

***Kurzfassung***

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

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

*Verwendete Abkürzungen:*

ADPRC, ADP-Ribosylcyclase; cADPR, cyclische Adenosin-5'-Diphosphatribose; CD38 (-/-)-T-Lymphoblasten, aus einer CD38-Knockout-Maus isolierte T-Lymphoblasten; NADGH, NAD-Glykohydrolyase; P2, 2000•g-Membranen; P10, 10.000•g-Membranen; PS100, von 100.000•g-Membranen abgewaschene cytosolische/membranassoziierte Proteine; RP-HPLC, Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography; S100, 100.000•g-Überstand (cytosolische Fraktion); TCR/CD3-Komplex, T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex; 8-Br-NHD, 8-Bromo-Nicotinamidhypoxanthin-dinukleotid