von Enzymen, oder verzögert, wie z.B. die Genexpression, auftreten. Calmodulin (CaM) stellt einen wichtigen cytosolischen Calciumrezeptor dar, der in allen eukaryontischen Zellen exprimiert wird. Calmodulin ist ein EF-Hand Protein, dass vier Calciumionen kooperativ binden kann. Nach Bindung von Calcium an Calmodulin bindet dieser Calcium/Calmodulin-(Ca/CaM)-Komplex an viele Proteine und reguliert so die Aktivität von Enzymen, Cytoskelettproteinen und Ionenkanälen. Zu den durch Ca/CaM modulierten Enzymen gehören die Leichtketten-Myosinkinase, die Ca/CaM-abhängige Proteinkinase CaM-Kinase und die Ca/CaM-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin (Premack & Gardner, 1992).

Ein wichtiges durch den Ca/CaM-Komplex aktiviertes Enzym ist die Ca/CaM-abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin. Sie wird durch die Bindung von Ca/CaM aktiviert und führt zur Dephosphorylierung des cytosolisch lokalisierten Transkriptionsfaktors NF-AT (Beals et al., 1997; Crabtree & Olson, 2002). Dadurch kommt es zur Demaskierung eines Kernlokalisierungssignals und zum Transport in den Zellkern (Beals et al., 1997; Crabtree & Olson, 2002). Dort bildet NF-AT mit AP1 einen aktiven Transkriptionsfaktor, der bei Expression des IL-2 Gens eine wichtige Rolle spielt. Interessant hierbei ist, dass die nukleäre Lokalisation von NF-AT der ständigen Aktivität von Calcineurin bedarf, da NF-AT durch Serin-Kinasen wie GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) phosphoryliert und zurück in das Cytosol transportiert wird. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Beteiligung des

Corezeptors CD28 zur Inaktivierung von GSK3 führen kann und so die Anwesenheit von NF-AT im Kern verlängert (Randriamampita & Trautmann, 2004).

Ein weiteres durch den Ca/CaM-Komplex aktiviertes Enzym ist die Leichtketten-Myosinkinase, die an der Reorganisation des Cytoskeletts beteiligt ist (Premack & Gardner, 1992; Walker et al., 1989). So ändert sich der Aufbau des submembranen Cytoskeletts im Bereichs von Lymphozyten schnell nach TCR Stimulation. Diese Reorganisation ist notwendig für die Bildung eines stabilen und langanhaltenden Kontaktes zwischen T-Zelle und APC und wird u.a. durch Änderungen der Interaktionen zwischen den Cytoskelettproteinen Aktin und Myosin hervorgerufen, wobei diese Interaktionen durch die Leichtketten-Myosinkinase reguliert werden (Premack & Gardner, 1992).

Des weiteren kann die Aktivität von Proteinen auch durch direkte Bindung von Calcium reguliert werden. So führt die Bindung von DAG, das bei der Spaltung von PIP₂ durch die PLC- γ gebildet wird, und Calcium zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Die PKC ist an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B beteiligt (Li & Verma, 2002; Steffan et al., 1995). So liegt NF κ B in nicht stimulierten Zellen im Komplex mit seinem Inhibitor I κ B im Cytosol vor. Die aktive PKC phosphoryliert I κ B, so dass I κ B von NF κ B abdissoziiert und dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Dadurch kommt es zu einer Freilegung eines Kernlokalisations signals und zum Transport in den Zellkern. Dort führt NF κ B mit weiteren Faktoren zur Expression von IL-2 (Janeway et al., 2002).

Wie oben schon erwähnt können sich die Calciumsignale einzelner Zellen stark von einander unterscheiden. So konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Muster von Calciumsignalen auch zu verschiedenen Resultaten in Bezug auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit der Genexpression führen. Es wurde beobachtet, dass bei schwacher Stimulation von T-Zellen ein oszillierendes Calciumsignal bei Aktivierung von NF-AT effizienter ist als ein anhaltender Anstieg von [Ca²⁺]_i. Daher wurde vermutet, dass Oszillationen der [Ca²⁺]_i die Detektion niedriger Antigenmengen ermöglichen und verstärken (Dolmetsch et al., 1998). Des weiteren scheint die Frequenz des Calciumsignals die Zellen in verschiedene Aktivierungsmuster zu führen. Während es bei hohen Frequenzen zur Aktivierung von NF-AT und NF κ B kommt, scheinen seltene unregelmäßige Calciumpeaks nur zu einer Aktivierung von NF κ B zu führen (Dolmetsch et al., 1997; Dolmetsch et al., 1998). Es konnte des weiteren gezeigt werden, dass die für IL-2 oder IL-8

codierenden Gene frequenzabhängig exprimiert werden, wobei das Ausmaß der Cytokinexpression das Ausmaß der Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF-AT und NF κ B widerspiegelt (Dolmetsch et al., 1998; Randriamampita & Trautmann, 2004).

1.3.2 Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern

Wie oben beschrieben kommt es durch Stimulation von T-Lymphozyten zu einer ganzen Reihe von Signaltransduktionsprozessen, die dazu führen, dass die $[Ca^{2+}]_i$ steigt und dadurch weitere Prozesse, wie Reorganisation des Cytoskeletts und Genexpression, in Gang gesetzt werden, die schließlich zur Proliferation und Differenzierung, aber auch zu Anergie oder Apoptose führen können. Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wird durch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und durch den Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum vermittelt. Die Freisetzung von Calcium wird durch die second Messenger IP₃, cADPR und NAADP, die nach Aktivierung von T-Lymphozyten gebildet werden, ausgelöst. Im Folgenden sollen nun die Funktionen der einzelnen second Messenger aufgeführt werden.

1.3.2.1 myo-Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃)

IP₃ wurde als erster der drei second Messenger identifiziert und führt zur Freisetzung von Calcium aus dem ER. Diese calciummobilisierende Eigenschaft wurde zunächst an permeabilisierten Azinuszellen des Pankreas gezeigt (Streb et al., 1983) und konnte seit dem in vielen anderen Zellsystemen bestätigt werden (Berridge, 1993).

Die Bildung von IP₃ erfolgt durch die aktivierte PLC γ , die PIP₂ unter Bildung von DAG und IP₃ spaltet (Berridge, 1984). DAG verbleibt in der Membran und führt gemeinsam mit Calcium zur Aktivierung der PKC (Nishizuka, 1984). IP₃ geht in das Cytosol über und gelangt durch Diffusion zu den in der ER-Membran lokalisierten IP₃-Rezeptoren. IP₃-Rezeptoren sind auch gleichzeitig Calcium-Kanäle, die durch Bindung von IP₃ öffnen und Calcium freisetzen. Ein IP₃-Rezeptor wird aus vier Untereinheiten gebildet, so dass gleichzeitig mehrerer IP₃-Moleküle an einen Rezeptor binden können (Marks, 1997). In T-Lymphozyten konnten drei Typen von IP₃-Rezeptoren identifiziert werden, die sich durch ihre Sensitivität gegenüber IP₃ und Calcium unterscheiden (Randriamampita & Trautmann, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass das IP₃-Signal nur von kurzer Dauer war. Nach der Stimulation von T-Lymphozyten stieg die IP₃-Konzentration binnen zwei bis drei Minuten schnell an und ging dann innerhalb von 15 bis 20 Minuten auf einen Wert etwas oberhalb der Basalkonzentration zurück (Guse et al., 1993). Aufgrund dieses Zeitverlaufs wurde vermutet, dass IP₃ in T-

Lymphozyten, insbesondere in der ersten Phase des Calciumsignals, eine wichtige Rolle spielt.

1.3.2.2 cyclische ADP-Ribose (cADPR)

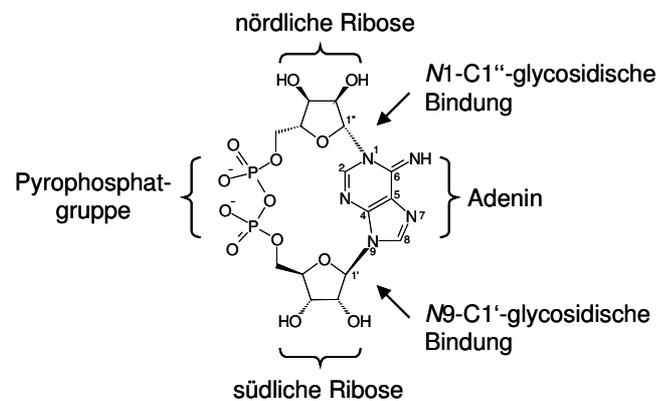


Abb. 1.2: Strukturformel von cADPR. Strukturformel mit häufig verwendeten Bezeichnungen für die verschiedenen Teile des Moleküls.

cADPR wurde 1987 als calciumfreisetzender Metabolit von NAD bei Untersuchungen an Seeigeleihomogenaten entdeckt (Clapper et al., 1987; Lee et al., 1989). Die Struktur von cADPR konnte aber erst 1994 endgültig bestimmt werden (Abb. 1.2, nach Lee et al., 1994). Seit seiner Entdeckung konnte die calciummobilisierende Eigenschaft von cADPR in vielen verschiedenen Organismen und Zelltypen wie Herzmuskelzellen der Ratte (Mészáros et al., 1993), Skelettmuskelzellen der Maus (Fulceri et al., 2001), neuronalen Zellen (Hirnmikrosomen der Ratte, White et al., 1993); humanen T-Lymphozyten (Guse et al., 1995a) und pankreatischen Azinuszellen der Maus (Thorn et al., 1994) gezeigt werden. Diese Aktivität von cADPR konnte darüber hinaus auch an Zellen von Invertebraten, wie den Oozyten des Seeigels (Rusinko & Lee, 1989), an Pflanzenzellen und auch an Einzellern beobachtet werden (Übersicht in Guse, 2004a).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation verschiedener Zelltypen zu einem Anstieg der enzymatischen Aktivität von ADP-Ribosyl-Cyclasen (ADPRC) und zu einem Anstieg der cADPR Konzentration kam. Eine Zunahme der ADPRC Aktivität konnte u.a. durch Stimulation von neuronalen Zellen mit Carbachol (Higashida et al., 1997) oder durch Stimulation glatter Muskelzellen des Darms mit Cholecystokinin (Kuemmerle & Makhlof, 1995) beobachtet werden. Der Anstieg der cADPR Konzentration wurde u. a. nach Stimulation von pankreatischen β -Zellen mit Glukose (Takasawa et al., 1993), nach Stimulation von neurosekretorischen PC12

Zellen mit Stickoxid (NO) (Clementi et al., 1996) oder Stimulation von T-Lymphozyten mit dem Anti-CD3-Antikörper OKT3 gezeigt. Bei der Untersuchung von T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass die cADPR Konzentration langsam anstieg, wobei die maximale cADPR Konzentration nach 30 Minuten erreicht wurde und für mindestens eine Stunde nach Stimulation erhöht blieb. Anhand dieser Resultate wurde vermutet, dass cADPR für den langanhaltenden Calciumeinstrom in T-Lymphozyten verantwortlich ist und somit eine wichtige Rolle bei Etablierung einer effektiven Immunantwort spielt (Guse et al., 1999).

cADPR (Abb. 1.2) wird durch ADP-Ribosyl-Cyclasen (ADPRC) aus NAD synthetisiert. Dabei wird Nicotinamid abgespalten und eine N-glycosidische Bindung zwischen dem Adeninring und der sogenannten nördlichen Ribose gebildet (Guse, 2004b). Die erste ADPRC wurde 1991 aus *Aplysia californica* aufgereinigt und kloniert (Glick et al., 1991; Hellmich & Strumwasser, 1991). In Säugern konnten CD38 (States et al., 1992) und CD157 (Itoh et al., 1994) über Sequenzhomologiesuche als ADPRC identifiziert werden. Ihre Funktion als ADPRC ist aber umstritten, da es sich bei diesen Enzymen um Ectoenzyme handelt, deren katalytisches Zentrum extrazellulär oder im Lumen von internalisierten Membranvesikeln gelegen ist. Das cytosolische Substrat NAD muss daher hinaus und das extrazellulär oder vesikulär gebildete cADPR wieder hineintransportiert werden. Diese Anordnung von Substrat, Enzym und Rezeptor wurde daher als topologisches Paradox bezeichnet. Es wurde von De Flora und Kollegen ein Modell entwickelt, dass dieses Paradox lösen konnte (De Flora et al., 2004). So konnten Transmembrantransporter für NAD und cADPR beschrieben werden. Connexin 43 (Cx43) Halbkanäle vermitteln den Transport von NAD aus dem Cytosol in den extrazellulären oder vesikulären Raum (Bruzzone et al., 2001), während der Transport von cADPR durch CD38 selbst oder durch Nucleosidtransporter vermittelt wurde (Franco et al., 1998; Guida et al., 2002). Dieser vermutete Transportmechanismus kann einerseits zu einer autokrinen als auch zu einer parakrinen Stimulation führen. Es konnten in der Tat auch Effekte von extrazellulärem cADPR beschrieben werden (Franco et al., 2001; Podestà et al., 2000). So konnte ein proliferationsfördernder Effekt für cADPR beschrieben werden. Humane hämatopoetische Vorläuferzellen, die für 24 h mit hohen extrazellulären cADPR Konzentrationen (100 μ M) inkubiert wurden, zeigten eine Zunahme der Anzahl als auch der Größe der Kolonien (Podestà et al., 2000). An 3T3-Fibroblasten

der Maus konnte beobachtet werden, dass es durch Inkubation mit cADPR zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und der Proliferation kam (Franco et al., 2001). Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Resultaten konnte gezeigt werden, dass CD38 positive Jurkat T-Lymphozyten die Fähigkeit besitzen NAD mittels Ecto-CD38 zu cADPR umzusetzen, aber cADPR nicht ins Innere der Zelle aufnehmen, denn nach Zugabe von extrazellulärem NAD konnte kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden. Dieser Befund weist darauf hin, dass der von De Flora vorgeschlagene Transportweg für NAD/cADPR nicht in allen Zellen aktiv ist.

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von CD38 bei der Synthese von cADPR konnte durch die Bestimmung des cADPR Gehaltes von CD38^{-/-}-Mäusen erhalten werden (Partida-Sánchez et al., 2001; Young et al., 2006). Hier wurde gezeigt, dass die cADPR Konzentration in einigen Geweben von CD38^{-/-}-Mäusen niedriger war als bei Wildtypmäusen, wobei das Ausmaß der Reduktion des cADPR Gehalts organabhängig war (Partida-Sánchez et al., 2001; Young et al., 2006). So konnte für die Milz eine Verminderung der cADPR Konzentration um 86 % und für das Gehirn eine Verminderung um 19 % festgestellt werden. Dieser Befund weist einerseits auf die Beteiligung von CD38 bei der cADPR Bildung hin, zeigt aber auch, dass wahrscheinlich noch andere Enzyme zur cADPR Bildung beitragen (Partida-Sánchez et al., 2001). So konnte eine intrazelluläre ADPRC Aktivität an neuronalen Zellen von CD38^{-/-}-Mäusen gezeigt werden (Ceni et al., 2003). Da die gemessene ADPRC-Aktivität membranassoziiert und in permeabilisierten Zellen deutlich höher als in intakten Zellen war, wurde vermutet, dass diese Aktivität von einer intrazellulär lokalisierten membranständigen ADPRC stammte. Durch Bestimmung des pH-Optimums und durch Inhibitionsversuche mit Zn²⁺ konnte CD157 als Ursache der Enzymaktivität ausgeschlossen werden (Ceni et al., 2003). Eine ADPRC-Aktivität konnte in ähnlichen Versuchen an speziellen Gehirn-Präparationen von CD38^{-/-}-Mäusen beschrieben werden, wobei auch hier die Aktivität membranassoziiert und intrazellulär lokalisiert war. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym im Gegensatz zu CD38 nicht in der Lage war NGD zu cGDPR umzusetzen (Ceni et al., 2006).

Es wurden auch Anzeichen für eine lösliche cytosolischen ADPRC gefunden, wobei die ADPRC Aktivität in den meisten Fällen recht niedrig und schwer zu bestimmen war. So konnte in Jurkat T-Lymphozyten gezeigt werden, dass nach Stimulation des TCR mit OKT3 sowohl die intrazelluläre cADPR Konzentration als auch die Aktivität

der cytosolischen ADPRC anstieg (Guse et al., 1999; Schweitzer et al., 2001). Des weiteren konnten lösliche ADPRC auch in peripheren mononukleären Blutzellen (Bruzzone et al., 2003), pancreatischen Azinuszellen (Sternfeld et al., 2003) und Muskelzellen des Hasen (Kuemmerle & Makhlof, 1995) gefunden werden, die sich in einigen Eigenschaften von CD38 unterschieden. So konnte für die ADPRC aus mononukleären Blutzellen gezeigt werden, dass sie im Gegensatz zu CD38 nicht in der Lage war NGD zu cGDPR umzusetzen (Bruzzone et al., 2003). Es konnte eine weitere lösliche ADPRC im Hirn des Rinds beschrieben werden. Dieses Enzym war im Gegensatz den oben erwähnten ADPRC aus mononukleären Blutzellen und neuronalen Zellen der Maus in der Lage NGD zu cGDPR umzusetzen (Matsumura & Tanuma, 1998). Die beschriebenen Resultate weisen auf die Existenz von löslichen cytosolischen ADPRC hin, es konnte aber bisher kein Enzym auf molekulare Ebene identifiziert werden. Wenn auch die molekulare Identität der ADPRC bisher nicht abschließend geklärt werden konnte, konnte dennoch gezeigt werden, dass es durch extrazelluläre Stimuli zur Aktivierung von ADPRC und zur Bildung von cADPR kam. Das nach Stimulation gebildete cADPR bindet im Folgenden an RyR vom Typ 2 oder 3, die in der ER Membran lokalisiert sind. RyR bestehen wie die IP₃R aus vier Untereinheiten und kommen in 3 Isoformen vor (RyR 1-3) (Giannini et al., 1992; Nakai et al., 1990; Takeshima et al., 1989; Review: Fill & Copello, 2002). Des weiteren sind RyR sowohl Rezeptoren als auch Calcium-Kanäle, die wie die IP₃R positiv durch Calcium reguliert werden. Die Interaktion von cADPR und RyR wurde zunächst durch pharmakologische Untersuchungen am Seeigeleisystem anhand der Sensitivität der cADPR vermittelten Calciumfreisetzung gegenüber pharmakologischen Inhibitoren des RyR wie Ruthenium Rot und inhibitorischen Konzentrationen von Ryanodin (Galione et al., 1991) gezeigt. Diese Resultate wurden durch Versuche mit weiteren RyR Antagonisten wie Magnesium (Guse et al., 1996) und Procain (Galione et al., 1991), aber auch durch Versuche mit RyR Agonisten wie Calcium und Koffein gestützt, die eine Sensitivierung der cADPR vermittelten Calciumfreisetzung bewirkten (Lee, 1993). Hinweise auf eine direkte Interaktion von cADPR und RyR wurden durch Patch-Clamp Untersuchungen mit rekonstituierten Typ 2 und 3 RyR in Lipiddoppelschichten erhalten. So konnte gezeigt werden, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit in Anwesenheit von cADPR erhöht ist (Mészáros et al., 1993). Die Relevanz von RyR für die cADPR vermittelte Calciumfreisetzung konnte auch durch einen molekularen Knockdown des Typ 3

RyR in T-Lymphozyten gezeigt werden, denn die cADPR vermittelte Calciumfreisetzung war in diesen Zellen signifikant vermindert (Schwarzmann et al., 2002). Bisher konnte aber nicht geklärt werden, ob cADPR direkt oder über ein cADPR-Bindeprotein an den RyR bindet. In ersten Studien zur Identifikation des cADPR-Rezeptors wurde [³²P]8-N₃-cADPR eingesetzt, um mögliche cADPR-Bindeproteine (cADPR-BP) im Seeigelei kovalent zu markieren. Es konnten Proteine mit einer Masse von 100 und 140 kDa markiert werden, wobei vermutet wurde, dass es sich bei diesen Proteinen entweder um proteolytische Abbauprodukte des RyR oder um spezielle cADPR-BP handelte (Walseth & Lee, 1993). Eine mögliche direkte Bindungsstelle von cADPR am RyR konnte bisher nicht beschrieben werden. In einigen Zellen konnte gezeigt werden, dass das FK506 Bindeprotein 12.6 (FKBP 12.6, Calstabin 2) cADPR band und die Empfindlichkeit von RyR gegenüber cADPR vermittelte. Aufgrund dieser Resultate wurde ein Modell entwickelt, nach dem FKBP 12.6 an den RyR bindet und die Öffnungswahrscheinlichkeit vermindert. Die Bindung von cADPR oder FK506 (ein Immunsuppressivum) an FKBP 12.6 führt zu einer Verminderung der Wechselwirkungen zwischen RyR und FKBP 12.6 und trägt so zur einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR bei (Noguchi et al., 1997; Tang et al., 2002).

cADPR scheint des weiteren an der Vermittlung der Calcium-induzierten Calcium Freisetzung (CICR - calcium induced calcium release) beteiligt zu sein. CICR ist ein Mechanismus, der auf der Sensitivität von RyR gegenüber einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ beruht und bei kleinen, oft nur lokalisierten Anstiegen der $[Ca^{2+}]_i$ eine starke Freisetzung von Calcium aus dem ER oder auch aus dem SR vermittelt. Für cADPR konnte u.a. an Herzmuskelzellen und pancreatischen β -Zellen, ein positiver Effekt auf den CICR Mechanismus gezeigt werden (Cui et al., 1999; Lemmens et al., 2001).

1.3.2.3 β -Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAADP)

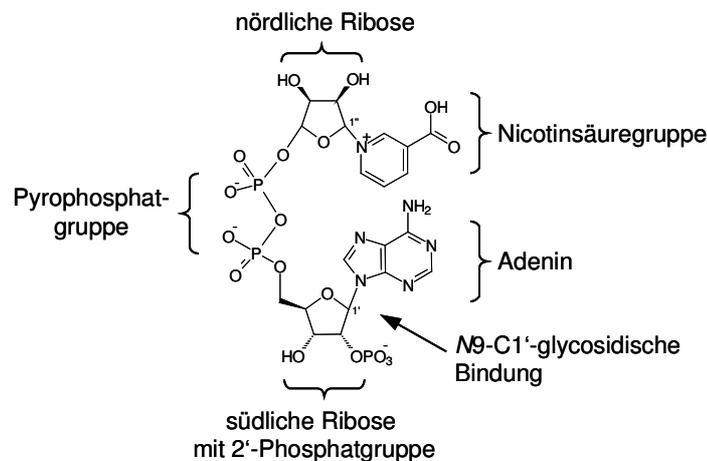


Abb. 1.3: Strukturformel von NAADP. Strukturformel mit Bezeichnungen der unterschiedlichen Gruppen des Moleküls.

NAADP ist ein weiterer endogener calciumfreisetzender second Messenger. Diese Substanz wurde schon 1987 als Verunreinigung von kommerziell erhältlichem NADP bei Untersuchungen an Seeigeleihomogenaten entdeckt (Clapper et al., 1987). Die Struktur von NAADP konnte erst Jahre später aufgeklärt werden (Aarhus et al., 1995). Die calciumfreisetzende Eigenschaft von NAADP konnte auch in Säugerzellen, wie pankreatischen β -Zellen (Johnson & Mislser, 2002) und T-Lymphozyten (Berg et al., 2000), gezeigt werden. Im Vergleich zu IP_3 und cADPR, die im μM -Konzentrationsbereich aktiv sind (Cancela et al., 2002; Guse et al., 1995a), konnte für NAADP beobachtet werden, dass es bereits in niedrigen nM-Konzentrationen aktiv ist und eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve in verschiedenen Säugerzellen aufweist (Berg et al., 2000; Johnson & Mislser, 2002), was zur Folge hat dass NAADP bei niedrigen Konzentrationen wirksamer sein kann als bei höheren. Es konnte darüber hinaus auch gezeigt werden, dass die Bildung von endogenem NAADP in verschiedenen Zelltypen durch Stimulation induziert werden kann. So konnte ein Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration nach Stimulation von pankreatischen β -Zellen (Masgrau et al., 2003), sowie pankreatischen Azinuszellen der Maus (Yamasaki et al., 2005) und humanen T-Lymphozyten (Gasser et al., 2006a) gezeigt werden. Die Stimulation von Jurkat T-Lymphozyten führte innerhalb von 20 Sekunden zu einem sehr schnellen und kurzlebigen Anstieg der NAADP-Konzentration, gefolgt von einem schnellen Abfall auf den Basalwert. Fünf Minuten nach Stimulation konnte ein zweiter schwächerer

Anstieg der NAADP-Konzentration beobachtet werden, der jedoch langanhaltend war und erst 50 Minuten nach der Stimulation wieder auf den NAADP Basalwert zurückkehrte (Gasser et al., 2006a).

Weiterhin umstritten sind das calciumspeichernde Zielkompartiment, der NAADP-Rezeptor, sowie das NAADP synthetisierende Enzym. So wurden in unterschiedlichen Zellsystemen Hinweise auf verschiedene Zielorganellen gefunden. In Seeigeleiern konnte gezeigt werden, dass NAADP Calcium aus einem anderen Speicher freisetzt als IP_3 und cADPR (Lee & Aarhus, 2000). Diese Calciumspeicher wurden später als Reservegranula identifiziert (Churchill et al., 2002), die mit Lysosomen vergleichbar sind. Wie im Seeigeleisystem konnte ein lysosomen-ähnlicher NAADP-sensitiver Calciumspeicher auch in höheren eukaryontischen Zellen gefunden werden, so z.B. in pancreatischen Azinuszellen und in pancreatischen β -Zellen (Yamasaki et al., 2004). Darüber hinaus wurden für das Seeigeleisystem (Berridge et al., 2002; Patel et al., 2000) und für höhere eukaryontische Systeme, wie arterielle glatte Muskelzellen (Boittin et al., 2002), Mikrosomen des Hirns (Bak et al., 1999), Mikrosomen des Herzens (Bak et al., 1999) und Leberlysosomen der Ratten (Zhang & Li, 2007) spezifische NAADP-Rezeptoren postuliert.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass NAADP die Calciumfreisetzung aus der Kernhülle von pancreatischen Azinuszellen und aus permeabilisierten Azinuszellen vermittelte und dass diese Freisetzung durch RyR-Antagonisten inhibiert werden konnte. Diese Resultate weisen drauf hin, dass der NAADP-Rezeptor in eukaryontischen Zellen durch den RyR repräsentiert wird und dass es sich bei dem NAADP Zielkompartiment eher um einen ER-assoziierten Calciumspeicher als um ein lysosomales Kompartiment handelt (Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 2006). Die Funktion des ER als NAADP Zielkompartiment konnte durch Versuche an T-Lymphozyten bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Depletion der lysosomalen Calciumspeicher durch Bafilomycin A1 nicht zu einer Verminderung des NAADP-vermittelten Calciumsignals führte, während aber die Depletion des ER durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin inhibiert wurde (Steen et al., 2007). Die Beteiligung des Ryanodinrezeptors bei der NAADP vermittelten Calciumfreisetzung konnte durch andere Untersuchungen untermauert werden. So konnte mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass gereinigte RyR aus Herz und Skelettmuskel,

die in einer Lipiddoppelschicht rekonstituiert wurden, durch NAADP aktivierbar waren (Hohenegger et al., 2002; Mojzisová et al., 2001). Dieses Resultat konnte auch durch Untersuchungen an T-Lymphozyten bestätigt werden. So konnte durch Mikroinjektionsversuche gezeigt werden, dass eine Inhibition der RyR durch Ruthenium Rot oder Ryanodin zu einem Ausbleiben des NAADP vermittelten Calciumsignals führte. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Untersuchungen an T-Lymphozyten mit reduzierter RyR Expression (Dammermann & Guse, 2005; Langhorst et al., 2004). Aufgrund dieser gegensätzlichen Daten wurden zwei Modelle postuliert. Das Ein-Speichermodell geht davon aus, dass NAADP direkt oder über ein Bindeprotein den RyR aktiviert, wobei cADPR und NAADP vermutlich verschiedene Bindeproteine nutzen (Gerasimenko et al., 2003). Das Zwei-Speichermodell besagt, dass NAADP über einen speziellen NAADP-Rezeptor Calcium aus den Lysosomen freisetzt, das dann die Freisetzung von weiterem Calcium über den RyR durch den CICR-Mechanismus auslöst (Cancela et al., 1999).

Wie oben erwähnt, konnte in einigen Zelltypen eine rezeptorvermittelte Bildung von NAADP beobachtet werden. Das NAADP synthetisierende Enzym ist aber noch nicht identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass NAADP durch das Ectoenzym CD38 durch eine Basenaustausch-Reaktion aus NADP synthetisiert werden kann. Die hierfür nötigen Bedingungen sind aber ungewöhnlich, da die Reaktion bevorzugt bei saurem pH-Wert von 4-5 abläuft und einen Überschuss von Nicotinsäure erfordert (Aarhus et al., 1995). Bei einer Beteiligung von CD38 bei der Synthese von NAADP tritt auch hier die oben erwähnte Problematik des topologischen Paradox auf. Untersuchungen an CD38^{-/-}-Mäusen zeigten, dass sich die NAADP Konzentrationen in den untersuchten Geweben nicht von den gefundenen Werten der Wildtypmäuse unterscheiden (Soares et al., 2007). Es scheint also ein anderes Enzym für die Synthese von NAADP zu geben. Möglich wäre die Synthese von NAADP durch eine Kinase, die NAAD, ein Metabolit der NAD Synthese, an der 2'-Hydroxylgruppe phosphoryliert.

1.3.3 Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum

Das Calciumsignal wird nicht nur durch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern sondern auch durch den Einstrom aus dem extrazellulären Raum vermittelt. Der Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum spielt bei der Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle, da der langanhaltende Einstrom, im

Vergleich zur transienten Calciumfreisetzung, an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-AT beteiligt ist, und so zu der Änderung der Genexpression beiträgt, die zur Proliferation und Cytokinproduktion von T-Lymphozyten führt (Feske et al., 2001; Lewis, 2001).

Der Einstrom von extrazellulärem Calcium kann über zwei Wege erfolgen, entweder abhängig vom Füllstand der Calciumspeicher oder speicherunabhängig. Der speicherabhängige Weg ist seit langem bekannt und wird wahrscheinlich von den drei oben beschriebenen calciummobilisierenden second Messengern genutzt, während der speicherunabhängige Einstrom noch recht wenig erforscht ist.

Bei dem speicherabhängigen Calciumeinstrom (store-operated calcium entry, SOCE), oder auch kapazitiven Calciumeinstrom, führt eine Depletion der Calciumspeicher zur Aktivierung von speicherabhängigen Calciumkanälen (store-operated channels, SOC) in der Plasmamembran, so dass es zum schnellen und starken Calciumeinstrom kommt (Putney, 1986). Die Calciumkanäle die bei T-Lymphozyten diesen Einstrom vermitteln, werden als CRAC-(calcium release activated calcium)-Kanäle bezeichnet und gehören zur Familie der SOC. Die CRAC-Kanäle zeichnen sich durch eine sehr hohe Selektivität und geringe Leitfähigkeit für Calciumionen, sowie durch eine schnelle Inhibition durch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ aus (Hoth & Penner, 1992; Zweifach & Lewis, 1995). Die Entleerung der Calciumspeicher kann, wie oben beschrieben, durch Bindung der second Messenger IP_3 , cADPR oder NAADP an den IP_3R bzw. RyR erfolgen oder auf unphysiologischem Wege durch Inhibition der SERCA mit Thapsigargin oder durch das Calciumionophor Ionomycin. Der Einstrom kann durch Komplexierung des extrazellulären Calciums mit EGTA oder durch Inhibition der CRAC-Kanäle z.B. mit Gadolinium-Ionen gehemmt werden. Der Mechanismus der Kopplung von Speicherentleerung und Öffnung von CRAC-Kanälen war lange Zeit umstritten und es wurden drei Möglichkeiten der Kopplung postuliert. So wurde vermutet, dass es durch Depletion der Calciumspeicher zur Bildung eines Botenstoffs kommt, der zur Membran diffundiert und dort die SOC aktiviert (Randriamampita & Tsien, 1993). Ein weiteres Modell postulierte, dass die SOC-Kanäle in den Membranen von Vesikeln vorliegen und dass diese nach Stimulation mit der Plasmamembran verschmelzen und so den Calciumeinstrom vermitteln (Patterson et al., 1999). Des Weiteren wurde angenommen, dass es sich um direkte Proteininteraktionen zwischen SOC-Kanälen in der Plasmamembran und den Calciumkanälen im ER handelte, wobei die

Entleerung des Calciumspeichers zu einer Konformationsänderung des Calciumkanals des ER und somit zur Aktivierung der SOC führte (Irvine, 1990). Vor Kurzem konnten zwei Komponenten des CRAC-Systems identifiziert werden: STIM1 und Orai1. STIM1 (stromal interaction molecule 1) ist ein Typ I Membranprotein, das hauptsächlich im ER lokalisiert ist und die Speicherdepletion vom ER zu den CRAC-Kanälen der Plasmamembran übermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Expression mittels RNAi den CRAC vermittelten Strom (I_{CRAC}) vermindert oder eliminiert (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Entleerung der Speicher zu einer Umordnung der diffus in der ER-Membran verteilten STIM1 Moleküle zu Clustern in der Nähe der Plasmamembran führte (Liou et al., 2005; Zhang et al., 2005). Orai1 stellt vermutlich eine Untereinheit der ionenleitenden Pore des CRAC-Kanals dar (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006). Hinweise dafür wurden durch Überexpression von Orai1 mit STIM1 erhalten. Bei Coexpression der beiden Proteine konnten großer Ströme gemessen werden, die die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften von I_{CRAC} aufwiesen (Mercer et al., 2006; Soboloff et al., 2006).

Für cADPR konnte gezeigt werden, dass es sowohl die Calciumfreisetzung als auch den Calciumeinstrom vermittelt (Guse et al., 1997b; Guse et al., 1999; Partida-Sánchez et al., 2001). So konnte zunächst beobachtet werden, dass Mikroinjektionen mit cADPR an Jurkat T-Lymphozyten zu langanhaltenden Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ führten und dass diese durch Inhibition des Einstroms mit Zinkionen oder SKF96365 unterdrückt wurden (Guse et al., 1997b). Des weiteren konnte beobachtet werden, dass die späte Plateau-Phase des OKT3 vermittelten Calciumsignals durch Vorinkubation mit dem cADPR Antagonisten 7-Deaza-8-Br-cADPR vermindert wurde (Guse et al., 1999). Die beobachtete Beteiligung von cADPR am Calciumeinstrom wurde auf den kapazitiven Calciumeinstrom zurückgeführt. Hinweise für die Aktivierung von CRAC-Kanälen durch die cADPR vermittelte Freisetzung von Calcium konnten an Jurkat T-Lymphozyten erhalten werden, deren RyR Typ 3 Expression mittels antisense-RNA vermindert war. Diese Zellen zeigten eine Verminderung des Calciumeinstroms während der Plateauphase des Calciumsignals (Schwarzmann et al., 2002). Des weiteren konnte eine Aktivierung von CRAC-Kanälen durch cADPR auch an IP_3R -defizienten DT40 Zellen gezeigt werden, da nach Gabe von cADPR charakteristische CRAC-Ströme gemessen wurden (Kiselyov et al., 2001). Untersuchungen an intakten T-Lymphozyten unter Anwendung des

sogenannten „Calcium free/Calcium readdition“-Protokolls mit den membranpermeanten cADPR Agonisten *N1*-cIDPRE und *N1*-cIDP-DE suggerierten ebenfalls, dass cADPR den Calciumeinstrom durch den kapazitativen Einstrom vermittelt, da nach Calciumfreisetzung durch Zugabe von extrazellulären Calcium ein Calciumeinstrom beobachtet werden konnte (Gu et al., 2004 Guse et al., 2005).

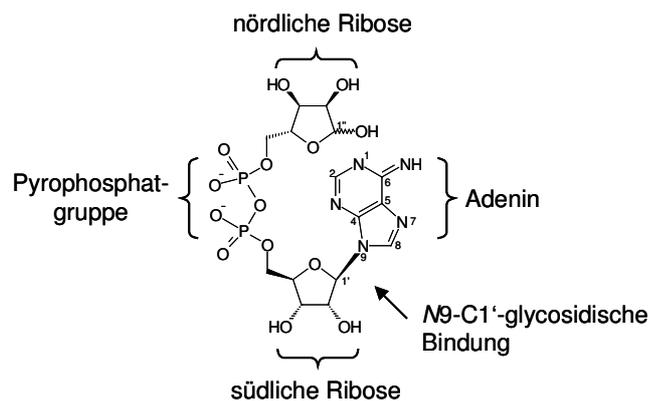


Abb. 1.4: Strukturformel von ADPR. Strukturformel mit häufig verwendeten Bezeichnungen der unterschiedlichen Merkmale des Moleküls.

Der Calciumeinstrom kann aber auch über einen speicherunabhängigen Mechanismus erfolgen. Im Rahmen der Untersuchungen des speicherunabhängigen Calciumeinstroms hat der in der Plasmamembran lokalisierte Ionenkanal TRPM2 (transient receptor potential -melastatin like) in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal durch ADP-Ribose (ADPR) aktivierbar war. ADPR wird wie cADPR durch ADPRC aus NAD synthetisiert und stellt gleichzeitig auch ein Abbauprodukt von cADPR dar. Für TRPM2 konnte gezeigt werden, dass er für Natrium- und Calciumionen durchlässig ist und hauptsächlich in Hirn und Zellen des Immunsystems exprimiert wird (Perraud et al., 2001; Perraud et al., 2003; Sano et al., 2001). Im cytosolischen C-Terminus weist TRPM2 eine Nudixbox auf, die ein konserviertes Motiv von Nukleotid-Pyrophosphatasen darstellt. An dieses konservierte Motiv kann ADPR binden und so die Aktivität des Kanals regulieren (Kühn & Lückhoff, 2004; Perraud et al., 2001). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch cADPR in Lage ist, den TRPM2-Kanal zu aktivieren (Kolisek et al., 2005). Zur Aktivierung des TRPM2-Kanals wurde eine sehr hohe Konzentration von cADPR benötigt, die mit einem EC_{50} von 700 μ M weit über der physiologisch gemessenen Konzentration für cADPR lag. Es konnte aber auch

gezeigt werden, dass mit physiologischen cADPR Konzentrationen im Bereich von 10 μM der EC_{50} Wert für ADPR von 12 μM um den Faktor 100 auf 90 nM gesenkt werden konnte. Daher scheint cADPR ein potenter Coregulator für den Calciumeinstrom über TRPM2 zu sein. Es konnte des weiteren beobachtet werden, dass die durch cADPR vermittelte Aktivierung des TRPM2 Kanals in Anwesenheit des cADPR Antagonisten 8-Br-cADPR inhibiert wurde, was auf eine spezifische Wirkung von cADPR an TRPM2 hinweist (Kolisek et al., 2005).

1.4 CD38: eine ADP-Ribosyl Cyclase

CD38 gehört wie die Cyclase von *Aplysia californica* und CD157 zur Familie der ADP-Ribosyl-Cyclasen (ADPRC). Diesen Enzymen ist u. a. gemein, dass sie NAD zu cADPR umsetzen können. Die *Aplysia* ADPRC war das erste Enzym dieser Familie für das eine Umsetzung von NAD zu cADPR beschrieben wurde (Lee & Aarhus, 1991). Durch Sequenzvergleiche wurden CD38 und CD157 als weitere potentielle ADPRC gefunden (States et al., 1992). Nachfolgende Studien zeigten, dass CD38 tatsächlich in der Lage war NAD zu cADPR umzusetzen (Howard et al., 1993; Kim et al., 1993; Lee et al., 1993), während für CD157 nur eine sehr schwache Cyclaseaktivität gezeigt werden konnte (Yamamoto-Katayama et al., 2001).

Die *Aplysia* ADPRC ist ein lösliches Protein, das aus 256 Aminosäuren besteht und in großen Mengen in den Keimdrüsen von *Aplysia californica* vorkommt (Lee & Aarhus, 1991). CD38 ist ein Typ II Membranprotein mit einer einzigen Transmembrandomäne in der Nähe des N-Terminus (Jackson & Bell, 1990). CD157 ist über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran verknüpft (Itoh et al., 1994). Die drei Proteine weisen eine Sequenzhomologie von 20 bis 30 % auf, wobei ein Sequenzmotiv von sechs Aminosäuren (TLEDTL) hoch konserviert ist. Des weiteren sind die Positionen der Cysteine hoch konserviert. Kristallstrukturuntersuchungen zeigten, dass die *Aplysia* ADPRC als Dimer aus zwei identischen Untereinheiten vorliegt (Prasad et al., 1996). Die Cokristallisation der *Aplysia* ADPRC mit Nicotinamid, einem Substrat der Basenaustauschreaktion, zeigte, dass sich das aktive Zentrum des Enzyms in einer Spalte befand und der Boden der Spalte durch das TLEDTL-Motiv gebildet wurde (Munshi et al., 1999). Wichtige Reste des aktiven Zentrums wurden durch Mutagenesestudien der *Aplysia* ADPRC bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei Glu179 wahrscheinlich um den katalytischen Rest handelt, da ein konservativer Austausch dieses Restes gegen Aspartat zu

einem Verlust der enzymatischen Aktivität führte. Es konnten weitere wichtige Reste identifiziert werden, darunter zwei Tryptophane und ein Glutamat. Für die Tryptophane wurde angenommen, dass sie an der richtigen Faltung des linearen NAD beteiligt sind und die beiden Enden des Substrats für die Reaktion zu cADPR in räumliche Nähe bringen (Lee, 1999; Munshi et al., 1999). Durch Mutagenesestudien von CD38 konnte gezeigt werden, dass Glu226 wahrscheinlich den katalytischen Rest darstellt, da Modifikationen dieser Aminosäure zu inaktivem CD38 führten (Munshi et al., 2000). Dieser Rest ist äquivalent zu Glu179 der *Aplysia* ADPRC (Munshi et al., 2000). Auch für CD38 konnte eine Kristallstrukturanalyse durchgeführt werden. Es wurde hierfür nur der extrazelluläre Anteil von CD38 eingesetzt. Diese lösliche Form von CD38 wies eine volle enzymatische Aktivität auf (Liu et al., 2005; Munshi et al., 2000). Ein Vergleich mit der Struktur der *Aplysia* ADPRC zeigte, dass sich die Sekundärstrukturen der beiden Enzyme recht ähnlich sind (Prasad et al., 1996). So konnte auch für CD38 beobachtet werden, dass das katalytische Zentrum in einer Spalte lokalisiert ist, deren Boden durch das konservierte TLEDTL-Motiv gebildet wird.

Bei Umsetzung von NAD durch ADPRC zu cADPR wird Nicotinamid abgespalten und eine N-glycosidische Bindung zwischen dem N1-Atom des Adeninrings und dem anomeren C1-Atom der sogenannten nördlichen Ribose gebildet. Die nördliche Ribose entspricht der Ribose, die in NAD ursprünglich mit dem Nicotinamid verbunden war (s. Abb. 1.2). Das Ausmaß der Cyclisierung von NAD unterscheidet sich aber stark zwischen der *Aplysia* ADPRC und CD38. Die *Aplysia* ADPRC setzt NAD nahezu vollständig zu cADPR um (Lee & Aarhus, 1991). Im Gegensatz dazu cyclisiert CD38 nur eine geringe Menge des Substrats, während der Hauptteil zu ADPR hydrolysiert (Howard et al., 1993). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass CD38 sein Produkt cADPR auch zu ADPR hydrolysieren kann (Howard et al., 1993). Bisher ist kein weiteres Enzym der Mammalia bekannt, das über eine cADPR-Hydrolaseaktivität verfügt. Diese Aktivität konnte für die *Aplysia* ADPRC nur in geringem Ausmaß und bei hoher Enzymkonzentration beobachtet werden (Cakir-Kiefer et al., 2000). Die ADPRC vereinen mehrere Enzymaktivitäten, so verfügen sie über eine Aktivität als ADP-Ribosyl-Cyclase, cADPR-Hydrolase und NADase (Abb. 1.5). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CD38 als auch die *Aplysia* ADPRC bei saurem pH-Wert eine Basenaustauschreaktion katalysieren, wobei NADP in Anwesenheit von Nicotinsäure zu NAADP umgesetzt wurde (Aarhus et al.,

1995). Bei saurem pH-Wert sind CD38 und die *Aplysia* ADPRC außerdem in der Lage die Hydrolyse von NAADP zu ADPR-2'-Phosphat und Nicotinsäure zu katalysieren (Graeff et al., 2006).

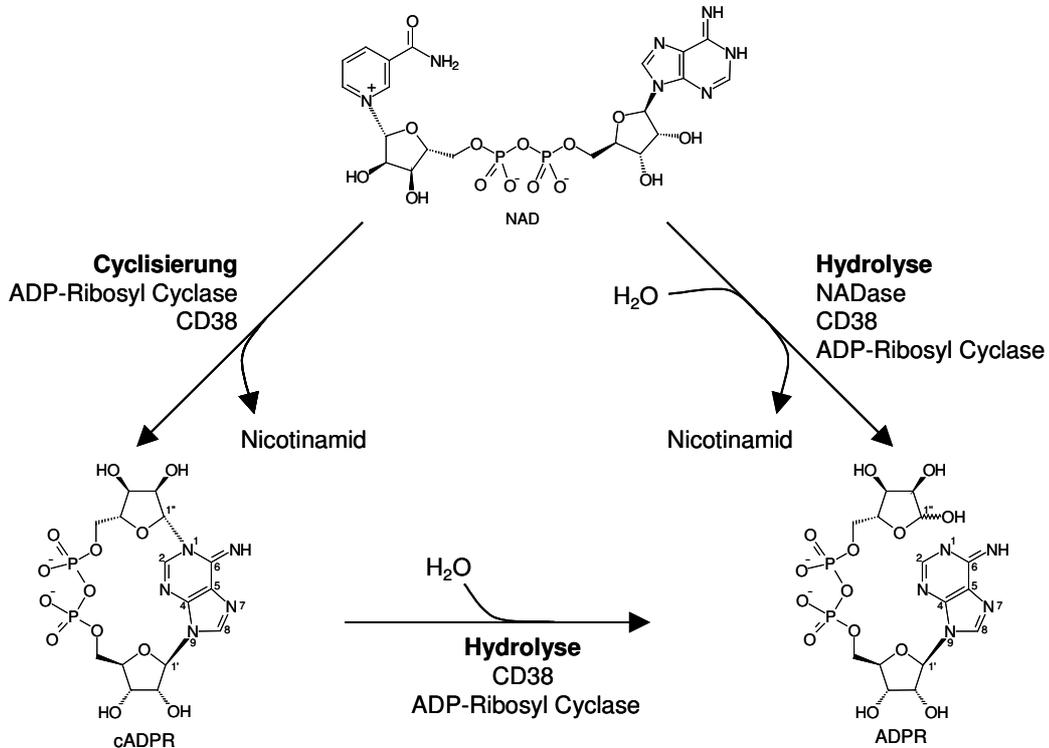


Abb. 1.5: Metabolischer Weg der Synthese und des Abbaus von cADPR.

Die Umsetzung von NAD erfolgt bei allen ADPRC nach dem gleichen Mechanismus (Abb. 1.6), wobei es zur Bildung eines reaktiven Intermediates (E*ADP-ribose Intermediat) kommt, das durch das Enzym stabilisiert wird (Cakir-Kiefer et al., 2000; Sauve et al., 1998). Dieses Intermediat wird durch die Spaltung der Bindung zwischen Nicotinamid und nördlicher Ribose gebildet und kann nachfolgend intermolekular mit Wasser zu ADPR hydrolysieren oder intramolekular mit dem N1-Atom des Adenins zu cADPR cyclisieren.

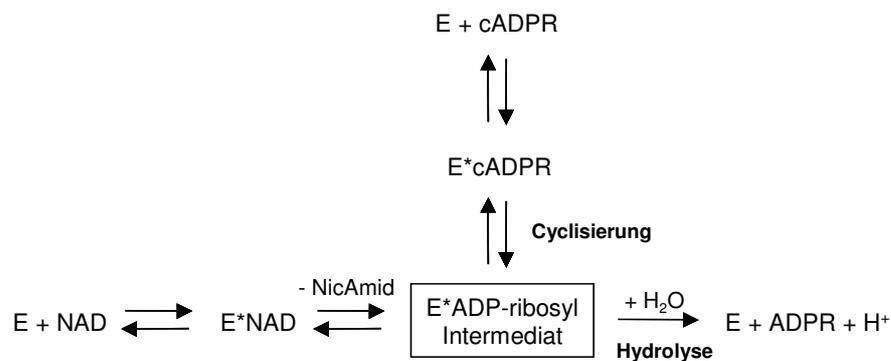


Abb. 1.6: Schema für die Umsetzung von NAD und cADPR durch ADPRC (vereinfacht nach Cakir-Kiefer et al., 2000).

Während die Hydrolyse des Intermediats irreversibel verläuft ist der Prozess, der zur Bildung von cADPR führt, reversibel so dass auch cADPR mit dem Enzym ein E*ADP-ribosyl Intermediat bilden kann. Das Intermediat wird wahrscheinlich durch den katalytischen Glutamatrest (CD38: Glu 179, *Aplysia* ADPRC: Glu 226) stabilisiert, wobei nicht eindeutig geklärt ist, ob es als Oxocarbeniumion vorliegt oder kovalent an das Enzym gebunden ist. Die Ursache der geringen Ausbeute von cADPR bei Umsetzung von NAD durch CD38 beruht wahrscheinlich nicht darauf, dass das gerade gebildete cADPR in einer weiteren Reaktion mit CD38 wieder hydrolysiert wird. Da das spezifische Verhältnis von (V/K_m) für NAD ist deutlich höher als für cADPR, so dass cADPR erst binden würde, wenn nur noch geringe Menge NAD im Reaktionsgemisch vorlägen (Cakir-Kiefer et al., 2001). Vermutet wird stattdessen, dass die unterschiedlichen Enzymaktivitäten durch die Zugänglichkeit des katalytischen Zentrums für Wasser bestimmt wurde. Im Falle der *Aplysia* ADPRC, scheint das Intermediat schwer zugänglich zu sein, so dass es hauptsächlich zum intramolekularen Ringschluß kommt, während das aktive Zentrum von CD38 gut für Wasser erreichbar ist und es daher überwiegend zu einer Reaktion von Wasser mit dem Intermediat kommt. Diese Hypothese konnte durch Untersuchungen von CD38 Mutanten untermauert werden. So führten Mutationen innerhalb des aktiven Zentrums von CD38 zu einer verminderten Erreichbarkeit der katalytischen Domäne und zu einem Anstieg der Ausbeute an cyclischem Produkt (Schuber & Lund, 2004).

2 Problemstellung

Cyclische ADP-Ribose (cADPR) ist ein calciummobilisierendes second messenger, der als Metabolit von NAD bei Untersuchungen an Seeigelleihomogenaten entdeckt wurde (Lee et al., 1989). Seit seiner Entdeckung konnte die calciumfreisetzende Eigenschaft von cADPR an vielen verschiedenen Organismen und Zelltypen der Mammalia, der Invertebraten, der Pflanzen und auch an Einzellern beobachtet werden (Übersicht in Guse, 2004a). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation verschiedener Zelltypen zu einem Anstieg der enzymatischen Aktivität von ADP-Ribosyl-Cyclasen (ADPRC) (Higashida et al., 1997; Kuemmerle & Makhlof, 1995) und zu einem Anstieg der cADPR Konzentration (Takasawa et al., 1993) kam. Eine Zunahme der ADPRC Aktivität und der cADPR Konzentration konnte auch nach Stimulation von T-Lymphozyten mit dem Anti-CD3-Antikörper OKT3 gezeigt werden, wobei zu beobachten war, dass die cADPR Konzentration langsam zunahm und über einen längeren Zeitraum erhöht blieb (Guse et al., 1999). Es wurde daher vermutet, dass cADPR für den langanhaltenden Calciumeinstrom in T-Lymphozyten verantwortlich ist und somit eine wichtige Rolle bei der Etablierung einer effektiven Immunantwort spielt (Guse et al., 1999).

Obwohl cADPR als calciummobilisierender second messenger etabliert ist, ist u.a. nicht geklärt, wie genau die Freisetzung von Calcium vermittelt wird, wie cADPR zur Modulation der Art des Calciumsignals in Koordination mit IP_3 und NAADP beiträgt und welche Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen cADPR und seinen zellulären Bindungspartnern bestehen. Um die Eigenschaften des cADPR vermittelten Calciumsignals eingehender untersuchen zu können, wurden verschiedene cADPR Analoga synthetisiert (Potter & Walseth, 2004). Wichtige Eigenschaften für cADPR Analoga zur Untersuchung des Calciumsignals sind: ein effizienter Syntheseweg, um ausreichend Substanz für umfassende Analysen zu erhalten, Membranpermeabilität, um Untersuchungen auf einfachem Weg an intakten Zellen durchführen zu können und Hydrolysestabilität, um bei Studien an Geweben mit hoher ADPRC-Aktivität oder bei Langzeitstudien keinen Abbau des Analogons zu erleiden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das cADPR Analogon 8-Br-N1-cIDPR näher untersucht werden, da bereits im Vorwege gezeigt werden konnte, dass es membranpermeant und chemisch stabil ist und calciummobilisierende Eigenschaften besitzt. 8-Br-N1-cIDPR sollte zunächst durch Umsetzung von 8-Br-NHD mit der

ADPRC von *Aplysia californica* gewonnen (Wagner et al., 2003), anschließend aufgereinigt und seine metabolische Stabilität sowie seine zellulären Effekte untersucht werden. Es sollte im Besonderen die Stabilität gegenüber der ADPRC CD38 untersucht werden, da sie das einzige bisher bekannte Enzym der Mammalia darstellt, das in der Lage ist cADPR zu ADPR abzubauen. Des Weiteren sollte der zelluläre Effekt von 8-Br-N1-cIDPR an Jurkat T-Lymphozyten untersucht werden, wobei einerseits der Einfluss auf die Proliferation analysiert und andererseits das durch 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal näher charakterisiert werden sollte. Bei Untersuchung des Calciumsignals sollte insbesondere überprüft werden, in wieweit 8-Br-N1-cIDPR zur Freisetzung und zum Einstrom von Calcium beiträgt und welche Kanäle an der Generierung des Calciumsignals beteiligt sind.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Medien und Puffer

Komplettmedium für die Jurkat T-Lymphozyten:

- RPMI 1640-Medium mit Glutamax I und 25 mM HEPES pH 7,4 (Invitrogen, Karlsruhe)
- 7,5 % neugeborenes Kälberserum (NCS), hitzeinaktiviert (Biochrom, Berlin)
- 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)

Messpuffer, pH 7,4 (eingestellt mit 7 M NaOH)

- 140 mM NaCl (Merck, Darmstadt)
- 5 mM KCl (Merck, Darmstadt)
- 1 mM MgSO₄ x 7H₂O (Merck, Darmstadt)
- 1 mM CaCl₂ x 2H₂O (Merck, Darmstadt)
- 20 mM HEPES (Biomol, Hamburg)
- 1 mM NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)
- 5 mM D-Glucose (Merck, Darmstadt)

Intrazellulärpuffer, pH 7,2 (eingestellt mit 7 M KOH)

- 20 mM HEPES (Biomol, Hamburg)
- 110 mM KCl (Merck, Darmstadt)
- 10 mM NaCl (Merck, Darmstadt)

HPLC-Puffer A, pH 6,0 (eingestellt mit 7 M KOH)

- 20 mM KH₂PO₄ (Fluka, Neu-Ulm)
- 5 mM TBAHP Tetrabutylammonium-Dihydrogenphosphat (Fluka, Neu-Ulm)

HPLC-Puffer B

- HPLC-Puffer A mit 50 % Methanol, Lichrosolv (Merck, Darmstadt)
(1 Teil HPLC-Puffer A + 1 Teil Methanol)

NADase-Puffer, pH 7,4

- 1 mM Tris/HCl (Sigma-Aldrich, München)
- 2,5 mM MgCl₂ (Merck, Darmstadt)

Cyclase-Puffer, pH 7,3

- 10 mM NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)

3.1.2 Chemikalien und Lösungen

Trypanblau-Lösung 0,4 % (Invitrogen, Karlsruhe)

Fura-2/AM, 1 mg/ml in DMSO (Calbiochem, Bad Soden)

Ionomycin, 150 µM in DMSO (Calbiochem, Bad Soden)

Tris/EGTA-Lösung, pH 7,4 (eingestellt mit 30%-iger HCl):

- 3 M Tris base (Sigma-Aldrich, München)
- 400 mM EGTA in A. bidest. (Sigma-Aldrich, München)

Siliconfett Baysilone (Bayer, Leverkusen)

Rinderserumalbumin (BSA) 5 mg/ml in A. bidest. (Sigma-Aldrich, München)

Poly-L-Lysin, MW 30-70 kDa 0,1 mg/ml in A. bidest. (Sigma-Aldrich, München)

CD38 (rekombinant, löslich) aus der Maus (Dr. F.E. Lund (Trudeau Institute))

NAD (Roche Diagnostics, Mannheim)

Nicotinamid (Sigma-Aldrich, München)

cADPR (Biolog, Bremen)

ADPR (Sigma-Aldrich, München)

8-Br-NHD (Biolog, Bremen)

8-Br-N1-cIDPR, N1-cIDPR (Prof. B.V.L. Potter, Dr. Ch. Moreau (University of Bath))

N1-cIDPRE, N1-cIDP-DE (Prof. Dr. Li-He Zhang (Peking University))

8-Br-cADPR (Sigma-Aldrich, München)

Ruthenium Rot (Calbiochem/Merck, Darmstadt)

SKF 96365 (Calbiochem/Merck, Darmstadt)

GdCl₃ (Sigma-Aldrich, München)

Chelex100 (Sigma-Aldrich, München)

Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Bioscience, Freiburg)

G10 Sephadex (Amersham Bioscience, Freiburg)

ADP-Ribosyl Cyclase aus *Aplysia californica* (Sigma-Aldrich, München)

NAD-Glycohydrolase (NADase) aus *Neurospora crassa* (Sigma-Aldrich, München)

Nukleotid-Pyrophosphatase von *Crotalus admanteus* (Sigma-Aldrich, München)

Trifluoressigsäure (Merk, Darmstadt)

Methanol, LiChrosolv für HPLC (Merk, Darmstadt)

DMSO (Sigma-Aldrich, München)

3.1.3 Geräte und Material

Sterile Werkbank (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)

CO₂-Inkubator (Heraeus, Hanau)

Variofuge 3.OR (Heraeus, Hanau)

Mikrozentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

Inversmikroskop CK 2 (Olympus, Hamburg)

Wasserbad Thermomix 4R Braun, Melsungen

Zellzähler CASY DT (Schärfe System, Reutlingen)

Zählkammer nach Neubauer (Helma, Müllheim)

Zellkulturmaterial aus Kunststoff (Greiner, Hamburg; Nunc, Wiesbaden; Sarstedt, Nümbrecht)

Rundbodenmikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden)

Cryofuge 8500i (Heraeus, Hanau)

Ultrafiltrationseinheiten

- Ultracel Centricon YM-10 (Porengröße 10 kDa) (Millipore, Bedford, USA)
- Ultracel Centriprep YM-10 (Porengröße 10 kDa) (Millipore, Bedford, USA)

Gefriertrocknungsgerät 2040 (Snijerds Scientific, Tillburg, NL)

Vakuum-Konzentrator (Bachofer, Reutlingen)

Säulenkörper (3 ml) mit Fritte für Ionenaustauschchromatographie (Supelco, Bellefort, USA)

Econo-Säulen für Gelfiltration 30 ml (Biorad, München)

UV-Detektor Uvicord SII und Pumpe P1 für Gelfiltration (Pharmacia LKB/Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

Leitfähigkeitsmesser LF 530 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim)

Dialyseschlauch Float-A-Lyzer, Porengröße 500 kDa, 10 ml (Spectrumlabs, Breda, NL)

C₁₈-HPLC-Säule Multohyp BDS C18, Partikelgröße 5 µm, 250 x 4,6 mm (Chromatographie Service, Langerwehe)

C₁₈-HPLC-Vorsäule Multohyp BDS C18, Partikelgröße 5 µm, 17 x 4,6 mm (Chromatographie Service, Langerwehe)

SercurityGuard-Kartuschen-Halter mit C18 (ODS) Filtereinsatz (Phenomenex, Aschaffenburg)

HPLC-System mit MT2-Software (Kontron Instruments, Neufahrn) bestehend aus:

- zwei HPLC-Pumpen 422
- Mischkammer 494
- Autosampler 360
- UV-Detektor 432

HPLC-System (1200 Serie) mit ChemStation-Software (Agilent Technologies, Böblingen) bestehend aus:

- Binäre Pumpe G1312A
- Autosampler (G1329A) mit Kühlung (G1330B)
- Säulenofen (G1316A)
- DAD-Detektor (G1315B)

Calcium-Imaging-System mit Openlab Software Version 4.0.2 (Improvision Systems, Heidelberg) bestehend aus:

- Fluoreszenzmikroskop DM IRE2 (Leica, Wetzlar)
- Monochromator- Polychrom IV (TILL Photonics, Gräflingen)
- CCD Kamera C4742-95-12ER (Hamamatsu, Japan)
- Orca ER Kamera-Kontroller (Hamamatsu, Japan)
- G4-workstation (Apple, Cupertino, USA)

Micromanipulator 5171 (Eppendorf AG, Hamburg)

Transjector 5246 oder Femtojet (Eppendorf AG, Hamburg)

Femtotips I und II (Eppendorf AG, Hamburg)

Microloader (Eppendorf AG, Hamburg)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur von Jurkat T-Lymphozyten

Jurkat T-Lymphozyten (Subklon JMP) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Luft kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:3 mit vorgewärmten Kompletmedium (RPMI 1640 mit Glutamax I, 25 mM HEPES, 7,5 % NCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Steptomycin) versetzt. Dazu wurde die Zahl der vitalen Zellen durch Trypanblaufärbung mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt und auf einen Wert von $0,3 \times 10^6$ /ml eingestellt, so dass die Zelldichte der Zellsuspension zwischen $0,3$ bis $1,2 \times 10^6$ /ml lag. Die Zelldichte wurde alternativ auch mit dem automatischen Zellzähler CASY DT bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:100 mit CASYton-Puffer (Schärfe, Reutlingen) verdünnt und die Zellzahl gemessen, wobei nur vitale Zellen mit einem Durchmesser ab 10,5 µm berücksichtigt wurden.

3.2.2 Synthese und Aufreinigung von 8-Br-N1-cIDPR

3.2.2.1 Synthese von 8-Br-N1-cIDPR

Die Synthese von 8-Br-N1-cIDPR erfolgte nach Wagner et al., 2003 durch Inkubation von 8-Br-NHD mit der ADP-Ribosyl Cyclase von *A. californica* (*Aplysia* ADPRC). Dazu wurden 100 ml 25 mM HEPES pH 7,4 mit 1 ml 100 mM 8-Br-NHD (100 µmol; Endkonzentration: 1 mM) und 40 µl 1 µg/µl *Aplysia* ADPRC (40 µg, Endkonzentration; 0,4 µg/ml) versetzt und für 15 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur unter rühren und im Dunklen inkubiert. Zur Überprüfung der Reaktion wurden für nachfolgende RP-HPLC Analysen Aliquots vor und nach der Inkubation entnommen, vom Enzym befreit und bis zur RP-HPLC Analyse bei -20 °C gelagert. Die Entfernung der Proteine erfolgte mittels Ultrafiltration. Die Abtrennung des Enzyms aus kleinen Probevolumina erfolgte mit Zentrifugationsfiltereinheiten vom Typ Centricon YM-10 mit einer Porengröße von 10 kDa, wobei die Zentrifugation für 30 min bei 3000 g und 4 °C durchgeführt wurde. Für die Entfernung des Enzyms aus großen Volumina wurden Ultrafiltrationseinheiten vom Typ Centriprep YM-10 mit einer Porengröße von 10 kDa verwendet. Die Zentrifugation wurde in mehreren Schritten für 1 bis 2 h bei 4000 g und 4 °C durchgeführt. Ein Reaktionsschema der Synthese von 8-Br-N1-cIDPR ist in Abb. 3.1 zu sehen.

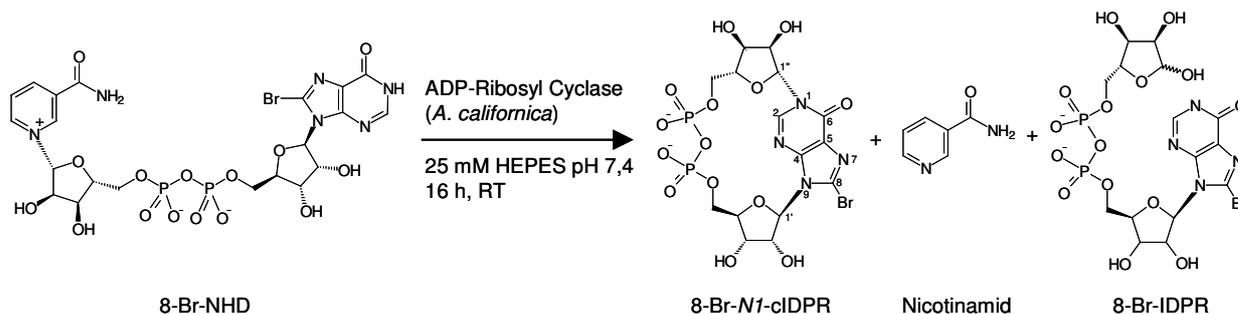


Abb. 3.1: Reaktionsschema der Synthese von 8-Br-N1-cIDPR. 8-Br-NHD wurde durch Inkubation mit *Aplysia* ADPRC zu 8-Br-N1-cIDPR umgesetzt. Als Nebenprodukte entstehen bei der Reaktion Nicotinamid und 8-Br-IDPR.

3.2.2.2 Abbau von 8-Br-IDPR durch Pyrophosphataseverdau

Das Nebenprodukt 8-Br-IDPR ließ sich durch Anionenaustauschchromatographie unter Anwendung eines TFA-(Trifluoressigsäure)-Gradienten nicht von 8-Br-N1-cIDPR trennen, so dass 8-Br-IDPR vor der Ionenaustauschchromatographie durch einen Verdau mit der Pyrophosphatase von *Crotalus adamanteus* zu 8-Br-IMP und Ribose-5'-Phosphat umgesetzt wurde. Dazu wurde der Reaktionsansatz aus 3.2.2.1 direkt mit 100 µl 0,1 U/µl Pyrophosphatase (10 U; Endkonzentration: 0,1 U/ml) und 0,8 ml 250 mM MgCl₂ (Endkonzentration: 1 mM) versetzt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen der Enzyme mittels Ultrafiltration (s. 3.2.2.1) wurde der Erfolg der Reaktion mittels RP-HPLC überprüft. Ein Reaktionsschema des Abbaus von 8-Br-IDPR ist in Abb. 3.2 gezeigt.

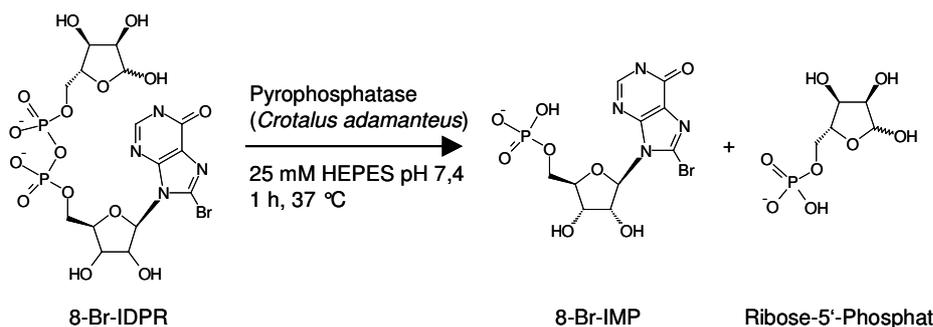


Abb. 3.2: Reaktionsschema des Abbaus von 8-Br-IDPR. 8-Br-IDPR wurde durch Inkubation mit der Pyrophosphatase von *Crotalus adamanteus* zu 8-Br-IMP und Ribose-5'-Phosphat umgesetzt

3.2.2.3 Aufreinigung von 8-Br-N1-cIDPR

Die Aufreinigung von 8-Br-N1-cIDPR sollte zunächst in Anlehnung an ein etabliertes Protokoll zur Aufreinigung von NAADP aus T-Lymphozyten erfolgen (Gasser et al., 2006a). Dazu wurde das Reaktionsgemisch auf eine Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose Fast Flow) aufgetragen, die Reaktionsprodukte mittels TFA-Gradienten

von der Säule eluiert und der Erfolg der Aufreinigung mittels HPLC kontrolliert. Die TFA sollte im Anschluss durch Gefriertrocknung entfernt werden. Dieser Schritt führte jedoch zur Verminderung der Ausbeute und zur Hydrolyse des Produkts. Da mit dieser etablierten Methode eine erfolgreiche Aufreinigung des Produkts nicht möglich war, wurde diese Methode modifiziert. So wurde statt eines TFA-Gradienten ein NaCl-Gradient zur Elution verwendet.

Zur Vorbereitung der Anionenaustauschchromatographie wurden 10 ml Q-Sepharose FF vier Mal mit 10 ml Wasser, vier Mal mit 10 ml 500 mM NaCl und fünf Mal mit 20 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde die äquilibrierte Q-Sepharose in einer 20 %igen Methanol-Wasser-Lösung suspendiert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde der Säulenkörper (3 ml) mit einer Fritte versehen, mit 3 ml Wasser und 1 ml Methanol gewaschen, mit 0,5 ml der äquilibrierten Q-Sepharose befüllt und mit 10 ml Wasser gespült. Das Reaktionsgemisch wurde zur Verringerung der Ionenstärke 1:5 mit Wasser verdünnt und in Aliquots mit einem Volumen von 3 ml auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule zwei Mal mit 5 ml Wasser gewaschen. Der Säulendurchlauf und die Waschfraktionen wurden für die nachfolgende RP-HPLC Analyse gesammelt. Die Elution erfolgte durch sukzessive Zugabe von je 1,5 ml NaCl-Lösungen steigenden Konzentrationen. Verwendet wurden Lösungen mit NaCl-Konzentrationen von 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 und 250 mM. Der Gehalt von 8-Br-N1-clDPR, 8-Br-IDPR und Nicotinamid wurde mittels RP-HPLC ermittelt und die Eluate vereinigt, die nur 8-Br-N1-clDPR enthielten.

Die Entsalzung der Proben erfolgte mittels Gelfiltration mit G10 Sephadex. Für eine gute Trennung von NaCl und 8-Br-N1-clDPR sollte das Probenvolumen 0,5 bis 5 % des Säulenvolumens betragen, daher wurde das Volumen der vereinigten Eluate durch Anlegen eines Vakuums reduziert und eine Säule mit einem Volumen von ungefähr 25 ml hergestellt. Dazu wurden 30 g des trockenen Säulenmaterials mit 100 ml Wasser versetzt und bei 90 °C für 1 h behandelt. Zur Entfernung feiner Teilchen, die später zu einem Verstopfen der Säule führen könnten, wurde das gequollene Säulenmaterial mit Wasser aufgeschlämmt, und nach Absetzen des Materials das überstehende Wasser abgesaugt. Dieser Vorgang wurde vier Mal durchgeführt. Vor dem Giessen der Gelfiltrationssäule wurde eine ungefähr 75 %ige Suspension hergestellt und, um eine spätere Bildung von Gasblasen in der Säule zu

verhindern, durch Anlegen eines Vakuums entgast. Der Säulenkörper (1,5 x 30 cm), wurde mit Wasser gefüllt und die Suspension des Säulenmaterials mit einer Pipette bei geöffnetem Auslass auf die Oberfläche des Wasser gegeben. Auf diese Weise sollte eine luftblasenfreie und gleichmäßige Sedimentation des Säulenmaterials erreicht werden. Das Säulenmaterial wurde mittels eines kontinuierlichen Durchflusses von Wasser über 16 h weiter verdichtet. Die fertige Säule wurde dann mit der Probe beladen. Dazu wurde das noch überstehende Wasser abgelassen und die Probe mit einem Volumen von 0,5 bis 2 ml vorsichtig auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Probe in die Säule eingelaufen war, wurde der Säulenkopf befestigt, die Gelfiltration mit Wasser als Laufmittel gestartet und zunächst Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml gesammelt. Während der Gelfiltration wurde die UV-Absorption des Eluats mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm verfolgt. Sobald ein Anstieg der UV-Absorption zu beobachten war, wurde das Volumen der aufgefangenen Fraktionen auf 1 ml reduziert. Nach Elution der UV-aktiven Substanz wurden noch weiter 6 bis 8 Fraktionen mit einem Volumen von 5 bis 6 ml gesammelt. Anschließend wurde der Gehalt von 8-Br-N1-clDPR und NaCl der einzelnen Fraktionen mittels RP-HPLC bzw. Messung der Leitfähigkeit bestimmt. Die Messung der Leitfähigkeit wurde bei Fraktionen mit einem Volumen von ≥ 5 ml direkt und bei Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml an Verdünnungen (1:100) durchgeführt. Die NaCl-Konzentration der Fraktionen wurde anhand eine Kalibriergerade ermittelt, die zuvor durch Messung der Leitfähigkeit von NaCl-Lösungen mit einer Konzentration von 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 mM erstellt wurde. Anschließend wurden die Fraktionen vereinigt, die den Hauptteil des 8-Br-N1-clDPR enthielten, aliquotiert und durch Anlegen eines Vakuums getrocknet. Die Aliquots wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde ein Aliquot in Wasser gelöst und die Stoffmenge mittels RP-HPLC bestimmt.

3.2.2.4 Kontrolle der Darstellung von 8-Br-N1-clDPR mittels RP-HPLC

Die Reversed Phase (RP)-HPLC Analytik wurde mit zwei verschiedenen Geräten durchgeführt, die sich u.a. durch ihre Detektoren sowie ihre Steuerungs- und Auswertungssoftware unterschieden. Das HPLC-System der Firma Kontron Instruments war an einen UV-Detektor (HPLC Detector 432) angeschlossen und die Steuerung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Datenerfassungssystems MT2. Das Gerät der Firma Agilent Technologies war mit einem DAD (Diodenarraydetektor,

1200 Serie) ausgestattet und die Steuerung und Auswertung wurde mit dem Programm ChemStation durchgeführt.

Die Darstellung 8-Br-N1-clDPR wurde mittels RP-HPLC überprüft. Dazu wurde eine C₁₈-Säule (Multohyp BDS C18, Partikelgröße 5 µm, 250 x 4,6 mm; Chromatographie Service, Langerwehe) verwendet, die durch eine Vorsäule aus gleichem Material (Chromatographie Service, Langerwehe) oder durch eine Schutzkartusche mit einer C18 (ODS) Filtereinheit (Phenomenex, Aschaffenburg) geschützt wurde. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min durch einen ansteigenden Methanol-Gradienten mit den HPLC-Puffern A (20 mM KH₂PO₄, 5 mM Tetrabutylammonium-Dihydrogenphosphat, pH 6) und B (Methanol mit 50 % HPLC-Puffer A). Der verwendete Gradient ist im Folgenden beschrieben (% HPLC-Puffer B): 0 min (13), 1,5 min (13), 3,5 min (15), 5,5 min (32), 6,5 min (32), 8,0 min (50), 16,0 min (50), 18,0 min (13), 27,0 min (13) (Schweitzer et al., 2001). Aufgetrennt wurden 1 bis 100 µl der verschiedenen Proben, die zuvor mit einem Gemisch aus 87 % HPLC-Puffer A und 13 % HPLC-Puffer B auf 100 µl aufgefüllt wurden. Von den so vorbereiteten Proben wurden mit Hilfe eines Autosamplers 100 µl in das HPLC-System injiziert. Die Detektion der Nukleotide erfolgte bei einer Wellenlänge von 250 nm. Die Quantifizierung der 8-Br-N1-clDPR-, Nicotinamid- und 8-Br-IDPR-Mengen erfolgte durch Integration der Peak-Fläche und Vergleich mit einem 8-Br-N1-clDPR-, Nicotinamid und 8-Br-IDPR-Standard bekannter Konzentration. Der Standard für 8-Br-N1-clDPR wurde mir freundlicherweise von Dr. Ch. Moreau (University of Bath) zur Verfügung gestellt. Der Standard für 8-Br-IDPR wurde durch vollständige Umsetzung einer 0,1 mM 8-Br-NHD Lösung mit 0,1 U/ml NADase von *N. crasse* in 1 mM Tris/HCl-Puffer, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,4 erzeugt, wobei angenommen wurde, dass bei vollständiger Umsetzung die Stoffmenge des synthetisierten 8-Br-IDPR der Stoffmenge des eingesetzten 8-Br-NHD entspricht. Die Standards wurden für gewöhnlich mit einer Stoffmenge von 1 bis 2 nmol eingesetzt.

3.2.2.5 Dialyse einer NaCl-Lösung

Um zu überprüfen, ob sich die Dialyse zur Entsalzung der 8-Br-N1-clDPR Präparation eignete, wurde eine Dialyse einer 100 mM NaCl-Lösung durchgeführt. Es wurde ein gebrauchsfertiger Dialyseschlauch mit einer Porengröße von 500 g/mol ($Mw_{(8-Br-N1-clDPR)} = 620$ g/mol) und einem Volumen von 10 ml verwendet. Zur Entfernung von azidhaltiger Lösung wurde der Schlauch zunächst zwei Mal mit

Wasser gespült, dann wurde er mit Wasser gefüllt und weitere 30 min bei Raumtemperatur unter Rühren in einem Volumen von 1 L Wasser gewaschen. Der Schlauch wurde erneut gespült und 10 ml einer 100 mM NaCl-Lösung eingefüllt. Diese Lösung wurde nun gegen 1-2 L Wasser unter Rühren bei Raumtemperatur für 10 Tage dialysiert. Das Wasser wurde alle 6 bis 24 h gewechselt und Aliquots entnommen. Die Aliquots wurden bis zum Ende der Dialyse bei -20 °C gelagert. Abschließend wurde die Leitfähigkeit der Aliquots bestimmt und anhand einer Kalibrierkurve die NaCl-Konzentration bestimmt.

3.2.3 Bestimmung der metabolischen Stabilität von cADPR und Derivaten mit Hilfe der RP-HPLC

Die hypoxanthin-basierten Nukleotide wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. B.V.L. Potter (University of Bath/ *N1*-cIDPR, 8-Br-*N1*-cIDPR (Wagner et al., 2005)) und Prof. Dr. L-h Zhang (Peking University/ *N1*-cIDPRE (Gu et al., 2004), *N1*-cIDP-DE (Guse et al., 2005)) zur Verfügung gestellt. Während die zur Verfügung gestellten Stoffmengen von *N1*-cIDPR und 8-Br-*N1*-cIDPR bekannt waren, mussten die genauen Stoffmengen von *N1*-cIDPRE und *N1*-cIDP-DE noch ermittelt werden. Dazu wurden *N1*-cIDPRE und *N1*-cIDP-DE mittels RP-HPLC (3.2.3.2) analysiert und mit *N1*-cIDPR als Standard quantifiziert.

3.2.3.1 Enzymassay zur Bestimmung der metabolischen Stabilität

Zur Bestimmung der metabolischen Stabilität von NAD, cADPR, *N1*-cIDPR, 8-Br-*N1*-cIDPR, *N1*-cIDPRE und *N1*-cIDP-DE wurden diese Nukleotide mit vier verschiedenen NAD-Glykohydrolasen inkubiert. Die Nukleotide (50 µM) wurden dazu mit nativem CD38 auf der Oberfläche von Jurkat T-Lymphozyten (1×10^7 , 2×10^7 oder 4×10^7 Zellen/ml) in Messpuffer, mit rekombinater löslicher CD38 der Maus (0,75 µg/ml) in Messpuffer, mit NADase von *N. crassa* (180 µg/ml) in NADase-Puffer (1 mM Tris/HCl, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,4) oder mit ADP-Ribosyl Cyclase von *A. californica* (0,1 µg/ml) in Cyclase-Puffer (10 mM NaH₂PO₄, pH 7,3) bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken inkubiert. Nach 2, 4, 6 oder 18 h wurden Aliquots von 150 – 200 µl entnommen. Um den Hintergrund der Enzyme und der Zellen für die nachfolgende RP-HPLC Analytik zu erfassen wurden die Zellen auch in Abwesenheit von Nukleotiden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Aliquots der Reaktionsansätze, die lösliche Enzyme enthielten, in ein Eis-Salz-Bad gestellt wurden. Aliquots der

Reaktionsansätze, die Jurkat T-Lymphozyten enthielten, wurden dazu erst in ein Eisbad gestellt und die Zellen dann schnell durch Zentrifugation für 2 min bei 3000 g und 4 °C entfernt. Die Enzyme wurden vor der RP-HPLC Analyse mittels Ultrafiltration mit Zentrifugationsfiltereinheiten vom Typ Centricon YM-10 mit einer Porengröße von 10 kDa entfernt, wobei die Zentrifugation für 30 min bei 3000 g und 4 °C durchgeführt wurde. Die Proben wurden entweder bei –20 °C gelagert oder sofort mittels RP-HPLC analysiert, wobei jede Probe als Duplikat vermessen wurde.

3.2.3.2 RP-HPLC Analyse zur Bestimmung der metabolischen Stabilität

Die RP-HPLC Analytik zur Untersuchung der metabolischen Stabilität von cADPR und Derivaten wurde mit dem HPLC-System der Firma Kontron Instruments durchgeführt und erfolgte wie unter Punkt 3.2.2.4 beschrieben. Die Auftrennung der Proben erfolgte als Doppelbestimmung, wobei je 34 µl der Probe mit 136 µl eines Gemischs aus 87 % HPLC-Puffer A und 13 % HPLC-Puffer B gemischt wurde. 100 µl der so vorbereiteten Proben wurden mit Hilfe eines Autosamplers in das HPLC-System injiziert. Die Detektion der Nukleotide wurde aufgrund der unterschiedlichen Absorptionmaxima bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt. So erfolgte die Detektion von NAD, cADPR, ADPR und Nicotinamid bei einer Wellenlänge von 270 nm (HPLC Programm: 8BrNHD50), während die hypoxanthin-basierten Nukleotide (N1-cIDPR, 8-Br-N1-cIDPR, N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE) bei einer Wellenlänge von 250 nm (HPLC Programm: cIDPR50) detektiert wurden. Die Quantifizierung der Nukleotide erfolgte durch Integration der Peak-Fläche und Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration, wobei diese üblicherweise mit einer Stoffmenge von 1 nmol eingesetzt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Datenerfassungssystems MT2 (Kontron Instruments).

3.2.4 Proliferationsassay von Jurkat T-Lymphozyten

Der Proliferationsassay wurden in Anlehnung an ein Protokoll durchgeführt, mit dem der Einfluss von 8-Br-NHD auf die Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten untersucht wurde (Dissertation von K. Schweitzer, 2002). Der Assay wurde in Rundboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Die Jurkat T-Lymphozyten wurden zunächst in serumfreies Medium überführt. Dazu wurde ein Aliquot der Jurkat T-Lymphozyten Kultur pelletiert (550 g, 5 min, RT) und in serumfreien Kompletmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde dabei auf einen Wert von ungefähr $0,113 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Es wurden in die Vertiefung der Mikrotiterplatte je 88,5 µl dieser

Zellsuspension (1×10^4 Zellen) vorgelegt und mit 4,5 μl einer Nukleotidlösung von cADPR, *N1*-cIDPR, 8-Br-*N1*-cIDPR *N1*-cIDPRE, *N1*-cIDP-DE oder Wasser versetzt und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 in wassergesättigter Luft inkubiert. Die verwendeten Nukleotidlösungen wiesen eine ansteigende Konzentration auf, die im Folgenden angegeben sind (Endkonzentrationen): 25 mM (1 mM), 2,5 mM (100 μM), 0,25 mM (10 μM) und 0,025 mM (1 μM). Anschließend wurde jeder Ansatz mit 7,5 μl NCS (Endkonzentration: 7,5 %) versetzt und die Inkubation fortgesetzt. Nach 48, 72 und 96 h wurde die Zellzahl mit Hilfe des automatischen Zellzählers CASY DT (Schärfe System, Reutlingen) bestimmt. Eine Dosis-Wirkungskurve für die Inhibition der Proliferation durch die unterschiedlichen Nukleotide wurde anhand der Zellzahl nach einer Inkubationsdauer von 72 h berechnet. Von jeder Versuchsbedingung wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und für jeden Zeitpunkt eine Mikrotiterplatte vorbereitet.

Der Proliferationassay wurde an weiteren Zelllinien nach dem oben beschriebenen Protokoll mit 25 μM *N1*-cIDPR durchgeführt. Es wurden die folgenden humanen Zelllinien untersucht: HPB.ALL (periphere T-Zell Leukämie), Raji (Burkitt-Lymphom), REH (B-Vorläuferzellen Leukämie), HL60 (akute myeloische Leukämie), K562 (chronische myeloische Leukämie), BV173 (T/B-Vorläuferzellen Leukämie).

3.2.5 Messung von Calciumsignalen mit Hilfe des Calcium-Imaging-Systems

3.2.5.1 Beladung von Jurkat T-Lymphozyten mit Fura-2/AM

Die Beladung der T-Zellen erfolgte nach einem etablierten Protokoll (Guse et al., 1993). 1×10^7 Jurkat T-Lymphozyten wurden bei Raumtemperatur mit 1600 rpm (550g) für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml vorgewärmtem Komplettmedium resuspendiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurden mit 4 μl des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2/AM (1 mg/ml in DMSO, Endkonzentration: 4 $\mu\text{g/ml}$) versetzt, durch Umschwenken mit der Zellsuspension gemischt und für 15 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch Zugabe von 4 ml vorgewärmten Komplettmedium verdünnt und die Inkubation für weitere 15 min bei 37°C lichtgeschützt fortgesetzt. Zur Entfernung des überschüssigen Fura-2/AM wurden die Zellen zwei Mal mit Messpuffer gewaschen. Dazu wurden die Zellen bei 1600 rpm und Raumtemperatur für 4 min abzentrifugiert und in 5 ml Messpuffer resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur Messung lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Beladung der Zellen wurde lichtgeschützt durchgeführt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden. Fura-2/AM ist ein membranpermeanter Acetoxymethylester, der während der Inkubation durch die Membran in die Zelle diffundiert. Dort wird die Acetoxymethylestergruppe durch unspezifischen Esterasen unter Freisetzung von Fura-2 freier Säure gespalten. Fura-2 freie Säure weist im Gegensatz zu Fura-2/AM nun negative Ladungen auf, die eine Diffusion durch die Membran verhindern und es zu einer Anreicherung der Säure im Cytosol der Zellen kommt. Fura-2 freie Säure kann mit Hilfe der Carboxylgruppen Calciumionen komplexieren, wobei die Bindung von Calciumionen zu einer Fluoreszenzänderung führt, die für die Bestimmung des $[Ca^{2+}]_i$ genutzt wird (Grynkiewicz et al., 1985).

3.2.5.2 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Calcium-Imaging

Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ der Jurkat T-Lymphozyten wurde auf Deckgläschen durchgeführt. Die Deckgläschen wurden dafür erst mit 5 μ l einer BSA-Lösung mit 5 mg/ml und dann mit 5 μ l 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin beschichtet. Die Beschichtung mit BSA wurde durchgeführt um eine Voraktivierung der Zellen durch die negativen Ladungen der Glasoberfläche zu vermeiden, während die Beschichtung mit Poly-L-Lysin zu einer verbesserten Anheftung der Zellen führte. Anschließend wurden die Deckgläschen mit einer Messkammer versehen. Dazu wurde ein O-Ring mit einem Durchmesser von ungefähr 10 mm mit Siliconfett auf dem Deckgläschen befestigt und die Messkammer mit weiterem Siliconfett abgedichtet (Guse et al., 1997b). In die Messkammer wurden 60 μ l Messpuffer und 40 μ l Zellsuspension gegeben. Die befüllte Messkammer wurde für 5 bis 10 Minuten lichtgeschützt aufbewahrt, so dass sich die Zellen während dieser Zeit auf dem beschichteten Deckgläschen absetzen und anheften konnten. Das so vorbereitete Deckgläschen wurde auf den Objektisch des Mikroskops des Calcium-Imaging-Systems gelegt. Die Versuche wurden für gewöhnlich mit dem 40 x Objektiv durchgeführt. Bei Mikroinjektionsversuchen wurde das 100 x Objektiv verwendet. Das Calcium-Imaging-System wurde mit der Openlab Software Version 4.0.2 gesteuert. Für die Messungen wurde der Automator „Ratio 340_380 bin2 NoN“, der von Dr. S. Kunert entworfen wurde, verwendet. Die Parameter des Automators wurden folgendermaßen gewählt: Threshold: 232/232, Ratiobereich: 0,4-2, Verzögerung (Delay): 2 oder 3 s, Belichtungszeit bei 340 nm: 12 bis 27 ms und bei 380 nm: 4 bis 9 ms. Die Belichtungszeiten wurden in Abhängigkeit

von der Fluoreszenzintensität gewählt, wobei immer ein Verhältnis der Belichtungszeiten (340:380) von 3:1 verwendet wurde.

Die Stimulation der Zellen folgte entweder durch Mikroinjektion von 8-Br-N1-cIDPR oder durch extrazelluläre Applikation von 8-Br-N1-cIDPR, wobei die extrazelluläre Zugabe in Gegenwart von Calcium oder in Abwesenheit von Calcium nach dem „Calcium free/ Calcium readdition“-Protokoll erfolgte.

Die Mikroinjektionen wurden mit einer Mikroinjektionseinheit bestehend aus einem Mikromanipulator (Eppendorf AG, Hamburg) und Transjektor oder Femtojet (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt. Es wurde mit einem Kompensationsdruck von 25 – 40 hPa, einem Injektionsdruck 60 – 80 hPa, einer Injektionszeit von 0,5 s und einer Injektionsgeschwindigkeit von 700 $\mu\text{m/s}$ gearbeitet. Nach Auswahl einer geeigneten Zelle wurde die mit der Injektionslösung gefüllte Mikroinjektionspipette (Femtotip I oder II, Eppendorf, Hamburg) in die Nähe der zu injizierenden Zelle gebracht, auf die Injektionsebene eingestellt und das z-Limit für die Injektion festgelegt. Dann wurde die Pipette direkt oberhalb der Zelle positioniert, die Messung durch Aktivierung des Automators gestartet und bei Bild 20 (ca. 1,5 min) mikroinjiziert. Die Entwicklung des Calciumsignals wurde für 15 bis 20 min verfolgt. Injiziert wurde Intrazellulär-Puffer und Lösungen von cADPR (100 μM), 8-Br-N1-cIDPR (0,1 mM, 1 mM, 10 mM, 100 mM), 8-Br-N1-cIDPR/Ruthenium Rot (1 mM/ 10 μM) in Intrazellulär-Puffer. Alle Lösungen wurden vorher für 5 min mit Chelex 100 behandelt. Die angegebenen Konzentrationen der Injektionslösungen sind Pipettenkonzentrationen, injiziert wurden aber nur 1 - 1,5 % des Zellvolumens, da die injizierten Substanzen durch die Mikroinjektion in die Zelle verdünnt wurden. Die wirksame Konzentration in den Zellen war daher 50- bis 100-fach geringer als die angegebene Pipettenkonzentration (Guse et al., 1997b).

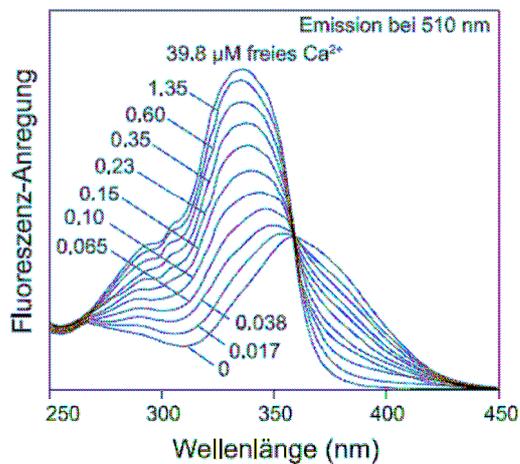
Bei Stimulation der Zellen durch extrazelluläre Applikation von 8-Br-N1-cIDPR in Anwesenheit von Calcium wurde nach Auswahl eines geeigneten Zellfelds mit 15 bis 25 Zellen die Messung durch Aktivierung des Automator gestartet. Nach der Aufnahme von 50 Bildern (ca. 200 s) wurden erst 6 μl Messpuffer und anschließend nach Aufnahme von insgesamt 80 Bildern (ca. 360 s) 10 μl 10 mM 8-Br-N1-cIDPR in den Messpuffer gegeben und das Calciumsignal für weiter 10 min aufgenommen.

Bei Versuchen, die mittels „Calcium free/ Calcium readdition“-Protokoll durchgeführt wurden, wurden 200 bis 400 μl der beladenen Zellen (3.2.5.1) direkt vor dem Versuch ein Mal mit nominal calciumfreien Messpuffer gewaschen, das Zellpellet in

67,5 μl calciumfreien Messpuffer aufgenommen und diese Zellsuspension in eine der oben beschriebenen Messkammern gegeben. Bei Versuchen, die in Anwesenheit von Inhibitoren durchgeführt wurden, wurden die beladenen Zellen zunächst in calciumhaltigen Messpuffer mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert (5 min 25 μM GdCl_3 , 10 min SKF96365 30 μM , 30 min 8-Br-cADPR 500 μM) und dann wie oben beschrieben in nominal calciumfreien Messpuffer überführt, wobei hier calciumfreier Messpuffer eingesetzt wurde, der mit dem jeweiligen Inhibitor ergänzt war. Nach Absetzen der Zellen für 5 min im Dunkeln wurde die Messung durch Aktivierung des Automators gestartet und bei Bild 20 bis 24 (80 s) entweder 7,5 μl 10 mM 8-Br-M1-cIDPR (Endkonzentration: 1 mM) oder zur Kontrolle 7,5 μl des calciumfreien Messpuffers zugegeben. Bei Bild 80 (350 s) wurden dann 7,5 μl 10 mM CaCl_2 (Endkonzentration: 1 mM) appliziert und das Calciumsignal für weitere 8 min aufgenommen.

3.2.5.3 Prinzip der Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Fura-2

A



B

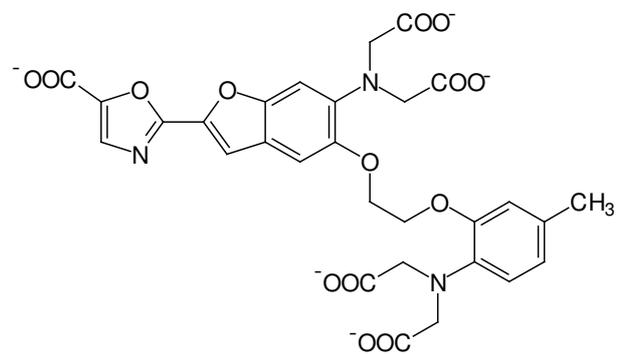


Abb. 3.3: Fluoreszenzspektrum und Strukturformel von Fura-2. (A) Fluoreszenzspektrum von Fura-2. Gezeigt ist die Fluoreszenz bei 510 nm in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslichts bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Bei der Anregungswellenlänge von 360 nm ist die Fluoreszenz von der Calciumkonzentration unabhängig (isobestrischer Punkt) (B) Strukturformel von Fura-2. Fura-2 kann aufgrund Carboxylgruppen, ähnlich wie EGTA, Calcium mit hoher Affinität komplexieren (Grynkiewicz et al., 1985).

Fura-2 ist fluoreszenzaktiv, d.h. bei Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge nimmt das Molekül Energie auf und gibt diese in Form von Licht kürzerer Wellenlänge wieder ab. Das Emissionsmaximum von Fura-2 liegt bei 510 nm. Die Fluoreszenzeigenschaften von Fura-2 sind abhängig von der Calciumkonzentration

(s. Abb. 3.3). So nimmt die Fluoreszenzintensität von Fura-2 nach der Bindung von Calciumionen bei Anregung mit 340 nm zu, während sie bei Anregung mit 380 nm abnimmt, wobei sich die Intensität bei den verschiedenen Wellenlängen nicht im gleichen Ausmaß verändert. Für eine quantitative Auswertung kann der Quotient der beiden gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Ratio 340/380) gebildet werden und dieser nach entsprechender Kalibrierung zur Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ verwendet werden.

3.2.5.4 Funktionsweise des verwendeten Calcium-Imaging-Systems

Die ratiometrische Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ wurden an einem digitalen Imaging System (Improvision Systems, Heidelberg) durchgeführt. Die Steuerung des Systems und die Erfassung der Messdaten erfolgte mit Hilfe eines Rechners. Eine Xenon-Bogenlampe erzeugte polychromatisches Anregungslicht, das mit Hilfe eines Monochromators (Polychrom IV, Till Photonics, Gräflingen) auf Licht nur einer Wellenlänge gebracht wurde. Dieses monochromatisches Licht wurde mittels Lichtleiteroptik an das Mikroskop weiter geleitet und so die Fluoreszenz angeregt. Das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht wird über einen dichroischen Spiegel und durch einen Emissionsfilter auf eine CCD (charge-coupled device)-Kamera (C4742-95-12ER, Hamamatsu) gelenkt. Es wurde mit einer Grauwertabstufung von 8 bit gearbeitet, so dass $2^8=256$ Graustufen unterschieden wurden. Die CCD-Kamera wies eine maximale räumliche Auflösung von 1280 x 1024 Pixel auf. Die Auflösung konnte über die Einstellung des Binnings verändert werden. In dieser Arbeit wurde mit einem Binning von 2 gearbeitet, d.h. das in x- und y-Richtung des Kamerachips 2 x 2 Pixel (4 Pixel) zu einem Pixel zusammengefasst wurden. Daraus ergab sich eine Auflösung von 640 x 512 Pixel. Die von der Kamera erfassten Bilddaten wurden auf den Rechner übertragen und auf dem Monitor dargestellt, so dass die Entwicklung des Calciumsignals während der Messung verfolgt werden konnte.

Die Steuerung des Calcium-Imaging-Systems erfolgte unter Verwendung der Openlab-Software. Mit Hilfe dieser Software ließen sich sogenannte Automatoren erzeugen. Diese Automatoren stellen kleine Programme dar, die zur automatischen Steuerung der Einzelkomponenten und für die Datenauswertung genutzt werden können. Der in dieser Arbeit verwendete Messautomator „Ratio 340_380 bin2 NoN“ bestand aus nur einer Schleife (loop), die mehrfach (150 bis 200 Mal) durchlaufen wurde. Diese Schleife setzte sich aus mehreren hintereinander folgenden Befehlen zusammen. So wurde zunächst eine Fluoreszenzbild bei 340 nm mit einer

vorgegeben Expositionszeit von 12 bis 27 ms und dann ein Fluoreszenzbild bei 380 nm mit einer Expositionszeit von 4 bis 9 ms aufgenommen. Die Fluoreszenzbilder wurden als Graustufenbilder dargestellt, wobei jeder Graustufe ein Wert von 0-255 entsprach. Aus diesen Fluoreszenzbildern wurde dann Pixel für Pixel ein Ratiobild erzeugt, das in Falschfarben dargestellt wurde, wobei kalte Farben für eine niedrige und warme Farben für eine hohe Calciumkonzentration standen. Für die Bildung der Ratiobilder mussten einige Parameter eingestellt werden. So musste der Ratiobereich mit minimalem und maximalem Ratio sowie der Threshold angegeben werden. Bei Arbeiten dem 40 x Objektiv wurde als minimales Ratio 0,5 ($[Ca^{2+}]_i = 0$ nM) gewählt, das in der Falschfarbendarstellung dunkelblau erschien, während Werte die kleiner als 0,5 waren schwarz dargestellt wurden. Das maximale Ratio betrug 2,0 ($[Ca^{2+}]_i = 900$ nM) und wurde rot dargestellt, während Werte größer als 2,0 weiß abgebildet wurden. Für Untersuchungen mit dem 100 x Objektiv wurde mit einem minimalen Ratio von 0,7 ($[Ca^{2+}]_i = 0$ nM) und einem maximalen Ratio von 2,4 ($[Ca^{2+}]_i = 950$ nM) gearbeitet. Der Threshold gibt einen Schwellenwert für die Graustufenverteilung an und wurde hier für beide Fluoreszenzbilder auf einen Wert von 232 eingestellt, d.h. dass alle Pixel mit einem Intensitätswert von kleiner 232 auf schwarz gesetzt wurden und so die Hintergrundfluoreszenz der Umgebung, sowie das Streulicht der fluoreszierenden Zellen vermindert wurden. Am Ende der Schleife wurde die Messung um 2 oder 3 s verzögert und dann erneut durchlaufen. Die Messung wurde beendet, wenn die eingestellte Anzahl erreicht wurde.

3.2.5.5 Datenauswertung und Kalibrierung

Die Auswertung der Daten, die mit den 40 x und 100 x Objektiven aufgenommen wurden, erfolgte auf unterschiedliche Weise und wurde mit der Openlab-Software Version 3.5.2 oder 4.0.4 und unter zur Hilfenahme verschiedener Automatoren durchgeführt.

Die Auswertung der Daten, die mit dem 40 x Objektiv aufgenommen wurden, erfolgte mit dem Automator „make A-B ratio and fit L_R Fura“, der der Anpassung des Thresholds an die Messdauer sowie der medianen Filterung diene. Im Verlauf der Messung kam es zum Ausbleichen des Farbstoffs Fura-2, wobei die Anpassung des Thresholds diesen Effekt kompensieren sollte. Dazu wurde eine Funktion verwendet, die den Threshold der Fluoreszenzbilder über die Dauer der Messung anpasst und abhängig war von dem Threshold zu Beginn und zum Ende der Messung sowie von

der Anzahl der durchlaufenen Schleifen. Des Weiteren wurden zur Rauschverminderung die so angepassten Bilder noch median gefiltert. Dabei wurde der Mittelwert der Intensitäten von jeweils 3 x 3 Pixel und der Ratio der veränderten Fluoreszenzbilder gebildet. Zur quantitativen Auswertung der Messungen wurden sogenannte „regions of interest“ (ROIs) um die Zellen gelegt, die als Messfenster dienten, der Ratio der ROIs ausgelesen und anhand einer Kalibrierkurve aus den Ratiowerten die entsprechende $[Ca^{2+}]_i$ berechnet.

Die mit dem 100 x Objektiv aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden mit der Openlab Software Version 4.0.4 ausgewertet. Zunächst wurden die Daten mit dem „no neighbor“ Algorithmus dekonvolviert, d.h. es wurde anhand einer mathematischen Funktion das statistisch auftretende Streulicht eliminiert und so ein quasi konfokales Bild erzeugt. Dazu wurde der Automator „decon loop Fura“ verwendet. Für die Dekonvolution mussten zuvor einige Parameter definiert werden. So wurde ein Removal von 0,575 gewählt, d.h. das 57,5 % des Streulichts beseitigt wurde. Des Weiteren wurde noch ein Gain (Verstärkung) von 8,5 eingestellt, so dass die Fluoreszenzintensität der Rohdaten um den Faktor 8,5 verstärkt wurde, und die Glättung aktiviert. Nach der Dekonvolution der Rohdaten wurde mit dem Automator „A_B ratio dci t_fit slow“ wie oben beschrieben der Threshold angepasst, die Daten median gefiltert, der Ratio gebildet und daraus die $[Ca^{2+}]_i$ berechnet, wobei hier eine andere Kalibrierkurve verwendet wurde.

Zur Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ aus den Ratiowerten wurde die folgende Formel verwendet (Poenie & Tsien, 1986):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * S_{f2} / S_{b2} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Gleichung 1: Allgemeine Kalibriergleichung für die Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ für Messungen mit Fura-2. Mit K_d – Dissoziationskonstante des Fura-2/ Ca^{2+} Komplexes; R – gemessener Ratiowert; R_{min} – minimaler Ratiowert; R_{max} – maximaler Ratiowert; S_{f2} – Fluoreszenzintensität von calciumfreiem Fura-2 bei 380 nm; S_{b2} – Fluoreszenzintensität von calciumgebundenem Fura-2 bei 380 nm.

Für die Kalibrierung wurden die extremen Ratiowerte R_{max} und R_{min} sowie die minimalen und maximalen Intensitätswerte S_{f2} und S_{b2} bei 380 nm bestimmt. Dazu wurden beladene Jurkat T-Lymphozyten mit dem Calciumionophor Ionomycin (Endkonzentration 2 μ M) versetzt, so dass es zur Bildung von calciumselektiven Poren kam und Calcium aus dem extrazellulären Raum und aus den intrazellulären

Speichern in das Cytosol einströmte. Auf diese Weise wurde die maximal mögliche Calciumkonzentration in den Zellen erreicht und das maximale Ratio gemessen. Für die Messung des minimalen Ratios wurden beladenen Jurkat T-Lymphozyten zunächst mit einer Tris/EGTA-Lösung versetzt (Endkonzentration 8 mM/ 60 mM) und für 5 min inkubiert, so dass das gesamte extrazelluläre Calcium komplexiert wurde. Nachfolgend wurde, um aus den Zellen das Calcium freizusetzen, Ionomycin zu den Zellen gegeben und das Ratio gemessen. Es wurden die folgenden Kalibriergleichungen erhalten:

$$40 \times \text{Objektiv:} \quad [\text{Ca}^{2+}]_i = 224 \text{ nM} * (\text{R}-0,534) / (3,69-\text{R}) * 114,4 / 25,09$$

$$100 \times \text{Objektiv:} \quad [\text{Ca}^{2+}]_i = 224 \text{ nM} * (\text{R}-0,719) / (4,19-\text{R}) * 113,5 / 25,05$$

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in drei Abschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt beschreibt die Synthese sowie die Entwicklung einer Aufreinigungsmethode für 8-Br-N1-cIDPR. Der zweite Teil stellt die Stabilität von cADPR und mehreren Hypoxanthin-Analoga gegenüber CD38 als auch ihre zellulären Effekt auf T-Lymphozyten dar. Der letzte Abschnitt zeigt charakteristische Eigenschaften des durch 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignals.

4.1 Synthese und Aufreinigung von 8-Br-N1-cIDPR

Wie schon in der Einleitung erwähnt stellt cADPR in vielen Zelltypen und Organismen einen endogenen Ca^{2+} -mobilisierenden second Messenger dar. Um das cADPR vermittelte Ca^{2+} -Signal besser untersuchen zu können, wurden bereits einige cADPR Analoga entwickelt und ihre biologische Aktivität untersucht. Wichtig für die Entwicklung solcher Analoga ist ihre Stabilität gegenüber enzymatischer und chemischer Hydrolyse sowie die Membran-Permeabilität. Die Synthese solcher Analoga ist über zwei Wege möglich, einerseits über eine vielstufige chemische Totalsynthese (Shuto et al., 2001) oder durch einen chemo-enzymatischen Ansatz (Walseth & Lee, 1993). Mit Hilfe des chemo-enzymatischen Weges kann, wie von Wagner et al., 2003 beschrieben, unter Verwendung der *Aplysia* ADPRC und 8-Br-NHD das cADPR Analogon 8-Br-N1-cIDPR in einem Schritt synthetisiert werden.

4.1.1 Synthese von 8-Br-N1-cIDPR

8-Br-N1-cIDPR wurde durch Inkubation von 8-Br-NHD mit der ADPRC aus *A. californica* synthetisiert. Nach einer Inkubationsdauer von 15 h wurde das Reaktionsgemisch mittels Ultrazentrifugation von dem Enzym befreit und die Umsetzung mit Hilfe der RP-HPLC kontrolliert. Während zu Beginn der Reaktion (0 h) nur ein Peak von 8-Br-NHD bei 10,6 min zu beobachten war, (Abb. 4.1, C) konnte nach 15 h eine vollständige Umsetzung des Substrates und die Bildung von 8-Br-N1-cIDPR mit einer Retentionszeit $t_{\text{R}} = 17,5$ min sowie von Nicotinamid ($t_{\text{R}} = 6,6$ min) und in Spuren von 8-Br-IDPR ($t_{\text{R}} = 15,9$ min) beobachtet werden (Abb. 4.1, D). Der Standard für 8-Br-N1-cIDPR wurde mir freundlicherweise von Dr. Ch. Moreau (University of Bath) zur Verfügung gestellt. Als Standard für das lineare 8-Br-IDPR

wurde ein Reaktionsgemisch verwendet, das durch Umsetzung von 8-Br-NHD mit NADase (*N. crassa*) erhalten wurde (Standard 2).

Für nachfolgende zellbiologische Versuche musste das hier synthetisierte 8-Br-N1-cIDPR von weiteren im Reaktionsgemisch befindlichen Substanzen, wie z.B. HEPES, Nicotinamid und 8-Br-IDPR befreit werden.

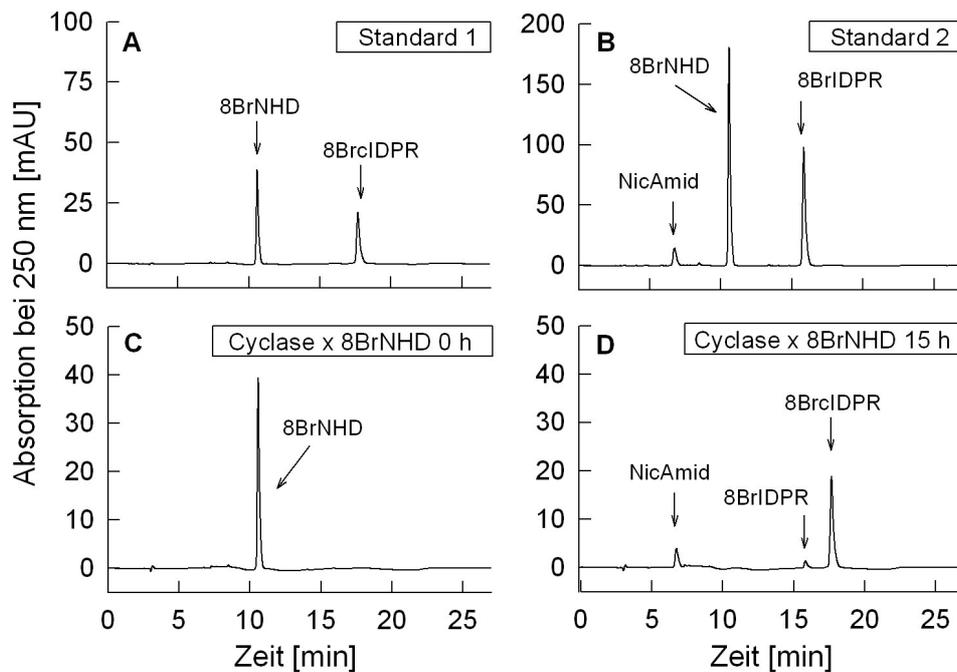


Abb. 4.1: Synthese von 8-Br-N1-cIDPR und Analyse der Umsetzung mittels RP-HPLC. (A, B) Chromatogramme von Standardmischungen mit 8-Br-NHD, 8-Br-N1-cIDPR, Nicotinamid (NicAmid) und 8-Br-IDPR. Die Synthese von 8-Br-N1-cIDPR durch Inkubation von 8-Br-NHD mit ADPRC (*A. californica*) wurde durch RP-HPLC kontrolliert. Die Ergebnisse der Analyse des Reaktionsgemisches sind für den Zeitpunkt 0 h (C) und 15 h (D) gezeigt. Während zu Beginn der Reaktion (0 h) nur ein Peak von 8-Br-NHD zu sehen war, konnte nach 15 h eine vollständige Umsetzung des Substrates und die Bildung von 8-Br-N1-cIDPR sowie von Nicotinamid und in Spuren von 8-Br-IDPR beobachtet werden.

4.1.2 Entwicklung einer Aufreinigungsmethode für 8-Br-N1-cIDPR

In Anlehnung an ein bereits in der Arbeitsgruppe durch Dr. A. Gasser etabliertes Protokoll zur Aufreinigung von NAADP aus Jurkat T-Lymphozyten (Gasser et al., 2006a) sollte das frisch synthetisierte 8-Br-N1-cIDPR über Anionenaustauschchromatographie (Material: Q-Sepharose Fast Flow) mittels eines Trifluoressigsäure-(TFA)-Gradienten gereinigt werden. Ein Schema des ersten Aufreinigungsversuches ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

Dazu wurde die Q-Sepharose mit TFA äquilibriert und in einen kleinen Säulenkörper überführt. Der Reaktionsansatz wurde zur Verringerung der Ionenstärke 5-fach mit Wasser verdünnt und in Aliquots auf die Säule aufgetragen. Die nachfolgende Elution erfolgte durch sukzessive Zugabe von TFA-Lösungen steigender Konzentration (TFA-Gradienten mit 5 – 70 mM TFA). Die jeweiligen Eluate wurden gesammelt und mittels RP-HPLC analysiert. Die Untersuchung der Eluate ergab, dass 8-Br-*N1*-cIDPR sowie 8-Br-IDPR bei einer TFA-Konzentration von 50 – 60 mM gemeinsam eluieren und sich durch diese hier angewandte Ionenaustauschchromatographie nicht trennen ließen.

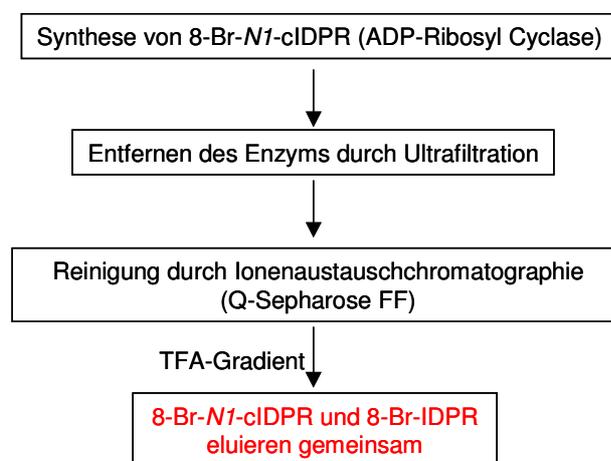


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Aufreinigung von 8-Br-*N1*-cIDPR über Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung eines TFA-Gradienten.

Das Trennproblem sollte durch einen enzymatischen Verdau von 8-Br-IDPR mit der Pyrophosphatase von *Crotalus admanteus* umgangen werden. Die Spaltprodukte, 8-Br-IMP und Ribose-5'-Phosphat, tragen veränderte Ladungen und sollten daher nun von 8-Br-*N1*-cIDPR zu trennen sein.

Ein Abbau von 8-Br-*N1*-cIDPR durch die Pyrophosphatase wurde nicht erwartet, da zuvor gezeigt werden konnte, dass cADPR gegenüber einer Inkubation mit Pyrophosphatase stabil ist (Gu & Sih, 1994). Um eine mögliche Degradation von 8-Br-*N1*-cIDPR durch die Pyrophosphatase auszuschließen, wurde diese mit 8-Br-*N1*-cIDPR inkubiert und das Reaktionsgemisch nach Abtrennung des Enzyms mittels RP-HPLC analysiert. Diese Analyse bestätigte die erwartete Stabilität von 8-Br-*N1*-cIDPR gegenüber der Pyrophosphatase.

Im Folgenden wird der zweite Aufreinigungsversuch von 8-Br-*N1*-cIDPR beschrieben. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 4.3 gezeigt.

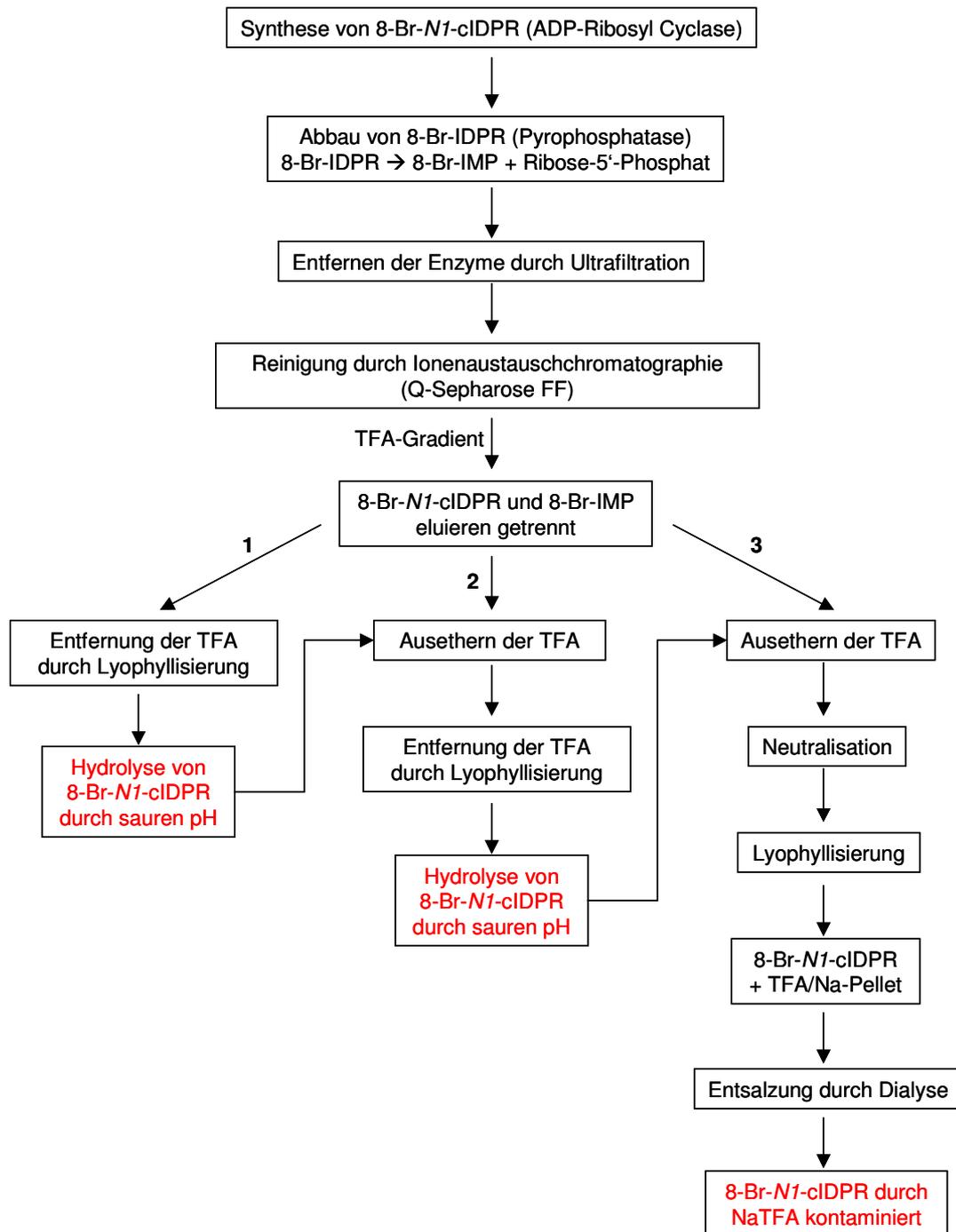


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Aufreinigung von 8-Br-N1-cIDPR nach einem enzymatischen Verdau von 8-Br-IDPR über Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung eines TFA-Gradienten

Nach Umsetzung von 8-Br-NHD mit der *Aplysia* ADPRC wurde der Reaktionsansatz direkt mit Pyrophosphatase versetzt und für weitere 1 – 2 h inkubiert. Die Enzyme wurden wie oben beschrieben durch Ultrafiltration entfernt und die Probe nach 5-fachem Verdünnen mit Wasser auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Elution wurde mit einem TFA-Gradienten durchgeführt und die Eluate mittels RP-

HPLC analysiert. Während 8-Br-IMP bei einer TFA-Konzentration von 20 – 30 mM eluierte, konnte 8-Br-N1-cIDPR in den Eluaten mit einer TFA-Konzentration von 50 – 70 mM detektiert werden. Somit ließ sich das Trennproblem durch einen Verdau von 8-Br-IDPR mit Pyrophosphatase umgehen. Das so erhaltene 8-Br-N1-cIDPR sollte im weiteren durch Gefriertrocknung von der TFA befreit werden (Abb. 4.3, 1). Dazu wurden die 8-Br-N1-cIDPR enthaltenen Eluate vereinigt, bei –80 °C eingefroren, bis zur Trockene gefriergetrocknet und ein Aliquot mittels RP-HPLC untersucht. Es wurden in dem Chromatogramm zwei Peaks von 8-Br-N1-cIDPR und einer unbekannt Substanz bei $t_R = 18,2$ min detektiert. Durch Versetzen der Probe mit einem 8-Br-IDPR Standard konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Peak unbekannter Herkunft um 8-Br-IDPR handelte, da sich die Retentionszeiten unterschieden. Es könnte sich bei der unbekannt Substanz aber um das kürzlich beschriebene Hydrolyseprodukt 8-Bromo-N1-ribosyl hypoxanthin 5'-monophosphat (8-Br-N1-IMP) handeln (Moreau et al., 2006). Die Bestimmung der Ausbeute ergab einen Verlust von 80 % 8-Br-N1-cIDPR. Aufgrund dieses Verlustes und der Hydrolyse von 8-Br-N1-cIDPR bei stark saurem pH-Wert während der Gefriertrocknung ist diese Methode zur Aufreinigung nicht geeignet.

Daher sollte im Folgenden durch Entfernen der TFA durch Extraktion mit Diethylether vor der Gefriertrocknung der pH-Wert der vereinigten Eluate erhöht und der TFA-Gehalt verringert werden (Abb. 4.3, 2). Dazu wurden die Eluate mehrfach (10 x) mit dem gleichen Volumen Diethylether ausgeschüttelt. Der pH-Wert konnte durch Extraktion mit Diethylether allerdings nicht deutlich erhöht werden. Die extrahierten Eluate wurden bei –80 °C eingefroren, bis zur Trockene gefriergetrocknet und ein Aliquot mittels RP-HPLC untersucht. Auch nach der Extraktion mit Diethylether konnten in dem Chromatogramm zwei Peaks von 8-Br-N1-cIDPR und der unbekannt Substanz detektiert sowie ein Verlust der Ausbeute von 8-Br-N1-cIDPR festgestellt werden.

Da die Extraktion der Eluate mit Diethylether vor der Gefriertrocknung nur zu einem schwachen Anstieg des pH-Wertes und somit weiterhin zu einer Hydrolyse von 8-Br-N1-cIDPR führte, wurden die ausgeetherten Eluate vor der Gefriertrocknung mit Natronlauge (NaOH) neutralisiert, bei –80 °C eingefroren und bis zur Trockene gefriergetrocknet (Abb. 4.3, 3). Die RP-HPLC Analyse eines Aliquots zeigte im Chromatogramm nur einen Peak von 8-Br-N1-cIDPR. Die Gefriertrocknung von 8-Br-N1-cIDPR muss also im Neutralen erfolgen, da es sonst zu einer Hydrolyse kommt.

Das auf diese Weise erhaltene 8-Br-*N1*-cIDPR enthielt nun Natriumtrifluoracetat (NaTFA), welches vor dem Einsatz für zellbiologische Versuche entfernt werden sollte, um später beobachtete Effekte eindeutig auf 8-Br-*N1*-cIDPR zurückführen zu können. Die Entsalzung des 8-Br-*N1*-cIDPR sollte mittels Dialyse erzielt werden. Die Dialyse wurde mit einer Membran mit einer Porengröße von ca. 500 Da ($M_{w(8-Br-N1-cIDPR)} = 620 \text{ g/mol}$) gegen Wasser über einen Zeitraum von 2 Tagen durchgeführt.

Da die Gefriertrocknung von 8-Br-*N1*-cIDPR in Gegenwart von TFA bei saurem pH-Wert nicht möglich war und die vorherige Neutralisation mit NaOH zur Bildung eines NaTFA Salzes führte, sollte für die Anionenaustauschchromatographie statt eines TFA-Gradienten ein NaCl-Gradient verwendet werden. Nachfolgend wird der dritte Aufreinigungsversuch von 8-Br-*N1*-cIDPR beschrieben (Abb. 4.4).

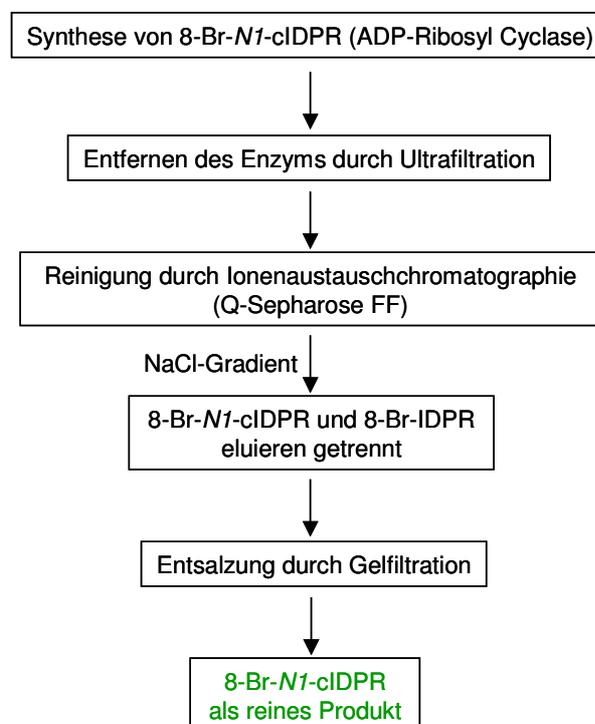


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Aufreinigung von 8-Br-*N1*-cIDPR über Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung eines NaCl-Gradienten.

Die Q-Sepharose wurde mit NaCl äquilibriert und in den Säulenkörper überführt, der Reaktionsansatz 5-fach mit Wasser verdünnt und in Aliquots auf die Säule aufgetragen. Die nachfolgende Elution wurde mit einem NaCl-Gradienten (20 – 250 mM NaCl) durchgeführt und die Eluate mittels RP-HPLC analysiert. Die Untersuchung der Eluate ergab, dass 8-Br-*N1*-cIDPR bei einer NaCl-Konzentration von 40 – 100 mM und 8-Br-IDPR später bei einer NaCl-Konzentration von 120 mM eluierte (Abb. 4.5). Die beiden Nukleotide ließen sich unter Verwendung eines NaCl-

Gradienten trennen. Für die nachfolgenden Schritte wurden die Eluate mit einer NaCl-Konzentration von 40 – 100 mM vereinigt.

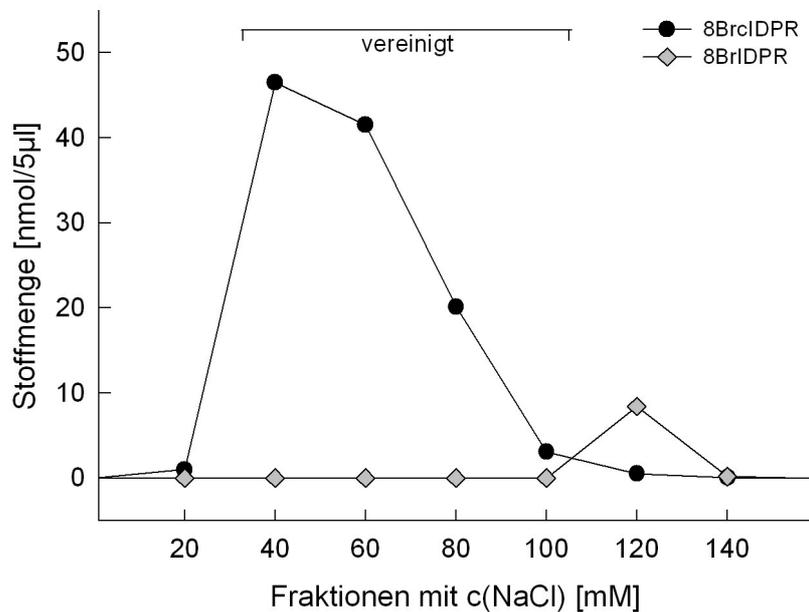


Abb. 4.5: Anionenaustauschchromatographie von 8-Br-N1-cIDPR mittels eines NaCl-Gradienten. Der Reaktionsansatz wurde auf die Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose) aufgetragen, mit einem NaCl-Gradienten (20 – 250 mM NaCl) eluiert und die Eluate mittels RP-HPLC analysiert. 8-Br-N1-cIDPR eluiert bei einer NaCl-Konzentration von 40 – 100 mM während 8-Br-IDPR erst bei einer NaCl-Konzentration von 120 mM eluiert. Die beiden Nukleotide konnten mittels Anionenaustausch-chromatographie unter Verwendung eines NaCl-Gradienten getrennt werden.

Das so erhaltene 8-Br-N1-cIDPR musste im Weiteren durch Entsalzung von NaCl befreit werden. Die Entsalzung sollte mittels Dialyse durchgeführt werden. Zur Überprüfung der Effizienz dieser Methode wurde zunächst die Dialyse einer NaCl-Lösung durchgeführt. Die NaCl-Lösung wurde dazu über 10 Tage gegen Wasser, welches alle 6 - 24 h gewechselt wurde, dialysiert. Im Verlauf dieser Dialyse wurden Aliquots entnommen, deren Leitfähigkeit bestimmt und daraus die jeweilige NaCl-Konzentration ermittelt (Abb. 4.6).

Um eine ausreichend niedrige NaCl-Konzentration von ca. 0,5 mM zu erreichen müsste eine Dialyse mindestens über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt werden. In Vorversuchen mit 8-Br-N1-cIDPR konnte gezeigt werden, dass es bei der Dialyse nach ca. 3 Tagen bereits zu einem Verlust von 40 % 8-Br-N1-cIDPR kommt. Daher schien die Dialyse als Methode zur Entsalzung von 8-Br-N1-cIDPR nicht geeignet zu sein.

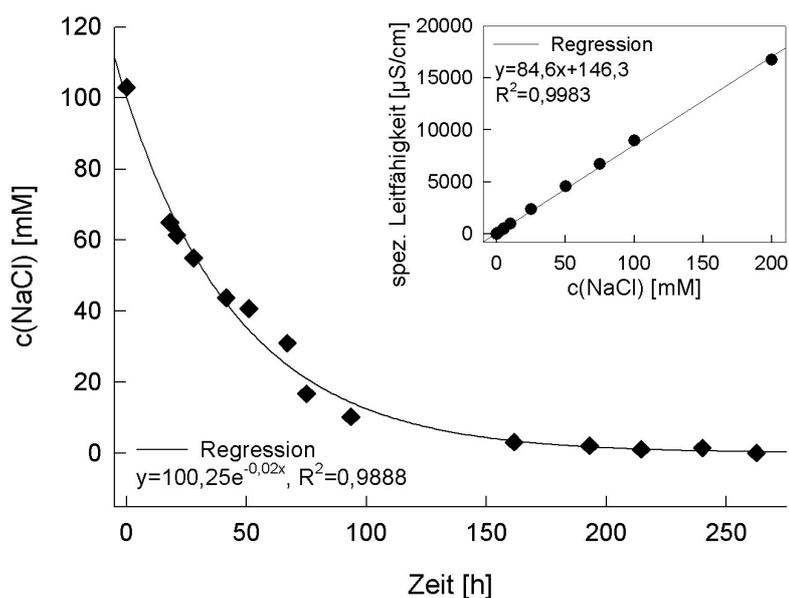


Abb. 4.6: Dialyse einer NaCl-Lösung gegen Wasser. Während der Dialyse einer NaCl-Lösung gegen Wasser wurden Aliquots des Dialysats entnommen, deren spezifische Leitfähigkeit bestimmt und mit Hilfe einer Kalibriergeraden die NaCl-Konzentration ermittelt.

Als alternative Methode zur Entsalzung von 8-Br-N1-clDPR wurde die Gelfiltration gewählt, wobei als Säulenmaterial G10 Sephadex verwendet wurde. Die Säule war an einen UV-Detektor ($\lambda = 280$ nm) angeschlossen, so dass die UV-Absorption des Eluats während der Gelfiltration verfolgt werden konnte. Das aus der Anionenaustauschchromatographie erhaltene Eluat wurden durch Anlegen eines Vakuums eingeeengt und auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Nach Einlauf der Probe in das Säulenmaterial wurde die Gelfiltration mit Wasser als Laufmittel gestartet und Fraktionen mit einem Volumen von 1 bis 5 ml gesammelt, wobei das Volumen der Fraktionen mit Stärke der UV-Absorption variierte. Die Fraktionen wurden mittels RP-HPLC analysiert und ihre Leitfähigkeit bestimmt (Abb. 4.7). 8-Br-N1-clDPR konnte ab Fraktion 4 in allen Fraktionen detektiert werden, wobei der Großteil mit den Fraktionen 5 bis 10 eluierte. Die NaCl-Konzentration der gesammelten Fraktionen wurde aus der Leitfähigkeit anhand einer Kalibriergeraden ermittelt. Der Hauptteil des NaCl eluierte von Fraktion 11 bis 14. Für nachfolgende Versuche wurden die Fraktionen 4 bis 10 vereinigt.

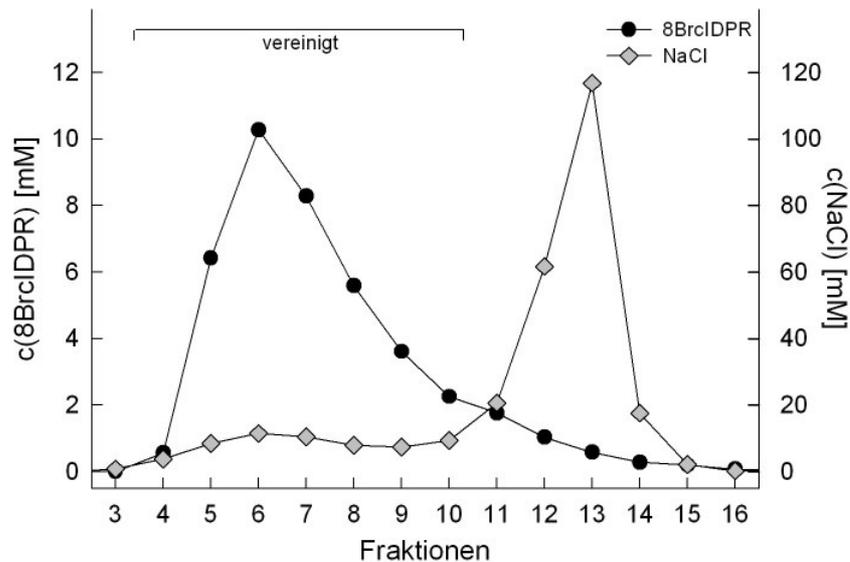


Abb. 4.7: Gelfiltration zur Entsalzung von 8-Br-N1-clDPR. Zur Entsalzung der 8-Br-N1-clDPR Lösung wurde eine Gelfiltration (G10 Sephadex) mit Wasser als Laufmittel durchgeführt. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels RP-HPLC analysiert und ihre Leitfähigkeit bestimmt. 8-Br-N1-clDPR konnte ab Fraktion 4 in allen Fraktionen detektiert werden, wobei der Großteil mit Fraktion 5 bis 10 eluiert. Die NaCl-Konzentration der gesammelten Fraktionen wurde aus der Leitfähigkeit anhand einer Kalibriergeraden ermittelt. Der Hauptteil des NaCl eluierte von Fraktion 11 bis 14.

Die Reinheit und die Identität des Produkts wurde mittels RP-HPLC Analyse überprüft. Die Identität konnte mittels Massenspektroskopie bestätigt werden (Abb. 4.8). Die massenspektroskopische Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Ch. Moreau (University of Bath) durchgeführt.

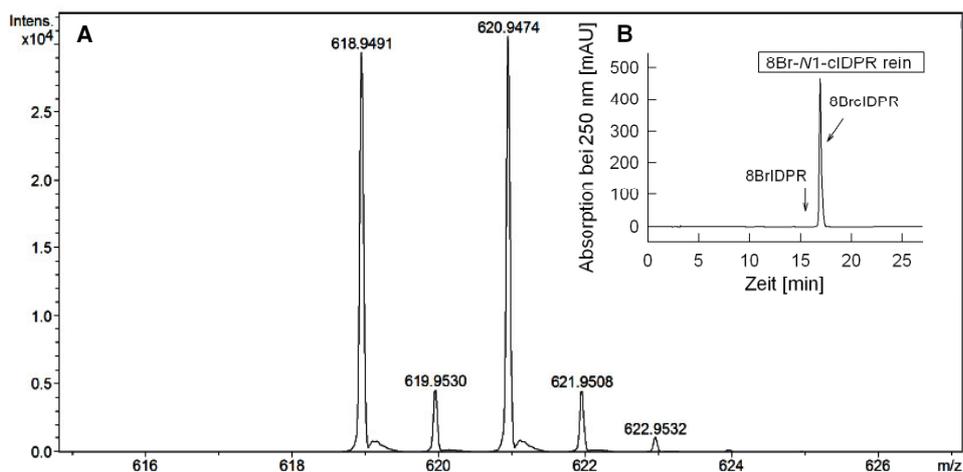


Abb. 4.8: RP-HPLC Analyse und Massenspektroskopische Untersuchung des aufgereinigten Produkts. (A) Die durchschnittliche Masse von 8-Br-N1-clDPR beträgt 620,17g/mol. Die Peaks bei 619 und 621 g/mol stammen von den beiden Bromisotopen, während die Peaks bei 620 und 622 g/mol die protonierte Form der jeweiligen Moleküle präsentieren. (B) Die RP-HPLC-Analyse ergab eine Reinheit von 99,3 %.

4.2 Stabilität von *M1*-cADPR und Derivaten im Vergleich zu cADPR

cADPR ist, wie in der Einleitung beschrieben, als Ca^{2+} -mobilisierender second Messenger in vielen Zelltypen und Geweben von Tieren, Protisten und Pflanzen bekannt (s. Übersichtsartikel De Flora et al., 2004; Galione & Churchill, 2002; Guse, 2004a; Lee, 2004). Aufgrund seiner Bedeutung als wichtiges Signalmolekül insbesondere in humanen Zellen könnten cADPR-Analoga in Zukunft eine wichtige Rolle als therapeutische Wirkstoffe spielen. Für einen therapeutischen Einsatz ist die Stabilität der Wirkstoffe von großer Bedeutung, da eine gleichbleibend effektive Wirkstoffkonzentration während der Therapie zum Erfolg einer Therapie beiträgt. Aufgrund dessen wurde schon eine Vielzahl von cADPR-Analoga synthetisiert und ihre biologische Aktivität sowie ihre metabolische Stabilität untersucht (s. Übersichtsartikel Guse, 2004b; Potter & Walseth, 2004; Shuto & Matsuda, 2004). In dieser Arbeit wurde die Stabilität von cADPR-Analoga untersucht, für die zuvor gezeigt werden konnte, dass sie ähnliche Ca^{2+} -mobilisierende Eigenschaften aufweisen wie cADPR (Gu et al., 2004; Guse et al., 2005; Wagner et al., 2003; Wagner et al., 2005). Die Analoga unterscheiden sich strukturell von cADPR durch den Austausch von Adenosin gegen Inosin, sowie durch eine Modifikation an C8 der Nukleobase oder durch den Ersatz einer oder beider Ribosen durch Etherbrücken. Die Untersuchung ihrer Stabilität wurde gegenüber dem Ectoenzym CD38 getestet, das auch auf der Oberfläche von T-Lymphozyten vorkommt (Howard et al., 1993). Es wurde dieses Enzym für die Stabilitätsuntersuchungen ausgewählt, da es das einzig gut beschriebene Enzym der Mammalia ist, welches sowohl die Bildung als auch den Abbau von cADPR katalysiert und somit auch in der Lage sein könnte, inosinbasierte Analoga von cADPR zu metabolisieren.

4.2.1 Stabilität von cADPR gegenüber CD38, ADP-Ribosyl Cyclase und NADase

Das natürliche Substrat von CD38, *Aplysia* ADPRC und NADase ist NAD, welches zu Nicotinamid und in unterschiedlichem Ausmaß zu cADPR und ADPR umgesetzt wird. Während CD38 in der Lage ist NAD zu ADPR und in geringem Ausmaß zu cADPR umzusetzen (Howard et al., 1993), zeigt die ADPRC von *A. californica* eine ausgeprägte Cyclase- und eine nur sehr schwache Hydrolase-Aktivität (Cakir-Kiefer et al., 2000). Unterdessen verfügt die NADase von *N. crasse* nur über eine NAD-Glycohydrolase Aktivität (Graeff et al., 1994). Die oben beschriebene Aktivität der

Enzyme gegenüber ihrem natürlichen Substrat NAD wurde durch eine Inkubation mit nativem CD38 auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, ADPRC aus *A. californica* oder NADase aus *N. crassa* und nachfolgende Untersuchungen der Reaktionsmischungen mittels RP-HPLC überprüft. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

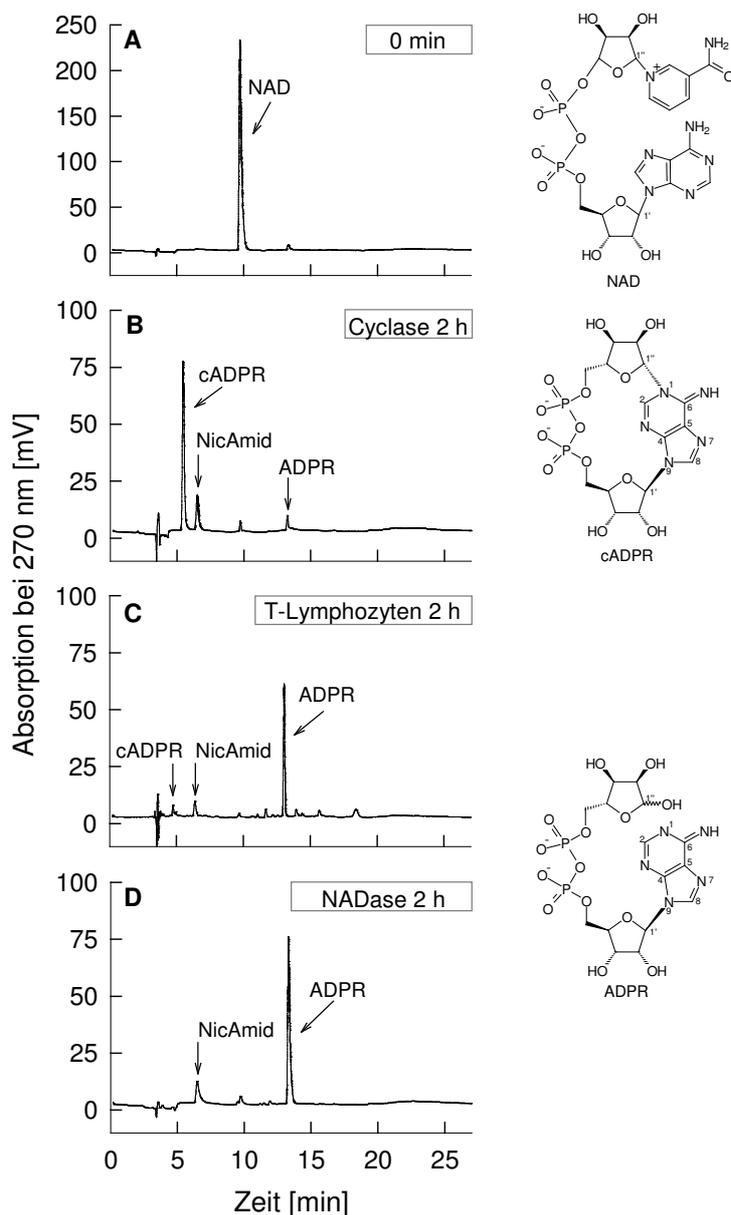


Abb. 4.9: Abbau von NAD durch ADPRC (*A. californica*), natives CD38 (T-Lymphozyten) und NADase (*N. crassa*). NAD (50 μ M) wurde mit ADPRC (100 ng/ml), CD38 (1 \times 10⁷ T-Lymphozyten/ml) oder NADase (180 μ g/ml) inkubiert (2 h, RT) und der Umsatz mittels RP-HPLC analysiert. Die Umsetzung von NAD (A, t_R = 10 min) verlief mit allen Enzymen nahezu vollständig, was durch die Abwesenheit des NAD-Peaks in den anderen Chromatogrammen erkennbar ist. Die Inkubation von NAD mit ADPRC (B) führte fast ausschließlich zur Bildung von cADPR, während bei Inkubation mit CD38 (C) hauptsächlich ADPR und bei Inkubation mit NADase (D) nur ADPR gebildet wurde.

NAD wurde unter den hier gewählten Bedingungen durch alle drei Enzyme nahezu vollständig umgesetzt. Während bei der Inkubation von NAD mit ADPRC (Abb. 4.9, B) fast ausschließlich cADPR (t_R = 5,5 min) gebildet wurde, konnte bei Inkubation mit CD38 (Abb. 4.9, C) hauptsächlich und bei Inkubation mit der NADase (Abb. 4.9, D) ausschließlich ADPR (t_R = 13,3 min) detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich

mit den für die Enzyme bekannten Aktivitäten (Cakir-Kiefer et al., 2000; Graeff et al., 1994; Howard et al., 1993; Lee & Aarhus, 1991).

Nachfolgend wurde die Stabilität von cADPR gegenüber CD38, ADPRC und NADase untersucht. Dazu wurde cADPR unter den gleichen Bedingungen, wie zuvor NAD, mit den Enzymen inkubiert und das jeweilige Reaktionsgemisch mittels RP-HPLC untersucht. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 4.10 gezeigt.

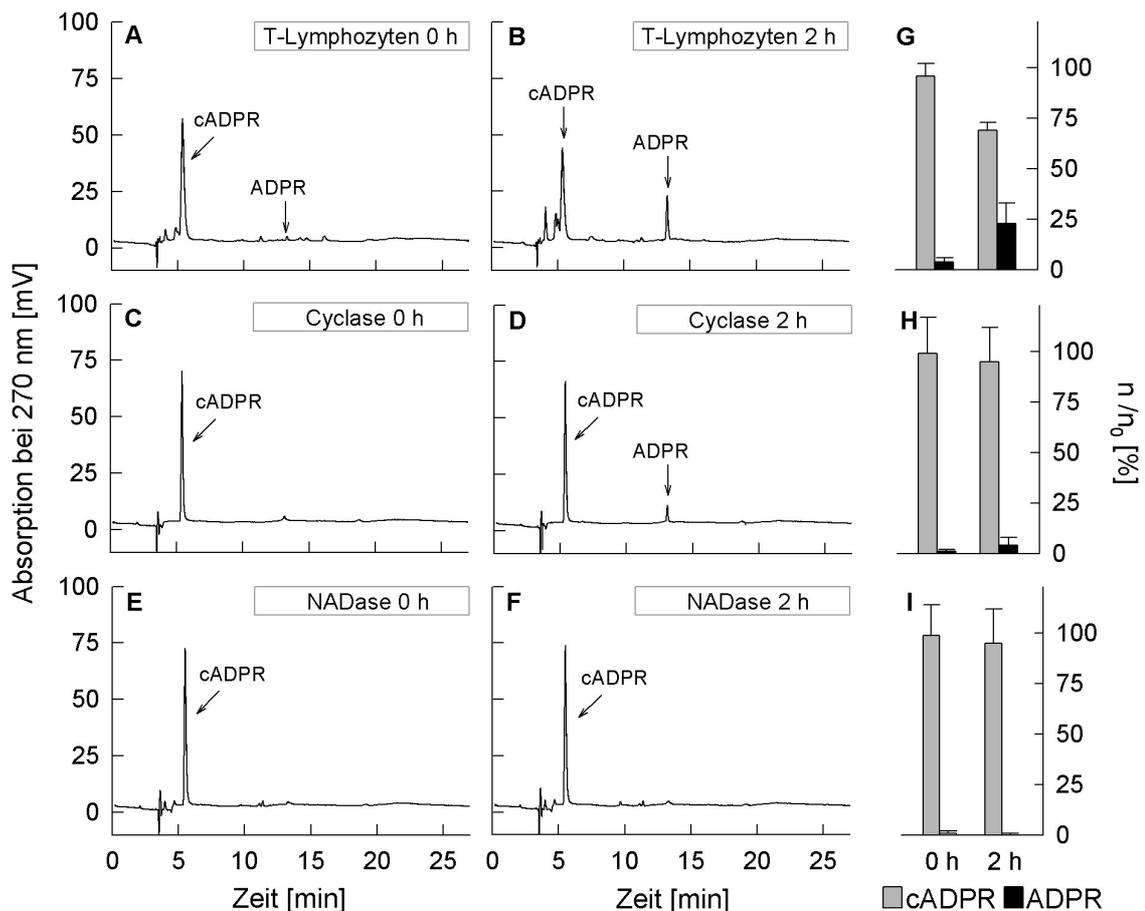


Abb. 4.10: Abbau von cADPR durch natives CD38 (T-Lymphozyten), ADPRC (*A. californica*) und NADase (*N. crassa*). cADPR (50 μ M) wurde mit CD38 (1×10^7 T-Lymphozyten/ ml), ADPRC (100 ng/ml) oder NADase (180 μ g/ml) inkubiert (2 h, RT) und der Umsatz mittels RP-HPLC analysiert (n=4-5). Die Inkubation von cADPR ($t_R= 5,4$ min) mit CD38 (A, B, G) führte zu einem Abbau von ca. 25 % der eingesetzten cADPR Menge unter gleichzeitiger Bildung von ADPR ($t_R= 13,2$ min). Bei Inkubation mit *Aplysia* ADPRC (C, D, H) wurden nur ca. 4 % des cADPR zu ADPR abgebaut, während die NADase (E, F, I) keine enzymatische Aktivität gegenüber cADPR zeigte. Die Daten in G,H und I sind Mittelwerte \pm S.D. (n= 4-5).

Während NAD unter identischen Bedingungen von allen Enzymen nahezu vollständig abgebaut wurde, konnte hier nur ein moderater Abbau von cADPR (ca. 25 %) durch CD38, bei gleichzeitiger Bildung von ADPR, beobachtet werden (Abb. 4.10, A, B, G). Bei Inkubation von cADPR mit *Aplysia* ADPRC wurde nur ein

minimaler Umsatz von ca. 4 % cADPR erzielt (Abb. 4.10, C, D, H), während die NADase keine cADPR-Hydrolase Aktivität zeigte (Abb. 4.10, E, F, I). Diese Ergebnisse stimmen mit den für die Enzyme beschriebenen Aktivitäten überein (Cakir-Kiefer et al., 2000; Graeff et al., 1994; Howard et al., 1993; Lee & Aarhus, 1991).

4.2.2 Stabilität von *N1*-cIDPR gegenüber CD38

Da ausschließlich CD38 (Abb. 4.10) eine nennenswerte cADPR-Hydrolase Aktivität aufwies, wurde die Stabilität der inosinbasierten cADPR Analoga insbesondere gegenüber CD38 untersucht. Zunächst wurde die Stabilität des strukturell ähnlichsten Analogon, *N1*-cIDPR, untersucht. Zur Verdeutlichung der Ähnlichkeit von cADPR und *N1*-cIDPR sind in Abbildung 4.11 die Strukturformeln gezeigt. Die beiden Nukleotide unterscheiden sich nur durch den Liganden am C6-Atom der Nucleobase. Während cADPR am C6-Atom eine Aminogruppe trägt, besitzt *N1*-cIDPR dort eine Oxogruppe.

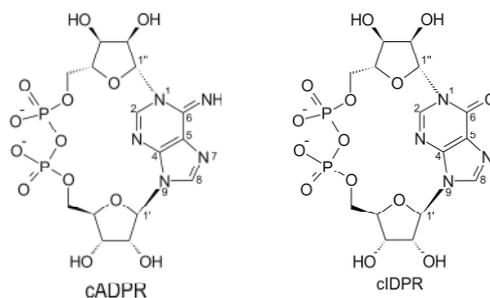


Abb. 4.11: Strukturformeln von cADPR und *N1*-cIDPR

Die Stabilität von *N1*-cIDPR gegenüber CD38 wurde wie zuvor von cADPR durch Inkubation mit T-Lymphozyten untersucht, wobei die Inkubationsdauer auf 18 h ausgedehnt wurde. Des Weiteren wurden Kontrollinkubationen ohne Substrat (Abb. 4.12, A, B, C) durchgeführt, um eine Synthese und/oder Freisetzung endogener Nucleotide durch die T-Lymphozyten zu erfassen. Die durch Inkubation mit T-Lymphozyten, insbesondere nach 18 h, auftretenden Hintergrundpeaks waren aber zu vernachlässigen, da nur ein geringer Anstieg einiger Substanzen beobachtet werden konnte, z. B. ein Peak bei $t_R = 4,5$ min, dessen Herkunft nicht genau bestimmt werden konnte, und bei $t_R = 13,2$ min von AMP. Für die Untersuchung der Stabilität von *N1*-cIDPR gegenüber CD38 wurde das Nucleotid in vergleichenden Versuchen mit cADPR mit 1×10^7 T-Lymphozyten/ml für 2, 4, 6, und 18 h inkubiert und die Reaktionsgemische mittels RP-HPLC untersucht.

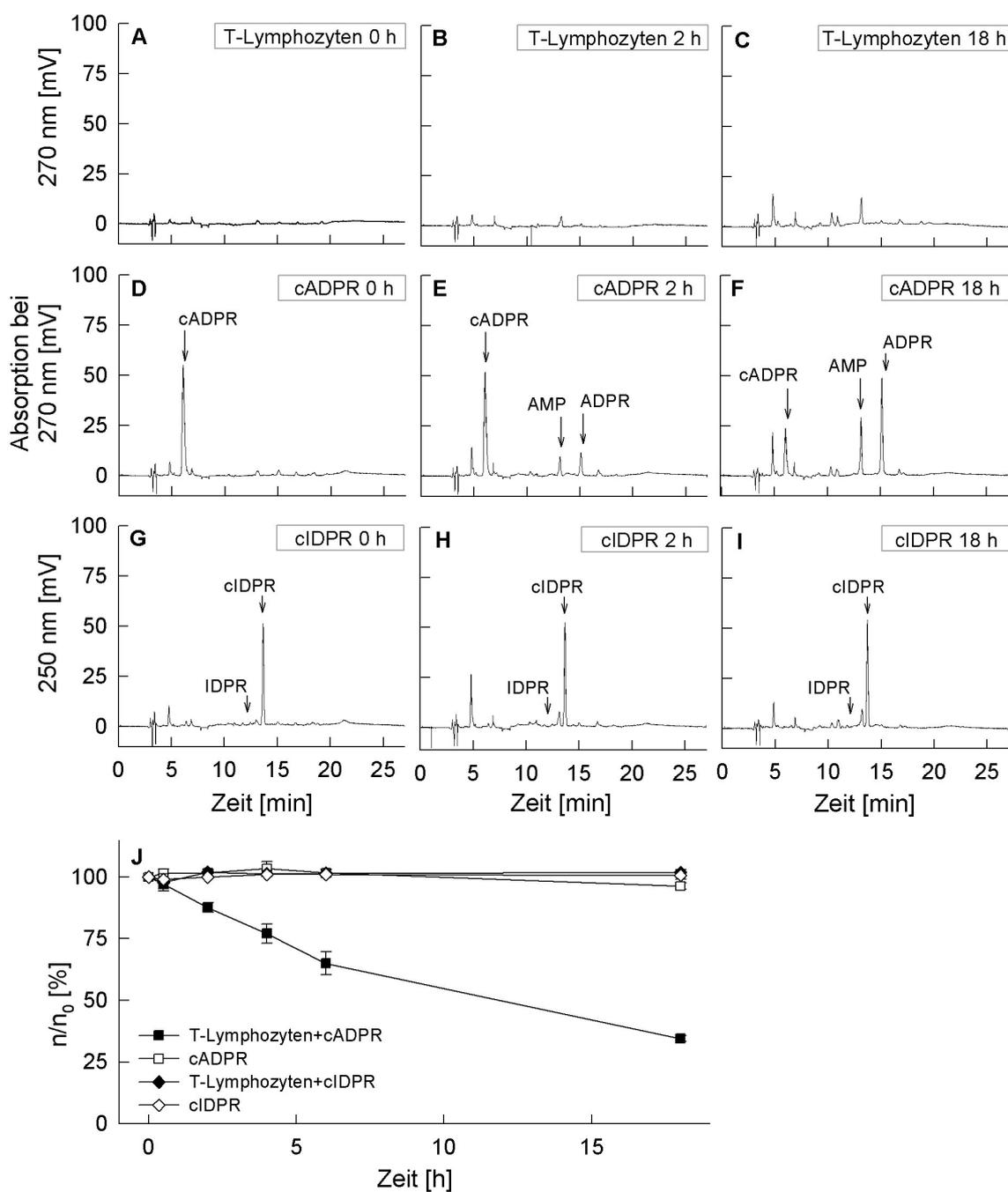


Abb. 4.12: Inkubation von cADPR und M1-cIDPR mit nativem CD38 (T-Lymphozyten). 1×10^7 T-Lymphozyten/ml wurden ohne Substrat (A-C), mit $50 \mu\text{M}$ cADPR (D-F, J) oder $50 \mu\text{M}$ M1-cIDPR (G-I, J) bei RT inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und der Umsatz mittels RP-HPLC analysiert. Die Detektion von cADPR erfolgte bei 270 nm während M1-cIDPR bei 250 nm detektiert wurde. Die hier gezeigten Chromatogramme sind repräsentativ. (J) Abnahme der relativen Stoffmenge mit Dauer der Inkubation von cADPR oder M1-cIDPR mit oder ohne T-Lymphozyten. Die Daten stellen Mittelwerte \pm S.D. dar ($n=3$).

Obwohl nach einer Inkubationsdauer von 18 h ca. 60 % des cADPR zu ADPR (Abb. 4.12, D-F, J) umgesetzt wurde, konnte keine Verringerung der Peakfläche, also kein Abbau von *N1*-cIDPR (Abb. 4.12, G-I, J), beobachtet werden. Die Inkubation der Nukleotide in Abwesenheit von T-Lymphozyten für 2, 4, 6 und 18 h bei Raumtemperatur führte zu keinem bedeutsamen Abbau (Abb. 4.12, J).

N1-cIDPR konnte durch natives CD38 auf der Oberfläche von T-Lymphozyten nicht metabolisiert werden. Die Stabilität gegenüber CD38 konnte durch Inkubation von *N1*-cIDPR mit rekombinanter, löslicher CD38 aus der Maus bestätigt werden. Während keine Metabolisierung von *N1*-cIDPR zu beobachten war, wurde cADPR mit längerer Inkubationsdauer zunehmend umgesetzt. (Abb. 4.13, A). Auch eine Erhöhung der Zellzahl bei einer Inkubationsdauer von 6 h führte zu keiner erkennbaren Metabolisierung von *N1*-cIDPR (Abb. 4.13, B), während cADPR durch die Erhöhung der Zellzahl verstärkt abgebaut wurde. So waren nach 6 h bei einer Zellzahl von 2×10^7 /ml ca. 68 % und bei einer Zelldichte von 4×10^7 /ml bereits 85 % der eingesetzten cADPR abgebaut.

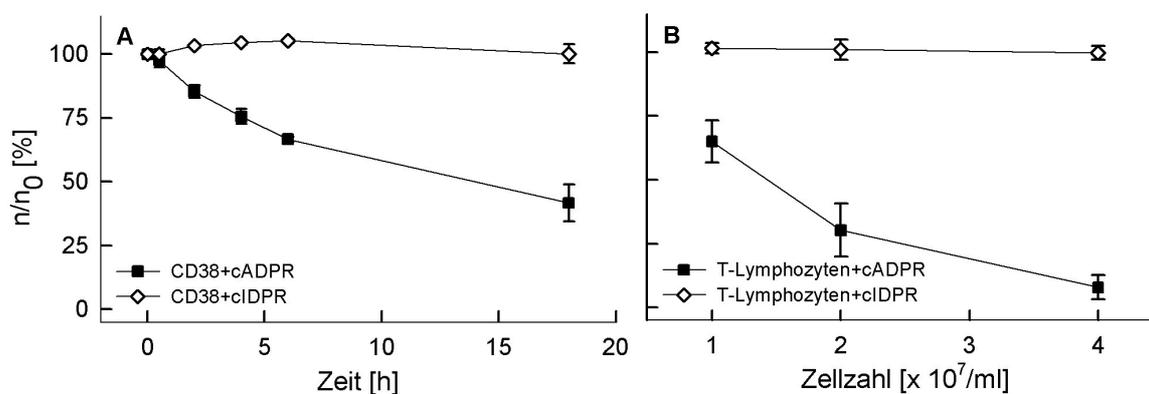


Abb. 4.13: Stabilität von cADPR und *N1*-cIDPR gegenüber CD38. (A) $50 \mu\text{M}$ *N1*-cIDPR und $50 \mu\text{M}$ cADPR wurden unter gleichen Bedingungen mit rekombinanter löslicher CD38 aus der Maus ($0,75 \mu\text{g/ml}$) für 2, 4, 6 und 18 h inkubiert und mittels RP-HPLC analysiert. (B) $50 \mu\text{M}$ *N1*-cIDPR und $50 \mu\text{M}$ cADPR wurden mit steigender Zahl von T-Lymphozyten für 6 h bei RT inkubiert und mittels HPLC untersucht. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. ($n=3-5$).

Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass der formelle Austausch der Aminogruppe am C6-Atom der Nukleobase durch eine Oxogruppe die Bindung zwischen dem N1-Atom und dem C''1-Atom der nördlichen Ribose in eine chemisch stabilere, amidähnliche Bindung überführt, so dass diese Verbindungen auch in biologischen Systemen stabil sind. Sollte diese amidähnliche Struktur von *N1*-cIDPR

tatsächliche der Grund für die Stabilität gegenüber CD38 sein, müssten auch andere inosinbasierten cADPR Analoga stabil gegenüber CD38 sein.

4.2.3 Stabilität von 8-Br-*N*1-cIDPR, *N*1-cIDPRE und *N*1-cIDP-DE gegenüber CD38

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die *N*1-cIDPR Analoga 8-Br-*N*1-cIDPR, *N*1-cIDPRE und *N*1-cIDP-DE untersucht, die wie *N*1-cIDPR eine amidähnliche Struktur aufweisen. Während sich 8-Br-*N*1-cIDPR gegenüber *N*1-cIDPR durch den Austausch eines Wasserstoffatoms an C8 der Nucleobase gegen Brom unterscheidet, ist bei *N*1-cIDPRE die nördliche Ribose und bei *N*1-cIDP-DE sowohl die nördlich als auch die südliche Ribose durch eine Etherbrücken ersetzt. Die Strukturformeln sind in Abbildung 4.14 gezeigt.

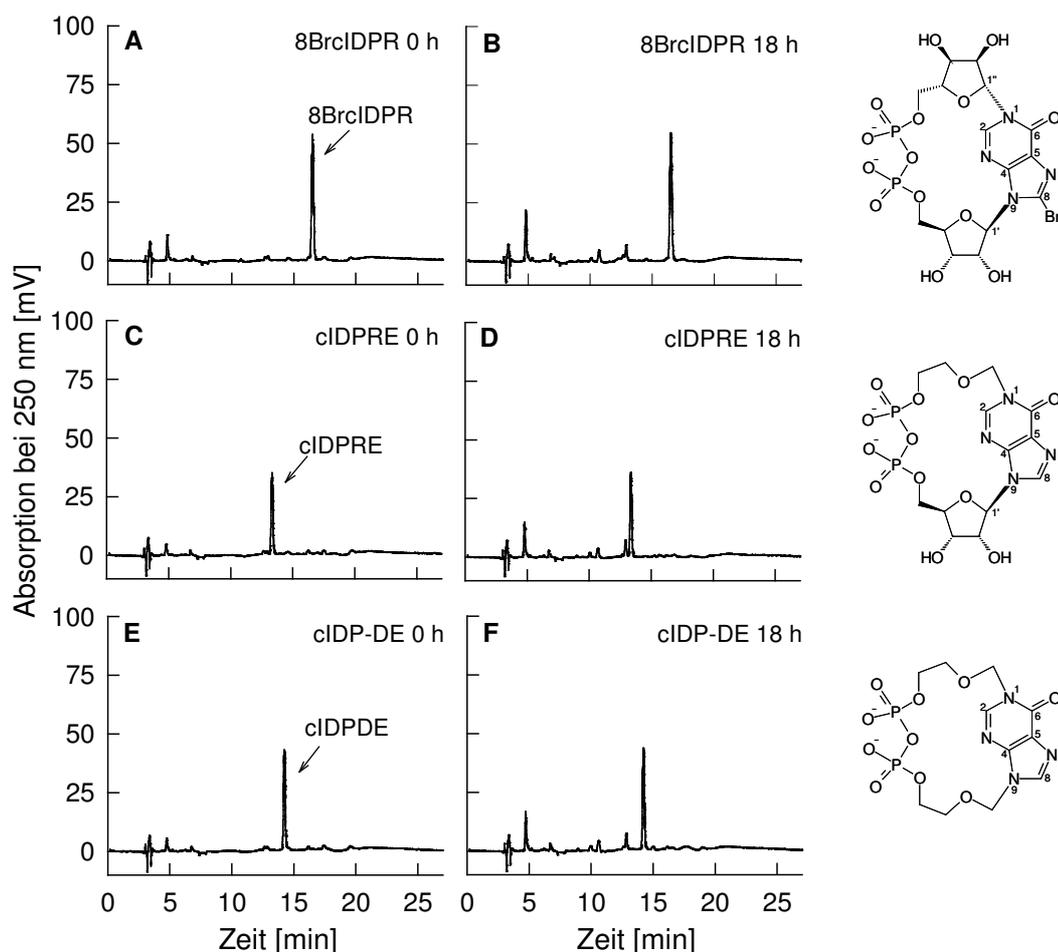


Abb. 4.14: Stabilität von 8-Br-*N*1-cIDPR, *N*1-cIDPRE und *N*1-cIDP-DE gegenüber CD38. T-Lymphozyten (1×10^7 Zellen/ml) wurden mit 50 μ M 8-Br-*N*1-cIDPR (A, B), 50 μ M *N*1-cIDPRE (C,D) oder 50 μ M *N*1-cIDP-DE (E, F) bei RT für 18 h inkubiert (n=2). Es wurden nach 0 min und 18 h Aliquots entnommen und der Umsatz mittels RP-HPLC analysiert, wobei die Detektion bei 250 nm erfolgte. Es sind charakteristische Chromatogramme gezeigt.

Keine dieser drei Substanzen konnte durch eine 18-stündigen Inkubation mit nativem CD38 auf der Oberfläche der T-Lymphozyten degradiert werden. Dieses Resultat lässt vermuten, dass tatsächlich die amidähnliche Struktur, die in allen hier untersuchten cADPR-Analoga vorliegt, zu einer Stabilität gegenüber CD38 führt.

4.3 Zelluläre Effekte von cADPR, M1-cIDPR und Analoga auf T-Lymphozyten

4.3.1 Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten in Anwesenheit von cADPR, M1-cIDPR und Analoga

Zur Überprüfung des Effektes von cADPR, M1-cIDPR, 8-Br-M1-cIDPR, M1-cIDPRE und M1-cIDP-DE auf die Proliferation von autonom proliferierenden Jurkat T-Lymphozyten wurden diese mit steigenden Konzentrationen der Nukleotide inkubiert und die Zellzahl nach 48, 72 und 96 h bestimmt (Abb. 4.15, A-E).

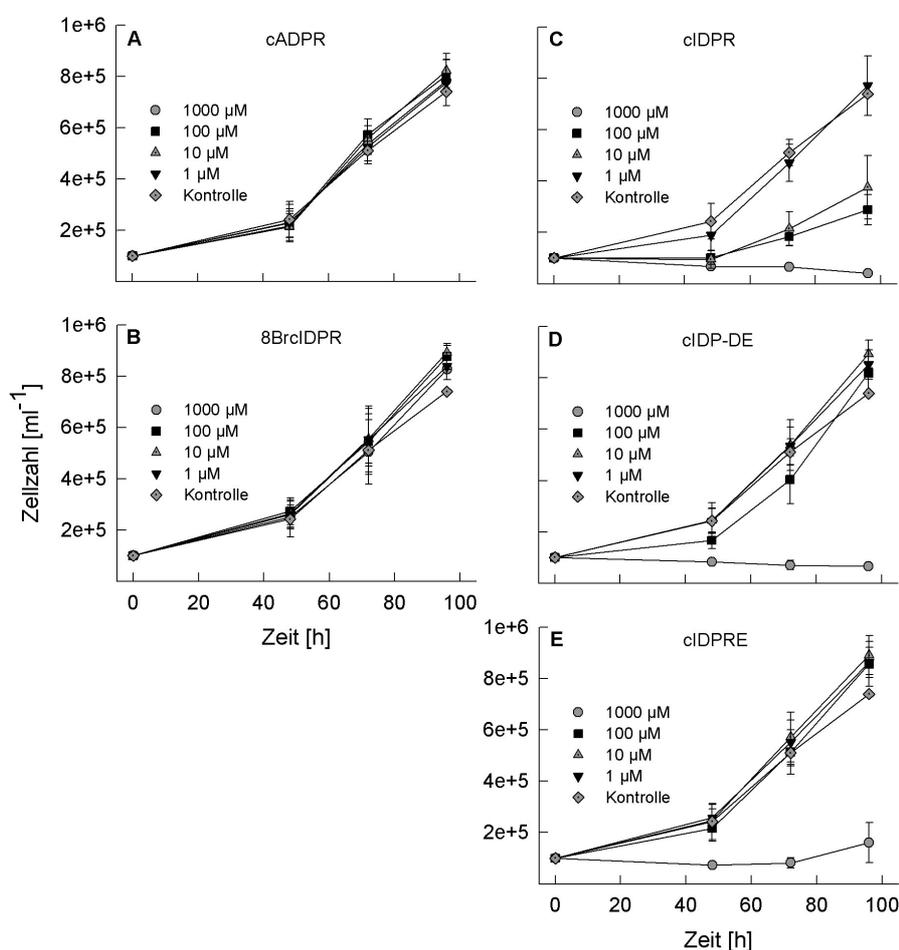


Abb. 4.15: Effekt von cADPR, 8-Br-M1-cIDPR, M1-cIDPR, M1-cIDPRE und M1-cIDP-DE auf die Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten. T-Lymphozyten ($1 \times 10^5/\text{ml}$) wurden mit steigenden Konzentrationen (1, 10, 100, 1000 μM) cADPR (A), 8-Br-M1-cIDPR (B), M1-cIDPR (C), M1-cIDPRE (D) und M1-cIDP-DE (E) bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert und die Zellzahl nach 48, 72 und 96 h bestimmt. Die ermittelte Zelldichte wurde gegen die Inkubationsdauer und die Konzentration der Nukleotide aufgetragen. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. ($n = 3-9$).

Während cADPR und 8-Br-N1-cIDPR (Abb. 4.15, A, B und Abb. 4.16, A) keinen Effekt auf die Proliferation der Jurkat T-Lymphozyten zeigten, konnte eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation durch N1-cIDPR, N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE (Abb. 4.15, C, D, E und Abb. 4.16, B) beobachtet werden. Der inhibitorische Effekt war in Gegenwart von N1-cIDPR mit einem IC_{50} von ca. 10 μ M am stärksten ausgeprägt, während N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE einen schwächeren inhibitorischen Effekt mit einem IC_{50} von 100 – 200 μ M zeigten. Diese antiproliferativen Effekte von N1-cIDPR, N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE sollten im Weiteren an primären T-Lymphozyten untersucht werden, wobei auf Versuche mit N1-cIDP-DE verzichtet werden musste, da nicht genug Substanz für weitere Versuche zur Verfügung stand.

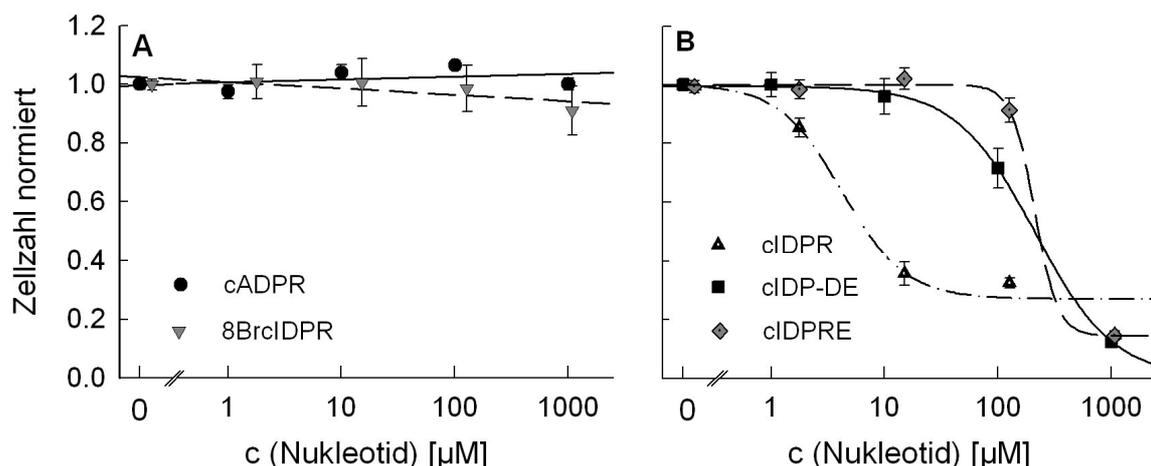


Abb. 4.16: Dosis-Wirkungskurven für Effekte von cADPR, 8-Br-N1-cIDPR, N1-cIDPR, N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE auf die Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten. T-Lymphozyten wurden mit steigenden Konzentrationen von cADPR (A), 8-Br-N1-cIDPR (A), N1-cIDPR (B), N1-cIDPRE (B) und N1-cIDP-DE (B) inkubiert. Nach 72 h wurde die Zellzahl bestimmt und gegen die Konzentration der Nukleotide aufgetragen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.E. (n= 2-3).

Der Proliferationsassay wurde mit anderen Zelllinien wiederholt (Abb. 4.17). Untersucht wurde der Einfluss von N1-cIDPR (25 μ M) auf die Proliferation von autonom wachsenden Lymphom- und Myelomzellen wie HPB.ALL (periphere T-Zell Leukämiezellen), Raji (Burkitt-Lymphomzellen), REH (B-Vorläufer Leukämiezellen), HL60 (akute myeloische Leukämiezellen), K562 (chronische myeloische Leukämiezellen) und BV173 (T/B-Vorläufer Leukämiezellen).

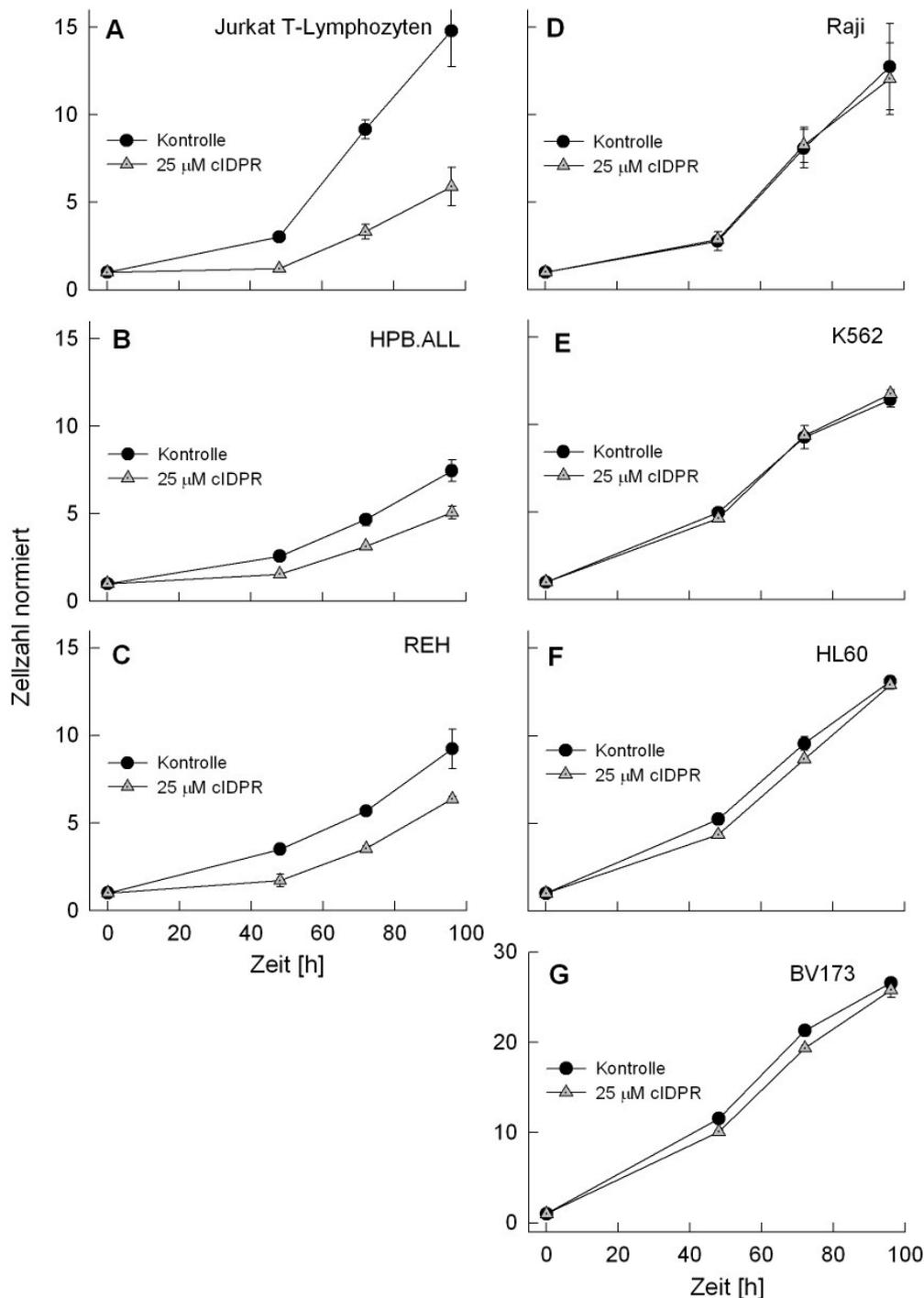


Abb. 4.17: Effekt von 25 µM M1-cIDPR auf die Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten und andere humane Lymphom- bzw. Myelomzelllinien. (A) Jurkat T-Lymphozyten, (B) HPB.ALL, (C) REH, (D) Raji, (E) K562, (F) HL60, (G) BV173 wurden mit einer Dichte von 1×10^5 /ml ausgesät und mit Wasser zur Kontrolle oder 25 µM M1-cIDPR bei 37 °C/ 5% CO₂ inkubiert. Die Zellzahl wurde nach 48, 72 und 96 h bestimmt und auf die Zellzahl zu Beginn des Experiments normiert. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. eines Versuchs.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle untersuchten Zelllinien sensitiv gegenüber M1-cIDPR waren. So hatte M1-cIDPR die stärkste inhibitorische Wirkung auf die

Proliferation der Jurkat T-Lymphozyten. Des weiteren wurde die Proliferation von HPB.ALL- und REH-Zellen inhibiert, wobei das Ausmaß der Inhibition schwächer war als bei den Jurkat T-Zellen. Bei den anderen Zelllinien konnte nur eine sehr schwache (BV173, HL60) bzw. keine Inhibition der Proliferation beobachtet werden (Raji, K562).

4.3.2 Cytokinexpression und Proliferation von primären Ratten T-Lymphozyten in Anwesenheit von *N1-cIDPR* und *N1-cIDPRE*

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden freundlicherweise von Chiara Cordiglieri (Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt.

	IFN- γ	TGF- β	IL-2	IL-2 Rezeptor	Proliferation
	[relative Kopienanzahl]				[Vermehrungsfaktor]
Kontrolle	0.0006 \pm 0.0002	0.010 \pm 0.0004	0.003 \pm 0.0002	0.032 \pm 0.025	6.41
MBP	0.0019 \pm 0.0003	0.014 \pm 0.0026	0.005 \pm 0.0011	0.046 \pm 0.020	20.34
<i>N1-cIDPR</i> / MBP	0.0015 \pm 0.0005	0.015 \pm 0.0016	0.006 \pm 0.0006	0.043 \pm 0.032	19.75
<i>cIDPRE</i> / MBP	0.0017 \pm 0.0003	0.011 \pm 0.0028	0.004 \pm 0.0020	0.058 \pm 0.036	18.13

Tabelle 4-1: Effekte von *N1-cIDPR* und *N1-cIDPRE* auf die Cytokinexpression und die Proliferation primärer Ratten T-Lymphozyten. MBP-spezifische Ratten-T-Lymphozyten wurden in Gegenwart von antigenpräsentierenden Zellen für 48 h mit 25 μ M *N1-cIDPR* oder 1 mM *N1-cIDPRE* inkubiert. Zur Bestimmung der Cytokinexpression wurde die mRNA nach 48 h präpariert und die Expression von IFN- γ , TGF- β , IL-2 und des IL-2 Rezeptors mittels quantitativer PCR bestimmt. Die Expression der Cytokine ist im Verhältnis zur Expression des „housekeeping“ Gens β -Aktin als relative Kopienzahl angegeben. Zur Bestimmung der Proliferation wurde die Zellzahl zum Zeitpunkt 0 h und nach 48-stündiger Inkubation zytofluorimetrisch bestimmt, das Ratio gebildet und in Form des Vermehrungsfaktors aufgeführt. Die Daten wurden aus 2-3 unabhängigen Experimenten erhalten und sind als Mittelwert \pm S.E. angegeben.

Für die Untersuchung des Effektes von *N1-cIDPR* und *N1-cIDPRE* auf die Cytokinexpression und auf die Proliferation von primären Ratten T-Lymphozyten wurden retroviral mit GFP transfizierte MBP-(myelin basic protein)-spezifische Ratten T-Lymphozyten ($T_{\text{MBP-GFP}}$ Zellen) zunächst für 2 h mit 25 μ M *N1-cIDPR* (*N1-cIDPR*/ MBP) oder 1 mM *N1-cIDPRE* (*cIDPRE*/ MBP) in Abwesenheit von Serum inkubiert. Nach 2 h wurden Serum und MBP-präsentierende Zellen zugesetzt und die T-Lymphozyten für weitere 48 h kultiviert. Des weiteren wurden zur Kontrolle des Effekts der Nukleotide Ratten-T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen in

Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit (MBP) des spezifischen Antigens für 48 h kultiviert.

Zur Bestimmung der Proliferation wurden die grünfluoreszierenden Ratten T-Lymphozyten nach 48 h geerntet und die Zellzahl (GFP positive Zellen) zytofluorimetrisch bestimmt. Angegeben ist die Proliferationsrate, die sich aus dem Verhältnis der Zellzahl nach 48 h und 0 h ergab. Die Untersuchung zeigte (Tabelle 4-1), dass die Inkubation der primären Ratten T-Lymphozyten mit *N1*-cIDPR und *N1*-cIDPRE nur in sehr geringem, nicht signifikanten Ausmaß zu einer Inhibition der Proliferation führte.

Die Bestimmung der Cytokinexpression erfolgte mittels quantitativer PCR. Dazu wurden die T-Lymphozyten nach 48 h geerntet, die mRNA präpariert und die Anzahl der mRNA-Kopien von IFN- γ , TGF- β , IL-2 und des IL-2 Rezeptors im Verhältnis zur Anzahl der mRNA-Kopien von β -Actin bestimmt und das sich daraus ergebende Ratio gebildet. Die Analyse der Cytokinexpression der primären Ratten T-Lymphozyten (Tabelle 4-1) ergab, dass keines der hier untersuchten Cytokine in seiner Expression durch Inkubation mit 25 μ M *N1*-cIDPR oder 1 mM *N1*-cIDPRE beeinflusst wurde.

Um auszuschließen, dass der beobachtet Unterschied des Effektes von *N1*-cIDPR und *N1*-cIDPRE auf die Proliferation von T-Lymphozyten eine Folge des Speziesunterschieds (humane T-Lymphozyten contra primäre Ratten T-Lymphozyten) war, wurde ein ähnliches Experiment unter Verwendung von humanen MBP-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Auch hier konnte kein inhibitorischer Effekt der Nukleotide (25 μ M *N1*-cIDPR, 1 mM *N1*-cIDPRE) auf die Proliferation der T-Lymphozyten beobachtet werden.

4.4 Charakterisierung des 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignals

8-Br-N1-cIDPR, das durch eine einfache Umsetzung von 8-Br-NHD mit der ADPRC von *A. californica* erhalten wurde, stellt, wie schon durch Wagner et al., 2003 beschrieben, einen membranpermeanten cADPR Agonisten dar. Das in Jurkat T-Lymphozyten durch 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

4.4.1 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignale

Zur Untersuchung des 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignals in Jurkat T-Lymphozyten wurden die Zellen mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 beladen. Die beladenen Zellen wurden auf einen Objektträger gegeben und dieser auf den Mikroskopisch des Ca^{2+} -Imaging-Systems gelegt. Während der Versuche wurden 100 - 200 Bilder der fluoreszierenden Zellen über einen Zeitraum von 10 – 15 min akquiriert und die gemessene Fluoreszenz mit Hilfe einer externen Kalibrierung in die Calciumkonzentration umgerechnet. Für die hier präsentierten Versuche wurde das 40x Objektiv des Mikroskops verwendet, so dass in einem Zellfeld gleichzeitig 15 - 25 Zellen beobachtet werden konnten. Ein charakteristischer Versuchsverlauf ist in Abbildung 4.18 gezeigt.

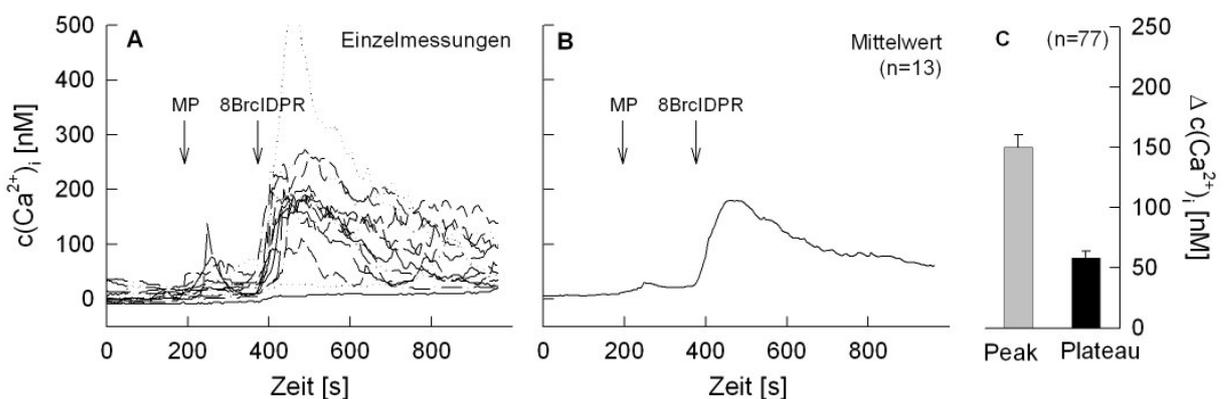


Abb. 4.18: 8-Br-N1-cIDPR vermitteltes Calciumsignal in Jurkat T-Lymphozyten. (A, B) Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Die Zeitpunkte der Puffer- und 8-Br-N1-cIDPR (1 mM) Zugaben sind durch Pfeile markiert. Dargestellt ist ein charakteristischer Versuchsverlauf eines ausgewählten Zellfeldes (13 Zellen). (C) Quantitative Auswertung der Änderung der Calciumkonzentration als Mittelwert \pm S.E. ($n_{\text{Zellen}} = 77$) für den 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Peak (350-450 s) und das Plateau (bei 800 s).

Nach Zugabe von 1 mM 8-Br-N1-cIDPR konnte ein biphasisches Calciumsignal, bestehend aus einem vorübergehenden Anstieg (Peak) direkt nach Zugabe des Nukleotids und einer langanhaltenden Erhöhung (Plateau) der Calciumkonzentration, beobachtet werden (Abb. 4.18, A, B). Die quantitative Auswertung (Abb. 4.18, C) zeigte, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration direkt nach Zugabe von 8-Br-N1-cIDPR kurzzeitig um durchschnittlich 150 nM stieg und im weiteren Verlauf auf einen Wert abfiel, der 50 nM oberhalb der Basalkonzentration lag.

Neben der Zugabe zu intakten Zellen, wurden auch Mikroinjektionsexperimente mit 8-Br-N1-cIDPR an Jurkat T-Lymphozyten durchgeführt und mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Die Versuchsverläufe sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Zur Kontrolle wurden Mikroinjektionen mit intrazellulärem Puffer (Abb. 4.19, A, B) und 100 μM cADPR (Abb. 4.19, C, D) durchgeführt. 8-Br-N1-cIDPR wurde mit einer Konzentration von 0,1 mM (Abb. 4.19, E, F), 1 mM (Abb. 4.19, G, H), 10 mM (Abb. 4.19, I, J) und 100 mM (Abb. 4.19, K, L) mikroinjiziert. Die angegebenen Konzentrationen der Injektionslösungen waren Pipettenkonzentrationen. Injiziert wurden aber nur 1 - 1,5 % des Zellvolumens, so dass die wirksame Konzentration in den Zellen 50- bis 100-fach geringer war als die angegebene Pipettenkonzentration (Guse et al., 1997b). Es konnte beobachtet werden, dass sich die Kinetik der durch cADPR und 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignale glich. Dem transienten Anstieg der Calciumkonzentration, der direkt nach Injektion zu sehen war, folgte ein Absinken der Calciumkonzentration auf einen Wert oberhalb des Basalwertes. Während der Verlauf des cADPR und des 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignals sehr ähnlich war, unterschied sich jedoch die Höhe des Signals bei gleicher Nukleotidkonzentration. So ergab sich bei Verwendung einer 100 μM cADPR Lösung (Abb. 4.19, D) durchschnittlich ein Anstieg der Calciumkonzentration auf 320 nM, während mit einer 100 μM 8-Br-N1-cIDPR Lösung (Abb. 4.19, F) die Calciumkonzentration nur auf einen Wert von 125 nM stieg.

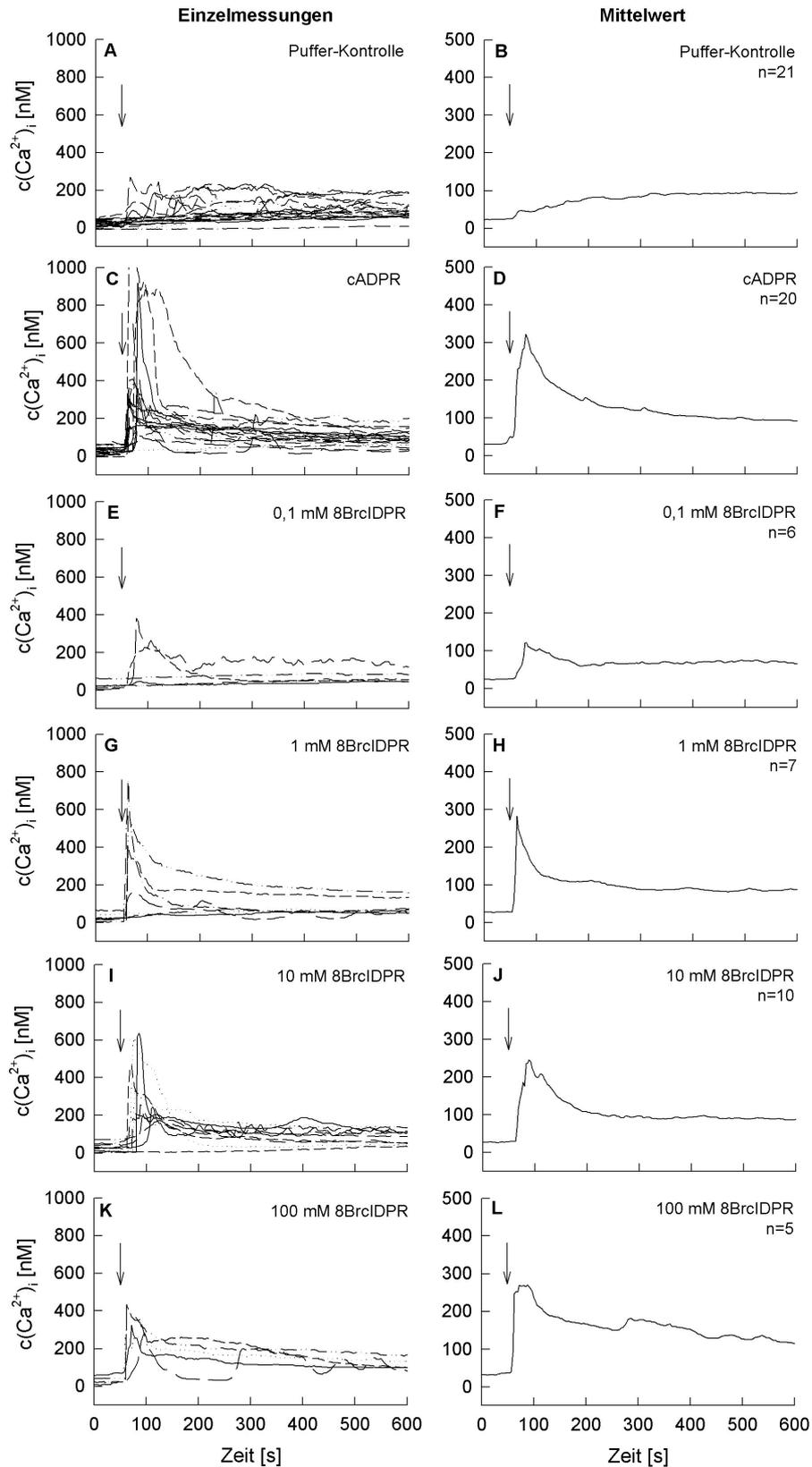


Abb. 4.19: Mikroinjektion von 8-Br-N1-clDPR an Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal nach Mikroinjektion mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Es wurde intrazellulärer Puffer (A, B) als Negativkontrolle, 100 μM cADPR (C, D) als Positivkontrolle und 8-Br-N1-clDPR mit 0,1 mM (E, F), 1 mM (G, H), 10 mM (I, J) und 100 mM (K, L) mikroinjiziert. Der Zeitpunkt der Injektion ist durch einen Pfeil markiert.

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Höhe des Calciumsignals dosisabhängig war (Abb. 4.20). So nahm mit steigender 8-Br-N1-cIDPR Konzentration auch die Höhe des Calciumsignals zu und ging ab einer Konzentration von 1 mM 8-Br-N1-cIDPR in die Sättigung über.

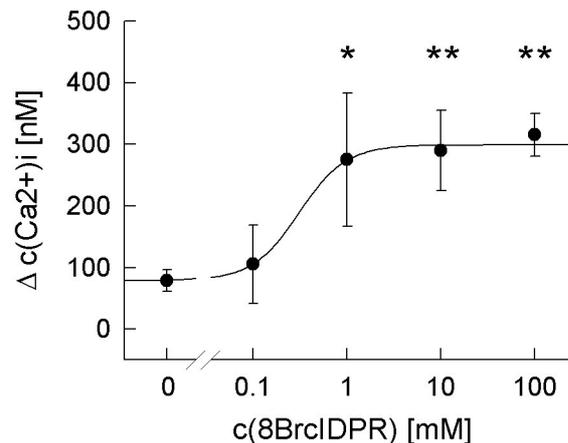


Abb. 4.20: Dosis-Wirkungskurve der Mikroinjektion von 8-Br-N1-cIDPR an Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal nach Mikroinjektion von 8-Br-N1-cIDPR mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Dargestellt ist die Höhe des Calciumsignals (Peak) der einzelnen Messungen als Mittelwert \pm S.E. ($n=5-21$) in Abhängigkeit von der 8-Br-N1-cIDPR Konzentration. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ (t-Test).

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung des 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignals besteht in der getrennten Betrachtung von Calciumfreisetzung und Calciumeinstrom. Diese Art der Betrachtung wird durch Verwendung des sogenannten „Calcium free/ Calcium readdition“-Protokolls ermöglicht. Dieses Protokoll besteht aus zwei Teilen, wobei im ersten Teil den Zellen kein extrazelluläres Calcium zur Verfügung steht, so dass in diesem Teil des Protokolls nur die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern beobachtet werden kann. Im zweiten Teil wird extrazelluläres Calcium zugesetzt, so dass nun der Calciumeinstrom verfolgt werden kann.

Für die nachfolgend gezeigten Experimente wurden Jurkat T-Lymphozyten mit Fura-2 beladen, in nominell calciumfreien Puffer aufgenommen und mittels Ca^{2+} -Imaging unter Verwendung des „Calcium free/ Calcium readdition“-Protokolls untersucht. Wie in Abbildung 4.21 A und B gezeigt, führte die Zugabe von 1 mM 8-Br-N1-cIDPR in der calciumfreien Phase des Protokolls ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}=0$ mM) zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Nach Rückgang der cytosolischen

Calciumkonzentration auf den Basalwert wurde die $[Ca^{2+}]_{ex}$ auf 1 mM erhöht und es konnte ein starkes transientes Calciumsignal, gefolgt von einer Plateauphase mit erhöhter Calciumkonzentration in Folge des Calciumeinstroms, beobachtet werden. In Abbildung 4.21 C und D ist beispielhaft der Verlauf eines Kontrollversuchs gezeigt, wobei Messpuffer an Stelle von 8-Br-N1-cIDPR während der calciumfreien Phase zugegeben wurde. Es konnte nur eine schwache Reaktion weniger Zellen nach Zugabe des Puffers als auch des Calciumchlorids beobachtet werden.

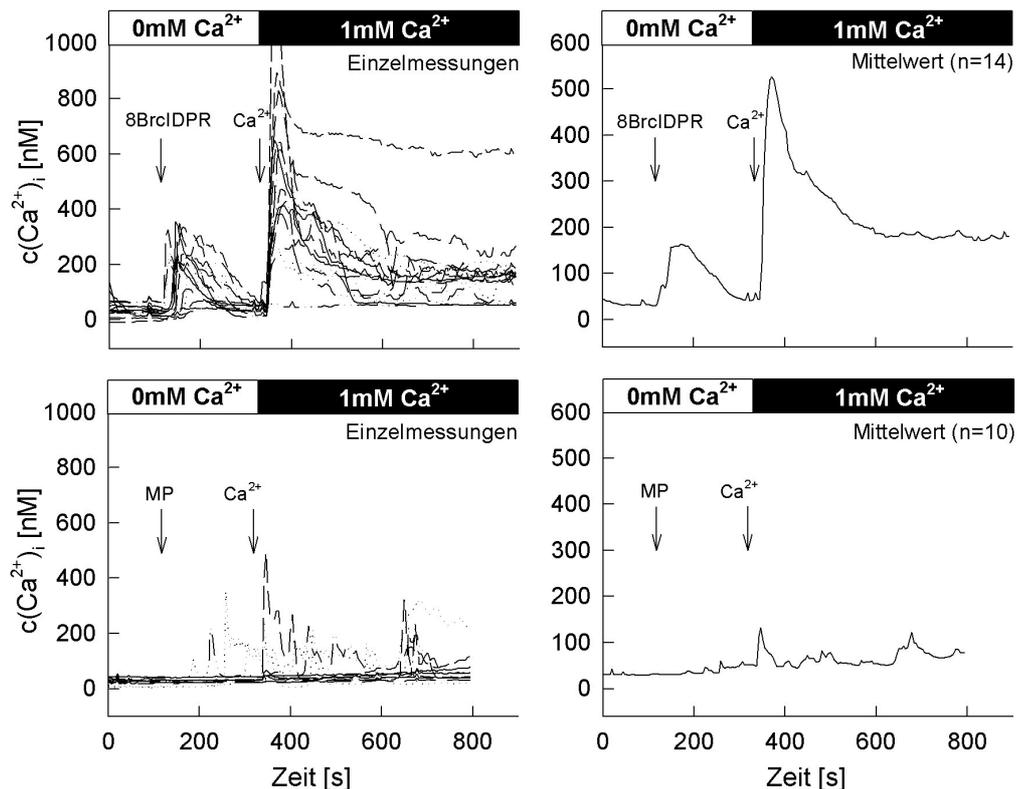


Abb. 4.21: Einfluss von 8-Br-N1-cIDPR auf die Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom von Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. (A, B) Im ersten Teil des Experiments wurde die Calciumfreisetzung beobachtet. Dazu wurden die Zellen in nominell calciumfreien Puffer aufgenommen und 1 mM 8-Br-N1-cIDPR zugeben. Im zweiten Teil des Experiments wurde durch Zugabe von 1 mM $CaCl_2$ der Calciumeinstrom beobachtet. (C, D). Zur Kontrolle wurde Messpuffer (MP) an Stelle von 8-Br-N1-cIDPR zugegeben. Die Zeitpunkte der Zugaben sind durch Pfeile gekennzeichnet. Abgebildet sind repräsentative Versuchsverläufe aller Zellen eines ausgewählten Zellfeldes.

Die quantitative Auswertung (Abb. 4.22) dieser Messungen zeigte deutlich, dass 8-Br-N1-cIDPR zu einer Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern führte und den daraus resultierenden Einstrom aus dem extrazellulären Raum vermittelte. Es konnte aber auch beobachtet werden, dass es bei Versuchen mit Messpuffer (MP) an Stelle von 8-Br-N1-cIDPR zu einem Einstrom von Calcium aus

dem extrazellulär Raum kam. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass die Calciumkonzentration im Lumen des ER während der Phase der Zellen in dem nominell calciumfreien Messpuffer abnimmt, und es so über den oben beschriebenen Mechanismus des kapazitiven Calciumeinstroms zu einem leichten Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von CaCl_2 kam.

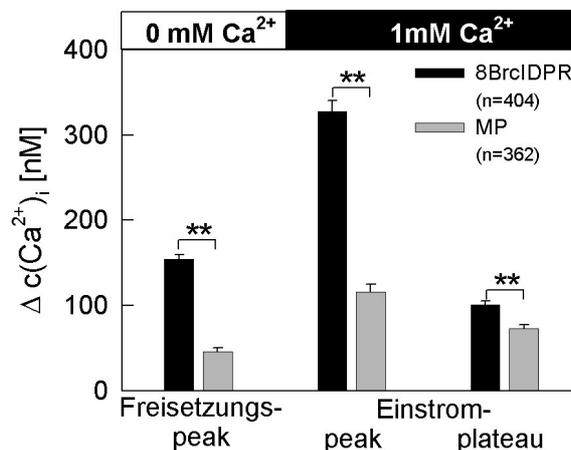


Abb. 4.22: Einfluss von 8-Br-N1-cIDPR auf die Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom von Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Gezeigt ist die Höhe der Calciumfreisetzung nach Zugabe von 8-Br-N1-cIDPR vs. Messpuffer (MP) (Freisetzungspike, 100 - 200 s) und des Calciumeinstroms direkt nach Zugabe von CaCl_2 (Einstromspike, 300 – 450 s) und bei 800 s (Einstromplateau) von einzelnen Zellen als Mittelwert \pm S.E. (n=362-404). * P < 0,01; ** P < 0,001 (t-Test).

Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass 8-Br-N1-cIDPR ein membranpermeanter cADPR Agonist ist, der sowohl durch Zugabe ins extrazelluläre Medium als auch durch Mikroinjektionen ein Calciumsignal hervorrief und dass dieses Signal aus Calciumfreisetzung und Einstrom bestand.

4.4.2 Mechanismus des 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignals

Das an Jurkat T-Lymphozyten durch 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal sollte in weiteren Versuchen mittels Ca^{2+} -Imaging näher charakterisiert werden. Diese Untersuchungen wurden in Gegenwart pharmakologischer Inhibitoren mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten oder unter Verwendung des schon beschriebenen „Calcium free/Calcium readdition“-Protokolls durchgeführt. Als Inhibitoren wurden Ruthenium Rot, GdCl_3 , SKF-96365 und 8-Br-cADPR verwendet. Während Ruthenium Rot den Ryanodinrezeptor und damit die Calciumfreisetzung hemmt, inhibieren GdCl_3 und SKF-96365 den Calciumeinstrom. 8-Br-cADPR ist ein

kompetitiver cADPR Antagonist und blockiert die Bindung von cADPR an seinen Bindestellen.

Zunächst soll hier das aktuelle Model für die Wirkungsweise von cADPR kurz wiederholt dargestellt werden. Wie einleitend schon beschrieben, vermittelt cADPR das Calciumsignal u.a. durch Bindung an den Ryanodinrezeptor (RyR), der sich darauf hin öffnet und Calcium aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) entlässt. Dies hat den Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration zur Folge und führt zur Öffnung weiterer benachbarter RyR. Dieser Prozess wird auch als Calcium induzierter Calcium-Release (CICR) bezeichnet. Aufgrund des Ausstroms von Calcium aus dem Lumen des ER fällt dort die Calciumkonzentration ab und es kommt durch Vermittlung des im ER befindlichen Calciumsensors STIM1 zur Öffnung von calciumpermeablen CRAC/Orai1-Kanälen in der Plasmamembran, und so zum Einstrom von Calcium und zum weiteren Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration (Feske et al., 2006; Liou et al., 2005). Dieser Vorgang wird auch als kapazitativer Calciumeinstrom bezeichnet. cADPR kann den Calciumeinstrom aber auch noch über einen anderen Weg vermitteln. Hierbei bindet cADPR an den Kationenkanal TRPM2, der für Natrium und Calcium permeabel ist. Die Bindung von cADPR führt zur Erhöhung der Sensitivität von TRPM2 gegenüber seinem Agonisten ADPR, so dass TRPM2 schon bei niedrigeren ADPR-Konzentrationen aktiviert wird und es zum Einstrom von Natrium und Calcium kommt (Kolisek et al., 2005).

Es sollte nun überprüft werden, ob dass von 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal durch Aktivierung des RyR ausgelöst wurde. Da kein membranpermeanter RyR-Inhibitor zur Verfügung steht, wurden Mikroinjektionsversuche durchgeführt. Als Inhibitor des RyR wurde Ruthenium Rot verwendet und gemeinsam mit 8-Br-N1-cIDPR coinjiziert. Für die Mikroinjektionen wurde Intrazellulärpuffer, 1 mM 8-Br-N1-cIDPR oder eine Mischung aus 1 mM 8-Br-N1-cIDPR und 10 μ M Ruthenium Rot verwendet (Abb. 4.23). Es konnte gezeigt werden, dass das 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal, aus einem transientem Anstieg der Calciumkonzentration (Peak) und dem anschließenden Abfall auf einen Wert oberhalb der Basallinie (Plateau) durch Coinjektion mit Ruthenium Rot im Bereich des Peaks partiell vermindert, und im Bereich des Plateaus komplett inhibiert war.

Die quantitative Auswertung (Abb. 4.23, B) zeigte eine Verminderung des 8-Br-N1-clDPR vermittelten Calciumsignals durch die Coinjektion mit Ruthenium Rot im Bereich des Peaks von ca. 50 %, während im Bereich des Plateaus das Calciumsignal auf den Wert der Negativkontrolle vermindert war.

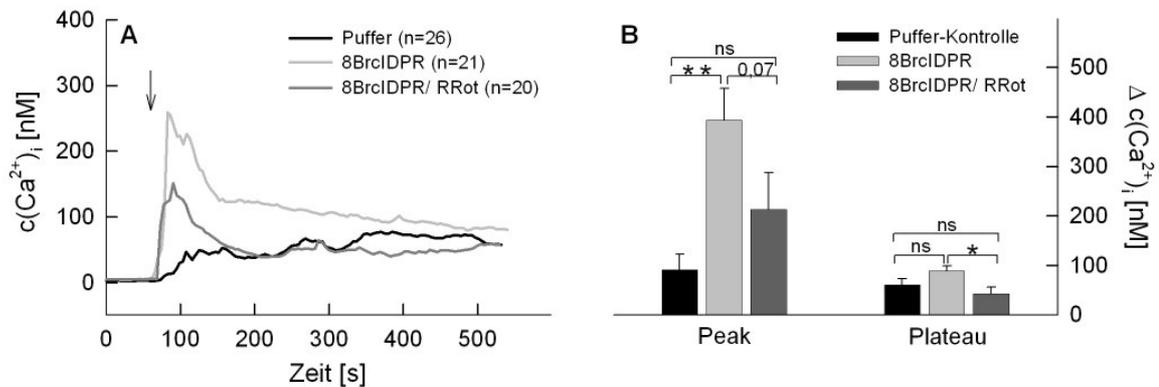


Abb. 4.23: Einfluss von Ruthenium Rot auf das 8-Br-N1-clDPR vermittelte Calciumsignal in Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal nach Mikroinjektion von Intrazellulärpuffer (Puffer-Kontrolle, n=26), 1 mM 8-Br-N1-clDPR (8-Br-N1-clDPR, n=21) oder einer 8-Br-N1-clDPR/ Ruthenium Rot-Mischung (8BrclDPR/ RuthRot, n=20) mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. (A) Gezeigt sind gemittelte Versuchsverläufe. Der Zeitpunkt der Injektion ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (B) Dargestellt ist die Änderung der Calciumkonzentration bei 50-150 s (Peak) und bei 500 s (Plateau) der einzelnen Messungen als Mittelwert \pm S.E. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ (t-Test).

Alle nachfolgenden Untersuchungen wurden unter Verwendung des „Calcium free/ Calcium readdition“-Protokolls durchgeführt. Zunächst werden die Ergebnisse gezeigt, die in Anwesenheit von GdCl_3 , einem Inhibitor des kapazitiven Calciumeinstroms, erhalten wurden. Die Jurkat T-Lymphozyten wurden mit GdCl_3 vorinkubiert und in nominell calciumfreien, GdCl_3 -haltigem Puffer aufgenommen und mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht (Abb. 4.24, E, F). Zur Kontrolle wurden die Versuche auch in Abwesenheit von GdCl_3 mit Messpuffer (Abb. 4.24, A, B) oder 8-Br-N1-clDPR (Abb. 4.24, C, D) durchgeführt. Wie in Abbildung 4.24 E und F dargestellt, führte in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ GdCl_3 (Gd^{3+}) die Zugabe von 1 mM 8-Br-N1-clDPR in der calciumfreien Phase ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}} = 0 \text{ mM}$) zu einer starken Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, während nach Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ auf 1 mM nur ein schwacher transients Calciumeinstrom beobachtet werden konnte. Ein Vergleich der Versuchsverläufe zeigte, dass die 8-Br-N1-clDPR vermittelte Calciumfreisetzung in Anwesenheit von GdCl_3 erhöht, der Calciumeinstrom hingegen signifikant vermindert war.

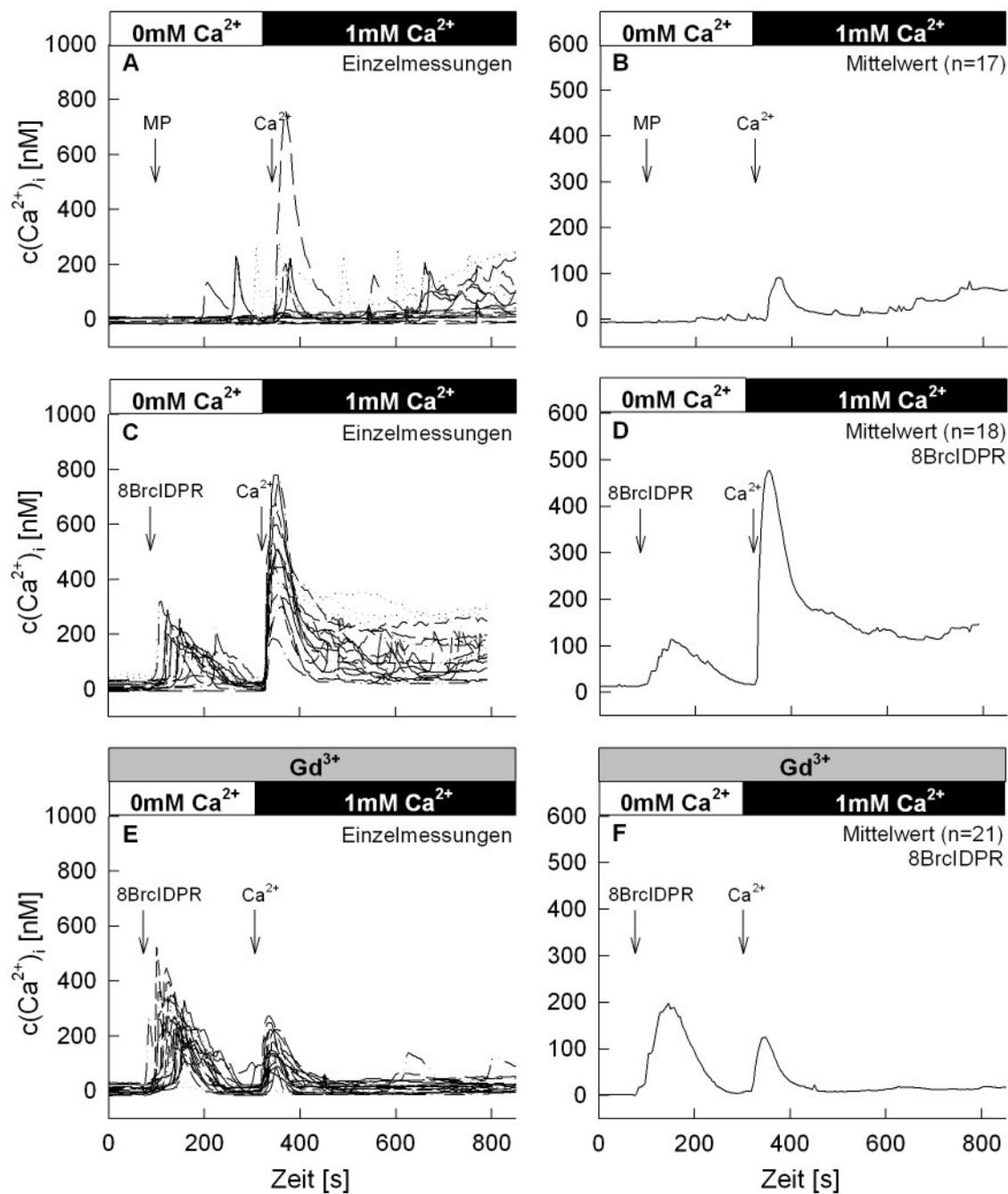


Abb. 4.24: Einfluss von Gd^{3+} auf die 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumfreisetzung und Calciumeinstrom von Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Die Zellen wurden im ersten Teil des Experiments in nominell calciumfreien Puffer aufgenommen und 1 mM 8-Br-N1-cIDPR (A-B, E-F) oder Messpuffer (MP) (C, D) zugeben. Dann wurde 1 mM $CaCl_2$ zugegeben. (E, F) Die Zellen wurden zur Inhibition des kapazitiven Calciumeinstroms mit 25 μM $GdCl_3$ vorinkubiert. Die Zeitpunkte der Zugaben sind durch Pfeile gekennzeichnet. Gezeigt sind charakteristische Versuchsverläufe.

Der Effekt von $GdCl_3$ auf das 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal wurde besonders bei der Betrachtung der quantitativen Auswertung (Abb. 4.25) deutlich. Während der Freisetzungsspeak in Abwesenheit von $GdCl_3$ einen Wert 140 nM (Ca^{2+})_i

annahme, betrug er in Gegenwart von GdCl_3 220 nM (Ca^{2+})_i. Die starke Verminderung des Einstrompeaks durch GdCl_3 bestätigte die Vermutung, dass der 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumeinstrom auf kapazitivem Wege erfolgte. Die Inhibition des Calciumeinstroms durch GdCl_3 war auch in der Plateauphase deutlich zu erkennen.

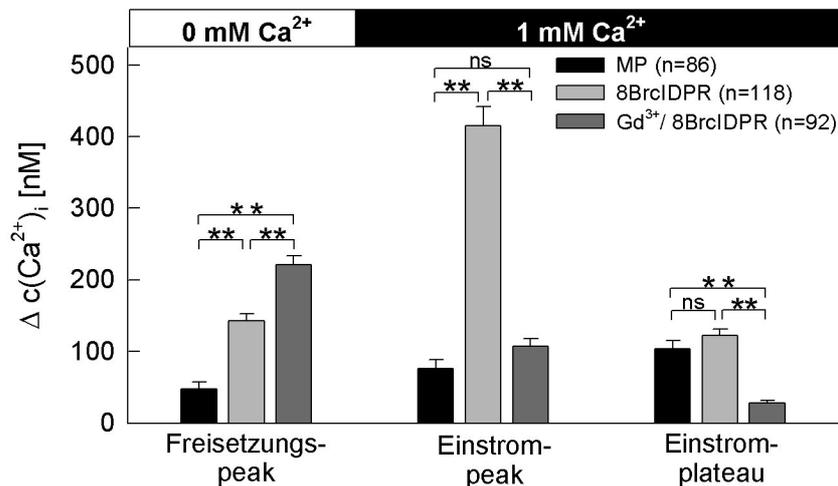


Abb. 4.25: Einfluss von Gd^{3+} auf 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumfreisetzung und Calciumeinstrom von Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Gezeigt ist Ausmaß der Calciumfreisetzung nach Zugabe von Messpuffer (MP), 1 mM 8-Br-N1-cIDPR oder 8-Br-N1-cIDPR in Anwesenheit von 25 μM Gd^{3+} (Freisetzungspike, 100 - 200 s) und des Calciumeinstroms direkt nach Zugabe von CaCl_2 (Einstrompeak, 300 – 450 s) und bei 750 s (Einstromplateau) von einzelnen Messungen als Mittelwert \pm S.E. (n=86-118). ** P < 0,001 (t-Test).

Im Folgenden sind die Ergebnisse gezeigt, die in Anwesenheit von SKF-96365, einem Inhibitor des Calciumeinstroms, erhalten wurden. Die beladenen Jurkat T-Lymphozyten wurden mit 30 μM SKF-96365 vorinkubiert und in nominell calciumfreien, SKF-96365-haltigem Messpuffer aufgenommen und mittels Ca^{2+} -Imaging unter Verwendung des „Calcium free/ Calcium readdition“-Protokolls untersucht (Abb. 4.26, E, F). Zur Kontrolle wurden die Versuche auch in Abwesenheit von SKF-96365 mit 8-Br-N1-cIDPR (Abb. 4.26, C, D) oder Messpuffer (Abb. 4.26, A, B) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass SKF-96365 keinen Einfluss auf die Calciumfreisetzung hatte, denn sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von SKF-96365 (SKF) führte die Zugabe von 1 mM 8-Br-N1-cIDPR in der calciumfreien Phase ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}} = 0 \text{ mM}$) zu einem starken, transienten Anstieg der Calciumkonzentration.

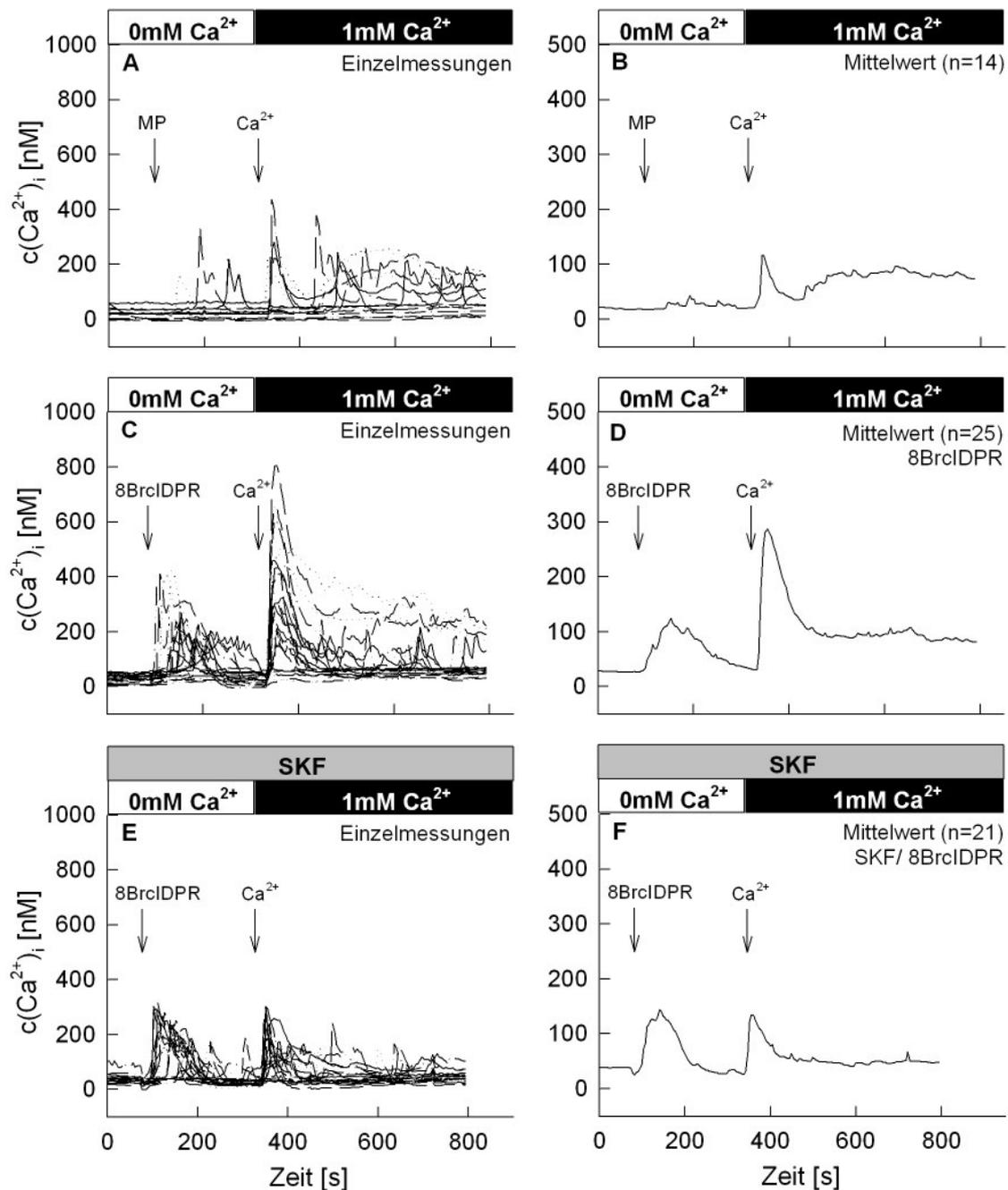


Abb. 4.26: Einfluss von SKF-96365 auf die 8-Br-M1-clDPR vermittelte Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom von Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Die Zellen wurden im ersten Teil des Experiments in nominell calciumfreien Puffer aufgenommen und mit 1 mM 8-Br-M1-clDPR (A-B, E-F) oder Messpuffer (MP) (C, D) versetzt. Dann wurde 1 mM CaCl_2 zugegeben. (E, F) Die Zellen wurden zur Inhibition des Calciumeinstroms mit 30 μM SKF-96365 (SKF) vorinkubiert. Die eingezeichneten Pfeile markieren die Zugabezeitpunkte. Es sind repräsentative Versuchsverläufe dargestellt.

Es konnte aber der für SKF-96365 beschriebene inhibitorische Effekt auf den Calciumeinstrom beobachtet werden (Guse et al., 1997b). Während die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ auf 1 mM in Anwesenheit von SKF-96365 (Abb. 4.26, E, F) nur einen

geringen, vorübergehenden Calciumeinstrom zur Folge hatte, konnte in Abwesenheit von SKF-96365 (Abb. 4.26, C, D) ein starker, transienter Calciumeinstrom, sowie eine darauf folgende Erhöhung der basalen Calciumkonzentration im Bereich der Plateauphase beobachtet werden. Der hier beschriebene Effekt von SKF-96365 auf das von 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal ist auch in der quantitativen Auswertung (Abb. 4.27) deutlich zu erkennen.

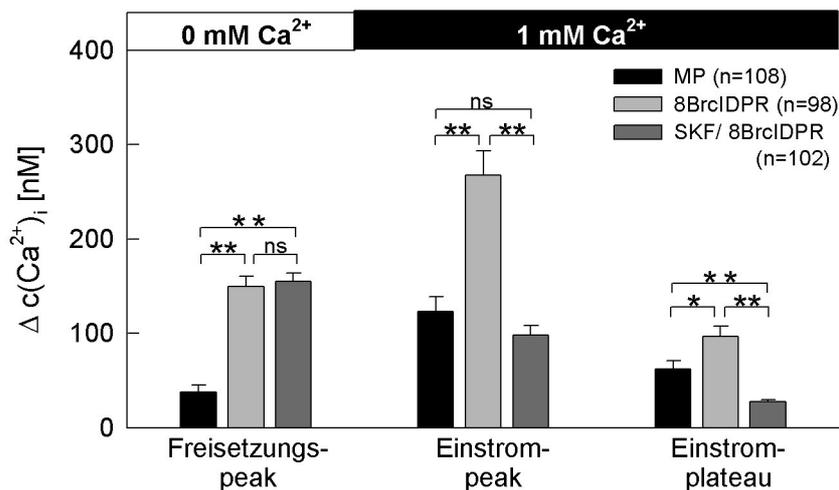


Abb. 4.27: Einfluss von SKF-96365 auf die 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom von Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal mittels Ca²⁺-Imaging untersucht. Dargestellt ist Höhe der Calciumfreisetzung nach Zugabe von Messpuffer (MP), 1 mM 8-Br-N1-cIDPR oder 8-Br-N1-cIDPR in Anwesenheit von 30 μM SKF-96365 (SKF) (Freisetzungspike, 100 - 200 s) und des Calciumeinstroms direkt nach Zugabe von CaCl₂ (Einstromspike, 300 - 450 s) und bei 750 s (Einstromplateau) von einzelnen Messungen als Mittelwert ± S.E. (n=98-108). * P < 0,01, ** P < 0,001 (t-Test).

Abschließend sind die Ergebnisse gezeigt, die in Anwesenheit von 8-Br-cADPR, einem cADPR-Antagonisten, erhalten wurden. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit 500 μM 8-Br-cADPR vorinkubiert, in nominell calciumfreien, 8-Br-cADPR enthaltenden Messpuffer aufgenommen und mittels Ca²⁺-Imaging unter Verwendung des „Calcium free/ Calcium readdition“-Protokolls untersucht (Abb. 4.28, E, F). Die Experimente wurden zur Kontrolle auch in Abwesenheit von 8-Br-cADPR mit Messpuffer (Abb. 4.28, A, B) oder 8-Br-N1-cIDPR (Abb. 4.28, C, D) durchgeführt.

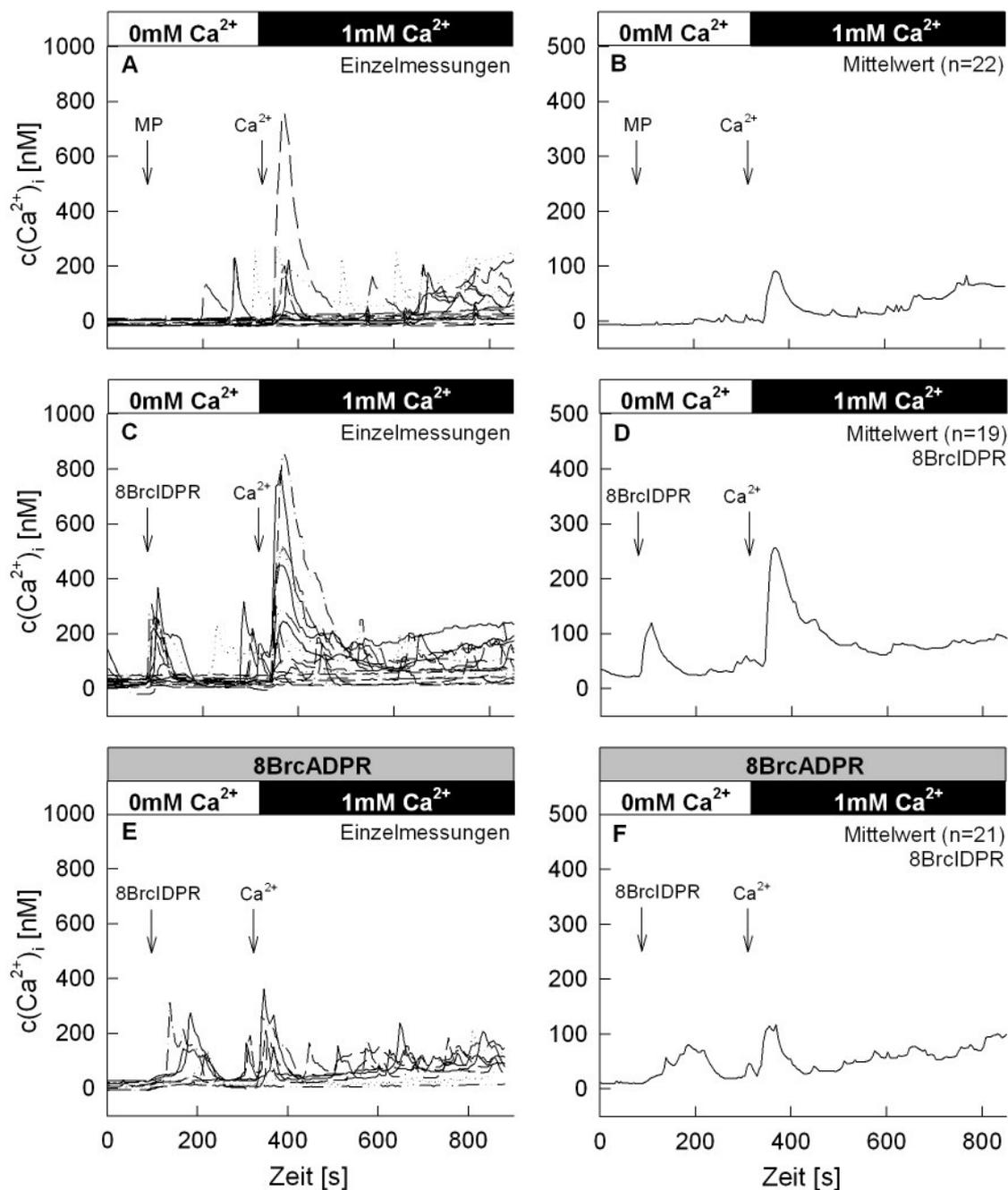


Abb. 4.28: Einfluss von 8Br-cADPR auf die 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom in Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Im ersten Abschnitt des Experiments wurden die Zellen in nominell calciumfreien Puffer aufgenommen und mit 1 mM 8-Br-N1-cIDPR (A-B, E-F) oder Messpuffer (MP) (C, D) versetzt. Dann wurde 1 mM CaCl_2 zugegeben. (E, F) Die Zellen wurden mit 500 μM 8-Br-cADPR vorinkubiert. Die Zeitpunkte der Zugaben sind durch Pfeile gekennzeichnet. Gezeigt sind charakteristische Versuchsverläufe.

Es konnte gezeigt werden, dass 8-Br-cADPR nur einen schwachen, nicht signifikanten inhibitorischen Effekt auf die 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumfreisetzung hat. Denn die Gabe von 8-Br-N1-cIDPR in der calciumfreien

Phase führte in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von 8-Br-cADPR zu einem transienten Anstieg der Calciumkonzentration. Allerdings konnte ein inhibitorischer Effekt von 8-Br-cADPR auf den Einstrom von Calcium beobachtet werden. Nach Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{ex}$ war der Calciumeinstrompeak in Anwesenheit von 8-Br-cADPR im Gegensatz zur Positivkontrolle signifikant vermindert. Der Einfluss von 8Br-cADPR auf das von 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal ist in der quantitativen Auswertung (Abb. 4.29) deutlich zu erkennen.

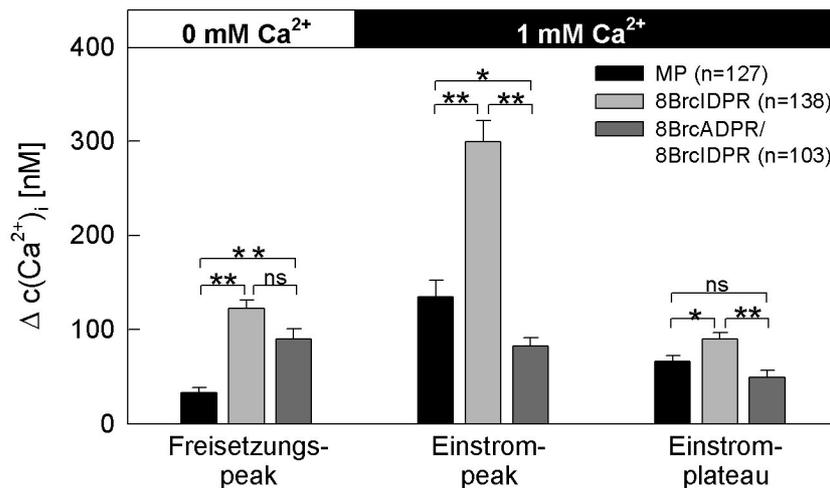


Abb. 4.29: Einfluss von 8-Br-cADPR auf die 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom in Jurkat T-Lymphozyten. Jurkat T-Lymphozyten wurden mit Fura-2 beladen und das Calciumsignal mittels Ca^{2+} -Imaging untersucht. Dargestellt ist die Höhe der Calciumfreisetzung nach Zugabe von Messpuffer (MP), 1 mM 8-Br-N1-cIDPR oder 8-Br-N1-cIDPR in Anwesenheit von 500 μ M 8Br-cADPR (Freisetzungspike, 100 - 250 s) und des Calciumeinstroms direkt nach Zugabe von $CaCl_2$ (Einstromspike, 300 – 450 s) und bei 750 s (Einstromplateau) von einzelnen Messungen als Mittelwert \pm S.E. (n=98-108). * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ (t-Test).

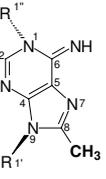
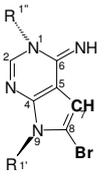
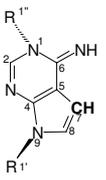
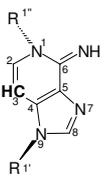
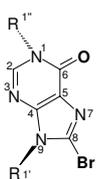
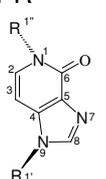
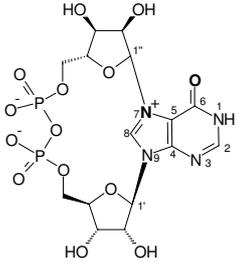
Der beobachtete inhibitorische Effekt von 8-Br-cADPR auf das 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal wurde so nicht erwartet. Es wurde vielmehr angenommen, dass 8-Br-cADPR als cADPR Antagonist die Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern inhibieren und somit auch zu einer Verminderung des kapazitiven Calciumeinstroms führen würde.

5 Diskussion

5.1 Synthesestrategien für cADPR-Derivate

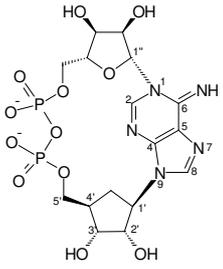
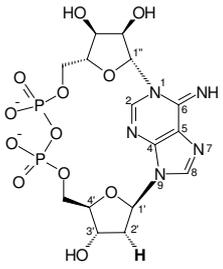
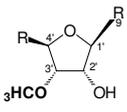
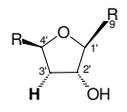
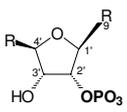
cADPR stellt in vielen Zelltypen und Organismen einen endogenen Ca^{2+} -mobilisierenden second Messenger dar, der im Zusammenspiel mit IP_3 und NAADP die cytosolische Calciumkonzentration und so viele zelluläre Prozesse, wie z.B. Proliferation, reguliert. Zur Erforschung des cADPR vermittelten Calciumsignals sowie der Struktur-Wirkbeziehung wurde bereits eine Vielzahl von cADPR Analoga synthetisiert, von denen einige in der nachfolgenden Tabelle 5-1 aufgeführt sind.

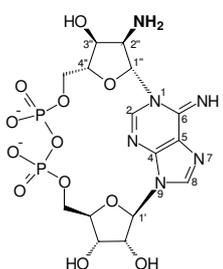
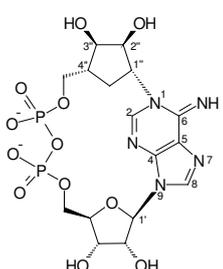
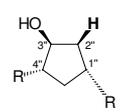
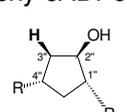
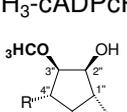
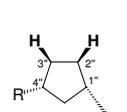
Analogon	Eigenschaften	Getestet an	Synthese	Literatur
Adenin modifizierte Analoga				
8-NH ₂ -cADPR 	potenter Antagonist	SIE, TZ, RHM	Chemo- enzymatische Synthese	Burdakov et al., 2001; Cancela & Petersen, 1998; Guse et al., 1995a; Guse et al., 1999; Walseth & Lee, 1993
8-N ₃ -cADPR 	Antagonist	SIE	Chemo- enzymatische Synthese	Walseth & Lee, 1993
8-Br-cADPR 	Antagonist, membranpermeant	SIE, TZ, RHM	Chemo- enzymatische Synthese	Guse et al., 1995a; Partida-Sánchez et al., 2001; Sethi et al., 1997; Walseth & Lee, 1993; Kolisek et al., 2005
8-OCH ₃ -cADPR 	Antagonist	TZ	Chemo- enzymatische Synthese	Guse et al., 1999

Analogon	Eigenschaften	Getestet an	Synthese	Literatur
8-CH ₃ -cADPR 	Antagonist	TZ	Chemo-enzymatische Synthese	Guse et al., 1997a
7-Deaza-8-Br-cADPR 	Antagonist, membranpermeant, hydrolysestabil	SIE, TZ	Chemo-enzymatische Synthese	Guse et al., 1999; Schöttelndreier et al., 2001; Sethi et al., 1997
7-Deaza-cADPR 	partieller Agonist hydrolysestabil	SIE	Chemo-enzymatische Synthese	Bailey et al., 1997
3-Deaza-cADPR 	potenter Agonist, hydrolysestabil	SIE	Chemo-enzymatische Synthese	Podestà et al., 2000; Wong et al., 1999
8-Br-N1-cIDPR 	Agonist, membranpermeant, hydrolysestabil	TZ	Chemo-enzymatische Synthese	Wagner et al., 2003
N1-cIDPR 	Agonist, hydrolysestabil	TZ	Chemo-enzymatische Synthese	Wagner et al., 2005
N7-cIDPR 	ohne Effekt	SIE	Chemo-enzymatische Synthese	Graeff et al., 1996

Analogon	Eigenschaften	Getestet an	Synthese	Literatur
N7-cGDPR 	ohne Effekt	SIE	Chemo-enzymatische Synthese	Graeff et al., 1994

südliche Ribose modifizierte Analoga

cArisDPR 	Agonist, hydrolysestabil	SIE, TZ	Chemo-enzymatische Synthese	Bailey et al., 1996; Guse et al., 2002
2'-Deoxy-cADPR 	Agonist	SIE (nicht in TZ)	Chemo-enzymatische Synthese	Ashamu et al., 1997
3'-OCH ₃ -cADPR 	Antagonist	SIE	Chemo-enzymatische Synthese	Ashamu et al., 1997
3'-Deoxy-cADPR 	ohne Effekt	SIE	Chemo-enzymatische Synthese	Ashamu et al., 1997
2'-Phospho-cADPR 	Agonist	TZ, RHM, (nicht in SIE)	Chemo-enzymatische Synthese	Aarhus et al., 1995; Guse et al., 1997a; Vu et al., 1996

Analogon	Eigenschaften	Getestet an	Synthese	Literatur
nördliche Ribose modifizierte Analoga				
2''-NH ₂ -cADPR 	Agonist, hydrolysestabil	TZ	Chemo- enzymatische Synthese	Cakir-Kiefer et al., 2001 ; Guse et al., 2002
cADPcR 	Agonist, hydrolysestabil	SIE, TZ (schwach)	chemische Synthese	Guse et al., 2002; Shuto et al., 2001; Shuto et al., 2003
2''-Deoxy-cADPcR 	Agonist, hydrolysestabil	SIE (schwach), TZ	chemische Synthese	Kudoh et al., 2005
3''-Deoxy-cADPcR 	Agonist, hydrolysestabil	SIE, TZ (schwach)	chemische Synthese	Kudoh et al., 2005
3''-OCH ₃ -cADPcR 	Agonist, hydrolysestabil	SIE, TZ (schwach)	chemische Synthese	Kudoh et al., 2005
2''-,3''-Dideoxy- cADPcR 	Agonist, hydrolysestabil	SIE (schwach), TZ	chemische Synthese	Kudoh et al., 2005
2''-,3''-Dideoxy- dideohydro-cADPcR 	Agonist, hydrolysestabil	SIE (schwach), TZ	chemische Synthese	Kudoh et al., 2005

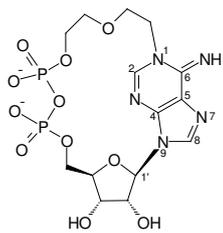
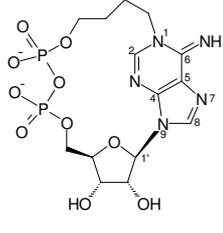
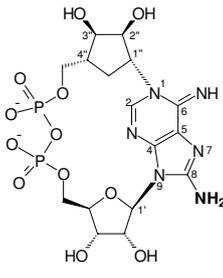
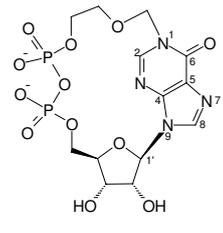
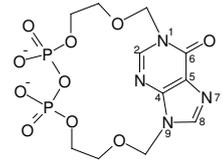
Analogon	Eigenschaften	Getestet an	Synthese	Literatur
cADPRE 	Agonist (schwach), membranpermeant, evtl. hydrolysestabil	TZ	chemische Synthese	Xu et al., 2006
cADPRE-Derivate mit C4-Alkylkette 	Agonist (schwach), membranpermeant, evtl. hydrolysestabil	TZ	chemische Synthese	Xu et al., 2006
mehrfach modifizierte Analoga				
8-NH ₂ -cADPcR 	Agonist, hydrolysestabil	SIE, TZ	chemische Synthese	Guse et al., 2002; Shuto et al., 2003
cidPRE 	Agonist, membranpermeant, hydrolysestabil	TZ	chemische Synthese	Gu et al., 2004; Kunerth et al., 2004
cidP-DE 	Agonist, membranpermeant, hydrolysestabil	TZ	chemische Synthese	Guse et al., 2005

Tabelle 5-1: Strukturmerkmale und Eigenschaften von cADPR Analoga. Mit SIE: Seeigeleihomogenat; TZ: T-Zellen; RHM: Rattenhirn Microsomen (nach Potter & Walseth, 2004).

Die Synthese von cADPR Analoga kann über zwei Wege erfolgen: entweder mittels eines chemo-enzymatischen Ansatzes oder durch eine, meist vielstufige, chemische Totalsynthese.

Die erste Generation von cADPR Analoga wurde mit Hilfe des chemo-enzymatischen Ansatzes synthetisiert, wobei die breite Substratspezifität der ADPRC von *A. californica* genutzt wurde (Lee & Aarhus, 1991; Walseth & Lee, 1993). Bei dieser Strategie wurden zunächst NAD Analoga chemisch oder enzymatisch synthetisiert und dann mit der ADPRC von *A. californica* zu cADPR Analoga umgesetzt (Abb. 5.1).

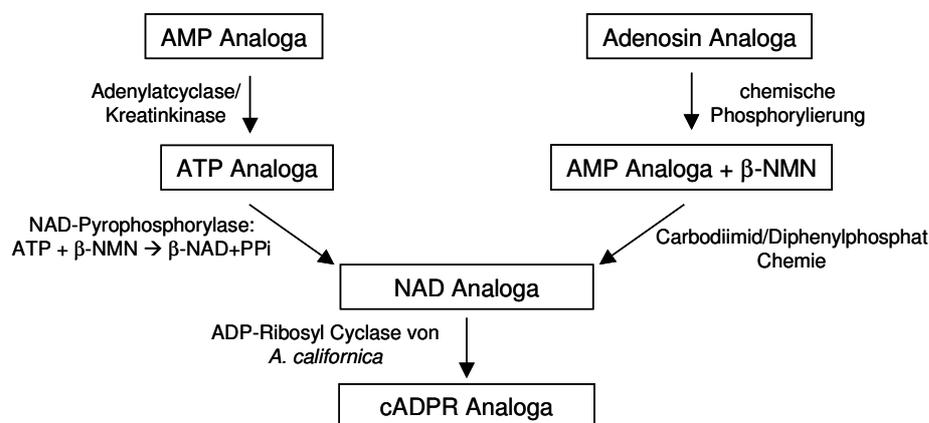


Abb. 5.1: Schema der chemo-enzymatischen Synthesestrategie für cADPR Analoga

Die chemische Synthese von NAD Analoga erfolgte durch Kopplung des korrespondierenden AMP Analoga mit β -NMN (Nicotinamid-Mononukleotid) unter Verwendung der Carbodiimid (Walseth & Lee, 1993; Ashamu et al., 1997) oder Diphenylphosphat-Chemie (Bailey et al., 1996; Bailey et al., 1997). Die für die Kopplungsreaktion eingesetzten AMP Analoga wurden durch chemische Phosphorylierung der entsprechenden Adenosin Analoga synthetisiert (Bailey et al., 1996; Bailey et al., 1997; Wong et al., 1999). NAD Analoga wurden des weiteren aus entsprechenden ATP Analoga durch Umsetzung mit einer NAD-Pyrophosphorylase, die unter Abspaltung von Pyrophosphat β -NMN auf ATP überträgt, erhalten (Wong et al., 1999). Die dafür benötigten ATP Analoga wurden zum Teil enzymatisch aus den korrespondierenden AMP Analoga durch die gemeinsame Umsetzung mit Adenylatcyclase und Kreatinkinase gewonnen (Walseth et al., 1997). Der enzymatische Weg zur Gewinnung von NAD Analoga ist aber nicht für alle Analoga anwendbar, so sind z.B. 8-substituierte AMP Analoga schlechte Substrate für die Adenylatcyclase, während die chemische Kopplungsstrategie für alle AMP Analoga anwendbar ist.

Die Vorteile des chemo-enzymatischen Ansatzes zur Synthese von cADPR Analoga bestehen in der breiten Substratspezifität der *Aplysia* ADPRC, in der geringeren Anzahl von verhältnismäßig einfachen chemischen und enzymatischen Syntheseschritten, sowie in der Intaktheit der nördlichen Ribose. Der chemo-enzymatische Ansatz hat aber auch Nachteile, da die *Aplysia* ADPRC neben der Bildung von *N1*-cyclisierten Analoga auch die Bildung von *N7*-cyclisierten Analoga katalysiert. So führte z. B. die Umsetzung von NGD oder NHD mit der *Aplysia* ADPRC zur Bildung von *N7*-cGDPR bzw. *N7*-cIDPR (Graeff et al., 1994; Graeff et al., 1996). Die *N7*-cyclisierten Produkte wiesen in der Regel keine Ca^{2+} -mobilisierenden Eigenschaften auf. Die Verwendung einer alternativen Cyclisierungsstelle (*N7* statt *N1*) lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass das *N7*-Atom in diesen NAD Analoga wahrscheinlich eine stärkere Nucleophilie als das *N1*-Atom aufweist und deshalb reaktiver ist als das *N1*-Atom (Graeff et al., 1996). Weitere Nachteile des chemo-enzymatischen Ansatzes beruhen auf einer beschränkten Verfügbarkeit von NAD Analoga und darauf, dass die synthetisierten Analoga eine hydrolyseempfindliche *N1*-glykosidische Bindung aufweisen, so dass weitere Modifikationen nicht mehr möglich sind.

Um die Nachteile des chemo-enzymatischen Ansatzes zu umgehen und Zugang zu cADPR Analoga zu erhalten, deren Synthese über den chemo-enzymatischen Weg nicht möglich wäre, wurden mehrere Strategien für die chemische Totalsynthese entwickelt. Eine Strategie zur Synthese von cADPR Analoga, die auch als biomimetische Synthese bezeichnet wird, beruht darauf, dass NAD unter bestimmten Bedingungen (NaBr, Triethylamin, DMSO, 70 °C) stereoselektiv zu cADPR reagiert (Yamada et al., 1994). Es wurde daher versucht, verschiedene NAD Analoga unter den biomimetischen Synthesebedingungen zu cyclisieren. In den meisten Fällen wurden mit der biomimetischen Strategie die selben Produkte erhalten wie bei der Umsetzung der entsprechenden NAD Analoga mit der *Aplysia* ADPRC, allerdings in geringerer Ausbeute. Es konnten aber auch Produkte synthetisiert werden, die über den enzymatischen Weg nicht zugänglich waren. So konnte bei der biomimetischen Umsetzung von etheno-NAD (NAD mit erweitertem Adeninringssystem) die Bildung eines neuen cyclischen Analogons beobachtet werden, wobei die Cyclisierung über das *N9* Atom der etheno-Gruppe erfolgte.

Die weiteren Strategien beruhten auf einer intramolekularen Kondensationsreaktion zwischen den Phosphatgruppen unter Ausbildung der Pyrophosphatbindung. Eines

der ersten auf diesem Wege erhaltenen cADPR Analoga war cIDPcR, das als Nucleobase Hypoxanthin und eine carbocyclische nördliche Ribose aufwies (Shuto, 1998). Durch Änderung der Kondensationsbedingungen (Iod, Pyridin, Molekularsieb) konnte die Ausbeute verbessert werden. Ein Fortschritt für die chemische Synthesestrategie bestand aber insbesondere in einer veränderten Kondensationsreaktion die zur Ausbildung der Pyrophosphatbindung führte, so erfolgte die intramolekulare Kopplung zwischen einer Phenylthiophosphatgruppe mit der endständigen Phosphatgruppe an der südlichen Ribose (Fukuoka et al., 2000). Durch Einsatz dieser Kopplungsreaktion konnte auch das Adenosin basierte cADPR Analoga, cADPcR, synthetisiert werden (Shuto et al., 2001).

Der Nachteil der chemischen Synthesestrategien besteht in darin, dass es sich hierbei um vielstufige Prozesse handelt. Des weiteren musste die nördliche Ribose, wie bei cIDPcR und cADPcR, carbocyclisch oder wie bei cIDPRE (Gu et al., 2004) und cADPRE (Xu et al., 2006) durch eine Etherbrücke ersetzt werden, so dass ein Zugang zu cyclischen Dinukleotiden mit einer unveränderten nördlichen Ribose nicht möglich war.

Ein weiterer Schritt in der Entwicklung von Synthesestrategien für cADPR Analoga stellte die Entdeckung dar, dass 8-Br-NHD durch Umsetzung mit der *Aplysia* ADPRC zu 8-Br-N1-cIDPR umgesetzt werden konnte, während die unsubstituierte Form, also NHD, ausschließlich zur Synthese von N7-cIDPR führte (Wagner et al., 2003). Dieser Unterschied bei der Wahl der Cyclisierungsstelle (N7 oder N1) wurde, wie oben erwähnt, auf die verminderte Nucleophilie und Reaktivität des N1-Atoms in NHD (Hypoxanthin) im Vergleich zu NAD (Adenin) zurückgeführt. Die Änderung der Cyclisierungsstelle durch einen großen Substituenten an Position C8 der Base wurde mit einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen syn- und anti-Konformation der Nukleotide begründet. So liegen die Nukleotide für gewöhnlich zum Großteil in anti-Konformation vor, d.h. die Nucleobase ist entgegengesetzt zur Ribose ausgerichtet, während sie sich in syn-Konformation oberhalb der Ribose befindet und sich Nucleobase und Ribose sterisch behindern. Große Substituenten wie Brom an C8 der Nucleobase könnten nun das Gleichgewicht in Richtung der syn-Konformation verschieben, so dass sich das N1-Atom des Hypoxanthins von 8-Br-NHD während der Reaktion in räumlicher Nähe zum anomeren C1 Atom der südlichen Ribose befindet und es so zu einer Cyclisierung über N1 kommt (Wagner et al., 2003). Nachfolgend konnten auf Basis dieses chemo-enzymatischen Ansatzes

weitere Analoga synthetisiert werden (Wagner et al., 2005). Aufgrund der erhöhten chemischen Stabilität von 8-Br-*N1*-cIDPR konnten durch direkte Modifikationen *N1*-cIDPR, 8-Phenyl-, 8-Azido-, und 8-Amino-*N1*-cIDPR synthetisiert werden. Vorteile dieser Synthesestrategie bestehen darin, dass auf relativ einfachem Wege verschiedene chemisch stabile cADPR Analoga mit Hypoxanthin als Base zugänglich sind, deren Cyclisierung über das *N1*-Atom der Base erfolgt und über eine intakte nördliche Ribose verfügen. Ein Nachteil dieser Synthesestrategie besteht darin, dass Analoga mit Adenin als Base nicht zugänglich sind, da die glykosidische Bindung in 8-Br-cADPR nicht hydrolyseresistent ist und daher nicht als Ausgangssubstanz für weitere Modifikationen genutzt werden kann.

Das in dieser Arbeit verwendete 8-Br-*N1*-cIDPR wurde über den beschriebenen chemo-enzymatischen Weg gewonnen (Wagner et al., 2003) und für weitere Versuche aufgereinigt. Es konnte eine zweistufige Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, bei der im ersten Schritt durch Anionenaustauschchromatographie mit steigendem NaCl-Gradienten das Nebenprodukt 8-Br-IDPR entfernt wurde und im zweiten Schritt eine Entsalzung durch Gelfiltration erfolgte. Vorausgegangene Aufreinigungsversuche mit einem TFA-Gradienten während der Ionenaustauschchromatographie zeigten, dass eine Entfernung der TFA durch Gefriertrocknung nicht möglich war, da es dabei zur Hydrolyse von 8-Br-*N1*-cIDPR kam. Ein weiterer Nachteil dieser Methode bestand darin, dass sich 8-Br-IDPR und 8-Br-*N1*-cIDPR unter Verwendung des TFA-Gradienten während der Ionenaustauschchromatographie nicht trennen ließen, so dass ein enzymatischer Verdau des 8-Br-IDPR mit einer Pyrophosphatase vorgeschaltet werden musste. Der Wechsel des Elutionsmittels von TFA zu NaCl brachte einen Fortschritt, da sich 8-Br-*N1*-cIDPR und 8-Br-IDPR nun in der Ionenaustauschchromatographie trennen ließen. Der Nachteil dieser Methode bestand aber darin, dass das so gewonnene 8-Br-*N1*-cIDPR noch entsalzt werden musste. Anfängliche Versuche der Entsalzung mittels Dialyse wurden aber verworfen, da zur Entsalzung dieser hochkonzentrierten NaCl-Lösung ein Zeitraum von ca. 7-10 Tagen benötigt wurde und es während dieses Zeitraums zu einem Verlust von 8-Br-*N1*-cIDPR kam, der auf den geringen Unterschied von Porengröße der Dialysemembran und Molmasse von 8-Br-*N1*-cIDPR zurückgeführt wurde.

Eine andere Strategie zur Aufreinigung von 8-Br-*N1*-cIDPR wurde von Wagner et al., 2003 beschrieben. Es wurde auch hier eine Anionenaustauschchromatographie mit

Q-Sepharose durchgeführt. Zur Elution wurde ein TEAB-(Triethylammonium-bicarbonat)-Gradient verwendet. Zur Entfernung des TEAB aus dem Eluat wurde zunächst das Wasser am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand aus TEAB und 8-Br-N1-cIDPR wurde mit Methanol versetzt und dieser am Rotationsverdampfer verdampft. Dieser Schritt wurde mehrfach bis zur Gewichtskonstanz wiederholt und führte zur Zersetzung von TEAB zu flüchtigem Triethylamin und Kohlendioxid. Am Ende erhielt man 8-Br-N1-cIDPR in Form seines Triethylammoniumsalzes. Ein Nachteil dieser Methode besteht in der Verwendung von TEAB zur Elution, da dieser Puffer aufgrund seiner Instabilität kommerziell nicht erhältlich ist und direkt vor der Elution durch Einleiten von Kohlendioxid in ein Triethylamin/Wasser-Gemisch hergestellt werden musste. Die Verwendung von TEAB stellte aber aufgrund der Instabilität auch einen Vorteil dar, da es sich recht einfach und vollständig entfernen ließ.

Die beiden vorgestellten Aufreinigungsmethoden für 8-Br-N1-cIDPR wurden als gleichwertige Methoden betrachtet, da sowohl Reinheit, Ausbeute als auch der zeitliche Aufwand vergleichbar waren.

5.2 Stabilität der Analoga von cADPR und N1-cIDPR

cADPR ist ein hydrolyseempfindliches Molekül (Lee & Aarhus, 1993). Unter physiologischen Bedingungen wird cADPR durch cADPR-Hydrolasen abgebaut. So konnten Jacobson und Mitarbeiter als Erste ein membrangebundenes multifunktionales Enzym aus Milzzellen des Kaninchens aufreinigen, das sowohl die Bildung von cADPR aus NAD als auch die Hydrolyse von cADPR zu ADPR katalysierte (Kim et al., 1993). Membrangebundene cADPR-Hydrolase Aktivität konnte aber auch in anderen Gewebeextrakten von Mammalia (Hundehirn, Hühnerhirn) und Invertebraten (Seeigeleier) (Lee & Aarhus, 1993) sowie humanen Erythrozytenmembranen gefunden werden (Lee et al., 1993).

cADPR wird aber auch aufgrund der instabilen C''1-N1-glykosidischen Bindung zwischen nördlicher Ribose und Adenin auf nicht-enzymatischem Wege zu ADPR hydrolysiert. So wurde gezeigt, dass cADPR bei Raumtemperatur und leicht saurem pH-Wert eine Halbwertszeit von $t_{1/2}=10$ d aufwies, während sie bei 37°C nur noch $t_{1/2}=24$ h betrug (Lee & Aarhus, 1993). Die pH-Titrationskurve von cADPR zeigte einen pKa-Wert von 8,2. Das Fehlen des pKa-Wertes bei pH 4,0, den die Aminogruppe von ADPR oder AMP aufweisen, wies daraufhin, dass cADPR eher in

der Iminoform als in der Aminoform vorliegt (Gu & Sih, 1994). Diese tautomere Form von cADPR konnte zur Erklärung der relativen Stabilität von cADPR bei basischem pH-Wert und der Hydrolyseempfindlichkeit bei saurem pH-Wert herangezogen werden. Bei saurem pH-Wert kommt es zur Protonierung der Amino/Iminogruppe und zu einer positiven Ladung des Adeninringsystems, was zur Spaltung der glykosidischen Bindung führen kann. Bei neutralem pH-Wert liegt das Ringsystem des Adenins ungeladen vor, so dass die Spaltung nicht begünstigt wird (Gu & Sih, 1994).

Im Vergleich zu cADPR weisen einige der oben aufgeführten cADPR Analoga (s. Tabelle 5-1) eine erhöhte chemische und metabolische Stabilität auf. So konnten stabile cADPR Analoga durch den Ersatz der südlichen oder nördlichen Ribose mit einer carbocyclische Struktur (cArisDPR bzw. cADPcR) synthetisiert werden (Bailey et al., 1996; Shuto et al., 2001). cArisDPR war eines der ersten cADPR Analoga, das auf chemo-enzymatischem Wege synthetisiert wurde und eine höhere metabolische Stabilität im Seeigeelei system aufwies als cADPR (Bailey et al., 1996). Eine deutlich ausgeprägtere Steigerung der Stabilität konnte durch den Austausch der nördlichen Ribose durch einen Kohlenstoffring erzielt werden. So zeigte sich cADPcR gegenüber chemischer als auch enzymatischer Hydrolyse resistent (Shuto et al., 2001). Des weiteren führten auch Änderungen im Gerüst des Adeninringsystems zu stabilen Analoga. So konnte für 7-Deaza-cADPR (Bailey et al., 1997) und 3-Deaza-cADPR (Wong et al., 1999), die auf chemo-enzymatische Wege synthetisiert wurden, eine hohe chemisch als auch enzymatische Stabilität gezeigt werden. Stabile cADPR Analoga können also durch Modifikationen des Adeninringsystems oder der Ribosen, insbesondere der nördlichen Ribose, erhalten werden. All diesen Modifikationen ist gemein, dass sie zu einer Abnahme der Reaktivität der C''-N1 glykosidischen Bindung (z. B. 3-Deaza-cADPR) oder sogar zu einer Überführung in eine nicht-glykosidische Bindung (z. B. N1-Alkyl Bindung in cADPcR) führten.

Weitere stabile cADPR Analoga stellen auch die in dieser Arbeit untersuchten inosinbasierten cADPR Analoga *N1*-cIDPR, 8-Br-*N1*-cIDPR (Wagner et al., 2005), *N1*-cIDPRE (Gu et al., 2004) und *N1*-cIDP-DE (Guse et al., 2005) dar, deren metabolische Stabilität gegenüber der ADPRC von *A. californica*, NADase von *N. crassa* und CD38 untersucht wurden.

Anfänglich wurden die gut beschriebenen enzymatischen Eigenschaften gegenüber NAD und cADPR untersucht. So konnte für die ADPRC von *A. californica* gezeigt

werden, dass sie unter den hier gewählten Bedingungen das eingesetzte NAD vollständig zu cADPR und geringen Mengen ADPR umsetzte, während cADPR unter identischen Versuchsbedingungen nur zu einem geringen Anteil abgebaut wurde. Dieses Ergebnis bestätigte die für die ADPRC von *A. californica* beschriebene Enzymaktivität als Cyclase (Lee & Aarhus, 1991). Die Aktivität als cADPR-Hydrolase wurde später gezeigt, wobei beobachtet wurde dass bei hoher Enzymkonzentration die *Aplysia* ADPRC auch in der Lage war cADPR zu ADPR zu hydrolysieren, dass aber der spezifische Ratio V_{\max}/K_m für die Umsetzung von NAD um vier Größenordnungen höher war als für cADPR (Cakir-Kiefer et al., 2000).

Die Inkubation von NAD mit der NADase von *N. crassa* führte zu einer vollständigen Umsetzung zu ADPR, während eine Bildung von cADPR nicht beobachtet werden konnte. So konnte auch kein Abbau von cADPR oder einem der N1-cIDPR Analoga durch die NADase unter den gleichen Bedingungen festgestellt werden. Diese Eigenschaft wurde für die NADase bereits beschrieben, wobei in diesen Untersuchungen gezeigt wurde, dass die NADase weder in der Lage war NAD zu cADPR noch NGD zu cGDPR umzusetzen (Graeff et al., 1994). Es scheint daher unwahrscheinlich, dass die NADase cyclische Nukleotide binden kann und daher nicht in der Lage ist cADPR oder Analoga zu hydrolysieren.

CD38 verfügt, wie einleitend schon beschrieben, über ADPRC, NADase und cADPR-Hydrolase Aktivität (Howard et al., 1993) und kann einerseits NAD zu cADPR und ADPR und andererseits cADPR zu ADPR umsetzen. Diese Enzymaktivitäten konnten in dieser Arbeit für die rekombinante lösliche CD38 und native CD38 auf der Oberfläche von Jurkat T-Lymphozyten bestätigt werden. Des weiteren konnte ein Unterschied in der Ausprägung der enzymatischen Aktivität beobachtet werden, wobei die Aktivität der NADase am höchsten und der Cyclase am niedrigsten war. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit früheren Untersuchungen überein (Howard et al., 1993; Zocchi et al., 1993).

Da CD38 als einziges Enzym in der Lage war, cADPR in größerem Umfang abzubauen, wurden die Stabilitätsuntersuchungen von N1-cIDPR, 8-Br-N1-cIDPR, N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE größtenteils mit CD38, aber auch mit der NADase und der *Aplysia* ADPRC durchgeführt. Es konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass keines der untersuchten N1-cIDPR Analoga durch CD38 oder die beiden anderen Enzyme abgebaut wurde. Die hier untersuchten N1-cIDPR Analoga sind also gegenüber diesen Enzymen metabolisch stabil.

Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Ergebnissen, die für die Stabilität von anderen cIDPR Analoga erhalten wurden. So konnte gezeigt werden, dass *N7*-cIDPR durch Inkubation mit CD38 zu IDPR hydrolysierte (Graeff et al., 1996). Und auch *N7*-cGDPR konnte durch CD38 metabolisiert werden, wobei die Hydrolyse aber langsamer als bei *N7*-cIDPR verlief (Moreau et al., 2006).

Die Cyclisierung von NHD und NGD durch die ADPRC von *A. californica* erfolgte wie schon erwähnt über das *N7*-Atom anstatt über das *N1*-Atom der Nucleobase, wobei als Grund die verminderte Nucleophilie des *N1*-Atom in Hypoxanthin und Guanin vermutet wurde und auf den Austausch der Aminogruppe gegen eine Oxogruppe am *N6*-Atom der Nucleobase zurückgeführt wurde (Graeff et al., 1996). Diese verringerte Nucleophilie und die daraus folgende geringere Reaktivität des *N1*-Atoms wird als Ursache für die Stabilität der hier untersuchten *N1*-cIDPR Analoga gegenüber CD38 angenommen.

Für *N1*-cIDPR und einige Analoga, die cADPR strukturell sehr ähnlich sind, konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass sie eine hohe chemische Stabilität aufwiesen (Wagner et al., 2005). So konnte beobachtet werden, dass 8-Br-*N1*-cIDPR bei neutralem pH-Wert und auch bei erhöhter Temperatur kaum hydrolysierte. Aufgrund dieser Stabilität konnte 8-Br-*N1*-cIDPR auch als Ausgangsprodukt für die direkte Modifikation an C8 der Nucleobase und Synthese weiterer Analoga eingesetzt werden ohne dass andere Teile des Moleküls beeinträchtigt wurden. In einer weiteren Untersuchung (Moreau et al., 2006) konnte dargelegt werden, dass die C'1-*N1*-Bindung von 8-Br-*N1*-cIDPR sogar bei niedrigem pH-Wert stabil war, während die glykosidische C1'-*N9*-Bindung hydrolysierte. Bei dieser Reaktion entstand zunächst 8-Br-*N1*-Inosin-5'-Diphosphoribose und nachfolgend durch Spaltung der Pyrophosphatbindung 8-Br-*N1*-Ribosylhypoxanthin-5'-Monophosphat (8-Br-*N1*-IMP). Dieser Befund zeigte, dass 8-Halo-*N1*-cIDPR Analoga eine un stabile *N9*-glykosidische Bindung, aber eine stabile *N1*-Amidbindung aufweisen. Dieses Ergebnis steht in starkem Kontrast zu der Stabilität von cADPR.

5.3 cADPR Analoga: Struktur und Rolle als zellbiologisches Tool

Neben dem hier untersuchten 8-Br-*N1*-cIDPR wurden viele der synthetisierten cADPR Analoga auf ihre calciumsignalvermittelnden Eigenschaften untersucht (s. Tabelle 5-1). So konnte gezeigt werden, dass alle 8-substituierten cADPR Analoga Antagonisten des cADPR vermittelten Calciumsignals sind, wobei die

antagonistische Potenz der 8-substituierten cADPR Analoga mit zunehmender Größe der Substituent abnahm (Walseth & Lee, 1993). 8-NH₂-cADPR wurde an Seeigeleihomogenaten als sehr potenter cADPR Antagonist beschrieben werden. Es konnte des weiteren gezeigt werden, dass es sich bei 8-NH₂-cADPR um einen kompetitiven Antagonisten handelt, da sein Wirkung bei Untersuchungen an Seeigeleimikrosomen durch einen Überschuss an cADPR aufgehoben werden konnte (Walseth & Lee, 1993). 8-NH₂-cADPR wurde in vielen Studien als cADPR Antagonist eingesetzt, um die Rolle von cADPR bei der Mobilisation von Calcium in verschiedenen Zellsystem wie Seeigeleiern (Walseth & Lee, 1993), glatten Muskelzellen (Kuemmerle & Makhlof, 1995) und pankreatischen Azinuszellen (Burdakov et al., 2001) zu klären. Aufgrund seiner Membran-Impermeabilität musste die Substanz mikroinjiziert oder die Untersuchungen an permeabilisierten Zellen durchgeführt wurden. So konnte u.a. durch Coinjektionen von cADPR und 8-NH₂-cADPR gezeigt werden, dass cADPR auch in Jurkat T-Lymphozyten zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führte (Guse et al., 1995a). 8-Br-cADPR ist ein schwächerer cADPR Antagonist als 8-NH₂-cADPR, aber aufgrund seiner Membran-Permeabilität, die zuerst an intakten Seeigeleiern gezeigt werden konnte (Sethi et al., 1997), ein interessantes Analogon für Untersuchungen an intakten Zellen. So wurde 8-Br-cADPR zur Untersuchung der Funktion von cADPR an anderen Zelltypen, wie z.B. Neutrophilen, genutzt. Dort konnte gezeigt werden, dass die durch das bakterielle Chemoattraktant fMLP vermittelte Chemotaxis von Neutrophilen durch cADPR vermittelt wird, da die Chemotaxis in Anwesenheit von 8-Br-cADPR vermindert war (Partida-Sánchez et al., 2001). Ein anderes 8-Brom Derivat von cADPR stellt 7-Deaza-8-Br-cADPR dar, bei dem an Position 7 im Adeninringsystem das Stickstoffatom gegen ein Kohlenstoffatom getauscht wurde. Dieses Analogon ist wie 8-Br-cADPR ein membranpermeanter cADPR Antagonist, aber darüber hinaus hydrolysestabil (Sethi et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass 7-Deaza-8-Br-cADPR in Seeigeleiern doppelt so effektiv ist wie 8-Br-cADPR, was auf seine Hydrolyseresistenz zurückgeführt wurde. 7-Deaza-8-Br-cADPR wurde des weiteren in T-Lymphozyten eingesetzt, wobei hier die Rolle von cADPR bei der T-Zellaktivierung untersucht wurde. Bei diesen Untersuchungen konnte u.a. gezeigt werden, dass die Vorinkubation von T-Lymphozyten mit 7-Deaza-8-Br-cADPR zu einer Inhibition des T-Zellrezeptor vermittelten Calciumsignals führte (Guse et al., 1999). Zwei weitere 8-substituierte cADPR Analoga, 8-CH₃-cADPR und 8-OCH₃-

cADPR, die ebenfalls antagonistische Eigenschaften aufwiesen, wurden bei Untersuchungen an T-Lymphozyten eingesetzt. So konnte durch Mikroinjektionsexperimente mit 8-OCH₃-cADPR gezeigt werden, dass cADPR insbesondere an der Entstehung der langanhaltenden zweiten Phase des durch Stimulation des T-Zellrezeptor vermittelten Calciums beteiligt war (Guse et al., 1999). Die Abnahme der antagonistischen Wirkung mit steigender Substituentgröße an Position 8 des Adenins könnte evtl. dadurch erklärt werden, dass größere Substituenten zu sterischen Hinderungen bei Bindung an die Bindungsstelle führen und damit ihre Affinität sinkt. Es muss allerdings daraufhingewiesen werden, dass ein Substituent an Position 8 der Nucleobase nicht immer zu einem Antagonisten führte. So wurden für 8-Br-N¹-cIDPR (Wagner et al., 2003) und 8-NH₂-cADPcR (Shuto et al., 2003) agonistische Eigenschaften beschrieben.

Weitere Modifikationen im Bereich der Nucleobase führten zu cADPR Analoga mit agonistische Eigenschaften. So konnte für 3-Deaza-cADPR gezeigt werden, dass es sich sowohl im Seeigelsystem (Wong et al., 1999) als auch in Mammaliazellen (hematopoetischen Vorläuferzellen) (Podestà et al., 2000) um einen potenten cADPR Agonisten handelte. Der Austausch der Nucleobase Adenin gegen Hypoxanthin (N¹-cIDPR) führte zu einem cADPR Agonisten, der an Jurkat T-Lymphozyten vergleichbare calciumfreisetzenden Eigenschaften wie cADPR aufwies (Wagner et al., 2005). Neben Modifikationen im Adeninring wurde auch die südliche Ribose verändert. Der Austausch der 2'-Hydroxylgruppe gegen eine Phosphatgruppe führte zu dem cADPR Analogon 2'-Phospho-cADPR, für das unterschiedlich stark ausgeprägte agonistische Effekte in Abhängigkeit vom zellulären Testsystem beschrieben wurden. Während dieses Analogon in permeabilisierten T-Lymphozyten (Guse et al., 1997a) und Rattenhirnmikrosomen (Vu et al., 1996) zur Freisetzung von Calcium führte, konnte keine Effekt in Seeigeleihomogenaten (Aarhus et al., 1995) festgestellt werden. Der Austausch der südlichen Ribose durch einen Kohlenstoffring führte zu dem cADPR Agonisten cArisDPR, der als schwacher Agonist im Seeigeleisystem (Bailey et al., 1996) aber als guter Agonist in permabelisierten T-Lymphozyten beschrieben wurde (Guse et al., 2002). Modifikationen an der südlichen Ribose führten bei T-Lymphozyten eher zu einer Verstärkung und im Seeigeleisystem zur Verminderung der agonistischen Wirkung. Der Ersatz der nördlichen Ribose durch einen Kohlenstoffring führte zu cADPcR, einem cADPR Agonisten. Auch cADPcR zeigte unterschiedlich stark ausgeprägte agonistische

Eigenschaften. So stellt cADPcR im Seeigeleissystem einen potenten cADPR Agonist dar, der drei- bis vierfach potenter ist als cADPR selbst (Shuto et al., 2001), während cADPcR in permeabilisierten T-Lymphozyten als schwacher Agonist beschrieben wurde (Guse et al., 2002). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Sauerstoffatom dieses Ribosering für die Interaktion mit dem Zielprotein von Bedeutung ist. Diese Beobachtung wird durch Untersuchungen mit cADPR Analoga untermauert, deren nördliche Ribose durch eine Etherbrücke (cADPRE) oder Alkylketten unterschiedlicher Länge (C4-C6) ersetzt wurden (Xu et al., 2006). So konnte anhand von Untersuchungen an T-Lymphozyten gezeigt werden, dass cADPRE und seine Derivate verminderte agonistische Eigenschaften besaßen, wobei cADPRE die stärkste Aktivität aufwies. Die agonistische Aktivität der cADPRE Analoga war geringer als von cADPRE und nahm mit der zunehmender Kettelänge ab.

Es wurden neben cADPcR auch Derivate mit Substituenten an Position 8 des Adeninrings synthetisiert, in der Hoffnung hydrolyseresistente Antagonisten zu erhalten. Wie schon erwähnt konnte aber gezeigt werden, dass diese cADPR Analoga zwar hydrolysestabil nicht aber antagonistische, sondern agonistische Eigenschaften aufwiesen. Die Eigenschaften von 8-NH₂-cADPcR wurden in verschiedenen Zellsystemen näher untersucht, wobei beobachtet werden konnte, dass dieses cADPcR Analogon im Seeigeleissystem einen potenten Agonisten (Shuto et al., 2003) und an T-Lymphozyten einen schwachen cADPR Agonisten (Guse et al., 2002) darstellte. Ähnlich Resultate wurden auch für Untersuchungen mit weiteren cADPcR Derivaten erhalten werden. So konnte z. B. für 3''-Deoxy-cADPcR gezeigt werden, dass es im Seeigeleissystem einen potenten cADPR Agonisten darstellt, der zu einer noch stärkeren Calciumfreisetzung führt als der potente cADPR Agonist cADPcR. Während dessen wies 3''-Deoxy-cADPcR an T-Lymphozyten nur eine schwache agonistische Aktivität auf, die vergleichbar mit der Aktivität von cADPcR an T-Lymphozyten war (Kudoh et al., 2005). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es zwischen den verschiedenen Spezies Unterschiede zwischen den cADPR-Bindungsproteinen und den cADPR-Signalsystemen geben könnte.

Eine kombinierte Modifikation von Nucleobase und Ribose wurde in den cADPR Analoga *N1*-cIDPRE (Gu et al., 2004) und *N1*-cIDP-DE (Guse et al., 2005) realisiert. Beide Analoga zeigten trotz dieser starken Eingriffe in die Struktur noch eine Aktivität als partielle Agonisten an Jurkat T-Lymphozyten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Modifikationen in den Bereichen der beiden Ribosen, insbesondere bei Mammaliazellen, zu agonistisch aktiven Analoga führen, wobei ihre Aktivität im Vergleich zu cADPR variieren kann. Der Erhalt der agonistischen Eigenschaften trotz zum Teil starker Modifikationen zeigte, dass die beiden Riboseeinheiten neben der Ausbildung von polaren Bindungen zum Bindeprotein auch für die Ausrichtung der Nucleobase und der Pyrophosphatbrücke im richtigen Abstand wichtig sind. Für die Entwicklung neuer cADPR Analoga kann daher der Bereich der Ribosen aber auch der Bereich der Nucleobase weiter modifiziert werden.

Ein interessanter Ansatz für die Entwicklung weiterer cADPR-Analoga bestünde in der Synthese von hydrolyseresistenten Affinitätsliganden zur Identifikation von cADPR-Bindeproteinen. Als Ausgangssubstanz für die Synthese solcher Liganden könnte z.B. 8-Br-M1-cIDPR verwendet werden, wobei die Kopplung an eine Affinitätsmatrix über Position 8 erfolgen könnte. Die Liganden sollten stabil sein und potente cADPR Agonisten oder Antagonisten darstellen. Die Kopplung über Position 8 der Nucleobase an die Matrix könnte aber dazu führen, dass das cADPR-Bindungsprotein nicht mehr binden kann, es wäre daher wichtig andere Liganden zu entwickeln, die über andere Positionen an die Matrix gekoppelt werden können. So könnte z.B. der hydrolyseresistente cADPR Agonist 2''-NH₂-cADPR verwendet werden, wobei die Kopplung über die 2''-NH₂-Gruppe erfolgen könnte.

5.4 Zelluläre Effekte der Analoga von M1-cIDPR

Wie schon erwähnt handelt es sich bei denen in dieser Arbeit untersuchten cADPR Analoga um cADPR Agonisten. So konnte für das nicht membranpermeante M1-cIDPR an permeabelisierten Jurkat T-Lymphozyten gezeigt werden, dass es Calcium aus intrazellulären Speichern freisetzte, wobei die halbmaximalwirksame Konzentration (EC₅₀) wie für cADPR bei ca. 30 µM lag (Wagner et al., 2005). Dieser Befund weist daraufhin, dass der Ersatz der Iminogruppe an C6 durch eine Oxogruppe nicht die Bindungseigenschaften des Analogons an seine Bindeproteine beeinträchtigt. Auch für die beiden membranpermeanten cADPR Analoga M1-cIDPRE und M1-cIDP-DE konnte gezeigt werden, dass sie die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern vermitteln, wobei sie in permeabelisierten Jurkat T-Lymphozyten weniger wirksam in Bezug auf die maximal freigesetzte Calciummenge waren als cADPR oder M1-cIDPR. So konnte das hohe Ausmaß der

Calciumfreisetzung, das durch cADPR vermittelt wurde, auch mit hohen Konzentrationen von *N1-cIDPRE* und *N1-cIDP-DE* nicht erreicht werden. An intakten Jurkat T-Lymphozyten wurde für *N1-cIDPRE* ein EC_{50} von ca. 500 μ M beschrieben, während für *N1-cIDP-DE* eine Angabe des EC_{50} nicht möglich war, da auch mit einer Konzentration von 1 mM keine Sättigung für das *N1-cIDP-DE* vermittelte Calciumsignal zu beobachten war (Gu et al., 2004; Guse et al., 2005). Auch für 8-Br-*N1-cIDPR* konnte bereits gezeigt werden, dass es in der Lage ist konzentrationsabhängig ein Calciumsignal an intakten Jurkat T-Lymphozyten zu vermitteln (Wagner et al., 2003).

Bei Untersuchungen des Effekts der Analoga auf die Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass cADPR und 8-Br-*N1-cIDPR* keinen Effekt zeigten und die Zellen normal proliferierten, während *N1-cIDPR* mit einem IC_{50} von 10 μ M und *N1-cIDPRE* und *N1-cIDP-DE* mit einem IC_{50} von 100 – 200 μ M die Proliferation inhibierten. Der mangelnde Effekt des membranimpermeanten cADPR auf die Proliferation der Jurkat T-Lymphozyten überraschte nicht, denn obwohl in einigen anderen Zelllinien, wie Mausfibroblasten oder HL-60 (AML, human Myelom) gezeigt werden konnte, dass sie Transporter für den Import von extrazellulärem cADPR exprimieren (Guida et al., 2002; Guida et al., 2004), konnte für cADPR bei Zugabe zum extrazellulären Medium kein Effekt auf das Calciumsignal von intakten Jurkat T-Lymphozyten beobachtet werden, so dass vermutlich in diesen Zellen keine Transporter exprimiert wurden, so dass sie cADPR nicht aufnehmen.

Für die membranpermeanten cADPR-Analoga 8-Br-*N1-cIDPR*, *N1-cIDPRE* und *N1-cIDP-DE* wurde aufgrund ihrer calciumsignalvermittelnden Eigenschaften erwartet, dass sie die Proliferation anregen könnten. Wie bei cADPR konnte aber für 8-Br-*N1-cIDPR* kein Effekt auf die Proliferation der Jurkat T-Lymphozyten beobachtet werden, während für die beiden Analoga *N1-cIDPRE* und *N1-cIDP-DE* sogar ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferation beobachtet wurde. Des Weiteren konnte in initialen Versuchen gezeigt werden, dass nicht nur die Proliferation gehemmt wurde, sondern dass die Zellen sich auch in die Apoptose begaben. Es scheint also so zu sein, dass ein langanhaltendes Calciumsignal alleine nicht zur Stimulation der Proliferation, sondern zu ihrer Inhibition oder sogar zur Apoptose führen kann. Dieses Ergebnis erstaunt, da die von *N1-cIDPRE* und *N1-cIDP-DE* vermittelten Calciumsignale dem Signalverlauf nach Stimulation des T-Zellrezeptors mit OKT3

sehr ähnlich sind (Gu et al., 2004; Guse et al., 2005). Es ist denkbar, dass ohne die gleichzeitige Stimulation weiterer Signaltransduktionswege, wie dem Ras/MAP-Kinase- oder PLC γ -Weg, die normalerweise nach Stimulation der T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor ebenfalls aktiviert werden, eine unphysiologische Erhöhung der Calciumkonzentration zu einem Übergang der Zellen in eine Art anergischen oder apoptotischen Zustand führte. Um den inhibitorischen Effekt von *N1*-cIDPRE und *N1*-cIDPR aufzuheben, wurden initiale Proliferationsversuche in Anwesenheit des cADPR-Antagonisten 8-Br-cADPR durchgeführt. Diese Versuche waren aber ohne Erfolg, was auf die schwache agonistische Wirkung 8-Br-cADPR an T-Lymphozyten zurückgeführt werden könnte oder darauf, dass die beobachtete Inhibition der Proliferation durch *N1*-cIDPRE und *N1*-cIDP-DE unabhängig von ihrem Effekt auf das Calciumsignal war.

Wie für *N1*-cIDPRE und *N1*-cIDP-DE konnte auch für *N1*-cIDPR ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferation der Jurkat T-Lymphozyten beobachtet werden, wobei *N1*-cIDPR mit einem IC₅₀ von 10 μ M deutlich potenter war. Dieses Ergebnis war besonders überraschend, da *N1*-cIDPR wie cADPR membranimpermeant ist und an permabilisierten Jurkat T-Lymphozyten ein ganz ähnliches Calciumsignal vermittelte wie cADPR (Wagner et al., 2005). Es wurde daher angenommen, dass *N1*-cIDPR und cADPR generell ähnliche physiologische Effekte zeigen würden. Da aus den Stabilitätsuntersuchungen bereits bekannt war, dass *N1*-cIDPR stabil gegenüber CD38 ist wurde vermutet, dass eine Inhibition von CD38 durch *N1*-cIDPR evtl. zur Inhibition der Proliferation führen könnte. In ersten Experimenten konnte aber gezeigt werden, dass der Abbau von cADPR durch natives CD38 von Jurkat T-Lymphozyten in Anwesenheit von *N1*-cIDPR nicht vermindert war. Möglich wäre statt dessen, dass *N1*-cIDPR zur Blockierung der Pyrophosphatase PC1 auf der Oberfläche der T-Lymphozyten führte. Dieses Enzym spaltet NAD oder ADPR, wobei u.a. AMP gebildet wird. Ein weiteres Ectoenzym, eine Nucleotidase, spaltet AMP weiter unter Bildung von Adenosin, welches dann von der Zelle über Nucleosidtransporter aufgenommen und z.B. über den Salvage Pathway zur Synthese von Nukleotiden verwendet werden kann (Deterre et al., 1996). Eine Inhibition der Pyrophosphatase könnte also letztlich zur verminderten Biosynthese von Nukleotiden und somit zur Inhibition der Proliferation führen.

Des Weiteren wurde der Einfluss von *N1*-cIDPR auf die Proliferation anderer autonom wachsender humaner Lymphom- und Myelomzellen untersucht. Es konnte

gezeigt werden, dass einige der Zelllinien, HPB.ALL und REH, sensitiv auf die Inkubation mit *M1-cIDPR* reagierten und wie Jurkat T-Lymphozyten eine Inhibition der Proliferation zeigten, während die Proliferation der anderen Zelllinien Raji, HL60, K562 und BV173 unbeeinflusst war. Die sensitiven HPB.ALL Zellen sind Lymphomzellen des T-Zellzweiges, so dass vermutet werden kann dass es eine generelle Empfindlichkeit von T-Lymphomzellen gegenüber *M1-cIDPR* gibt. Bei der anderen sensitiven Zelllinie REH handelt es sich um B-Lymphomzellen. Es scheint also so zu sein, dass die Wirkung von *M1-cIDPR* nicht nur auf T-Lymphomzellen beschränkt ist. Es konnte aber keine generelle Wirkung auf B-Lymphomzellen beobachtet werden, denn die Proliferation von Raji-Zellen wurde durch *M1-cIDPR* nicht inhibiert. Ebenso zeigten die beiden myeloischen Zelllinien HL60 und K562 keine Sensitivität gegenüber *M1-cIDPR*, was vermuten lässt, dass myeloische Zellen gegenüber einer Inkubation mit *M1-cIDPR* resistent sind. Diese Versuche zeigten, dass *M1-cIDPR* eine Zelltyp abhängige Inhibition der Proliferation hervorrief und nicht auf einer allgemein cytotoxischen Eigenschaft von *M1-cIDPR* basierte.

Es wurde des weiteren die inhibitorische Wirkung von *M1-cIDPR* und *M1-cIDPRE* auf die Proliferation von primären Ratten T-Lymphozyten überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Substanzen keinen Einfluss auf die Proliferation der Ratten T-Zellen hatten. Die unterschiedliche Sensitivität von autonom proliferierenden T- und B-Lymphomzellen, Myelomzellen und primären T-Zellen gegenüber *M1-cIDPR* ist interessant, da es verwendet werden könnte um speziell die Proliferation von Lymphomzellen, z.B. bei malignen Erkrankungen, zu inhibieren, ohne dass die primären T-Zellen, ob ruhend oder proliferierend, betroffen wären

In ersten Untersuchungen von 8-Br-*M1-cIDPR* konnte gezeigt werden, dass es sich um ein membranpermeanten cADPR Agonisten handelt. In dieser Arbeit wurde das 8-Br-*M1-cIDPR* vermittelte Calciumsignal an Jurkat T-Lymphozyten nun genauer untersucht. So wurde beobachtet, dass auch eine Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf das Ausmaß des Calciumsignals bei Mikroinjektion bestand (Abb. 4.20), wobei ein EC_{50} von ca. 300 μM bestimmt wurde. Es sei darauf hingewiesen, dass dieser Wert aus den Konzentrationen der Injektionslösungen ermittelt wurde, die durch Injektion in die T-Lymphozyten um den Faktor 50 bis 100 verdünnt wurden (Berg et al., 2000). Die wirksame Konzentration der oben angegebenen EC_{50} Konzentration entspricht in den Zellen damit 3 - 6 μM . Der Anstieg der

Calciumkonzentration betrug bei einer 8-Br-N1-cIDPR Konzentration von 1 mM dabei durchschnittlich 300 nM und entsprach dem Anstieg, der auch bei Mikroinjektionen von 100 μ M cADPR beobachtet werden konnte. (Abb. 4.19). Bei Coinjektionsversuchen mit dem Inhibitor des Ryanodinrezeptors Ruthenium Rot konnte beobachtet werden, dass das Calciumsignal im Bereich des Peaks um 50 % reduziert wurde (Abb. 4.23). Erwartet wurde eine nahezu vollständige Inhibition des Signals, da vermutet wurde, dass das 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Signal durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und dem daraus resultierenden Einstrom über CRAC/Orai-Kanäle erfolgte, so dass bei Inhibition der Freisetzung durch Ruthenium Rot auch der Einstrom gehemmt würde. Es wird daher angenommen, dass die Inhibition des Ryanodinrezeptors unvollständig war oder der Calciumeinstrom über einen anderen Kanal als CRAC/Orai1, wie z. B. TRPM2 erfolgte. Für den Na⁺/Ca²⁺-Kationenkanal TRPM2 konnte beobachtet werden, dass er durch ADPR und auch durch hohe Konzentrationen von cADPR aktivierbar war. Es konnte darüber hinaus beschrieben werden, dass eine niedrige cADPR Konzentration im physiologischen Bereich einen synergistischen Effekt auf die durch ADPR vermittelte TRPM2 Aktivierung hatte (Kolisek et al., 2005).

In Versuchen unter Verwendung des „Calcium free/ Calcium readdition“-Protokolls konnte beobachtet werden, dass 8-Br-N1-cIDPR ein Calciumsignal bestehend aus Calciumfreisetzung und Calciumeinstrom vermittelte. Diese Art des Signals wurde so auch für die Applikation von N1-cIDPRE (Gu et al., 2004) und N1-cIDP-DE (Guse et al., 2005) beschrieben. Zur weiteren Charakterisierung des 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignals wurden Versuche mit GdCl₃, SKF96365 und 8-Br-cADPR durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass durch Inkubation der Jurkat T-Lymphozyten mit GdCl₃ der Freisetzungsspeak erhöht und der Einstrompeak und auch das Calciumplateau stark inhibiert wurden. Die verstärkte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern könnte dadurch erklärt werden, dass es während der calciumfreien Phase des „Calcium-free/ Calcium-readdition“-Protokolls zu einem Verlust von luminalem Calcium über die Calciumkanäle der Plasmamembran kam. Durch Inhibition dieser Kanäle mittels GdCl₃ trat dieser Verlust nicht auf, so dass die Calciumspeicher eine höher Calciumkonzentration aufwiesen und mehr Calcium freisetzten.

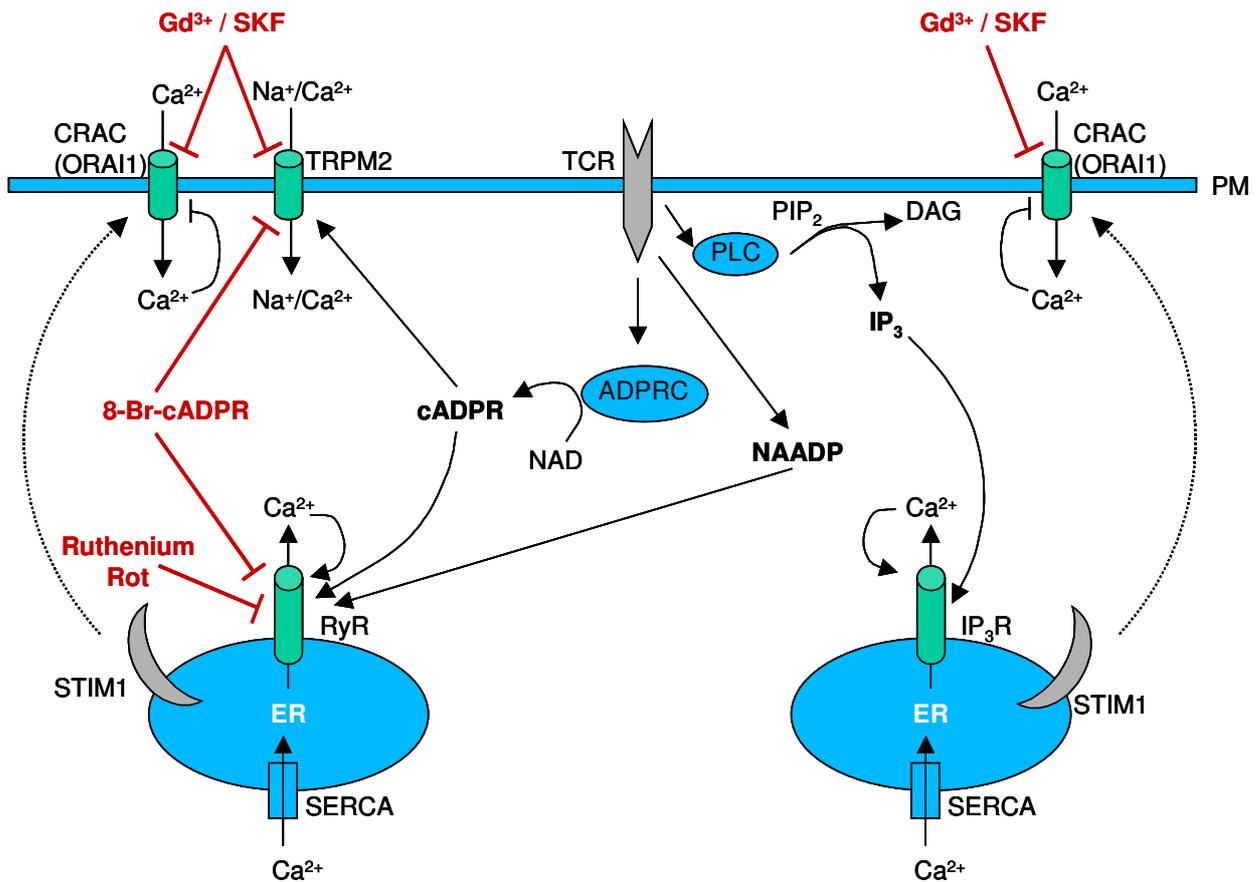


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Inhibition von Calciumsignalwegen in T-Lymphozyten.

GdCl₃ und SKF wirken inhibitorisch auf den CRAC- und TRPM2-vermittelten Einstrom von Calcium. Ruthenium Rot ist ein RyR Antagonist und hemmt die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. 8-Br-cADPR ist ein cADPR Antagonist und inhibiert die Calciumfreisetzung und den Calciumeinstrom.

Bei Versuchen mit dem Calciumeinstrominhibitor SKF96365 konnte kein Einfluss auf den Freisetzungsspeak beobachtet werden, wohl aber wie auch bei GdCl₃ die Inhibition des Calciumeinstroms. Diese Verminderung des Einstroms durch Inkubation mit GdCl₃ oder SKF96365 wurde zunächst als Inhibition der CRAC/Orai1 Kanäle interpretiert. Widersprüchliche Ergebnisse wurden aber mit dem cADPR Antagonisten 8-Br-cADPR erhalten. Bei Vorinkubation von Jurkat T-Lymphozyten mit 8-Br-cADPR wurde der Freisetzungsspeak nur schwach inhibiert, während der Einstrompeak und das Einstromplateau wie bei GdCl₃ und SKF96365 signifikant vermindert waren. Dieses Resultat überraschte, da erwartet wurde, dass 8-Br-cADPR als Antagonist insbesondere die Calciumfreisetzung durch Inhibition des Ryanodinrezeptors, und damit auch den Einstrom über CRAR/Orai1-Kanäle inhibieren würde. Es scheint aber so zu sein, dass 8-Br-cADPR viel mehr den

Einstrom von Calcium über Calciumkanäle in der Plasmamembran hemmt, als dass es zur Inhibition des Ryanodinrezeptors führte. Diese Feststellung führte zu der Frage, wieso die beiden Wege (Einstrom und Freisetzung) so unterschiedlich stark inhibiert wurden und wie es zur starken Inhibition des Einstroms und nur zur schwachen Inhibition der Freisetzung kommen konnte. Der Unterschied des Ausmaßes der Inhibition kann vielleicht durch unterschiedlich stark ausgeprägte Affinitäten von 8-Br-cADPR und 8-Br-N1-cIDPR gegenüber den verschiedenen Bindestellen an RyR und Calciumkanälen erklärt werden. Die starke Inhibition des Einstroms wies daraufhin, dass der durch 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Einstrom zum Grossteil durch Aktivierung von TRPM2 hervorgerufen wird. Denn es konnte gezeigt werden, dass 8-Br-cADPR als cADPR Antagonist an TRPM2 wirksam ist und der koaktivierende Effekt von cADPR auf TRPM2-Kanal durch 8-Br-cADPR aufgehoben werden konnte (Kolisek et al., 2005).

Diese Annahme, dass 8-Br-N1-cIDPR das Calciumsignal u.a. durch Aktivierung von TRPM2 vermittelt, steht nicht im Widerspruch zu den Beobachtungen aus Versuchen mit $GdCl_3$, da $GdCl_3$ in der hier verwendeten Konzentration (25 μM) sowohl CRAC-Kanäle als auch TRPM2 hemmt (Gasser et al., 2006b). Es scheint also so zu sein, dass 8-Br-N1-cIDPR einerseits zur Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern und Aktivierung der CRAC-Kanäle führt, als auch einen direkten Einstrom von Calcium durch Stimulation von TRPM2 vermittelt (Abb. 5.3). Diese Vermutung stützen auch die Beobachtungen der Mikroinjektionsversuche mit Ruthenium Rot. So könnte die unvollständige Inhibition des Calciumsignals dadurch erklärt werden, dass zwar der Ausstrom aus den intrazellulären Speichern durch Ruthenium Rot gehemmt wurde, aber es dennoch zu einer Aktivierung des TRPM2-Kanals und damit zum Anstieg der Calciumkonzentration kam. Um eine Aktivierung von TRPM2 durch 8-Br-N1-cIDPR direkt nachzuweisen, müssten zukünftig Patch-Clamp Untersuchungen z.B. an Jurkat T-Lymphozyten oder an TRPM2 transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt werden. Hierbei müsste mit hohen Konzentrationen von 8-Br-N1-cIDPR gearbeitet werden, da für cADPR in Patch-Clamp Untersuchungen im whole-cell Modus an transfizierten HEK-Zellen ein EC_{50} von 700 μM beschrieben wurde (Kolisek et al., 2005).

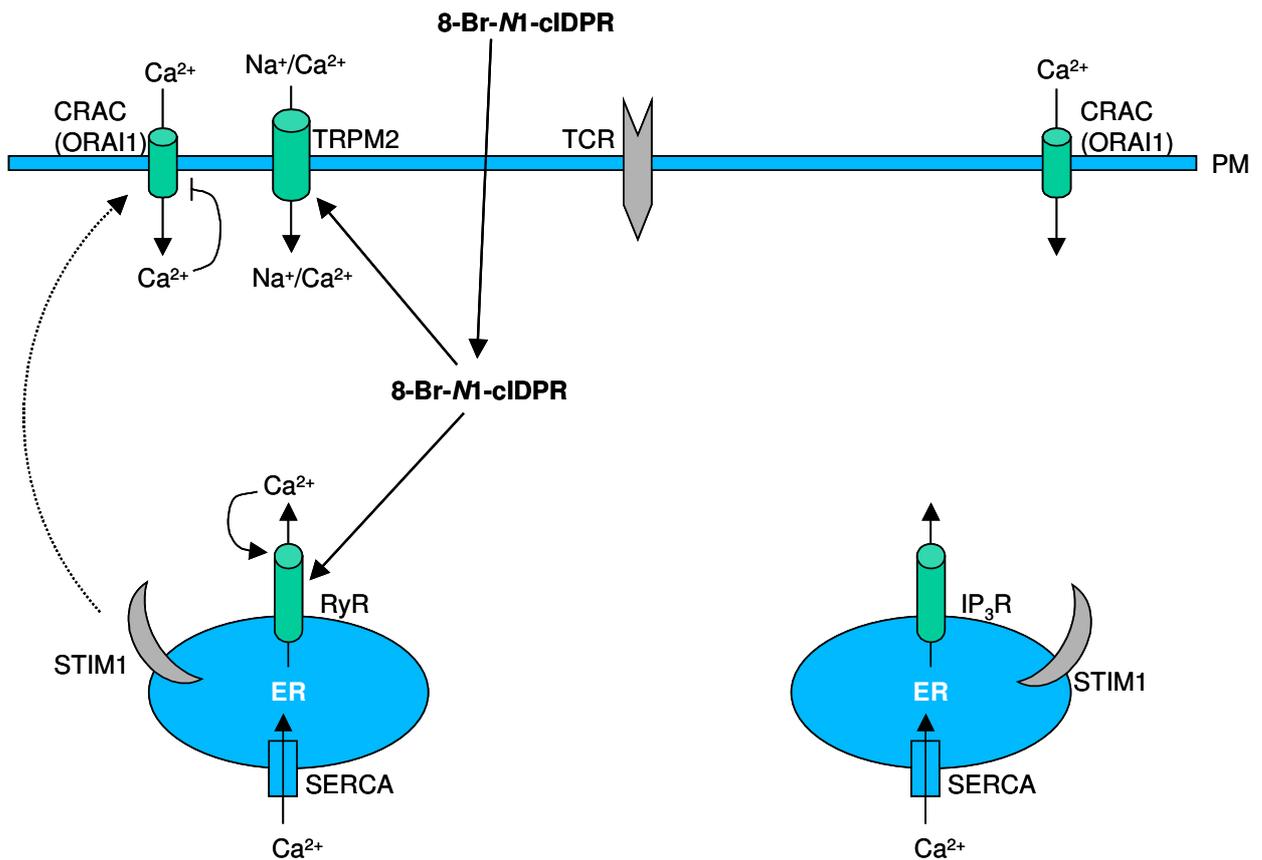


Abb. 5.3: Darstellung der vermuteten Zielproteine von 8-Br-M1-cIDPR in Jurkat T-Lymphozyten.

Die Bindung von 8-Br-M1-cIDPR an den RyR führt zu seiner Aktivierung und zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Des Weiteren vermittelt 8-Br-M1-cIDPR den Einstrom von Calcium, der vermutlich durch TRPM2- und CRAC-Kanäle getragen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 8-Br-M1-cIDPR ein gut zugänglicher, membranpermeabler und metabolisch stabiler cADPR Agonist ist, der wie cADPR zu Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern als auch zum Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum führte. Aufgrund dieser Resultate stellt 8-Br-M1-cIDPR eine interessante Ausgangssubstanz für die Entwicklung weiterer cADPR Analoga sowie für die Synthese von hydrolyseresistenten Affinitätsliganden dar, mit dessen Hilfe versucht werden kann, cADPR-Bindungsproteinen zu isolieren und zu identifizieren.

6 Zusammenfassung

cADPR ist ein calciummobilisierender second Messenger der bei T-Lymphozyten an der Erzeugung des langanhaltenden Calciumsignals beteiligt ist und vermutlich zur effizienten Aktivierung von T-Zellen beiträgt. Zur näheren Untersuchung des cyclischen ADP-Ribose (cADPR) vermittelten Calciumsignals wurden bereits viele cADPR Analoga synthetisiert und ihre Eigenschaften analysiert und beschrieben (Potter & Walseth, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das cADPR Analogon 8-Br-N1-cIDPR synthetisiert, aufgereinigt und seine metabolische Stabilität, der Effekt auf die Proliferation und das durch 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Calciumsignal näher untersucht.

Die erfolgreiche Synthese von 8-Br-N1-cIDPR erfolgte durch Umsetzung von 8-Br-NHD durch die ADP-Ribosyl Cyclase (ADPRC) von *A. californica*, wobei zur Aufreinigung von 8-Br-N1-cIDPR eine neue Strategie entwickelt wurde. Die Reinheit und Identität des Produkts konnten durch RP-HPLC- und massenspektroskopische Analyse gezeigt werden.

Die metabolische Stabilität von 8-Br-N1-cIDPR und von weiteren Hypoxanthin-basierten cADPR Analoga wie N1-cIDPR, N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE wurde gegenüber der ADPRC CD38 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Analoga im Gegensatz zu cADPR gegenüber CD38 stabil sind, was sie für weitere Untersuchungen des cADPR vermittelten Calciumsignals, aber auch als Leitstruktur für die Entwicklung weiterer Analoga interessant erscheinen lässt. Die Stabilität dieser cADPR Analoga beruht auf einem formellen Austausch der Nukleobase Adenin gegen Hypoxanthin und führt zu einer verminderten Nucleophilie und Reaktivität des N1-Atoms. In weiteren Studien wurde der Effekt dieser stabilen cADPR Agonisten und von cADPR selbst auf die Proliferation von Jurkat T-Lymphozyten untersucht. 8-Br-N1-cIDPR und cADPR hatten keinen Einfluss auf die Proliferation, während N1-cIDPR, N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE zur Inhibition der Proliferation führten. Der inhibitorische Effekt von N1-cIDPR war am stärksten ausgeprägt und wurde an anderen autonom wachsenden Lymphom- und Myelomzelllinien sowie an primären Ratten T-Zellen überprüft. Ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferation konnte aber nur bei einigen Lymphomzelllinien beobachtet werden, so dass vermutet wurde, dass es sich um einen zellspezifischen Effekt handelt.

Die Untersuchung des 8-Br-N1-cIDPR vermittelten Calciumsignals zeigte eine Beteiligung von 8-Br-N1-cIDPR sowohl an der Freisetzung als auch am Einstrom von Calcium. So konnte mit Hilfe des „Calcium free/Calcium readdition“-Protokolls gezeigt werden, dass 8-Br-N1-cIDPR während der calciumfreien Phase zu einer Freisetzung von Calcium führte. Nach Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{ex}$ konnte nachfolgend ein starker Einstrom beobachtet werden. Der Einstrom konnte durch die Calciumkanalblocker $GdCl_3$ und SKF96365 inhibiert werden, während die Freisetzung leicht erhöht oder unbeeinflusst war. Die Freisetzung konnte durch den RyR Antagonisten Ruthenium Rot zum Teil inhibiert werden. Ein unerwartetes Ergebnis wurde mit dem cADPR Antagonisten 8-Br-cADPR erhalten, hier konnte beobachtet werden, dass die Freisetzung nur schwach, der Einstrom aber stark inhibiert wurde. Da zuvor durch Kolisek et al., 2005 gezeigt wurde, dass cADPR gemeinsam mit ADPR aktivierend auf den Na^+/Ca^{2+} -Kationenkanal TRPM2 wirkt, wurde vermutet, dass die durch 8-Br-cADPR vermittelte Inhibition des Einstroms auf die Inhibition des TRPM2-Kanals zurückzuführen war. Der durch 8-Br-N1-cIDPR vermittelte Einstrom wird also vermutlich zu einem großen Teil durch TRPM2-Kanäle und weniger durch die CRAC-Kanäle vermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass sich bei 8-Br-N1-cIDPR um ein membranpermanente, metabolisch stabile cADPR Agonisten handelt, der zur Freisetzung als auch zum Einstrom von Calcium führt.

7 Abstract

Cyclic ADP-ribose (cADPR) is a Ca^{2+} -mobilizing second messenger in T-lymphocytes that is involved, at least partially, in the activation of the long-lasting calcium signal and presumably also for the efficient activation of T-cells. Many cADPR-analogues have been synthesized and characterized for detailed analysis of the cADPR activated calcium signal (Potter & Walseth, 2004).

The current thesis describes synthesis and purification of the cADPR analogue 8-Br-N1-cIDPR. Also, metabolic stability, effect of proliferation on T-cells and Ca^{2+} mobilization by 8-Br-N1-cIDPR was analyzed.

8-Br-N1-cIDPR was successfully synthesized by conversion of 8-Br-NHD using ADP-ribosyl cyclase (ADPRC) from *Aplysia californica*. A new strategy has been used for purification of the 8-Br-N1-cIDPR using anion exchange chromatography and gel filtration. The purity and identity of the product was confirmed by RP-HPLC and mass-spectroscopy.

The metabolic stability of 8-Br-N1-cIDPR and also of other hypoxanthin-based cADPR analogues, like N1-cIDPR, N1-cIDPRE and N1-cIDP-DE towards ADPRC CD38 was analyzed. These analogues, unlike cADPR, were stable towards CD38. The stability of these analogues is based on the replacement of adenosine by inosine which resulted in reduced nucleophilicity and reactivity of the N1-atom of the nucleobase. The metabolic stability of these analogues is interesting for further analyses of the cADPR mediated calcium signal, since no metabolism during experiments has to be expected.

Further, the effects of these stable cADPR agonists and of cADPR itself on proliferation of Jurkat T-lymphocytes were analysed. While 8-Br-N1-cIDPR and cADPR had no effect on proliferation, there was a concentration-dependent inhibition of proliferation by N1-cIDPR, N1-cIDPRE and N1-cIDP-DE. Because of the potent inhibition of proliferation by N1-cIDPR, this effect was controlled using other autonomously proliferating lymphoma- and myeloma cells and also in primary rat T-cells. However, only in a few lymphoma-cell lines the inhibitory effect concerning the proliferation was observed indicating that it was cell-type specific.

The analysis of the 8-Br-N1-cIDPR mediated calcium signal showed that 8-Br-N1-cIDPR is involved in both calcium release and entry. The "calcium free/calcium readdition" protocol indicated that in the absence of extracellular calcium 8-Br-N1-

cIDPR mediated calcium release. After readdition of extracellular calcium strong entry was observed. This entry was inhibited by the calcium channel blockers GdCl_3 and SKF96356, whereas calcium release was slightly increased or unaffected. Using the RyR antagonist ruthenium red, calcium release was partially inhibited. Unexpected 8-Br-N1-cIDPR evoked Ca^{2+} signaling was inhibited by the cADPR antagonist 8-Br-cADPR. Here, the release was only slightly, but the influx strongly inhibited. Kolisek et al., 2005 showed, that cADPR together with ADPR activates $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cation channel TRPM2, indicating that the inhibition of calcium entry by 8-Br-cADPR resulted from an inhibition of the TRPM2 channel. Presumably, the 8-N1-cIDPR mediated entry was mainly evoked by activation of TRPM2-channels and less by CRAC-channels.

Taken together, 8-Br-N1-cIDPR is a membrane permanent, metabolically stable cADPR agonist, which mediates the release and entry of calcium in T-cells.

8 Literaturverzeichnis

Aarhus, R., Graeff, RM., Dickey, DM., Walseth, TF. and Lee, HC. (1995) ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem* **270**: 30327-30333.

Ashamu, GA., Sethi, JK., Galione, A. and Potter, BV. (1997) Roles for adenosine ribose hydroxyl groups in cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose-mediated Ca^{2+} release. *Biochemistry* **36**: 9509-9517.

Bailey, VC., Fortt, SM., Summerhill, RJ., Galione, A. and Potter, BV. (1996) Cyclic aristeromycin diphosphate ribose: a potent and poorly hydrolysable Ca^{2+} -mobilising mimic of cyclic adenosine diphosphate ribose. *FEBS Lett* **379**: 227-230.

Bailey, VC., Sethi, JK., Fortt, SM., Galione, A. and Potter, BV. (1997) 7-Deaza cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose: first example of a Ca^{2+} -mobilizing partial agonist related to cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose. *Chem Biol* **4**: 51-61.

Bak, J., White, P., Timár, G., Missiaen, L., Genazzani, AA. and Galione, A. (1999) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate triggers Ca^{2+} release from brain microsomes. *Curr Biol* **9**: 751-754.

Beals, CR., Clipstone, NA., Ho, SN. and Crabtree, GR. (1997) Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* **11**: 824-834.

Berg, I., Potter, BV., Mayr, GW. and Guse, AH. (2000) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca^{2+} -signaling. *J Cell Biol* **150**: 581-588.

Berridge, MJ. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* **220**: 345-360.

Berridge, MJ. (1990) Calcium oscillations. *J Biol Chem* **265**: 9583-9586.

Berridge, MJ. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.

Berridge, MJ., Bootman, MD. and Lipp, P. (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature* **395**: 645-648.

Berridge, MJ., Lipp, P. and Bootman, MD. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11-21.

- Berridge, G., Dickinson, G., Parrington, J., Galione, A. and Patel, S.** (2002) Solubilization of receptors for the novel Ca^{2+} -mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem* **277**: 43717-43723.
- Boittin, F., Galione, A. and Evans, AM.** (2002) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate mediates Ca^{2+} signals and contraction in arterial smooth muscle via a two-pool mechanism. *Circ Res* **91**: 1168-1175.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L. and De Flora A** (2001) Connexin 43 hemi channels mediate Ca^{2+} -regulated transmembrane NAD^+ fluxes in intact cells. *FASEB J* **15**: 10-12.
- Bruzzone, S., De Flora, A., Usai, C., Graeff, R. and Lee, HC.** (2003) Cyclic ADP-ribose is a second messenger in the lipopolysaccharide-stimulated proliferation of human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem J* **375**: 395-403.
- Burdakov, D., Cancela, JM. and Petersen, OH.** (2001) Bombesin-induced cytosolic Ca^{2+} spiking in pancreatic acinar cells depends on cyclic ADP-ribose and ryanodine receptors. *Cell Calcium* **29**: 211-216.
- Cakir-Kiefer, C., Muller-Steffner, H. and Schuber, F.** (2000) Unifying mechanism for Aplysia ADP-ribosyl cyclase and CD38/ NAD^+ glycohydrolases. *Biochem J* **349**: 203-210.
- Cakir-Kiefer, C., Muller-Steffner, H., Oppenheimer, N. and Schuber, F.** (2001) Kinetic competence of the cADP-ribose-CD38 complex as an intermediate in the CD38/ NAD^+ glycohydrolase-catalysed reactions: implication for CD38 signalling. *Biochem J* **358**: 399-406.
- Cancela, JM. and Petersen, OH.** (1998) The cyclic ADP ribose antagonist 8-NH₂-cADP-ribose blocks cholecystokinin-evoked cytosolic Ca^{2+} spiking in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* **435**: 746-748.
- Cancela, JM., Churchill, GC. and Galione, A.** (1999) Coordination of agonist-induced Ca^{2+} -signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* **398**: 74-76.
- Cancela, JM., Van Coppenolle, F., Galione, A., Tepikin, AV. and Petersen, OH.** (2002) Transformation of local Ca^{2+} spikes to global Ca^{2+} transients: the combinatorial roles of multiple Ca^{2+} releasing messengers. *EMBO J* **21**: 909-919.
- Cantrell, D.** (1996) T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* **14**: 259-274.

- Ceni, C., Muller-Steffner, H., Lund, F., Pochon, N., Schweitzer, A., De Waard, M., Schuber, F., Villaz, M. and Moutin, M.** (2003) Evidence for an intracellular ADP-ribosyl cyclase/NAD⁺-glycohydrolase in brain from CD38-deficient mice. *J Biol Chem* **278**: 40670-40678.
- Ceni, C., Pochon, N., Villaz, M., Muller-Steffner, H., Schuber, F., Baratier, J., De Waard, M., Ronjat, M. and Moutin, M.** (2006) The CD38-independent ADP-ribosyl cyclase from mouse brain synaptosomes: a comparative study of neonate and adult brain. *Biochem J* **395**: 417-426.
- Churchill, GC., Okada, Y., Thomas, JM., Genazzani, AA., Patel, S. and Galione, A.** (2002) NAADP mobilizes Ca²⁺ from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* **111**: 703-708.
- Clapper, DL., Walseth, TF., Dargie, PJ. and Lee, HC.** (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., Nisticò, G. and Meldolesi, J.** (1996) The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxide/cGMP pathway. *J Biol Chem* **271**: 17739-17745.
- Crabtree, GR. and Olson, EN.** (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**: S67-79.
- Cui, Y., Galione, A. and Terrar, DA.** (1999) Effects of photoreleased cADP-ribose on calcium transients and calcium sparks in myocytes isolated from guinea-pig and rat ventricle. *Biochem J* **342 (Pt 2)**: 269-273.
- Dammermann, W. and Guse, AH.** (2005) Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes. *J Biol Chem* **280**: 21394-21399.
- De Flora, A., Zocchi, E., Guida, L., Franco, L. and Bruzzone, S.** (2004) Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system. *Ann N Y Acad Sci* **1028**: 176-191.
- Deterre, P., Gelman, L., Gary-Gouy, H., Arrieumerlou, C., Berthelie, V., Tixier, JM., Ktorza, S., Goding, J., Schmitt, C. and 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.

- Dolmetsch, RE., Lewis, RS., Goodnow, CC. and Healy, JI.** (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* **386**: 855-858.
- Dolmetsch, RE., Xu, K. and Lewis, RS.** (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**: 933-936.
- Donnadieu, E., Bismuth, G. and Trautmann, A.** (1992) Calcium fluxes in T lymphocytes. *J Biol Chem* **267**: 25864-25872.
- Donnadieu, E., Bismuth, G. and Trautmann, A.** (1994) Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr Biol* **4**: 584-595.
- Feske, S., Giltzane, J., Dolmetsch, R., Staudt, LM. and Rao, A.** (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* **2**: 316-324.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S., Tanasa, B., Hogan, PG., Lewis, RS., Daly, M. and Rao, A.** (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**: 179-185.
- Fill, M. and Copello, JA.** (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* **82**: 893-922.
- Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E., Usai, C. and 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. and De Flora, A.** (2001) 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.
- Fukuoka, M., Shuto, S., Minakawa, N., Ueno, Y. and Matsuda, A.** (2000) An efficient synthesis of cyclic IDP- and cyclic 8-bromo-IDP-carbocyclic-riboses using a modified Hata condensation method to form an intramolecular pyrophosphate linkage as a key step. An entry to a general method for the chemical synthesis of cyclic ADP-ribose analogues *J Org Chem* **65**: 5238-5248.
- Fulceri, R., Rossi, R., Bottinelli, R., Conti, A., Intravaia, E., Galione, A., Benedetti, A., Sorrentino, V. and Reggiani, C.** (2001) Ca^{2+} release induced by cyclic ADP ribose in mice lacking type 3 ryanodine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **288**: 697-702.

- Galione, A., Lee, HC. and Busa, WB.** (1991) Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* **253**: 1143-1146.
- Galione, A. and Churchill, GC.** (2002) Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* **32**: 343-354.
- Gardner, P.** (1989) Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* **59**: 15-20.
- Gasser, A., Bruhn, S. and Guse, AH.** (2006a) Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *J Biol Chem* **281**: 16906-16913.
- Gasser, A., Glassmeier, G., Fliegert, R., Langhorst, MF., Meinke, S., Hein, D., Krüger, S., Weber, K., Heiner, I., Oppenheimer, N., Schwarz, JR. and Guse, AH.** (2006b) Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose. *J Biol Chem* **281**: 2489-2496.
- Gelfand, EW., Cheung, RK. and Grinstein, S.** (1984) Role of membrane potential in the regulation of lectin-induced calcium uptake. *J Cell Physiol* **121**: 533-539.
- Gerasimenko, JV., Maruyama, Y., Yano, K., Dolman, NJ., Tepikin, AV., Petersen, OH. and Gerasimenko, OV.** (2003) NAADP mobilizes Ca^{2+} from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol* **163**: 271-282.
- Gerasimenko, JV., Sherwood, M., Tepikin, AV., Petersen, OH. and Gerasimenko, OV.** (2006) NAADP, cADPR and IP_3 all release Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci* **119**: 226-238.
- Giannini, G., Clementi, E., Ceci, R., Marziali, G. and Sorrentino, V.** (1992) Expression of a ryanodine receptor- Ca^{2+} channel that is regulated by TGF-beta. *Science* **257**: 91-94.
- Glick, DL., Hellmich, MR., Beushausen, S., Tempst, P., Bayley, H. and Strumwasser, F.** (1991) Primary structure of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul* **2**: 211-218.
- Graeff, RM., Walseth, TF., Fryxell, K., Branton, WD. and Lee, HC.** (1994) Enzymatic synthesis and characterizations of cyclic GDP-ribose. A procedure for distinguishing enzymes with ADP-ribosyl cyclase activity. *J Biol Chem* **269**: 30260-30267.
- Graeff, RM., Walseth, TF., Hill, HK. and Lee, HC.** (1996) Fluorescent analogs of cyclic ADP-ribose: synthesis, spectral characterization, and use. *Biochemistry* **35**: 379-386.

- Graeff, R., Liu, Q., Kriksunov, IA., Hao, Q. and Lee, HC.** (2006) Acidic residues at the active sites of CD38 and ADP-ribosyl cyclase determine nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthesis and hydrolysis activities. *J Biol Chem* **281**: 28951-28957.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, RY.** (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440-3450.
- Gu, QM. and Sih, CJ.** (1994) Cyclic ADP-Ribose: Synthesis and Structural Assignment *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 7481-7486.
- Gu, X., Yang, Z., Zhang, L., Kunerth, S., Fliegert, R., Weber, K., Guse, AH. and Zhang, L.** (2004) Synthesis and biological evaluation of novel membrane-permeant cyclic ADP-ribose mimics: N1-[(5'-O-phosphorylethoxy)methyl]-5'-O-phosphorylinosine 5',5"-cyclicpyrophosphate (cIDPRE) and 8-substituted derivatives. *J Med Chem* **47**: 5674-5682.
- Guida, L., Bruzzone, S., Sturla, L., Franco, L., Zocchi, E. and De Flora, A.** (2002) Equilibrative and concentrative nucleoside transporters mediate influx of extracellular cyclic ADP-ribose into 3T3 murine fibroblasts. *J Biol Chem* **277**: 47097-47105.
- Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S., Sturla, L., Zocchi, E., Basile, G., Usai, C. and De Flora, A.** (2004) Concentrative influx of functionally active cyclic ADP-ribose in dimethyl sulfoxide-differentiated HL-60 cells. *J Biol Chem* **279**: 22066-22075.
- Guse, AH., Roth, E. and Emmrich, F.** (1993) Intracellular Ca^{2+} pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J* **291 (Pt 2)**: 447-451.
- Guse, AH., da Silva, CP., Emmrich, F., Ashamu, GA., Potter, BV. and Mayr, GW.** (1995a) Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca^{2+} release in T lymphocyte cell lines. *J Immunol* **155**: 3353-3359.
- Guse, AH., Goldwisch, A., Weber, K. and Mayr, GW.** (1995b) Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *J Chromatogr B Biomed Appl* **672**: 189-198.
- Guse, AH., Silva, CP., Weber, K., Ashamu, GA., Potter, BV. and Mayr, GW.** (1996) Regulation of cADP-ribose-induced Ca^{2+} release by Mg^{2+} and inorganic phosphate. *J Biol Chem* **271**: 23946-23953.

- Guse, AH., da Silva, CP., Weber, K., Armah, CN., Ashamu, GA., Schulze, C., Potter, BV., Mayr, GW. and Hilz, H.** (1997a) 1-(5-phospho-beta-D-ribose)2'-phosphoadenosine 5'-phosphate cyclic anhydride induced Ca^{2+} release in human T-cell lines. *Eur J Biochem* **245**: 411-417.
- Guse, AH., Berg, I., da Silva, CP., Potter, BV. and Mayr, GW.** (1997b) Ca^{2+} entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes. *J Biol Chem* **272**: 8546-8550.
- Guse, AH., da Silva, CP., Berg, I., Skapenko, AL., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger, M., Ashamu, GA., Schulze-Koops, H., Potter, BV. and Mayr, GW.** (1999) Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* **398**: 70-73.
- Guse, AH., Cakir-Kiefer, C., Fukuoka, M., Shuto, S., Weber, K., Bailey, VC., Matsuda, A., Mayr, GW., Oppenheimer, N., Schuber, F. and Potter, BVL.** (2002) Novel hydrolysis-resistant analogues of cyclic ADP-ribose: modification of the "northern" ribose and calcium release activity. *Biochemistry* **41**: 6744-6751.
- Guse, AH.** (2004a) Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Mol Med* **4**: 239-248.
- Guse, AH.** (2004b) Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Med Chem* **11**: 847-855.
- Guse, AH., Gu, X., Zhang, L., Weber, K., Krämer, E., Yang, Z., Jin, H., Li, Q., Carrier, L. and Zhang, L.** (2005) A minimal structural analogue of cyclic ADP-ribose: synthesis and calcium release activity in mammalian cells. *J Biol Chem* **280**: 15952-15959.
- Hellmich, MR. and Strumwasser, F.** (1991) Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul* **2**: 193-202.
- Higashida, H., Yokoyama, S., Hashii, M., Taketo, M., Higashida, M., Takayasu, T., Ohshima, T., Takasawa, S., Okamoto, H. and Noda, M.** (1997) Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes. *J Biol Chem* **272**: 31272-31277.
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R., Drobny, H. and Zidar, A.** (2002) Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem J* **367**: 423-431.
- Hoth, M. and Penner, R.** (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**: 353-356.

- Hoth, M., Fanger, CM. and Lewis, RS.** (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* **137**: 633-648.
- Hoth, M., Button, DC. and Lewis, RS.** (2000) Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10607-10612.
- Howard, M., Grimaldi, JC., Bazan, JF., Lund, FE., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, RM., Walseth, TF. and Lee, HC.** (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* **262**: 1056-1059.
- Imboden, JB. and Weiss, A.** (1987) The T-cell antigen receptor regulates sustained increases in cytoplasmic free Ca^{2+} through extracellular Ca^{2+} influx and ongoing intracellular Ca^{2+} mobilization. *Biochem J* **247**: 695-700.
- Irvine, RF.** (1990) 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett* **263**: 5-9.
- Itoh, M., Ishihara, K., Tomizawa, H., Tanaka, H., Kobune, Y., Ishikawa, J., Kaisho, T. and 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, DG. and Bell, JI.** (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.
- Janeway, CA., Travers, P., Walpot, M. and Shlomchik, M.;** Immunologie. 5. Auflage. Spektrum, 2002.
- Johnson, JD. and Misler, S.** (2002) Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate-sensitive calcium stores initiate insulin signaling in human beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14566-14571.
- Kim, H., Jacobson, EL. and Jacobson, MK.** (1993) Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD glycohydrolases. *Science* **261**: 1330-1333.
- Kiselyov, K., Shin, DM., 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.
- Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A. and Penner, R.** (2005) Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* **18**: 61-69.

- Kudoh, T., Fukuoka, M., Ichikawa, S., Murayama, T., Ogawa, Y., Hashii, M., Higashida, H., Kunerth, S., Weber, K., Guse, AH., Potter, BVL., Matsuda, A. et al.** (2005) Synthesis of stable and cell-type selective analogues of cyclic ADP-ribose, a Ca^{2+} -mobilizing second messenger. Structure-activity relationship of the N1-ribose moiety. *J Am Chem Soc* **127**: 8846-8855.
- Kuemmerle, JF. and Makhlouf, GM.** (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.
- Kunerth, S., Langhorst, MF., Schwarzmann, N., Gu, X., Huang, L., Yang, Z., Zhang, L., Mills, SJ., Zhang, L., Potter, BVL. and Guse, AH.** (2004) Amplification and propagation of pacemaker Ca^{2+} signals by cyclic ADP-ribose and the type 3 ryanodine receptor in T cells. *J Cell Sci* **117**: 2141-2149.
- Kühn, FJP. and Lückhoff, A.** (2004) Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2. *J Biol Chem* **279**: 46431-46437.
- Langhorst, MF., Schwarzmann, N. and Guse, AH.** (2004) Ca^{2+} release via ryanodine receptors and Ca^{2+} entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *Cell Signal* **16**: 1283-1289.
- Lee, HC., Walseth, TF., Bratt, GT., Hayes, RN. and Clapper, DL.** (1989) Structural determination of a cyclic metabolite of NAD^+ with intracellular Ca^{2+} -mobilizing activity. *J Biol Chem* **264**: 1608-1615.
- Lee, HC. and Aarhus, R.** (1991) ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD^+ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul* **2**: 203-209.
- Lee, HC. and Aarhus, R.** (1993) Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. *Biochim Biophys Acta* **1164**: 68-74.
- Lee, HC.** (1993) Potentiation of calcium- and caffeine-induced calcium release by cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* **268**: 293-299.
- Lee, HC., Zocchi, E., Guida, L., Franco, L., Benatti, U. and De Flora, A.** (1993) Production and hydrolysis of cyclic ADP-ribose at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **191**: 639-645.
- Lee, HC., Aarhus, R. and Levitt, D.** (1994) The crystal structure of cyclic ADP-ribose. *Nat Struct Biol* **1**: 143-144.
- Lee, HC.** (1999) A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol Chem* **380**: 785-793.

- Lee, HC. and Aarhus, R.** (2000) Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose. *J Cell Sci* **113 Pt 24**: 4413-4420.
- Lee, HC.** (2004) Multiplicity of Ca²⁺ messengers and Ca²⁺ stores: a perspective from cyclic ADP-ribose and NAADP. *Curr Mol Med* **4**: 227-237.
- Lemmens, R., Larsson, O., Berggren, PO. and Islam, MS.** (2001) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca²⁺ signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **276**: 9971-9977.
- Lewis, RS. and Cahalan, MD.** (1989) Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul* **1**: 99-112.
- Lewis, RS.** (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **19**: 497-521.
- Li, Q. and Verma, IM.** (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**: 725-734.
- Liou, J., Kim, ML., Heo, WD., Jones, JT., Myers, JW., Ferrell, JEJ. and Meyer, T.** (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* **15**: 1235-1241.
- Liu, Q., Kriksunov, IA., Graeff, R., Munshi, C., Lee, HC. and Hao, Q.** (2005) Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure* **13**: 1331-1339.
- Makowska, A., Zablocki, K. and Duszyński, J.** (2000) The role of mitochondria in the regulation of calcium influx into Jurkat cells. *Eur J Biochem* **267**: 877-884.
- Marks, AR.** (1997) Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* **272**: H597-605.
- Masgrau, R., Churchill, GC., Morgan, AJ., Ashcroft, SJH. and Galione, A.** (2003) NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca²⁺ responses in clonal pancreatic beta cells. *Curr Biol* **13**: 247-251.
- Matsumura, N. and Tanuma, S.** (1998) Involvement of cytosolic NAD⁺ glycohydrolase in cyclic ADP-ribose metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 246-252.
- Mercer, JC., Dehaven, WI., Smyth, JT., Wedel, B., Boyles, RR., Bird, GS. and Putney, JWJ.** (2006) Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem* **281**: 24979-24990.

- Mojzisová, A., Krizanová, O., Záciková, L., Komínková, V. and Ondrias, K.** (2001) Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflugers Arch* **441**: 674-677.
- Moreau, C., Woodman, T.J. and Potter, BVL.** (2006) Unusual entry to the novel 8-halo-N1-ribosyl hypoxanthine system by degradation of a cyclic adenosine-5'-diphosphate ribose analogue. *Chem Commun (Camb)* : 1127-1129.
- Munshi, C., Thiel, DJ., Mathews, II., Aarhus, R., Walseth, TF. and Lee, HC.** (1999) Characterization of the active site of ADP-ribosyl cyclase. *J Biol Chem* **274**: 30770-30777.
- Munshi, C., Aarhus, R., Graeff, R., Walseth, TF., Levitt, D. and Lee, HC.** (2000) Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **275**: 21566-21571.
- Mészáros, LG., Bak, J. and Chu, A.** (1993) Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. *Nature* **364**: 76-79.
- Nakai, J., Imagawa, T., Hakamat, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H. and Numa, S.** (1990) Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* **271**: 169-177.
- Nishizuka, Y.** (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- Noguchi, N., Takasawa, S., Nata, K., Tohgo, A., Kato, I., Ikehata, F., Yonekura, H. and Okamoto, H.** (1997) Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca^{2+} from islet microsomes. *J Biol Chem* **272**: 3133-3136.
- Partida-Sánchez, S., Cockayne, DA., Monard, S., Jacobson, EL., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, TD. and Lund, FE.** (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. *Nat Med* **7**: 1209-1216.
- Patel, S., Churchill, GC. and Galione, A.** (2000) Unique kinetics of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) binding enhance the sensitivity of NAADP receptors for their ligand. *Biochem J* **352 Pt 3**: 725-729.
- Patterson, RL., van Rossum, DB. and Gill, DL.** (1999) Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* **98**: 487-499.

- Perraud, AL., Fleig, A., Dunn, CA., Bagley, LA., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, AJ., Zhu, Q., Bessman, MJ., Penner, R., Kinet, JP. and Scharenberg, AM.** (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**: 595-599.
- Perraud, A., Shen, B., Dunn, CA., Rippe, K., Smith, MK., Bessman, MJ., Stoddard, BL. and Scharenberg, AM.** (2003) NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem* **278**: 1794-1801.
- Podestà, M., Zocchi, E., Pitto, A., Usai, C., Franco, L., Bruzzone, S., Guida, L., Bacigalupo, A., Scadden, DT., Walseth, TF., De Flora, A. and Daga, A.** (2000) Extracellular cyclic ADP-ribose increases intracellular free calcium concentration and stimulates proliferation of human hemopoietic progenitors. *FASEB J* **14**: 680-690.
- Poenie, M. and Tsien, R.** (1986) Fura-2: a powerful new tool for measuring and imaging $[Ca^{2+}]_i$ in single cells. *Prog Clin Biol Res* **210**: 53-56.
- Potter, BVL. and Walseth, TF.** (2004) Medicinal chemistry and pharmacology of cyclic ADP-ribose. *Curr Mol Med* **4**: 303-311.
- Powell, JD., Ragheb, JA., Kitagawa-Sakakida, S. and Schwartz, RH.** (1998) Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunol Rev* **165**: 287-300.
- Prasad, GS., McRee, DE., Stura, EA., Levitt, DG., Lee, HC. and Stout, CD.** (1996) Crystal structure of Aplysia ADP ribosyl cyclase, a homologue of the bifunctional ectozyme CD38. *Nat Struct Biol* **3**: 957-964.
- Premack, BA. and Gardner, P.** (1992) Signal transduction by T-cell receptors: mobilization of Ca^{2+} and regulation of Ca^{2+} -dependent effector molecules. *Am J Physiol* **263**: C1119-40.
- Putney, JWJ.** (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**: 1-12.
- Ragheb, JA., Deen, M. and Schwartz, RH.** (1999) CD28-Mediated regulation of mRNA stability requires sequences within the coding region of the IL-2 mRNA. *J Immunol* **163**: 120-129.
- Randriamampita, C. and Tsien, RY.** (1993) Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* **364**: 809-814.
- Randriamampita, C. and Trautmann, A.** (2004) Ca^{2+} signals and T lymphocytes; "New mechanisms and functions in Ca^{2+} signalling". *Biol Cell* **96**: 69-78.

- Rao, A.** (1994) NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* **15**: 274-281.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, AV., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., Velicelebi, G. and Stauderman, K.A.** (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol* **169**: 435-445.
- Rusinko, N. and 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.
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Yokoi, H., Matsushime, H. and Furuichi, K.** (2001) Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2. *Science* **293**: 1327-1330.
- Sauve, A.A., Munshi, C., Lee, H.C. and 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. and Lund, F.E.** (2004) Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med* **4**: 249-261.
- Schwarzmann, N., Kunerth, S., Weber, K., Mayr, G.W. and Guse, A.H.** (2002) Knock-down of the type 3 ryanodine receptor impairs sustained Ca^{2+} signaling via the T cell receptor/CD3 complex. *J Biol Chem* **277**: 50636-50642.
- Schweitzer, K., Mayr, G.W. and Guse, A.H.** (2001) Assay for ADP-ribosyl cyclase by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **299**: 218-226.
- Schweitzer, K.;** Untersuchungen zu ADP-Ribosylcyclasen in humanen immunkompetenten Zellen. Dissertation, Universität Hamburg, 2002.
- Schöttelndreier, H., Potter, B.V., Mayr, G.W. and Guse, A.H.** (2001) Mechanisms involved in alpha-6-beta1-integrin-mediated Ca^{2+} signalling. *Cell Signal* **13**: 895-899.
- Sethi, J.K., Empson, R.M., Bailey, V.C., Potter, B.V. and 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.
- Shuto, S., Shirato, M., Sumita, Y., Ueno, Y., and Matsuda, A.** (1998) Nucleosides and Nucleotides. 173. Synthesis of Cyclic IDP-carbocyclic-ribose, a Stable Mimic of Cyclic ADP-ribose. Significant Facilitation of the Intramolecular Condensation

Reaction of N-1-(Carbocyclic-ribosyl)inosine 5',6''-Diphosphate Derivatives by an 8-Bromo-Substitution at the Hypoxanthine Moiety. *J. Org. Chem.* **63**: 1986 - 1994.

Shuto, S., Fukuoka, M., Manikowsky, A., Ueno, Y., Nakano, T., Kuroda, R., Kuroda, H. and Matsuda, A. (2001) Total synthesis of cyclic ADP-carbocyclic-ribose, a stable mimic of Ca²⁺-mobilizing second messenger cyclic ADP-ribose. *J Am Chem Soc* **123**: 8750-8759.

Shuto, S., Fukuoka, M., Kudoh, T., Garnham, C., Galione, A., Potter, BVL. and Matsuda, A. (2003) Convergent synthesis and unexpected Ca²⁺-mobilizing activity of 8-substituted analogues of cyclic ADP-carbocyclic-ribose, a stable mimic of the Ca²⁺-mobilizing second messenger cyclic ADP-ribose. *J Med Chem* **46**: 4741-4749.

Shuto, S. and Matsuda, A. (2004) Chemistry of cyclic ADP-ribose and its analogs. *Curr Med Chem* **11**: 827-845.

Soares, S., Thompson, M., White, T., Isbell, A., Yamasaki, M., Prakash, Y., Lund, FE., Galione, A. and Chini, EN. (2007) NAADP as a second messenger: neither CD38 nor base-exchange reaction are necessary for in vivo generation of NAADP in myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**: C227-39.

Soboloff, J., Spassova, MA., Tang, XD., Hewavitharana, T., Xu, W. and Gill, DL. (2006) Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* **281**: 20661-20665.

States, DJ., Walseth, TF. and Lee, HC. (1992) Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem Sci* **17**: 495.

Steen, M., Kirchberger, T. and Guse, AH. (2007) NAADP mobilizes calcium from the endoplasmic reticular Ca²⁺ store in T-lymphocytes. *J Biol Chem* **282**: 18864-18871.

Steffan, NM., Bren, GD., Frantz, B., Tocci, MJ., O'Neill, EA. and Paya, CV. (1995) Regulation of I κ B alpha phosphorylation by PKC- and Ca²⁺-dependent signal transduction pathways. *J Immunol* **155**: 4685-4691.

Sternfeld, L., Krause, E., Guse, AH. and Schulz, I. (2003) Hormonal control of ADP-ribosyl cyclase activity in pancreatic acinar cells from rats. *J Biol Chem* **278**: 33629-33636.

Streb, H., Irvine, RF., Berridge, MJ. and Schulz, I. (1983) Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**: 67-69.

- Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H. and Okamoto, H.** (1993) Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells. *Science* **259**: 370-373.
- Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T. and et al.** (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **339**: 439-445.
- Tang, W., Chen, Y., Zou, A., Campbell, WB. and Li, P.** (2002) Role of FKBP12.6 in cADPR-induced activation of reconstituted ryanodine receptors from arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**: H1304-10.
- Thorn, P., Gerasimenko, O. and Petersen, OH.** (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.
- Tsien, RW. and Tsien, RY.** (1990) Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* **6**: 715-760.
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, JM., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, DL., Soboloff, J., Gill, DL., Fleig, A., Kinet, J. and Penner, R.** (2006) CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* **16**: 2073-2079.
- Vu, CQ., Lu, PJ., Chen, CS. and Jacobson, MK.** (1996) 2'-Phospho-cyclic ADP-ribose, a calcium-mobilizing agent derived from NADP. *J Biol Chem* **271**: 4747-4754.
- Wagner, GK., Black, S., Guse, AH. and Potter, BVL.** (2003) First enzymatic synthesis of an N1-cyclised cADPR (cyclic-ADP ribose) analogue with a hypoxanthine partial structure: discovery of a membrane permeant cADPR agonist. *Chem Commun (Camb)* : 1944-1945.
- Wagner, GK., Guse, AH. and Potter, BVL.** (2005) Rapid synthetic route toward structurally modified derivatives of cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose. *J Org Chem* **70**: 4810-4819.
- Walker, G., Kerrick, WG. and Bourguignon, LY.** (1989) The role of caldesmon in the regulation of receptor capping in mouse T-lymphoma cell. *J Biol Chem* **264**: 496-500.
- Walseth, TF. and Lee, HC.** (1993) Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADP-ribose-induced Ca^{2+} release. *Biochim Biophys Acta* **1178**: 235-242.
- Walseth, TF., Aarhus, R., Gurnack, ME., Wong, L., Breitinger, HG., Gee, KR. and Lee, HC.** (1997) Preparation of cyclic ADP-ribose antagonists and caged cyclic ADP-ribose. *Methods Enzymol* **280**: 294-305.

- White, AM., Watson, SP. and Galione, A.** (1993) Cyclic ADP-ribose-induced Ca^{2+} release from rat brain microsomes. *FEBS Lett* **318**: 259-263.
- Wong, L., Aarhus, R., Lee, HC. and Walseth, TF.** (1999) Cyclic 3-deaza-adenosine diphosphoribose: a potent and stable analog of cyclic ADP-ribose. *Biochim Biophys Acta* **1472**: 555-564.
- Xu, J., Yang, Z., Dammermann, W., Zhang, L., Guse, AH. and Zhang, L.** (2006) Synthesis and agonist activity of cyclic ADP-ribose analogues with substitution of the northern ribose by ether or alkane chains. *J Med Chem* **49**: 5501-5512.
- Yamada, S., Gu, QM. and Sih, CJ.** (1994) Cyclic ADP-Ribose via Stereoselective Cyclization of β -NAD. *J. Am. Chem. Soc.* **116(23)**: 10787-10788.
- Yamamoto-Katayama, S., Sato, A., Ariyoshi, M., Suyama, M., Ishihara, K., Hirano, T., Nakamura, H., Morikawa, K. and 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.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, AJ., Churchill, GC., Patel, S., Ashcroft, SJH. and Galione, A.** (2004) Organelle selection determines agonist-specific Ca^{2+} signals in pancreatic acinar and beta cells. *J Biol Chem* **279**: 7234-7240.
- Yamasaki, M., Thomas, JM., Churchill, GC., Garnham, C., Lewis, AM., Cancela, J., Patel, S. and Galione, A.** (2005) Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked Ca^{2+} spiking in mouse pancreatic acinar cells. *Curr Biol* **15**: 874-878.
- Young, GS., Choleris, E., Lund, FE. and Kirkland, JB.** (2006) Decreased cADPR and increased NAD^+ in the $\text{Cd38}^{-/-}$ mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **346**: 188-192.
- Zhang, SL., Yu, Y., Roos, J., Kozak, JA., Deerinck, TJ., Ellisman, MH., Stauderman, KA. and Cahalan, MD.** (2005) STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* **437**: 902-905.
- Zhang, F. and Li, P.** (2007) Reconstitution and characterization of a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-sensitive Ca^{2+} release channel from liver lysosomes of rats. *J Biol Chem* **282**: 25259-25269.
- Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Benatti, U., Bargellesi, A., Malavasi, F., Lee, HC. and 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.

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

9 Eigene Publikationen

9.1 Veröffentlichungen

- Kirchberger T., Wagner G., Xu J., Cordiglieri C., Wang P., Gasser A., Fliegert R., Bruhn S., Flügel A., Lund F.E., Zhang L-h., Potter B.V.L., Guse A.H. (2006) Cellular effects and metabolic stability of *M1*-cyclic inosine diphosphoribose and its derivatives. *Br J Pharmacol* **149**: 337-44.
- Steen M., Kirchberger T., Guse A.H. (2007) NAADP mobilizes calcium from the endoplasmic reticular Ca^{2+} store in T-lymphocytes. *J Biol Chem* **282**: 18864-71.

9.2 Abstracts und Posterpräsentationen

- Kirchberger T., Wagner G., Xu J., Cordiglieri C., Wang P., Gasser A., Fliegert R., Bruhn S., Flügel A., Lund F.E., Zhang L-h., Potter B.V.L., Guse A.H. (2006) Cellular effects and metabolic stability of *M1*-cyclic inosine diphosphoribose and its derivatives. CD38-Meeting vom 8. bis 10.06.2006 an der Universität Turin, Italien.
- Steen M., Kirchberger T., Guse A.H. (2007) NAADP mobilizes calcium from the endoplasmic reticular Ca^{2+} store in T-lymphocytes. Tagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM) vom 16. bis 19.09.2007 an der Universität Hamburg.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas H. Guse für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller technischen und finanziellen Mittel, die zahlreichen experimentellen und wissenschaftlichen Anregungen und für die motivierende und engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. K. Wiese danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie.

Des weiteren danke ich Prof. Dr. B. V. L. Potter sowie Dr. Ch. Moreau von der University of Bath, England für die Bereitstellung der cADPR Analoga 8-Br-N1-cIDPR und N1-cIDPR, sowie die für Durchführung der massenspektroskopischen Analyse.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Li-He Zhang von der Peking University, China für die Überlassung der cADPR Analoga N1-cIDPRE und N1-cIDP-DE danken.

Ebenfalls danke ich Dr. F. E. Lund vom Trudeau Institute, USA für die Bereitstellung der rekombinanten ADP-Ribosyl Cyclase CD38 aus der Maus.

Ferner möchte ich Prof. Dr. A. Flügel und C. Cordiglieri für die Untersuchung der Cytokinexpression und der Proliferation von primären T-Lymphozyten danken.

Bedanken möchte ich mich bei meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen Ralf Fliegert, Cornelia Siebrands, Sören Bruhn, Frederike Schmid, Merle Nebel, Karin Weber, Angelika Harneit, Andreas Gasser, Werner Dammermann, Susan Schlegel und Mareike Steen für die zahlreichen Diskussionen über wissenschaftliche und experimentelle Probleme, für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und für das angenehme und sehr motivierende Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank geht an meinen Mann Niklas und an meine Familie für ihre Unterstützung, Hilfe und Geduld.