

**Untersuchungen
zum Metabolismus des
Ca²⁺-freisetzenden Botenstoffs NAADP**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

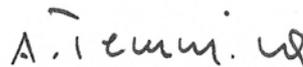
Frederike Schmid

aus Würzburg

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Prof. Dr. A. H. GUSE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 20. Mai 2011

Hamburg, den 05. Mai 2011



Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Signaltransduktion und Ca^{2+}	1
1.1.1 Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER.....	2
1.1.2 Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum	3
1.1.3 Ca^{2+} regulierte zelluläre Prozesse.....	4
1.2 Signaltransduktion und Ca^{2+} in T-Lymphozyten.....	5
1.3 Signaltransduktion und Ca^{2+} in HeLa-Zellen	6
1.4 Der Ca^{2+} -freisetzende Botenstoff NAADP.....	7
1.4.1 Entdeckung der Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung von NAADP.....	7
1.4.2 NAADP-Rezeptoren.....	8
1.4.3 NAADP-Metabolismus	10
1.5 Die Familie der alkalischen Phosphatasen	12
1.5.1 Entdeckung und Struktur der alkalischen Phosphatasen.....	12
1.5.2 Physiologie und Pathophysiologie der alkalischen Phosphatasen.....	13
1.5.2.1 Gewebsspezifische alkalische Phosphatase.....	13
1.5.2.2 Intestinale alkalische Phosphatase.....	14
1.5.2.3 Plazentale alkalische Phosphatase.....	15
 2 Zielsetzung.....	 17
 3 Material und Methoden	 18
3.1 Zellkultur	18
3.1.1 Kultur von Jurkat-T-Lymphozyten.....	18
3.1.2 Kultur von HeLa-Zellen	18
3.1.3 Kultur von HEK-293-Zellen.....	19
3.1.4 Kryokonservierung von Zellen.....	19
3.2 HPLC-Analytik.....	20
3.2.1 RP-HPLC von Nukleotiden	20
3.2.1.1 RP-HPLC von NAAD	21
3.2.1.2 RP-HPLC von NAADP	22
3.2.1.3 RP-HPLC von ADPRP	22
3.2.2 Herstellung des ADPRP-Standards	23
3.3 Ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$	23
3.4 Enzymatische Quantifizierung der intrazellulären NAADP-Konzentration	24
3.4.1 Extraktion von NAADP	25
3.4.2 Aufreinigung der Zellextrakte über Ionenaustauschchromatographie	26
3.4.3 Reinigung der verwendeten Enzyme.....	26
3.4.4 Umsatz von NAADP zu NADP	27
3.4.5 Amplifikationsreaktion und Detektion	27
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	28
3.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen.....	28
3.5.2 RT-PCR und PCR.....	28
3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese	30

3.5.4 Restriktionsverdau von DNA	30
3.5.5 Ligation von DNA	31
3.5.6 Transformation von <i>E.coli</i>	31
3.5.7 Präparation von Plasmid-DNA	32
3.5.8 TA-Klonierung mit pGEM-T easy	32
3.5.9 Sequenzierung von DNA	33
3.6 Rekombinante Protein-Expression	33
3.6.1 Herstellung eines Vektors zur Expression der alkalischen Phosphatase	33
3.6.2 Transfektion eukaryotischer Zellen	34
3.6.3 Überexpression und affinitätschromatographische Reinigung von CD38	35
3.7 Proteinbiochemische Methoden	35
3.7.1 Präparation von Membranfraktionen aus eukaryotischen Zellen	35
3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
3.7.3 Western Blotting	36
3.7.4 DotBlot zur Validierung der Primärantikörper	37
3.8 Enzymatische Assays	37
3.8.1 Fluorimetrischer Nachweis der NAD-Glykohydrolase-Aktivität	37
3.8.2 Colorimetrischer Nachweis der Phosphatase-Aktivität mit dem Substrat pNPP	39
3.8.3 Colorimetrischer Nachweis der Phosphat-Freisetzung durch Komplexbildung mit Molybdat und Malachitgrün	41
3.8.4 Enzymkinetik und Auswertung enzymatischer Assays	42
3.9 Fluoreszenz-Mikroskopie	43
3.10 Software und Datenanalyse	44
3.11 Primer	44
3.12 Plasmide	46
3.13 Antikörper	46
3.14 Medien, Chemikalien und Reagenzien-Kits	47
3.15 Puffer und Lösungen	49
3.16 Material	50
3.17 Geräte	51
4 Ergebnisse	52
4.1 NAADP-Metabolismus in Jurkat-T-Lymphozyten	52
4.1.1 CD38- <i>knock down</i> -Zellen zeigen verringerte NAD-Glykohydrolase-Aktivität	52
4.1.2 CD38- <i>knock down</i> -Zellen weisen eine reduzierte NAADP-Syntheserate auf ...	53
4.1.3 CD38 <i>knock down</i> -Zellen zeigen einen verminderten Abbau von NAADP	55
4.2 Analyse der NAADP-abbauenden Aktivität von rekombinantem, affinitäts- gereinigtem CD38	58
4.2.1 HEK-293-Zellen exprimieren endogen kein CD38	58
4.2.2 Rekombinantes CD38 zeigt NAD-Glykohydrolase-Aktivität	59
4.2.3 Rekombinantes CD38 katalysiert den Abbau von NAADP zu ADPRP	61
4.3 NAADP-Metabolismus in HeLa-Zellen	63
4.3.1 Stimulation von HeLa-Zellen mit Carbachol führt zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$	63
4.3.2 Stimulation von HeLa-Zellen mit Carbachol führt zum Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration	64
4.3.3 HeLa-Zellen exprimieren kein CD38	65

4.3.4 Enzymatische Charakterisierung des NAADP-Abbaus in HeLa-Zellen.....	68
4.3.4.1 HeLa-Zellen enthalten eine NAADP-dephosphorylierende Aktivität.....	68
4.3.4.2 Das pH-Optimum der NAADP-abbauenden Aktivität liegt bei 9.....	70
4.3.4.3 Physiologische Konzentrationen an NAADP werden in HeLa-Zellen dephosphoryliert	71
4.3.4.4 Die Produktbildung von NAAD zeigt eine lineare Zunahme über die Zeit	72
4.3.4.5 Die NAADP-abbauende Aktivität folgt der Michaelis-Menten-Kinetik.....	73
4.3.4.6 HeLa-Zellen exprimieren drei Isoformen der alkalischen Phosphatase.....	74
4.3.4.7 Isoformen der alkalischen Phosphatase können durch spezifische Inhibitoren differenziert werden	76
4.4 Vergleich der Expression der alkalischen Phosphatase in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen	78
4.4.1 Jurkat-T-Lymphozyten zeigen keine Aktivität der alkalischen Phosphatase.....	78
4.4.2 Die Expression einer alkalischen Phosphatase ist in Jurkat-T-Lymphozyten weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene nachweisbar	80
4.5 Untersuchung der Aktivität von rekombinant exprimierter alkalischer Phosphatase	80
4.5.1 HEK-293-Zellen exprimieren endogen keine alkalische Phosphatase.....	81
4.5.2 Transient mit alkalischer Phosphatase transfizierte HEK-293-Zellen zeigen Phosphatase-Aktivität	83
4.5.3 Rekombinant exprimierte alkalische Phosphatase katalysiert den Abbau von NAADP	84
5 Diskussion.....	87
5.1 Methoden zur Quantifizierung von NAADP.....	87
5.1.1 Quantifizierung von NAADP durch den Radio-Rezeptor-Assay.....	88
5.1.2 Quantifizierung von NAADP durch fluorimetrische Cycling-Assays	89
5.1.3 Quantifizierung von NAADP durch SERS	91
5.1.4 Quantifizierung von NAADP durch HPLC-Analytik	92
5.1.5 Quantifizierung von Botenstoffen durch FRET	93
5.2 Enzymologie von CD38	95
5.2.1 Hydrolyse von NAD durch CD38	96
5.2.2 Katalyse der Basenaustauschreaktion durch CD38	98
5.2.3 Hydrolyse von NAADP durch CD38	99
5.3 CD38 und NAADP-Metabolismus.....	101
5.3.1 Bildung von NAADP im Seeigeelei.....	101
5.3.2 Bildung von NAADP in Säugerzellen.....	102
5.3.3 Abbau von NAADP in Säugerzellen und CD38	103
5.4 Enzymologie der alkalischen Phosphatasen	106
5.4.1 Substrate der TNAP	108
5.4.2 Substrate der IAP	109
5.4.3 Substrate der PLAP	109
5.5 NAADP-Metabolismus in HeLa-Zellen.....	110
5.5.1 Expression und Aktivität der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen.....	110
5.5.2 NAADP-Abbau in HeLa-Zellen.....	111
5.6 Vergleich des NAADP-Abbaus in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen	114

6 Zusammenfassung	117
7 Abstract	119
8 Literaturverzeichnis	121
9 Danksagung.....	142
10 Anhang.....	143
10.1 Veröffentlichungen.....	143
10.2 Kongressbeiträge	143
10.3 HPLC-Programme	145
10.4 Sequenzierungen.....	150

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosindiphosphatribose
ADPRC	ADP-Ribosylcyclase
ADPRP	ADP-Ribose-2'-Phosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary unit</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	zweiwertige Calciumionen
[Ca ²⁺]	Konzentration freier zweiwertiger Calciumionen
[Ca ²⁺] _i	Konzentration freier zweiwertiger Calciumionen im Cytosol
[Ca ²⁺] _n	Konzentration freier zweiwertiger Calciumionen im Kern
cADPR	cyclische Adenosindiphosphatribose
cADPRP	cyclisches Adenosindiphosphatribose-2'-Phosphat
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCh	Carbachol
CD38	<i>cluster of differentiation</i> 38, ADP-Ribosylcyclase
CD157	<i>cluster of differentiation</i> 157, ADP-Ribosylcyclase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CICR	Ca ²⁺ induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung
CRAC	<i>Ca²⁺-release activated Ca²⁺</i>
CRACR2A	<i>Ca²⁺ release activated Ca²⁺ regulator 2A</i>
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EDTA	Ethylendiamin-(N,N,N',N')-tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-(N,N,N',N')-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
Em	Emission
Ex	Exzitation
F	Fluoreszenz
FCS	fötales Kälberserum
Fura-2/AM	Acetoxymethoxyester des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2
G-418	Geneticin-Sulfat
GCAP	Keimzell-spezifische alkalische Phosphatase
HEK	<i>human embryonic kidney</i> (Zelllinie)
HeLa	Henrietta Lacks (Zelllinie)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IAP	intestinale alkalische Phosphatase
IC ₅₀	Konzentration mit halbmaximaler inhibitorischer Wirkung
IP ₃	D- <i>myo</i> -Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
kb	Kilobasen
kd	<i>knock down</i>
kDa	Kilodalton
LB	Nährmedium nach Luria-Bertani
mACh-	Rezeptor muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MCS	Multiple cloning site
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
NAAD	Nikotinsäure-Adenindinukleotid
NAADP	Nikotinsäure-Adenindinukleotid-2'-phosphat
NAD	Nikotinamid-Adenindinukleotid
NADase	NAD-Glykohydrolase
NADP	Nicotinamid-Adenindinucleotid-2'-phosphat
NCS	Serum neugeborener Kälber
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered salt solution</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PKC	Proteinkinase C
PLAP	plazentale alkalische Phosphatase
PLC	Phospholipase C
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase der Plasmamembran
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
P _i	anorganisches Phosphat
PP _i	Pyrophosphat
RE	relative Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums
SOCE	<i>Store operated Ca²⁺ entry</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STIM	<i>stromal interaction molecule</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor-Komplex
TNAP	gewebunspezifische alkalische Phosphatase
TPC	<i>two pore channel</i>
Tris	<i>Tris</i> -(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPM	<i>melastatin-related transient receptor potential</i>

TRPML1	<i>transient receptor potential-mucolipin 1</i>
ÜN	über Nacht
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion und Ca^{2+}

Um sich an Veränderungen der Umwelt anpassen zu können, müssen Zellen äußere Reize erkennen und auf sie reagieren können. Mit Hilfe von Rezeptoren werden die äußeren Reize registriert und die Information über Botenstoffe ins Zellinnere übermittelt. Dabei werden häufig mehrere Signalkaskaden in Gang gesetzt. Oft wird das Signal amplifiziert, bevor es an den entsprechenden Zielort in der Zelle gelangt.

Ca^{2+} ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, der die Aktivität vieler verschiedener Signalproteine steuert und dadurch so unterschiedliche Zellprozesse wie Exozytose, Muskelkontraktion, Proliferation und Apoptose reguliert. Die Beschreibung des Calcium-Signalsystems in der vorliegenden Arbeit konzentriert sich auf Prozesse in nicht-erregbaren Zellen.

Damit Ca^{2+} seine Funktion als Botenstoff erfüllen kann, muss die Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) präzise reguliert werden. Im Extrazellulärraum beträgt die $[\text{Ca}^{2+}]$ ca. 2 mM (Berridge et al., 2000), während sich die $[\text{Ca}^{2+}]$ im endoplasmatischen Retikulum (ER) auf ca. 60 - 400 μM beläuft (Miyawaki et al., 1997; Christensen et al., 2002; Lloyd-Evans et al., 2008). Im Cytosol wird die $[\text{Ca}^{2+}]$ durch ein aufwendiges System an Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -Pufferproteinen auf ca. 100 nM eingestellt, wodurch ein hoher elektrochemischer Gradient zwischen dem Cytosol und dem ER bzw. Extrazellulärraum aufgebaut wird (Berridge et al., 2000). Nach Stimulation der Zelle öffnen Ca^{2+} -permeable Kanäle, so dass die freie, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) innerhalb weniger Sekunden auf 300 – 1000 nM ansteigt. Dabei kann Ca^{2+} zum einen über Kanäle aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen, zum anderen kann Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie beispielsweise dem ER freigesetzt werden. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimuliert eine Reihe von Ca^{2+} -abhängigen Signalproteinen, welche wiederum in nachgeschaltete Signalkaskaden eingreifen und so eine Reaktion der Zelle auf den Stimulus ermöglichen. Um das Ruhenniveau der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder herzustellen, wird Ca^{2+} durch Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran (PMCA) bzw. in intrazellulären Membranen (sarcoplasmatische/endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase; SERCA) aus dem Cytosol entfernt. Durch die Aktivität der SERCA werden gleichzeitig die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher ER bzw. sarkoplasmatisches Retikulum (SR) wieder gefüllt (MacLennan et al., 1985).

1.1.1 Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern ins Cytosol wird über Botenstoffe gesteuert. Je nach Art des Stimulus und des an der Signalweiterleitung beteiligten Rezeptors werden unterschiedliche Botenstoffe gebildet (Berridge et al., 2000).

Einer dieser Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe ist *D-myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), welches nach Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat entsteht (Kirk et al., 1981). Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von IP_3 war zuerst an Zellen des Pankreas beobachtet worden (Streb et al., 1983) und wurde inzwischen in vielen Zellsystemen nachgewiesen, unter anderem in T-Lymphozyten (Imboden und Stobo, 1985) und HeLa-Zellen (Bootman et al., 1992). Die Wirkung von IP_3 beruht auf der Bindung an den IP_3 -Rezeptor, einen ligandengesteuerten Ca^{2+} -Kanal im ER. Dies führt zur Öffnung des Kanals, so dass Ca^{2+} entlang des elektrochemischen Gradienten aus dem ER ins Cytosol strömt (Streb et al., 1983). Zugleich wird die Offenwahrscheinlichkeit des IP_3 -Rezeptors durch Ca^{2+} moduliert: In geringen Konzentrationen erhöht Ca^{2+} die Offenwahrscheinlichkeit des IP_3 -Rezeptors. Diese positive Rückkopplung ermöglicht einen weiteren Ausstrom von Ca^{2+} ins Cytosol. In hohen Konzentrationen hingegen inhibiert Ca^{2+} den IP_3 -Rezeptor, so dass der Ca^{2+} -Strom zum Erliegen kommt (Mak et al., 1998).

Ein weiterer Ca^{2+} -freisetzender Botenstoff ist zyklische ADP-Ribose (cADPR). Die Wirkung des NAD-Metaboliten wurde erstmals in Seeigeelei-Homogenaten beobachtet (Clapper et al., 1987) und später cADPR als Botenstoff identifiziert (Lee et al., 1989). Nach Rezeptorstimulation wird cADPR aus NAD unter Abspaltung von Nikotinamid durch eine ADP-Ribosylcyclase (ADPRC) gebildet (Partida-Sánchez et al., 2001; Schuber und Lund, 2004). In T-Lymphozyten kann die Bildung von cADPR durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors induziert werden (Guse et al., 1999). Mittlerweile wurde das cADPR-Signalsystem in vielen verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen (Guse, 2004), unter anderem auch in HeLa-Zellen (Zocchi et al., 1998). Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von cADPR wird durch die Bindung an Ryanodinrezeptoren im ER vermittelt (Mészáros et al., 1993). Dies induziert die Öffnung dieser ligandengesteuerten Ca^{2+} -Kanäle, so dass Ca^{2+} aus dem ER ins Cytosol gelangt. Ähnlich wie bereits für den IP_3 -Rezeptor beschrieben wird auch die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodinrezeptors durch Ca^{2+} moduliert (Meissner, 2004).

Der wirksamste Ca^{2+} -freisetzende Botenstoff ist Nikotinsäure-Adenindinukleotid-2'-phosphat (NAADP). Im Gegensatz zu IP_3 und cADPR, ruft NAADP schon in geringen nanomolaren Konzentrationen einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervor (Lee und Aarhus, 1995). Entdeckung, Metabolismus und Wirkmechanismus von NAADP sind in Abschnitt 1.4 dargelegt.

1.1.2 Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum

Der Ausstrom von Ca^{2+} aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern führt zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und zu einer Depletion der Speicher. Dies induziert einen Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran, wodurch die intrazellulären Speicher wieder aufgefüllt werden können. Dieser Ca^{2+} -Einstrom wird als speichervermittelter Ca^{2+} -Einstrom bezeichnet (*store operated Ca^{2+} entry*, SOCE) (Clapham, 1995). Obwohl das Phänomen bereits 1986 beschrieben wurde (Putney, 1986), konnte der zugrunde liegende molekulare Mechanismus erst 2005 aufgeklärt werden: Die Speicher-Entleerung wird durch das in der ER-Membran lokalisierte Protein *stromal interaction molecule 1* (STIM1) erkannt. Ist die $[\text{Ca}^{2+}]$ im ER-Lumen gering, so bildet STIM1 Oligomere und wird in Bereiche nahe der Plasmamembran gebracht (Liou et al., 2005). Hier interagieren die STIM1-Oligomere mit Orai1, einem Protein in der Plasmamembran. Ein Tetramer aus Orai1 bildet wahrscheinlich den Ca^{2+} -permeablen Kanal, durch den Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum ins Cytosol strömt (Prakriya et al., 2006).

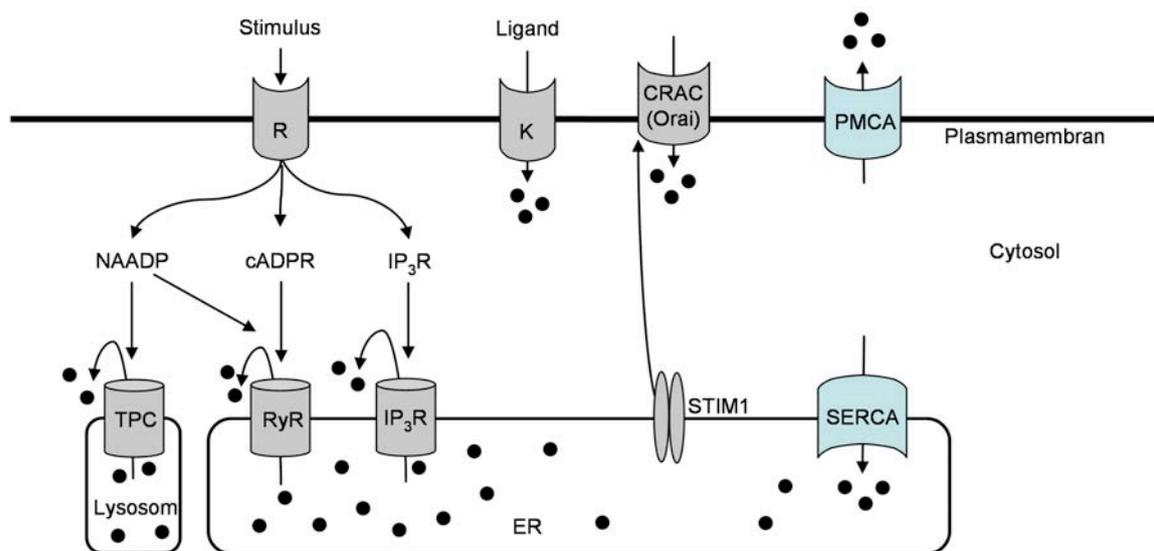


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen der Calcium-Signalgebung.

Zellen können über Rezeptoren in der Plasmamembran (R) stimuliert werden, was die Bildung der Botenstoffe NAADP, IP₃ und cADPR auslöst. Diese wiederum setzen über spezifische Rezeptoren Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie dem ER bzw. den Lysosomen frei. Die Speicherentleerung führt zur Aktivierung von STIM1 und damit zum Ca^{2+} -Einstrom über CRAC. Zudem können ligandengesteuerte Kanäle (K) in der Plasmamembran direkt aktiviert werden und so den Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum ermöglichen. Ca^{2+} -Pumpen (SERCA bzw. PMCA) entfernen das Ca^{2+} wieder aus dem Cytosol und senken die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder. Die Mechanismen beeinflussen sich gegenseitig, so dass die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ periodisch steigt und fällt. TPC: *two pore channel*, RyR: Ryanodinrezeptor, IP₃R: IP₃-Rezeptor, CRAC: *Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel*, STIM1: *stromal interaction molecule 1*, PMCA: Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran, SERCA: endoplasmatische/sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase.

Als zusätzlicher Regulator wurde in T-Lymphozyten das Ca^{2+} -sensitive Protein *Ca²⁺ release activated Ca²⁺ regulator 2A* (CRACR2A) identifiziert, welches bei geringer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Bindung zwischen STIM1 und Orai1 stabilisiert und so den Ca^{2+} -Einstrom fördert. Bei hoher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hingegen verlässt CRACR2A den STIM/Orai1-Komplex und bewirkt damit eine Verminderung des SOCE (Srikanth et al., 2010). Zusätzlich bewirkt bei hoher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Bindung von Calmodulin an den N-Terminus von Orai1 die Inaktivierung des Kanals (Mullins et al., 2009).

Zudem kann Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum über ligandengesteuerte Kanäle in der Plasmamembran einströmen. So können beispielsweise P2X-Rezeptoren aus der Familie der Purinorezeptoren durch Bindung von extrazellulären Nukleotiden geöffnet werden (MacKenzie et al., 1999). Auch die Aktivierung nicht-selektiver Kationen-Kanäle wie TRMP2 hat einen Ca^{2+} -Einstrom zur Folge (Perraud et al., 2001). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von TRPC-Kanälen am SOCE vermutet (Beech, 2005).

Durch die bereits erwähnten Ca^{2+} -Pumpen (SERCA bzw. PMCA) wird Ca^{2+} aus dem Cytosol entfernt und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder auf das Ruhenniveau gebracht. Das Zusammenspiel von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -erhöhenden und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -senkenden Mechanismen induziert periodische Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, welche als Ca^{2+} -Oszillationen bezeichnet werden. Die Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ betrifft folglich nicht nur die Amplitude und räumliche Ausbreitung des Signals, sondern wird um die zeitliche Dimension erweitert.

1.1.3 Ca^{2+} regulierte zelluläre Prozesse

Ca^{2+} dient in der Zelle dazu, Signale aus der Umgebung in intrazelluläre Signale umzuwandeln. Abhängig davon, welcher Rezeptor einen Stimulus empfängt, werden unterschiedliche Ca^{2+} -mobilisierende Mechanismen aktiviert, was verschiedenartige Ca^{2+} -Signale zur Folge hat (Berridge et al., 2000). Die Ca^{2+} -Signale können sich in Amplitude, Frequenz und räumlicher Ausbreitung in der Zelle unterscheiden. Dadurch ist es möglich, die Information des äußeren Reizes in Form vielfältiger Ca^{2+} -Muster zu kodieren. Aufgrund der Komplexität der Muster können durch einen einzelnen Botenstoff so unterschiedliche Zellprozesse wie Exozytose, Proliferation oder Apoptose gesteuert werden.

Im Regelfall führen lokale Ca^{2+} -Signale zur Vesikelfreisetzung bzw. beeinflussen die Migration. Globale Signale sind dagegen für die Muskelkontraktion sowie die Prozesse bei der Befruchtung verantwortlich (Berridge et al., 1998). Bleibt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über einen längeren Zeitraum stark erhöht, führt die übermäßige Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien zur Beeinträchtigung des mitochondrialen Metabolismus. In Folge dessen wird Cytochrom c freigesetzt und der Zelltod eingeleitet (Orrenius et al., 2003).

Eine wichtige Rolle bei der Umwandlung des äußeren Reizes in intrazelluläre Informationen spielen Ca^{2+} -Oszillationen. Diese verhindern durch das periodische Steigen und Sinken der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine Desensibilisierung Ca^{2+} -abhängiger Signalproteine (Dolmetsch et al., 1998). Gleichzeitig kann durch Modulation der Amplitude und Frequenz von Ca^{2+} -

Oszillationen der Informationsgehalt des Ca^{2+} -Signals erhöht werden. Untersuchungen an T-Lymphozyten zeigen, dass künstlich induzierte Ca^{2+} -Oszillationen mit hoher Frequenz die Translokation der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF κ B) in den Kern bewirken. Dort wird die Transkription von Interleukinen induziert, welche für die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten essentiell sind. Ca^{2+} -Oszillationen mit geringer Frequenz hingegen führen nur zur Transkription von NF κ B-abhängigen Genen, so dass der Entzündungsmodulator Interleukin-8 gebildet wird (Dolmetsch et al., 1998).

1.2 Signaltransduktion und Ca^{2+} in T-Lymphozyten

Die Aktivierung von T-Lymphozyten wird durch Bindung des spezifischen Antigens an den T-Zell-Rezeptor ausgelöst. Die Signaltransduktion erfolgt über mit dem T-Zell-Rezeptor assoziierte Moleküle des CD3-Komplexes, welche im cytosolischen Teil *immunoreceptor tyrosine based activation motives* (ITAMs) enthalten. Die Phosphorylierung der ITAMs dient zur Rekrutierung weiterer Signalmoleküle, so dass mehrere Signalkaskaden in Gang gesetzt werden können. Auf diese Weise wird unter anderem die Phospholipase $\text{C}\gamma$ aktiviert, welche die Bildung des Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffs IP_3 katalysiert. Der daraus resultierende Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF κ B. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen, welche die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten induzieren (Murphy et al., 2008).

Die Stimulation des T-Zell-Rezeptor-Komplexes kann *in vitro* durch Zugabe eines Antikörpers gegen den mit dem T-Zell-Rezeptor assoziierten CD3-Komplex simuliert werden. Untersuchungen an T-Lymphozyten zeigen, dass die Stimulation mit dem α -CD3-Antikörper OKT3 zur Bildung der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe NAADP, IP_3 und cADPR führt (Abb. 1.2). Nach Stimulation wird zuerst der Botenstoff NAADP gebildet (Gasser et al., 2006). In der Tat wurde postuliert, dass NAADP als Schrittmacher der Ca^{2+} -Signalgebung dient: Durch NAADP werden zunächst kleine, lokale Ca^{2+} -Signale auslöst, welche die IP_3 - und Ryanodinrezeptoren sensibilisieren (Cancela et al., 1999). Im Anschluss wird durch die Botenstoffe IP_3 und cADPR aus dem ER Ca^{2+} freigesetzt. Die Entleerung der Speicher wiederum führt zum Einstrom von Ca^{2+} über die Plasmamembran, so dass ein globales Ca^{2+} -Signal entsteht. Während die Konzentrationen der Botenstoffe NAADP und IP_3 wieder sinken, steigt die Konzentration von cADPR und bleibt über den Zeitraum von 1 h erhöht (Guse et al., 1999). cADPR spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des lang anhaltenden Ca^{2+} -Signals, welches Voraussetzung für die Proliferation von T-Lymphozyten ist.

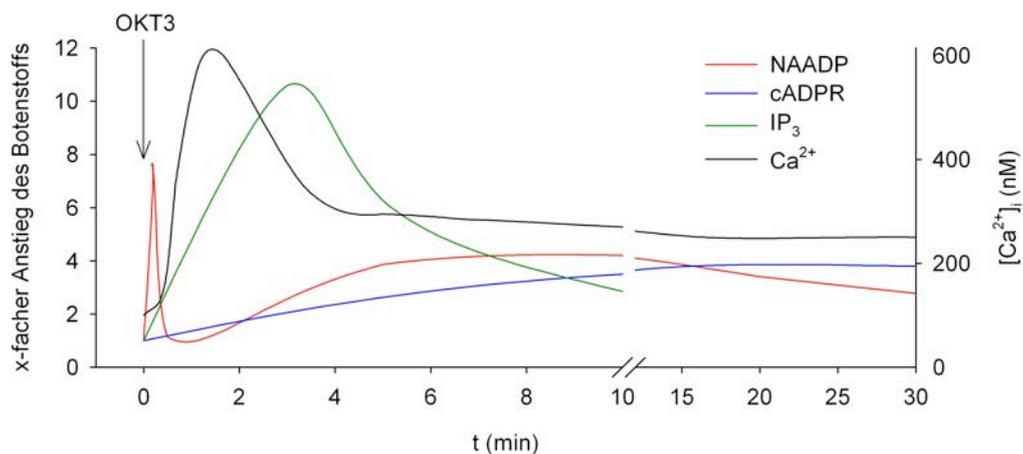


Abb. 1.2: Zeitlicher Verlauf der Konzentration der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe und der dadurch induzierten Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Nach Stimulation des T-Zell-Rezeptor-Komplexes mit dem anti-CD3-Antikörper OKT3 wurde die Konzentration der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe IP_3 (Guse et al., 1993), cADPR (Guse et al., 1999) und NAADP (Gasser et al., 2006) sowie die globale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Jurkat-T-Lymphozyten gemessen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von OKT3.

1.3 Signaltransduktion und Ca^{2+} in HeLa-Zellen

Stimulation von HeLa-Zellen mit Aminen wie Histamin oder Carbachol führt zur Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Die Bindung des Liganden induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors. Nun kann der cytosolische Teil des Rezeptors als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) wirken und durch den Austausch von GDP zu GTP die α -Untereinheit eines trimeren G-Proteins aktivieren (Bourne, 1997). $G_{\alpha q}$ vermittelt die Aktivierung der Phospholipase C β (Ueda et al., 2004), welche aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat den Botenstoff IP_3 bildet (Kirk et al., 1981). IP_3 wiederum setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei und führt so zur Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Lui et al., 1998). Es wurde beobachtet, dass lokale cytosolische Ca^{2+} -Signale einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]$ im Kern ($[\text{Ca}^{2+}]_n$) vorausgehen (Allbritton et al., 1994). Daher ging man zunächst davon aus, dass cytosolisches Ca^{2+} über Kernporen in den Kern gelangt (Hinshaw et al., 1992), um dort seine Funktion als Botenstoff erfüllen zu können (Clapham, 1995). Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass die cytosolische und nukleäre $[\text{Ca}^{2+}]$ getrennt reguliert werden können (Lui et al., 1998). Zum einen wurde beobachtet, dass die Kernhülle, welche mit dem ER ein Kontinuum bildet, auch als Ca^{2+} -Speicher dient (Badminton et al., 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass molekulare Bestandteile der Ca^{2+} -Signalgebung wie Phospholipase C und IP_3 -Rezeptoren ebenfalls im Kern zu finden sind (Irvine und Divecha, 1992; Humbert et al., 1996). Um die widerstreitenden Erkenntnisse in Einklang zu bringen, wurde für HeLa-Zellen vorgeschlagen, dass sowohl cytosolische als auch nukleäre Ca^{2+} -Signale unabhängig voneinander entstehen können. Dennoch beeinflusst ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die $[\text{Ca}^{2+}]_n$ und

umgekehrt (Lipp et al., 1997). Auch erreichen nukleäre Ca^{2+} -Signale in HeLa-Zellen höhere Amplituden als cytosolische und bleiben über einen längeren Zeitraum bestehen (Lipp et al., 1997).

Über die $[\text{Ca}^{2+}]_n$ werden Prozesse wie DNA-Synthese und Zellzyklus gesteuert. Bleibt allerdings die $[\text{Ca}^{2+}]_n$ dauerhaft erhöht, so induziert dies die Aktivierung von Nukleasen und Proteasen, was letztlich zur Apoptose führt (Clapham, 1995).

1.4 Der Ca^{2+} -freisetzende Botenstoff NAADP

1.4.1 Entdeckung der Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung von NAADP

1987 wurde erstmals beschrieben, dass durch Injektion von NADP (Nikotinamid-Adenindinukleotid) Ca^{2+} -Signale im Seeigeelei ausgelöst werden können (Clapper et al., 1987). Erst 1995 gelang der Nachweis, dass für diese Wirkung eine Kontamination der NADP-Probe verantwortlich war, die als NAADP identifiziert wurde (Lee und Aarhus, 1995). In den Folgejahren wurde das NAADP-Signalsystem in vielen verschiedenen Zellsystemen in Mensch (Berg et al., 2000), Tier (Cancela et al., 1999) und Pflanze (Navazio et al., 2000) sowie in Bakterien (Churamani et al., 2004) beschrieben. Bis heute ist NAADP der wirksamste Ca^{2+} -freisetzende Botenstoff: NAADP löst bereits in Konzentrationen von 10 nM bis 50 nM einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus, während die Botenstoffe cADPR und IP_3 erst in höheren Konzentrationen ihre Wirkung entfalten (Lee und Aarhus, 1995). In Säugerzellen zeigt NAADP eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve (Cancela et al., 2003), wobei in T-Lymphozyten ein Optimum von 100 nM NAADP bestimmt wurde (Berg et al., 2000). Micromolare Konzentrationen NAADP zeigen keine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung mehr, sie desensibilisieren sogar das Signalsystem und verhindern einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Cancela et al., 1999; Berg et al., 2000).

Die Struktur von NAADP unterscheidet sich von NADP, welches in reiner Form keine Ca^{2+} -Signale hervorruft, nur durch die Nikotinsäure-Gruppe der nördlichen Ribose. Im Seeigeelei wurden mit Hilfe von NAADP-Analoga Untersuchungen zur Struktur-Wirkbeziehung durchgeführt und drei strukturelle Merkmale identifiziert, welche für die Ca^{2+} -Freisetzung durch NAADP essentiell sind (Lee und Aarhus, 1997): 1. die negative Ladung der Nikotinsäure-Gruppe, 2. die 2'-Phosphat-Gruppe der südlichen Ribose, sowie 3. die Amino-Gruppe des Adenins (siehe Abb. 1.3).

Chemische Veränderungen an den genannten Positionen verringerten die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung. Diese Erkenntnisse zur Struktur-Wirkbeziehung von NAADP zeigen auf, welche funktionellen Gruppen an der Rezeptor-Bindung beteiligt sein könnten. Darüber hinaus ergeben sich aus den Beobachtungen wichtige Hinweise darauf, welche funktionellen Gruppen abgebaut werden müssten, um das NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Signal abzuschalten.

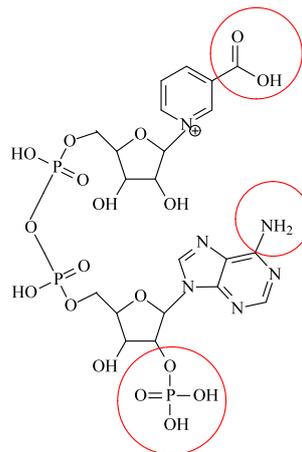


Abb. 1.3: Struktur und funktionelle Gruppen des Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffs NAADP.

Für die Freisetzung von Ca^{2+} durch NAADP im Seeigeelei sind die rot markierten Gruppen essentiell. Wird eine der funktionellen Gruppen verändert, so verliert das Nucleotid an Wirkung (Lee und Aarhus, 1997).

1.4.2 NAADP-Rezeptoren

Der NAADP-vermittelte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]$ kann im Seeigeelei nicht durch Antagonisten des IP_3 - bzw. cADPR-Signalwegs unterdrückt werden, was vermuten lässt, dass NAADP Ca^{2+} über einen anderen Mechanismus mobilisiert (Chini et al., 1995). In Säugerzellen hingegen gibt es eine Verbindung zwischen den verschiedenen Signalwegen (Cancela et al., 2002). Werden in Azinuszellen des Pankreas IP_3 - bzw. Ryanodinrezeptoren pharmakologisch inaktiviert, so kann durch NAADP kein globales Ca^{2+} -Signal mehr ausgelöst werden (Cancela et al., 1999). Desensibilisierende Konzentrationen NAADP wiederum vermindern den cADPR- bzw. IP_3 -induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Berg et al., 2000; Cancela et al., 1999). Aufgrund dieser Untersuchungen wird vermutet, dass NAADP ein lokales Ca^{2+} -Signal auslöst, welches IP_3 - und Ryanodinrezeptoren sensibilisiert und dadurch die Entstehung eines globalen Ca^{2+} -Signals ermöglicht (Cancela et al., 1999). NAADP würde damit eine wichtige Rolle als Schrittmacher der Ca^{2+} -Signalgebung spielen. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die NAADP-Konzentration nach Stimulation der Zellen innerhalb weniger Sekunden auf das 5- bis 10-fache erhöht wird, während die Konzentrationen der Botenstoffe IP_3 und cADPR erst nach einigen Minuten ihre maximalen Werte erreichen (Yamasaki et al., 2005; Gasser et al., 2006; Kim et al., 2008).

Trotz molekularbiologischer, pharmakologischer und elektrophysiologischer Studien ist der NAADP-Rezeptor noch nicht zweifelsfrei identifiziert. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von NAADP auf der Bindung an den Ryanodinrezeptor (RyR) beruht. Elektrophysiologische Messergebnisse zeigen, dass die Offenwahrscheinlichkeit der Isoformen RyR1 und RyR2 durch NAADP deutlich erhöht wird (Mojzisoová et al., 2001; Hohenegger et al., 2002). Pharmakologische

Inhibition des Ryanodinrezeptors vermindert in T-Lymphozyten (Langhorst et al., 2004), Azinuszellen des Pankreas (Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 2006) sowie glatten Muskelzellen (Kinnear et al., 2008) die Ca^{2+} -Freisetzung durch NAADP. Zudem wird durch *knock down* des Ryanodinrezeptors in T-Lymphozyten das NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Signal verringert (Langhorst et al., 2004; Dammermann und Guse, 2005).

Wenn die Wirkung von NAADP über die Bindung an den Ryanodinrezeptor vermittelt wird, so erfolgt die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Allerdings wurde unter anderem in glatten Muskelzellen (Kinnear et al., 2004), Zellen des Pankreas (Yamasaki et al., 2004), der neuronalen Zelllinie PC12 (Brailoiu et al., 2006) sowie Herzmuskelzellen (Macgregor et al., 2007) eine durch NAADP vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus sauren Ca^{2+} -Speichern wie Lysosomen beobachtet. Die daran beteiligten Mechanismen sind nicht durch Inhibition des Ryanodinrezeptors beeinflussbar, sondern werden durch Vorbehandlung der Zellen mit Bafilomycin A1 deaktiviert. Bafilomycin A1 hemmt die Protonenpumpe in Lysosomen und verhindert so die Aufnahme von Ca^{2+} in saure Ca^{2+} -Speicher (Churchill et al., 2002). In Lysosomen von HEK293-Zellen wurde eine neue Klasse NAADP-responsiver Kanäle identifiziert (Calcraft et al., 2009), welche zur Familie der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle gehören. Aufgrund ihrer Struktur werden diese Kanäle *two pore channels* (TPCs) genannt (Ishibashi et al., 2000). In menschlichen Zellen konnte die Expression der Isoformen TPC1 und TPC2 nachgewiesen werden (Calcraft et al., 2009). Allerdings konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Isoform TPC2 (Brailoiu et al., 2009; Zong et al., 2009). Erste Hinweise auf die Rolle von TPCs als NAADP-Rezeptoren ergaben sich aus Untersuchungen an HEK293-Zellen. Hier verhinderte der *knock down* von TPC2 die Entstehung von NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Signalen (Calcraft et al., 2009). An gereinigten TPCs konnte gezeigt werden, dass die Offenwahrscheinlichkeit durch NAADP konzentrationsabhängig erhöht wird und die Kanäle durch hohe NAADP-Konzentrationen inaktiviert werden (Pitt et al., 2010).

Sowohl die Expression von Ryanodinrezeptoren als auch von TPCs variiert je nach Zellsystem. Möglicherweise spielen in den verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche molekulare Mechanismen für das NAADP-Signalsystem eine Rolle. Eine Möglichkeit, die verschiedenen Modelle in Einklang zu bringen, stellt das „Zwei-Speicher-Modell“ dar. Demnach aktiviert NAADP in den Lysosomen lokalisierte TPCs, was ein lokales Ca^{2+} -Signal zur Folge hat. Der lokale Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in räumlicher Nähe zum ER erhöht die Offenwahrscheinlichkeit der Ryanodin- und IP_3 -Rezeptoren, wodurch ein globales Ca^{2+} -Signal ausgelöst wird (Zhu et al., 2010). Dieser Mechanismus wird als Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (*Ca^{2+} induced Ca^{2+} release, CICR*) bezeichnet.

Als weiterer NAADP-Rezeptor wurde der Kanal *transient receptor potential-mucolipin 1* (TRPML1) vorgeschlagen (Zhang und Li, 2007). Hierbei handelt es sich um einen Kanal der TRP-Familie, der in lysosomalen Membranen lokalisiert ist. Blockade des TRPML-1 verhinderte die NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus Lysosomen der Ratte (Zhang und Li, 2007). Die Beteiligung von TRPML-1 am NAADP-Signalweg wird aber kontrovers diskutiert und konnte nicht durch weitere Publikationen gestützt werden.

Auch extrazellulär appliziertes NAADP ist in der Lage, Ca^{2+} -Signale zu induzieren. Durch die Bindung von NAADP an den Purinorezeptor P2Y_{11} wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt (Moreschi et al., 2008). Auch andere Purinorezeptoren können durch NAADP aktiviert werden (Heidemann et al., 2005; Singaravelu und Deitmer, 2006). Damit besteht die Möglichkeit, dass NAADP zusätzlich zu seiner Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung auch eine Rolle als parakriner Botenstoff spielt (Billington et al., 2006).

1.4.3 NAADP-Metabolismus

Nach Stimulation steigt die intrazelluläre NAADP-Konzentration in Azinuszellen und T-Lymphozyten innerhalb weniger Sekunden stark an und fällt nach kurzer Zeit wieder auf das Ruhenniveau zurück (Yamasaki et al., 2005; Gasser et al., 2006; Kim et al., 2008). Zudem ist bekannt, dass NAADP in nanomolaren Konzentrationen Ca^{2+} -Signale auslöst, während mikromolare Konzentrationen das Signalsystem inaktivieren (Cancela et al., 1999; Berg et al., 2000). In den Zellen müssen demnach effiziente Systeme für die Bildung und den Abbau von NAADP vorhanden sein, um durch die präzise Regulation der NAADP-Konzentration eine funktionelle Signalübertragung zu gewährleisten. Trotz umfangreicher Untersuchungen zur Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung von NAADP sind die Fragen zum Metabolismus von NAADP noch weitgehend ungeklärt.

Im Allgemeinen werden drei mögliche Synthesewege diskutiert: Zum einen wäre die Bildung von NAADP durch eine ADP-Ribosylcyclase nach dem Mechanismus der Basenaustauschreaktion denkbar (Aarhus et al., 1995). Bei dieser Reaktion wird die Nikotinamid-Gruppe von NADP gegen die Nikotinsäure-Gruppe ausgetauscht, so dass NAADP gebildet wird. Des Weiteren könnte NAADP durch Deamidierung von NADP entstehen (Chini und Dousa, 1995). Auch könnte eine Kinase durch Phosphorylierung von NAAD die Synthese von NAADP katalysieren (Lerner et al., 2001). Bisher konnten in Säugerzellen weder eine Deamidase- noch eine Kinase-Aktivität nachgewiesen werden, die NAADP bilden könnten. Die Synthese von NAADP nach der Basenaustauschreaktion hingegen wurde in Säugerzellen beobachtet und kann durch das Ektoenzym CD38 katalysiert werden (Aarhus et al., 1995). CD38 ist ein membranständiges Ektoenzym, das zunächst als Oberflächenmarker für Lymphozyten klassifiziert wurde (Reinherz et al., 1980). Das multifunktionelle Ektoenzym CD38 zeigt sowohl NAD-Glykohydrolase-Aktivität als auch ADP-Ribosylcyclase-Aktivität. Im neutralen bis alkalischen pH-Bereich katalysiert CD38 die Bildung von cADPR und ADPR aus NAD (Howard et al., 1993). Bei saurem pH und einem Überschuss von Nikotinsäure wird aus NADP NAADP gebildet (Aarhus et al., 1995). Da aber das aktive Zentrum von CD38 im Extrazellulärraum liegt, wurde als Erklärung das so genannte topologische Paradoxon vorgeschlagen: Zunächst müsste das Substrat aus der Zelle heraustransportiert werden und anschließend müssten die Produkte wieder in die Zelle zurückgeführt werden (De Flora et al., 1997). In der Tat kann NAD über Connexin-43-Halbkanäle in den Extrazellulärraum gelangen (Bruzzone et al.,

2001). Auch wurde gezeigt, dass cADPR durch Nukleosid-Transporter in die Zelle aufgenommen werden kann (Guida et al., 2002). NAADP würde aufgrund seiner Größe und Form wahrscheinlich nicht auf diesem Weg in die Zelle gelangen. Die Aufnahme von NAADP aus dem Extrazellulärraum in basophile Zellen konnte zwar nachgewiesen werden, der molekulare Mechanismus wurde aber nicht aufgeklärt (Billington et al., 2006). Möglicherweise kann die Aufnahme von NAADP in die Zelle über Connexin-43-Halbkanäle erfolgen (Heidemann et al., 2005). Ebenso könnte die Internalisierung von CD38 die Freisetzung von NAADP ins Cytosol ermöglichen (De Flora et al., 1997; Franco et al., 1998).

Ein weiteres Problem sind die Reaktionsbedingungen der Synthese von NAADP durch CD38, da ein pH-Wert von 5 und hohe Nikotinsäure-Konzentrationen wenig physiologisch erscheinen. Zudem konnte im Gewebe von *CD38-knock out*-Mäusen NAADP nachgewiesen werden, so dass CD38 für die Bildung von NAADP nicht notwendig ist (Soares et al., 2007). Tatsächlich wurde in *CD38-knock out*-Mäusen eine ADP-Ribosylcyclase-Aktivität beobachtet, wobei nicht untersucht ist, ob diese ADP-Ribosylcyclase auch NAADP bilden könnte (Ceni et al., 2003).

Die Suche nach dem NAADP-bildenden Enzym gestaltet sich schwierig, da nicht bekannt ist, aus welchen Substraten das Produkt NAADP gebildet wird. Zum anderen erschweren experimentelle Hindernisse die Untersuchungen. Die Bestimmung der endogenen NAADP-Konzentration erfordert sehr sensitive und aufwendige Methoden, die zurzeit weltweit nur von zwei Arbeitsgruppen durchgeführt werden (Gasser et al., 2006; Lewis et al., 2007).

Auch der Abbau von NAADP ist noch nicht geklärt. NAADP-Messungen in *CD38-knock out*-Mäusen zeigten, dass die fehlende Expression von CD38 in einigen Geweben zu erhöhten NAADP-Konzentrationen führte (Soares et al., 2007). Diese Ergebnisse konnten durch Untersuchungen an T-Lymphozyten bestätigt werden (Bruhn, 2008). Möglicherweise spielt CD38 also nicht etwa bei der Bildung, sondern beim Abbau von NAADP eine Rolle. In der Tat kann NAADP durch CD38 zu ADP-Ribose-2'-Phosphat (ADPRP) abgebaut werden (Graeff et al., 2006). In Zellen, die CD38 nicht exprimieren, müsste ein anderes Enzym diese Funktion übernehmen. Eine Alternative wäre die Dephosphorylierung von NAADP zu NAAD, was das vermittelte Ca^{2+} -Signal unterbrechen würde (Lee und Aarhus, 1995; Chini und De Toledo, 2002). In Membranfraktionen von Mäusehirnen wurde die Aktivität einer 2'-Phosphatase beobachtet, welche allerdings auch andere Nukleotide wie AMP und NADP umsetzen konnte (Berridge et al., 2002). Außerdem kann das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase die Reduktion von NAADP zu NAADPH katalysieren, welches keine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung zeigt (Billington et al., 2004). Die physiologische Relevanz der beschriebenen Abbau-Reaktionen ist allerdings noch unklar.

Der Botenstoff NAADP spielt eine wichtige Rolle für die Ca^{2+} -Signalgebung, da NAADP als Schrittmacher ein lokales Ca^{2+} -Signal induziert, welches dann die Ausbildung eines globalen Ca^{2+} -Signals ermöglicht. Zudem ist NAADP der potenteste Ca^{2+} -freisetzende

Botenstoff und schon in nanomolaren Konzentrationen wirksam. Mikromolare Konzentrationen NAADP können den NAADP-Signalweg inaktivieren und damit die Ca^{2+} -Signalgebung unterbrechen. Daher ist eine präzise Regulation der intrazellulären NAADP-Konzentration Voraussetzung für eine funktionelle Signalübertragung. Die Fragen zur Bildung und zum Abbau von NAADP sind allerdings noch ungeklärt.

1.5 Die Familie der alkalischen Phosphatasen

1.5.1 Entdeckung und Struktur der alkalischen Phosphatasen

Die alkalischen Phosphatasen gehören zur Superfamilie der Metalloenzyme, welche auch Phosphopentomutasen, Phosphoglyceratmutasen und Sulfatasen umfasst (Galperin et al., 1998). Die alkalischen Phosphatasen erhielten 1912 ihren Namen (Von Euler und Funke, 1912), da sie bei alkalischem pH die Hydrolyse von Monophosphatestern katalysieren. Die Expression von alkalischen Phosphatasen wurde in vielen Organismen von Bakterien bis zum Menschen nachgewiesen (McComb et al., 1979).

Bisher wurden vier humane Isoformen der alkalischen Phosphatase identifiziert, welche nach ihrer gewebsspezifischen Expression benannt sind: die drei gewebsspezifischen Isoformen intestinale alkalische Phosphatase (IAP), plazentale alkalische Phosphatase (PLAP) und Keimzell-spezifische alkalische Phosphatase (*germ cell alkaline phosphatase*, GCAP) sowie die ubiquitär vorkommende gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (*tissue non specific alkaline phosphatase*, TNAP), welche teilweise auch als Leber/Knochen/Nieren-Phosphatase bezeichnet wird (Stigbrand, 1984). Das Gen für die TNAP ist auf Chromosom 1 (1p34-p36.1) lokalisiert (Smith et al., 1988), während die Gene für die IAP, PLAP und GCAP auf Chromosom 2 (2q34-q37) zu finden sind (Griffin et al., 1987; Martin et al., 1987).

Die TNAP ist nicht nur auf einem anderen Chromosom kodiert, sondern zeigt auch weniger genetische Verwandtschaft zu den gewebsspezifischen alkalischen Phosphatasen. Die Aminosäuresequenz der TNAP stimmt zu 50-60% mit der Aminosäuresequenz der drei gewebsspezifischen alkalischen Phosphatasen überein. Dagegen beträgt die Homologie der Aminosäuresequenz der PLAP zur IAP 87%. Die GCAP weist sogar eine Übereinstimmung von 98% zur PLAP auf und wurde erst vor kurzem als eigenständige alkalische Phosphatase klassifiziert (Harris, 1990).

Die humanen alkalischen Phosphatasen zeigen ca. 25% Sequenzhomologie zur alkalischen Phosphatase von *E.coli* (ECAP) (Kim und Wyckoff, 1990). Der zentrale Teil des Enzyms mit dem katalytischen Zentrum hat sich im Laufe der Evolution kaum verändert und zeigt eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den humanen alkalischen Phosphatasen und ECAP, so dass viele Erkenntnisse der ECAP auf die humanen Isoformen übertragbar sind (Kim und Wyckoff, 1990; Kozlenkov et al., 2002).

Die humanen Isoformen bilden Homodimere, welche über stark hydrophobe Bereiche verbunden sind, und werden über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker am C-

Terminus in der Plasmamembran gehalten (Low, 1989). Jedes Monomer enthält vier Metall-Ionen. Zwei Zn^{2+} -Ionen sowie ein Mg^{2+} -Ion befinden sich im aktiven Zentrum und werden über Asparagin-, Serin- sowie Histidinreste koordiniert (Gettins und Coleman, 1983; Le Du et al., 2001). In der Peripherie des Enzyms ist ein Ca^{2+} -Ion lokalisiert. Die Funktion dieses vierten Metall-Ions ist noch nicht aufgeklärt, besteht aber wahrscheinlich in der Stabilisierung der 3D-Struktur (Llinas et al., 2005). An der Kontaktstelle zwischen den beiden Monomeren wird die so genannte *crown domain* ausgebildet. In dieser sehr flexiblen Region finden sich die größten Unterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen der alkalischen Phosphatase. Aufgrund dieser Unterschiede können die verschiedenen Isoformen mit Hilfe von unkompetitiven Hemmstoffen differenziert werden (Kozlenkov et al., 2002).

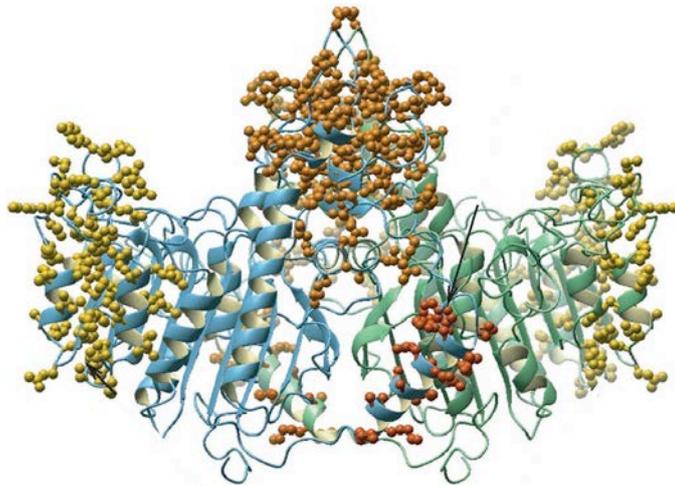


Abb. 1.4: 3D-Struktur der placentalen alkalischen Phosphatase.

Das eine Monomer der PLAP ist blau dargestellt, während das andere grün gefärbt ist. Die Aminosäuren der N-terminalen α -Helix, welche der Dimerisierung dient, sind als rote Kugeln gezeigt. Orange Kugeln markieren die *crown domain*. Gelb dargestellt sind die metallbindenden Domänen. Abb. entnommen aus Le Du et al., 2001.

1.5.2 Physiologie und Pathophysiologie der alkalischen Phosphatasen

1.5.2.1 Gewebunspezifische alkalische Phosphatase

Die TNAP spielt eine wichtige Rolle beim Knochenaufbau und der Bildung von Neurotransmittern, während Fehlfunktionen der TNAP zu pathophysiologischen Folgen wie Hypophosphatasie, Osteoarthritis und Gefäßverkalkung führen (Orimo 2010).

Die TNAP wird vor allem in Chondrozyten, Osteoblasten und Odontoblasten exprimiert (Hoshi et al., 1997; Miao und Scutt, 2002). Die physiologischen Substrate der TNAP sind Pyrophosphat (PP_i) und Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) (Fedde und Whyte, 1990). PLP ist essentiell für die Bildung von Neurotransmittern, so dass Fehlfunktionen der TNAP

Epilepsie auslösen können (Waymire et al., 1995). PP_i hingegen fungiert als Inhibitor der Hydroxyapatit-Ablagerung im Knochen (Francis et al., 1969). Durch die Hydrolyse von PP_i , reguliert die TNAP die Mineralisierung der Knochen und stellt P_i für die Bildung von Hydroxyapatit zur Verfügung (Whyte, 1994). Mutationen der TNAP führen zu erhöhten PP_i -Konzentrationen und damit zu Hypophosphatasie (Henthorn et al., 1992). Zum einen wird zu wenig Hydroxyapatit für den Knochenaufbau generiert, zum anderen bilden sich ungeordnete Calcium-Phosphat-Ablagerungen, die Entzündungsreaktionen auslösen können. Die Folgen sind häufig Rachitis und Osteoarthritis (Orimo, 2010). Die Therapie von TNAP *knock out*-Mäusen durch die Gabe löslicher, rekombinanter TNAP führte zu normalisierter Knochenbildung und Reduktion epileptischer Anfälle (Millán et al., 2008). Eine besondere pathophysiologische Rolle der TNAP tritt erst im Alter zutage. In den Zellen, welche sich in Gewebsveränderungen bei Arteriosklerose fanden, wurde eine erhöhte Expression der TNAP nachgewiesen (Hsu und Camacho, 1999). Ausserdem wurde beobachtet, dass die TNAP im Alter besonders stark in Endothelzellen der Arteriolen in Gehirn und Herz gebildet wird. Die erhöhte Expression der TNAP könnte zur Anreicherung von P_i führen und so die Ablagerung von Hydroxyapatit fördern, was die Entstehung von Arteriosklerose begünstigen könnte (Hui und Tenenbaum, 1998). Um diese Hypothese zu testen, wurden Untersuchungen in einem Zellmodell der glatten Gefäßmuskulatur durchgeführt, welches durch erhöhte Expression der TNAP gekennzeichnet war. Dies führte im Zellmodell zu Verkalkung, welche durch spezifische Inhibition der TNAP reduziert werden konnte (Narisawa et al., 2007). Aufgrund dieser viel versprechenden Ergebnisse wurden weitere spezifische TNAP-Inhibitoren getestet, die eventuell zur Therapie von Arteriosklerose eingesetzt werden können. Zusätzlich zu ihrer therapeutischen Bedeutung können die Inhibitoren auch als pharmakologische Werkzeuge zur Charakterisierung der alkalischen Phosphatase genutzt werden (Sergienko und Millán, 2010).

1.5.2.2 Intestinale alkalische Phosphatase

Die IAP ist an vielfältigen Prozessen im Darm beteiligt. Sie reguliert die Fettabsorption über das Dünndarmepithel, nimmt Einfluss auf den pH und spielt eine Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen. Fehlfunktionen der IAP können Fettleibigkeit fördern und Entzündungsreaktionen hervorrufen (Lallès, 2010).

Die IAP wird besonders auf der luminalen Seite des Dünndarmepithels exprimiert. Die physiologischen Substrate der IAP sind Phospholipide, ATP sowie Lipopolysaccharide. Nahrungsfette induzieren die Sekretion der IAP ins Darmlumen, die dann in *surfactant like particles* (SLP) eingebaut wird (Eliakim et al., 1991; Nakano et al., 2009). Untersuchungen an *knock out*-Mäusen zeigen, dass die fehlende Expression der IAP zu einem beschleunigten Transport der Fette durch das Dünndarmepithel und erhöhten Triglyceridwerten im Serum führt. Möglicherweise kontrolliert die IAP die Aufnahme von Fetten und schützt so vor viszeralen Fettablagerungen und Fettleber (Narisawa et al.,

2003). Eine weitere Funktion der IAP besteht in der Regulation des pH-Wertes an der Oberfläche des Dünndarmepithels. Bei geringem pH ist die Aktivität der IAP niedrig und so wird nur wenig ATP hydrolysiert. Dadurch steht mehr ATP zur Stimulation von Purinorezeptoren, insbesondere des P2Y₁-Rezeptors, zur Verfügung. ATP aktiviert den P2Y₁-Rezeptor und bewirkt so die Sekretion von Bicarbonat durch das Dünndarmepithel, wodurch der pH-Wert an der Oberfläche des Epithels steigt. Der erhöhte pH-Wert zieht eine gesteigerte Hydrolyse von ATP durch IAP nach sich und induziert damit einen negativen Rückkopplungsmechanismus (Mizumori et al., 2009).

Die immunprotektive Rolle der IAP liegt vor allem in der Dephosphorylierung der bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS) begründet (Poelstra et al., 1997). Gramnegative Bakterien im Darm produzieren LPS, welche Entzündungsreaktionen und sogar einen septischen Schock auslösen können, sobald sie in die Blutbahn gelangen (Jerala, 2007). Steigt die LPS-Konzentration im Darmlumen, so wird die Expression der IAP erhöht (Bates et al., 2007). Das Expressionslevel der IAP wird also an die LPS-Belastung im Darm angepasst. Die IAP dephosphoryliert dann LPS und verhindert dadurch eine Entzündungsreaktion. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der IAP das Eindringen von Bakterien in die Mucosa unterbindet (Geddes und Philpott, 2008) und eine Schlüsselfunktion für die Erhaltung einer gesunden Darmflora hat (Malo et al., 2010).

Untersuchungen experimentell induzierter, entzündlicher Darmerkrankungen zeigen eine erhöhte Phosphatase-Aktivität in den betroffenen Geweben. Überraschenderweise wird in diesem Fall nicht die Expression der IAP, sondern der TNAP verstärkt (Sánchez de Medina et al., 2004). Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt, weist aber darauf hin, dass die Expression der TNAP als Marker für entzündliche Darmerkrankungen verwendet werden könnte. Zudem bieten spezifische Inhibitoren der TNAP einen Therapieansatz, um den Krankheitsverlauf zu verbessern (Sánchez de Medina et al., 2004).

Die Expression der IAP wird durch die Aufnahme von Fetten, Proteinen und Kohlehydraten aus der Nahrung moduliert (Goldberg et al., 2008). Die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen könnte wegweisend für die Prävention entzündlicher Darmerkrankungen sein, da diese häufig auf eine zu geringe Aktivität der IAP zurückzuführen sind (Lallès, 2010).

1.5.2.3 Plazentale alkalische Phosphatase

Die PLAP ist evolutionsbiologisch die jüngste alkalische Phosphatase, welche nur in Mensch, Orang-Utan und Schimpanse nachgewiesen ist (Doellgast und Benirschke, 1979). Die Expression der PLAP in der Plazenta ist so hoch, dass das Enzym für Kristallstrukturanalysen direkt aus der Plazenta isoliert wurde (Le Du et al., 2001). Da die Isoformen der alkalischen Phosphatase einander sehr homolog sind, wurden die 3D-Strukturen der Isoformen IAP und TNAP anhand der Strukturdaten der PLAP modelliert (Llinas et al., 2005).

Bisher sind nur pathophysiologische Funktionen der PLAP bekannt. Die Expression der PLAP bzw. der Nachweis der Aktivität im Serum findet als Marker für schnell wachsende Tumoren Verwendung (Fishman et al., 1968; Millán, 1992). Die biologische Funktion der PLAP ist noch nicht geklärt. Im Gegensatz zu TNAP und IAP wird die PLAP weder in der Ratte noch in der Maus exprimiert. Das erschwert die Suche nach der physiologischen Rolle der PLAP, da die entsprechenden Untersuchungen an *knock out*-Tieren nicht möglich sind. Erste Hinweise auf die Funktion der PLAP ergeben sich aus Studien, die eine stimulierende Wirkung auf die DNA-Synthese und Proliferation nachweisen (She et al., 2000). Ferner wurde beobachtet, dass PLAP an den Fc-Teil von Immunglobulin G bindet und möglicherweise am Transport der mütterlichen Antikörper zum Foetus beteiligt ist (Makiya und Stigbrand, 1992).

Die GCAP ist in Plazenta und Testis zu finden. Allerdings wird in der Plazenta deutlich weniger GCAP als PLAP exprimiert (Povinelli und Knoll, 1991). Zur biologischen Funktion der GCAP ist noch nichts bekannt.

2 Zielsetzung

Äußere Reize werden durch die Zelle in intrazelluläre Signale umgewandelt, so dass die Zelle auf Veränderungen der Umgebung reagieren kann. Ca^{2+} spielt bei dieser Signalübertragung eine wichtige Rolle und ist an der Regulation von Zellprozessen wie Exozytose, Muskelkontraktion, Proliferation und Apoptose beteiligt. Je nach Stimulus werden unterschiedliche Ca^{2+} -Signale generiert, die in räumlicher Ausbreitung, Amplitude und Frequenz variieren. Diese Vielfalt an Ca^{2+} -Signalen wird durch das kontrollierte Zusammenspiel von Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoffen, Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -Speichern erreicht. Eine Schlüsselfunktion kommt dabei dem Botenstoff NAADP zu, der als Schrittmacher der Ca^{2+} -Signalgebung fungiert. Darüber hinaus ist NAADP der wirksamste Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoff und löst schon in nanomolaren Konzentrationen ein Ca^{2+} -Signal aus.

Um die Ca^{2+} -Signalgebung präzise regulieren zu können, muss auch die Konzentration an NAADP genau eingestellt werden. Da aber die geringen Konzentrationen des Botenstoffs schwer nachzuweisen sind, ist bisher nur wenig über den Auf- und Abbau des Botenstoffs bekannt.

In der vorliegenden Arbeit musste zunächst eine Methode entwickelt werden, um geringe Mengen NAADP bzw. seines Abbauprodukts durch HPLC nachzuweisen.

Um ein NAADP-metabolisierendes Enzym zu finden, sollten Untersuchungen an Jurkat-T-Lymphozyten durchgeführt werden. An diesen Zellen war bereits gezeigt worden, dass die intrazelluläre NAADP-Konzentration nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex schnell ansteigt und innerhalb weniger Minuten wieder abfällt. Die Studien sollten sich auf die Charakterisierung des Enzyms CD38 konzentrieren, welches *in vitro* sowohl die Synthese als auch den Abbau von NAADP katalysieren kann. Hierzu sollten Analysen an Wildtyp- und CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten durchgeführt werden.

Als zweites Modellsystem zur Untersuchung des NAADP-Metabolismus dienten HeLa-Zellen. Auch in HeLa-Zellen war zuvor nachgewiesen worden, dass nach Stimulation mit den muscarinischen Acetylcholin-Rezeptor NAADP gebildet wird, wobei der Botenstoff innerhalb weniger Minuten wieder abgebaut wird. Expressionsstudien sollten zeigen, ob in HeLa-Zellen und Jurkat-T-Lymphozyten die gleichen molekularen Mechanismen am Abbau von NAADP beteiligt sind. Des Weiteren sollte eine enzymatische Charakterisierung des NAADP-abbauenden Enzyms durchgeführt werden.

Im Anschluss sollte das NAADP-abbauende Enzym rekombinant exprimiert werden, um seine katalytische Funktion zu verifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde der NAADP-Metabolismus in den Zelllinien Jurkat und HeLa untersucht. Für die rekombinante Expression der NAADP-abbauenden Enzyme wurden HEK-293-Zellen verwendet.

3.1.1 Kultur von Jurkat-T-Lymphozyten

Jurkat-T-Lymphozyten dienen als Modellsystem zur Untersuchung der Signaltransduktion von T-Lymphozyten, da diese Zellen im Gegensatz zu primären T-Lymphozyten kontinuierlich kultiviert werden können (Abraham und Weiss, 2004). Die Zelllinie wurde aus T-Lymphozyten etabliert, welche aus dem Blut eines 14-jährigen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie stammten (Schneider et al., 1977). In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Subklon JMP gearbeitet, der zusätzlich auf eine hohe Expression von CD3, einem Bestandteil des T-Zell-Rezeptorkomplexes, selektiert wurde.

Jurkat-T-Lymphozyten sind Suspensionszellen und wurden bei 5% CO₂ und 37°C im CO₂-Inkubator gehalten. Die Bestimmungen im CASY-Zellzähler (Schärfe System, Reutlingen) ergaben für die Zellen ein mittleres Volumen von 1,4 pl und einen mittleren Durchmesser von 14 µm. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mit frischem RPMI-Komplettmedium (RPMI-Kulturmedium mit Glutamax I, 7,5% NCS (v/v), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) versorgt. So wurde die Zelldichte zwischen 0,3·10⁶ und 1,2·10⁶ Zellen/ml gehalten. CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten sowie die dazugehörigen *scrambled*-Kontrollzelllinien wurden von Sören Bruhn durch stabile Transfektion mit pDsRed2-U6-si270#1 bzw. pDsRed2-U6-si270#A hergestellt (Bruhn, 2008). Diese Zellen wurden in RPMI-Selektionsmedium (RPMI-Komplettmedium, 800 µg/ml G 418) kultiviert.

3.1.2 Kultur von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen gehören zu den ersten etablierten und am häufigsten verwendeten Zelllinien. Es handelt sich hier um epitheliale Zellen, die 1951 aus dem Zervixkarzinom einer Patientin entnommen wurden (Gey et al., 1952; Scherer et al., 1953).

HeLa-Zellen sind adhärente Zellen und wurden bei 5% CO₂ und 37°C im CO₂-Inkubator gehalten. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, ohne den

Zellrasen zu beschädigen. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung (2 ml pro 25 cm² Kulturfläche; 0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe des vierfachen Volumens an DMEM-Komplettmedium gestoppt und die Zellen wurden resuspendiert. Im CASY-Zellzähler (Schärfe System, Böblingen) wurde ein mittleres Volumen von 2,35 pl und ein mittlerer Durchmesser von 16 µm der resuspendierten Zellen gemessen. Die Zellen wurden dann mit DMEM-Komplettmedium (DMEM-Kulturmedium mit Glutamax I, 10% FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) 1:5 bis 1:20 verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt.

3.1.3 Kultur von HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden aus humanen, embryonalen Nierenzellen hergestellt, welche durch Transformation mit dem Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurden (Graham et al., 1977).

HEK-293-Zellen sind adhärente Zellen und wurden bei 5% CO₂ und 37°C im CO₂-Inkubator gehalten. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert. Mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung (2 ml pro 25 cm² Kulturfläche; 0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, im Anschluss 1:5 bis 1:20 in DMEM-Komplettmedium (DMEM-Kulturmedium mit Glutamax I, 10% FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) verdünnt und in eine neue Kulturflaschen überführt. CD38⁺-HEK-293-Zellen wurden wie Wildtyp-HEK-293-Zellen passagiert, jedoch in DMEM-Selektionsmedium (DMEM-Komplettmedium, 400 µg/ml G 418) gehalten.

3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in einer Dichte von 1·10⁷ Zellen/ml in gekühltem Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO oder Biofreeze, Biochrom, Berlin) aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Kryokonservierte Bestände wurden in regelmäßigen Abständen wieder in Kultur genommen. Hierzu wurden die Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 10 ml Komplettmedium gewaschen und anschließend in eine Zellkulturflasche mit Komplettmedium überführt. Transfizierte Zellen wurden am zweiten Tag in Selektionsmedium überführt.

3.2 HPLC-Analytik

Die *high performance liquid chromatography* (HPLC) ist eine Methode zur Auftrennung von Substanzgemischen. Hier kommt eine polare stationäre Phase zum Einsatz. Dagegen wird bei der *reversed phase* HPLC (RP-HPLC) eine unpolare stationäre Phase verwendet. Die Auftrennung von Nukleotiden über RP-HPLC wird durch ein Ionenpaarreagenz möglich. Dieses bindet an die geladenen Gruppen der Nukleotide und verändert so ihre Hydrophobizität. Bei der isokratischen Elution bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während der gesamten Zeit gleich. Hingegen wird bei der Gradientenelution im Verlauf der Chromatographie die Polarität der mobilen Phase verändert und so die Elutionskraft erhöht. Um die Hauptsäule zu schützen, werden häufig Vorsäulenkartuschen eingesetzt, welche mit dem gleichen Material wie die Hauptsäule gefüllt sind. So können kostengünstig Verunreinigungen aus der Probe abgefangen werden, was die Verwendungsdauer der Hauptsäule verlängert.

3.2.1 RP-HPLC von Nukleotiden

In der vorliegenden Arbeit wurden Nukleotidgemische mit Hilfe der RP-HPLC unter Verwendung des Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumphosphat (Sigma-Aldrich, München) getrennt (Werner, 1993). Im Folgenden wird die Ionenpaar-RP-HPLC immer mit HPLC bezeichnet. Verwendet wurde ein HPLC-System der Firma Agilent Technologies (1200 Serie, Böblingen). Die Auftrennung erfolgte über eine C₁₈-Säule mit einer Porengröße von 5 µm und Maßen von 250 x 4,6 mm (Material: Multohyp BDS, Chromatographie Service, Langerwehe bzw. HyPURITY ADVANCE, Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Vor die Hauptsäule wurde eine Vorsäulenkartusche geschaltet, die das gleiche Material wie die Hauptsäule enthielt. Die Proben wurden durch 10 kDa-Größenausschlussfilter (Microcon, Millipore, Billerica, MA, USA) filtriert und mit Elutionspuffer verdünnt. 100 µl der verdünnten Probe wurden mit Hilfe des Autosamplers in das HPLC-System injiziert. Die Elution erfolgte mit einem ansteigenden Methanol-Gradienten (Methanol Lichrsolv Hypergrade, Merck, Darmstadt) mit HPLC-Puffer A (20 mM KH₂PO₄, 5 mM Tetrabutylammonium-phosphat, pH 6) und HPLC-Puffer B (50% HPLC-Puffer A, 50% Methanol LiChrosolv Hypergrade, Merck, Darmstadt) bzw. HPLC-Puffer C (30% HPLC-Puffer A, 70% Methanol) bei einer Flussrate von 0,8 bis 1 ml/min. Sofern nicht anders angegeben, wurde die Temperatur im Säulenofen auf 25°C eingestellt. Die selbst erstellten Elutions-Programme sind in diesem Abschnitt kurz aufgeführt und im Anhang detailliert aufgelistet (siehe Anhang).

Die Detektion der Nukleotide erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm mit Hilfe des UV-Detektors (Agilent Technologies, 1200 Serie, Böblingen). Wurden Proben mit fluoreszierenden Nukleotiden wie beispielsweise 1,N⁶-etheno-NAD analysiert, so wurden zusätzliche Chromatogramme mit dem Fluoreszenz-Detektor (Agilent Technologies, Böblingen) bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 410$ nm aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der Peakflächen mit der ChemStation-Software

(Agilent Technologies, Böblingen). Zur Kalibrierung wurden kommerziell erhältliche Standards der Nukleotide (Sigma-Aldrich, München bzw. Biolog, Bremen) eingesetzt.

3.2.1.1 RP-HPLC von NAAD

Um den Umsatz von NAADP zu NAAD zu untersuchen, wurden 1 µg/ml P10-Präparation von HeLa-Zellen mit NAADP (Biolog, Bremen bzw. Sigma-Aldrich, München) in Triethanolaminpuffer (40 mM TEA, pH 9) bei 37°C inkubiert. Enzym- bzw. Substratmix wurden zunächst auf 37°C vortemperiert und erst dann zusammen gegeben. Nach der Inkubationszeit (im Regelfall nach 5 min) wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (95°C, 10 min) gestoppt, die Probe auf Eis abgekühlt und dann durch 10 kDa-Größenausschlussfilter (Microcon, Millipore, Billerica, MA, USA) filtriert. Es folgte die Analyse der Proben über HPLC (siehe unten).

Wurde die Aktivität der rekombinant exprimierten Isoformen der alkalischen Phosphatase nachgewiesen, so wurden die Untersuchungen mit intakten Zellen durchgeführt. HEK-293-Zellen wurden mit den Plasmiden pIRES2-EGFP-PLAP, pIRES2-EGFP-TNAP bzw. pIRES2-EGFP transfiziert (siehe Abschnitt 3.6.2) und die Phosphatase-Aktivität nach 24 h analysiert. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst, zweimal in Calcium-Messpuffer gewaschen und dann die Zellzahl auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Calcium-Messpuffer eingestellt. Nun wurde die EGFP-Fluoreszenz im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 520$ nm gemessen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit Calcium-Messpuffer verdünnt, bis alle drei Ansätze eine EGFP-Fluoreszenz in etwa gleicher Höhe aufwiesen. Nun wurden je 200 µl Zellsuspension zu 200 µl Substratlösung (200 µM NAADP in Calcium-Messpuffer) zugegeben und die Proben für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt (1000 g, 2 min, 4°C) und die Überstände durch 10 kDa-Größenausschlussfilter (Microcon, Millipore, Billerica, MA, USA) filtriert. Dann wurde die NAAD-Bildung über HPLC bestimmt.

Zur Analyse der NAAD-Bildung wurden zwei verschiedene Säulenmaterialien eingesetzt: Multohyp BDS (Chromatographie Service, Langerwehe) bzw. HyPURITY ADVANCE (Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Bei Auftrennung über das Säulenmaterial Multohyp BDS wurde das Elutions-Programm *FSCADPR_30Bmod04* verwendet. Die Auftrennung erfolgte mit den HPLC-Puffern A und B mit einer Flussrate von 0,8 ml/min, wobei ein ansteigender Gradient an HPLC-Puffer B (und damit an Methanol) verwendet wurde (%B): 0 min (30), 3,5 min (30), 17 min (80), 27 min (90), 31 min (100), 33 min (100), 35 min (30), 40 min (30).

Wurden die Proben über das Säulenmaterial HyPURITY ADVANCE (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) aufgetrennt, so kam das Elutions-Programm *ADPRP7* zum Einsatz. Auch hier wurde wieder mit den HPLC-Puffern A und B bei einer Flussrate von 1 ml/min

mit einem ansteigenden Anteil an HPLC-Puffer B gearbeitet (%B): 0 min (0), 3 min (0), 30 min (60), 32 min (60), 34 min (0), 40 min (0).

Zur Analyse von sehr geringen Mengen NAAD wurden das Säulenmaterial Multohyp BDS (Chromatographie Service, Langerwehe) und das Elutions-Programm *FS_30Bmod19* eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte mit den HPLC-Puffern A und B bei einer Flussrate von 0,8 ml/min (%B): 0 min (30), 4 min (30), 10 min (60), 13 min (100), 20 min (100), 22 min (30), 29 min (30).

3.2.1.2 RP-HPLC von NAADP

Um die Bildung von NAADP durch CD38 nachzuweisen, wurden 500 µg/ml P10-Präparation von Jurkat-T-Lymphozyten mit 1 mM NADP und 10 mM Nikotinsäure (beide Sigma-Aldrich, München) in Phosphatpuffer (9,1 mM NH₂PO₄, pH 5) bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 5 min auf Eis/Salzmischung gekühlt und anschließend durch 10 kDa-Größenausschlussfilter (Microcon, Millipore, Billerica, MA, USA) filtriert. Die HPLC-Analyse erfolgte über das Säulenmaterial HyPURITY ADVANCE (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mit dem Elutions-Programm *NAADP V22*. Zur Auftrennung wurden die HPLC-Puffer A und C (70% Methanol + 30% HPLC-Puffer A) mit einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt, wobei die Temperatur im Säulenofen auf 30°C eingestellt wurde und ein ansteigender Gradient an HPLC-Puffer C (und damit an Methanol) verwendet wurde (%C): 0 min (50), 5 min (50), 13 min (100), 23 min (100), 25 min (50), 30 min (50).

3.2.1.3 RP-HPLC von ADPRP

Um den Abbau von NAADP zu ADP-Ribose-2'-Phosphat (ADPRP) durch CD38 zu analysieren, wurden P10-Präparation von Jurkat-T-Lymphozyten bzw. rekombinantes CD38 verwendet. In *E. coli* exprimiertes CD38 wurde von Angelika Harneit (IBM I, UKE) zur Verfügung gestellt, während in HEK-293-Zellen exprimiertes CD38 wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben hergestellt wurde. Es wurden 1 mg/ml P10-Präparation von Jurkat-T-Lymphozyten bzw. 10 µg/ml rekombinantes CD38 mit 100 µM NAADP (Biolog, Bremen) in HEPES-Puffer (40 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7,4) bei 37°C für 5 min bis 30 min inkubiert. Dann wurden die Proben für 5 min auf Eis/Salzmischung gekühlt und anschließend durch 10 kDa-Größenausschlussfilter (Microcon, Millipore, Billerica, MA, USA) filtriert. Die Analyse erfolgte durch HPLC über das Säulenmaterial HyPURITY ADVANCE (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mit dem Elutions-Programm *ADPRP7* unter Verwendung der HPLC-Puffer A und B mit einer Flussrate von 1 ml/min (%B): 0 min (0), 3 min (0), 30 min (60), 32 min (60), 34 min (0), 40 min (0).

Wurden Proben mit den fluoreszierenden Nukleotiden 1,N⁶-etheno-NAD, 1,N⁶-etheno-NAADP, 1,N⁶-etheno-ADPR oder 1,N⁶-etheno-ADPRP analysiert, so wurde ebenfalls das Elutions-Programm *ADPRP7* verwendet. Zusätzlich wurden mit dem Fluoreszenz-Detektor

(Agilent Technologies, Böblingen) Chromatogamme bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 410 \text{ nm}$ aufgenommen.

3.2.2 Herstellung des ADPRP-Standards

Das Nukleotid ADPRP ist nicht kommerziell erhältlich. Der Standard zur Bestimmung der Retentionszeit von ADPRP musste daher selbst hergestellt werden. Es wurden 1 mM NADP mit 500 ng/ml ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* (Sigma-Aldrich, München) in Tris-Puffer (20 mM Tris, pH = 7) über Nacht im Kühlschrank inkubiert (Aarhus et al., 1995; Hellmich und Strumwasser, 1991)). Das entstandene 2'-Phospho-cADPR hydrolysierte nach 2 h bei 95°C zu ADPRP. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der Peakflächen mit der ChemStation-Software (Agilent Technologies, Böblingen).

Zur Kalibrierung wurde das strukturell ähnliche und kommerziell erhältliche ADPR als Standard eingesetzt (Sigma-Aldrich, München). Zur Analyse der Bildung von ADPRP wurde eine C₁₈-Säule (5 μm , 250 x 4,6 mm, Säulenmaterial: HypURITY ADVANCE, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und das Elutions-Programm *ADPRP7* mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet (%B): 0 min (0), 3 min (0), 30 min (60), 32 min (60), 34 min (0), 40 min (0).

3.3 Ratiometrisch-fluorimetrische Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intakter Zellen wurde mit Hilfe des ratiometrischen, fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikators Fura2 gemessen. Die spektralen Eigenschaften von Fura2 verändern sich, wenn Ca^{2+} gebunden wird. Im Ca^{2+} -freien Zustand liegt das Anregungsmaximum bei 362 nm, während das Anregungsmaximum des Ca^{2+} -gebundenen Zustands 335 nm beträgt (Gryniewicz et al., 1985). Der isobestische Punkt befindet sich bei einer Wellenlänge von 360 nm (siehe Abb. 3.1).

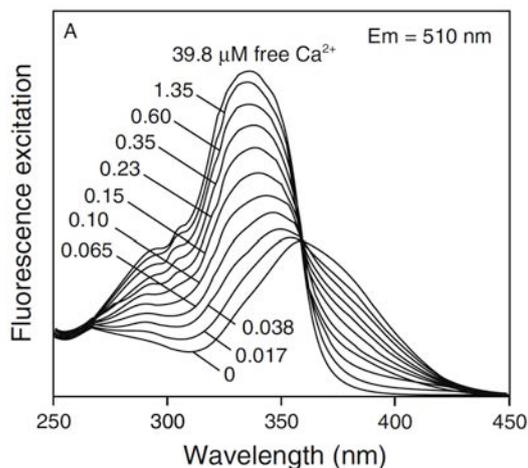


Abb. 3.1: Anregungsspektrum des Ca^{2+} -Indikators Fura2.

Die spektralen Eigenschaften des ratiometrischen Ca^{2+} -Indikators Fura2 verändern sich, wenn Ca^{2+} gebunden wird. In der Grafik sind die Anregungsspektren von Fura2 in Abhängigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgetragen. Um die Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ darzustellen, wird der Quotient aus den bei $\lambda_{\text{Ex}} = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Ex}} = 380 \text{ nm}$ gemessenen Fluoreszenzintensitäten gebildet ($\lambda_{\text{Em}} = 510 \text{ nm}$).

Quelle: www.probes.com.

Um die $[Ca^{2+}]_i$ von HeLa-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben von der Zellkulturflasche abgelöst und pelletiert (Zentrifugation bei 500 g, 4 min, RT). Das Zellpellet wurde in einer Dichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in DMEM-Komplettmedium mit 4 μ M Fura2-AM (Calbiochem, Merck, Darmstadt) aufgenommen und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte von nun an im Dunkeln. Fura2-AM ist membranpermeabel und wird in der Zelle durch Esterasen gespalten (Williams et al., 1985). Das so entstandene Fura2 ist nicht mehr membranpermeabel und wird in der Zelle angereichert. Anschließend wurden die Zellen auf eine Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit DMEM-Komplettmedium verdünnt und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Calcium-Messpuffer gewaschen und in einer Dichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Vor der Messung wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Zunächst wurde im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) die Fluoreszenz bei $\lambda_{Ex} = 340$ nm (Ca^{2+} -gebundener Indikator) sowie $\lambda_{Ex} = 380$ nm (Ca^{2+} -freier Indikator) und $\lambda_{Em} = 510$ nm gemessen. Aus den Fluoreszenzwerten wurde der Quotient gebildet, auch Ratio (R) genannt. Durch die Ratio-Berechnung wird die Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ intakter Zellen weitgehend unabhängig von unterschiedlich erfolgreicher Beladung der Zellen mit Fura2 bzw. unterschiedlicher Zelldichte. Nach Aufnahme von 20 Messpunkten, wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert und die Veränderung der Fluoreszenzwerte über 20 min verfolgt. Zur Kalibrierung wurden zu jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte 0,1% Triton X-100 zugefügt und 20 Messpunkte aufgenommen. Daraus wurde die maximale Ratio (R_{max}) berechnet. Anschließend wurde durch Zugabe des Chelators EGTA (8 mM EGTA/ 60 mM Tris) die minimale Ratio (R_{min}) ermittelt. Die $[Ca^{2+}]_i$ wurde nach der Formel

$$[Ca^{2+}] = 224 \text{ nM} * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * (C_2 / B_2)$$

berechnet (Grynkiewicz et al., 1985). Anschließend wurde $\Delta[Ca^{2+}]$ -Peak durch Bildung der Differenz zwischen der $[Ca^{2+}]_i$ vor Stimulation und der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation berechnet.

3.4 Enzymatische Quantifizierung der intrazellulären NAADP-Konzentration

Für die Bestimmung der intrazellulären NAADP-Konzentration von eukaryotischen Zellen werden sehr sensitive Methoden benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre NAADP-Konzentration von HeLa-Zellen mit einem enzymatisch gekoppelten Fluoreszenz-Assay (NAADP-Cycling-Assay) quantifiziert (Gasser et al., 2006).

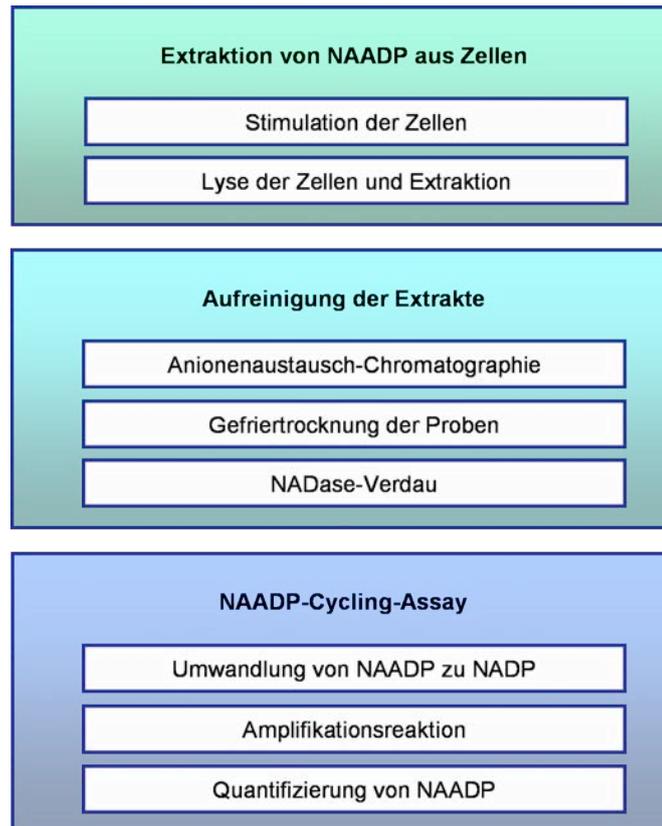


Abb. 3.2: Schema zum Arbeitsablauf der Quantifizierung der intrazellulären NAADP-Konzentration.

3.4.1 Extraktion von NAADP

HeLa-Zellen wurden wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben von der Zellkulturflasche abgelöst, pelletiert (Zentrifugation bei 4 min, 500 g, RT) und zweimal mit Calcium-Messpuffer gewaschen. Dann wurden die Zellen auf einem Schüttler (Biometra, Göttingen) für 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Die Bestimmung von Zellzahl und Zellvolumen erfolgte mit einem CASY-Zellzähler (Schärfe System, Reutlingen). Je Messpunkt wurden $1 \cdot 10^8$ Zellen in 10 ml Calcium-Messpuffer resuspendiert. Zur Stimulation wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit Carbachol (100 μ M bzw. 300 μ M, Sigma-Aldrich, München) behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 1 min auf Eis gekühlt, dann durch Zentrifugation (960 g, 1 min, 4°C) pelletiert und in 1 ml eisgekühlter Trichloressigsäure (20% TCA (w/v)) aufgenommen. Die Zellen wurden 20 s auf dem Vortex gemischt. Dann wurde zu einer Probe als Referenz 15 pmol NAADP zugegeben. Mit Hilfe dieser Referenzprobe konnte später die Wiederfindungsrate bestimmt werden. Nun wurden die Proben insgesamt zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation (5400 g, 10 min, 4°C) abgetrennt.

Zur Neutralisation wurden die Überstände dreimal mit je 20 ml wassergesättigtem Diethylether (Merck, Darmstadt) ausgeschüttelt. Um den Ether vollständig zu entfernen,

wurden die Proben eingefroren und für 1 h bei -80°C gefriergetrocknet. Die Extrakte wurden über Nacht bei -80°C gelagert.

3.4.2 Aufreinigung der Zellextrakte über Ionenaustauschchromatographie

Für die Aufreinigung wurden am Vortag kleine Chromatographie-Säulen vorbereitet. Zunächst wurde das Säulenmaterial (Q-Sepharose Fast Flow, GE Healthcare, München) dreimal mit dem doppelten Volumen Wasser, dreimal mit dem doppelten Volumen 150 mM Trifluoressigsäure (TFA) sowie dreimal mit dem doppelten Volumen Tris-Puffer (10 mM, pH 8) gewaschen. Die Extraktionskartuschen (Volumen 3 ml, Supelco, Sigma-Aldrich, München) wurden mit 500 μl Wasser und 1 ml Methanol gespült. Dann wurden 3,5 ml vorbereiteter Q-Sepharose eingefüllt, was ein Säulenbett mit einem Volumen von 500 μl ergab. Das Säulenbett wurde mit einem in Methanol aktivierten Filter (Supelco, Sigma-Aldrich, München) abgedeckt. Das Säulenmaterial wurde viermal mit 2 ml 150 mM TFA gespült und mit fünfmal 2 ml Tris-Puffer äquilibriert. Die fertigen Säulen wurden verschlossen und über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Vor dem Auftragen der Proben mussten die Säulen erneut mit 2,5 ml eisgekühltem Tris-Puffer gespült werden. Die neutralisierten Extrakte wurden mit 10 ml eisgekühltem Tris-Puffer verdünnt und schrittweise auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde viermal mit 2,5 ml Tris-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit eisgekühlter TFA in steigenden Konzentrationen. Zunächst wurden unerwünschte Nukleotide mit TFA eluiert und verworfen. Hierzu wurden dreimal je 500 μl 10 mM, 12,5 mM und 15 mM TFA über die Säulen gegeben. Dann wurde mit dreimal je 500 μl 17,5 mM, 20 mM und 25 mM TFA eluiert und die Fraktionen in je 3,5 ml eisgekühltem Wasser aufgefangen. Im Anschluss wurden die Proben bei -20°C eingefroren, 30 min bei -80°C gekühlt und dann über Nacht gefriergetrocknet.

3.4.3 Reinigung der verwendeten Enzyme

Da der NAADP-Cycling-Assay sehr sensitiv ist, würden schon geringe Verunreinigungen das Ergebnis verfälschen. Daher muss die verwendete NADase aus *Neurospora crassa* (N9629, Sigma-Aldrich, München) vor dem Einsatz gereinigt werden. Dazu wurden 2,9 mg NADase in 320 μl Probenpuffer (10 mM Tris/HCl, 2,5 mM MgCl_2 , pH 8) gelöst. Dann wurden 320 μl BSA (5 mg/ml) und 660 μl 2%-ige Aktivkohlesuspension zugegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C) entfernt. Die Enzymlösung wurde dann durch 10 kDa-Größenausschlussfilter (Vivaspin2, Sartorius Stedim, Göttingen) auf 150 μl eingengt. Die gereinigte NADase wurde bei -20°C gelagert.

Für die Amplifikationsreaktion mussten die Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH, Sigma-Aldrich, München) und Diaphorase (USB Affymetrix, Buckingham, UK) gereinigt werden. Zunächst wurden die Enzyme in 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer

(pH 8) gelöst (G6P-DH: 1 mg/ml; Diaphorase 12 mg/ml). Zu je 100 µl Enzymlösung wurden 200 µl BSA (5 mg/ml) und 1,2 ml 2%-ige Aktivkohlesuspension hinzugefügt. Nach Inkubation für 60 min bei 37°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) wurde die Aktivkohle durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C) entfernt. Die gereinigte Enzymlösung wurde direkt zur Amplifikationsreaktion eingesetzt (siehe Abschnitt 3.4.5).

3.4.4 Umsatz von NAADP zu NADP

Bevor die Nachweisreaktion des NAADP-Cycling-Assays gestartet werden konnte, wurde das in den Proben enthaltene NAADP in NADP umgewandelt. Allerdings musste zuvor eventuell in den Proben enthaltenes NADP entfernt werden. Hierzu wurden die gefriergetrockneten Proben in 1,5 ml Tris-Mg-Puffer (1 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,3) rekonstituiert und für 4 h mit 10 µl der vorbereiteten NADase-Lösung (0,1 U NADase) (siehe Abschnitt 3.4.3) bei 37°C inkubiert. Dann wurde die NADase durch Erhitzen auf 95°C für 20 min inaktiviert und die Proben anschließend auf Eis abgekühlt. Für die Erstellung der NAADP-Eichgerade wurden NAADP-Standards (62,5 pM bis 10 nM) vorbereitet und ebenfalls mit NADase verdaut.

Nun wurden je Probe bzw. Standard 200 µl in eine Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Für die Proben wurden Triplikate angesetzt, während für die Standards Duplikate pipettiert wurden. Dann wurde jede Vertiefung mit 11 µl Reaktionsmix versetzt, welcher 6 µl Nikotinamid (1 M), 4 µl Natrium-Acetat (100 mM) sowie 1 µl ADP-Ribosyl-Cyclase aus *Aplysia californica* (100 µg/ml, A8950, Sigma-Aldrich, München) enthielt. Zur Kontrolle wurden Ansätze ohne ADP-Ribosyl-Cyclase mitgeführt. Die Inkubation erfolgte 1 h lang im Dunkeln bei Raumtemperatur. In diesem Schritt wurde NAADP mit Hilfe der ADP-Ribosyl-Cyclase durch die Basenaustauschreaktion zu NADP umgewandelt.

3.4.5 Amplifikationsreaktion und Detektion

Während der Amplifikationsreaktion wird NADP kontinuierlich reduziert und reoxidiert, wobei der Farbstoff Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird. Um die Reaktion zu starten, wurden in jede Vertiefung 59 µl Reaktionsmix zugegeben, welcher die folgenden Substanzen enthielt:

Nikotinamid, 1 M	1 µl
Natrium-Phosphat-Puffer, 500 mM, pH 8	20 µl
FMN, 1 mM	1 µl
BSA, 5 mg/ml	2 µl
Resazurin, 10 mM	0,1 µl
Glucose-6-Phosphat, 100 mM	5 µl
gereinigte Enzymlösung (Abschnitt 3.4.3.)	30 µl

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) bei $\lambda_{\text{Ex}} = 530 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 590 \text{ nm}$. Nach 16 h Inkubation wurde erneut gemessen. Zur Auswertung wurden die Startwerte von den Endwerten abgezogen. Anschließend wurde die Differenz zwischen den Werten mit und ohne ADP-Ribosyl-Cyclase gebildet. So wurde nur der Fluoreszenzanstieg berücksichtigt, der auf NAADP zurückzuführen ist. Anhand der Eichgeraden wurde die NAADP-Konzentration in den Proben berechnet.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Um die Expression von Proteinen auf mRNA-Ebene zu überprüfen, wurde Gesamt-RNA isoliert und zur RT-PCR eingesetzt. HeLa-Zellen und HEK-293-Zellen wurden wie in den Abschnitten 3.1.2 bzw. 3.1.3 beschrieben von der Zellkulturfläsche abgelöst. Jurkat-T-Lymphozyten konnten direkt verwendet werden. Es wurden $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen zentrifugiert (500 g, 4 min, RT), in Calcium-Messpuffer gewaschen und erneut pelletiert. Aus dem Zellpellet wurde Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) unter Verwendung von QIAshredder-Säulchen (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Auf der Aufreinigungssäule wurde ein Verdau mit RNase freier DNase (Qiagen, Hilden) durchgeführt, um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden. Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurden mit einem UV-Vis-Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Schwerte) überprüft. Die Integrität der RNA wurde über Gelelektrophorese kontrolliert. Hierzu wurde ein Aliquot der isolierten RNA unter denaturierenden Bedingungen über ein 1%-iges Agarosegel aufgetrennt. Die Färbung der RNA erfolgte mit SYBR Green II (Sigma-Aldrich, München). Da Gesamt-RNA isoliert worden war, fanden sich im Gel zwei Banden: Die 28S-rRNA (5,1 kb) sowie die 18S-rRNA (1,9 kb) waren deutlich zu erkennen. Wären die Banden unscharf gewesen, hätte dies auf eine Degradation der RNA hingewiesen. Auch eine Kontamination durch genomische DNA wäre im Gel sichtbar geworden. Die isolierte RNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.2 RT-PCR und PCR

Für die RT-PCR wurde isolierte Gesamt-RNA (siehe Abschnitt 3.5.1) auf $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt. Die RT-PCR wurde mit dem Titan One Tube RT-PCR-Kit (Roche, Mannheim) mit spezifischen Primern (siehe Abschnitt 3.11) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Enzymmix enthielt AMV reverse Transkriptase für die Erststrangsynthese sowie *Taq* DNA-Polymerase und *Tgo* DNA-Polymerase zur Amplifikation. *Tgo* DNA-Polymerase besitzt eine Korrekturlesefunktion, was für die

Sequenzierung der RT-PCR-Produkte von Bedeutung ist. Mix A und Mix B wurden getrennt angesetzt und kurz vor dem Start der Reaktion zusammen geführt.

Mix A		Mix B	
0,2 mM	dNTPs	10 µl	5x RT-PCR-Puffer
0,4 µM	forward Primer	1 µl	Enzymmix
0,4µM	reverse Primer		
5 U	RNase Inhibitor		
5 mM	DTT		
200 ng	RNA		
ad 25 µl Wasser (bidest)		ad 25 µl Wasser (bidest)	

In Kontroll-Ansätzen wurde die reverse Transkriptase vor der Reaktion durch Hitzebehandlung (2 min, 95°C) inaktiviert.

Die RT-PCR wurde im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt.

Zyklen	Temperatur	Dauer	Prozess
1	50°C	30 min	reverse Transkription
1	95°C	2 min	initiale Denaturierung
	95°C	10 s	Denaturierung
30	55°C	30 s	Annealing
	68°C	1 min/kb	Elongation
1	68°C	7 min	finale Elongation
1	4°		Lagerung

Zur Vervielfältigung von PCR-Produkten und zur *nested* PCR wurde 1 µl des ursprünglichen PCR-Ansatzes eingesetzt. Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten aus einem Plasmid wurden 5 ng Plasmid verwendet.

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>Temperaturprogramm</u>		
0,2 mM	dNTPs			
0,2 µM	forward Primer	Zyklen	Temperatur	Dauer
0,2µM	reverse Primer	1	95°C	2 min
1,7 mM	MgCl ₂		95°C	20 s
5 µl	10x PCR-Puffer	30	55°C – 65°C	30 s
1 µl	<i>template</i>		72°C	1 min/kb
1 U	DNA-Polymerase	1	72°C	7 min
ad 50 µl	Wasser (bidest)	1	4°C	

War das Ziel der PCR der Nachweis von DNA-Abschnitten (z.B. zur Kontrolle der Transformation) so wurde *Taq*-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Sollten DNA-Abschnitten für die Klonierung vervielfältigt werden, wurde *Pfu*Turbo-DNA-Polymerase (Agilent Technologies, Waldbronn) eingesetzt.

Der Erfolg der PCR wurde über Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.3) kontrolliert.

3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Agarose-Gelelektrophorese wurden 1-2%-ige Gele verwendet. Hierzu wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer unter Aufkochen gelöst und mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Dann wurde die Agaroselösung in Gelkammern gegossen. Nach dem Erkalten wurden Kamm sowie Gießsperrn entfernt und das Gel mit 1xTAE-Puffer in die Gelelektrophorese-Apparatur (Pharmacia, GE Healthcare, München) eingesetzt. Die Proben wurden mit 6xLaufpuffer versetzt und in die Taschen aufgetragen. Als Größenmarker wurden Gene ruler 100 bp ladder plus sowie pUC (MspI) (beide Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für ca. 1 h durchgeführt. Die Detektion der DNA erfolgte mit einem UV-Transilluminator (Bachhofer, Reutlingen) bei $\lambda = 312 \text{ nm}$.

3.5.4 Restriktionsverdau von DNA

Vor dem Restriktionsverdau wurden PCR-Produkte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) aufgereinigt. Der Restriktionsverdau wurde im Wesentlichen nach Angaben der Hersteller mit dem Puffer Tango (Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Im Standardansatz wurde 1 µg DNA mit 2 U Enzym in 20 µl Volumen für 1 h bei 37°C inkubiert.

Für die Klonierung von pIRES2-EGFP-PLAP bzw. pIRES2-EGFP-TNAP wurden die folgenden Reaktionsansätze verwendet:

NheI-Verdau		EcoRI-Verdau	
50 µl	PCR-Produkt	60 µl	NheI-Ansatz
2 µl	NheI (Fermentas)	2 µl	EcoRI (Fermentas)
6 µl	10x Puffer Tango	8 µl	10x Puffer Tango
ad 60 µl	Wasser	ad 70 µl	Wasser
Inkubation	1 h bei 37°C	Inkubation	2 h bei 37°C

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Restriktionsenzyme durch Hitzebehandlung für 20 min bei 65°C inaktiviert. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung die Fragmente mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim).

Der Erfolg des Restriktionsverdau wurde über Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.3) überprüft. Mit einem UV-Vis-Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Schwerte) wurden sowohl Konzentration als auch Reinheit der DNA-Fragmente gemessen.

3.5.5 Ligation von DNA

Zur Ligation wurden zuvor mit Restriktionsenzymen verdaute und gereinigte DNA-Fragmente eingesetzt. Plasmid-DNA wurde nach dem Restriktionsverdau über Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.3) aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) aufgereinigt. Plasmid und Insert wurden im Verhältnis 5:1 durch DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 (Fermentas, St. Leon-Rot) ligiert. In 10 µl Ligationsansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA mit Insert und 3 U T4-DNA-Ligase in T4-DNA-Ligase-Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert. 10xT4-DNA-Ligase-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot) war zuvor aliquotiert worden, um eine Degradation des enthaltenen ATPs zu vermeiden. Nach der Inkubation wurde die Ligase durch Hitzebehandlung für 10 min bei 60°C inaktiviert.

3.5.6 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation wurden *E.coli* eingesetzt (K12 XL-1 blue; Genotyp: F': *Tn10 pro A⁺B⁺ lacIqΔ(lacZ)M15 recA1^{end}A1 gyrA96 (NaI^r) thi hsdR17(rk⁻mk⁺) supE44 relA1 lac*). Vor der Transformation waren die Bakterien mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode chemisch kompetent gemacht worden. 100 µl kryokonservierte Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Nun wurden 1 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz vorsichtig untergerührt und die Bakterien 20 min auf Eis gehalten. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42°C wurden die Ansätze für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 900 µl SOC-Medium versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden 100 µl Bakteriensuspension auf eine LB-Agarplatte aufgebracht. Nach Transformation von Ligationsansätzen wurde die gesamte Bakteriensuspension pelletiert, in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte aufgebracht. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank gehalten.

Der Erfolg der Transformation wurde durch PCR-Screen bzw. Mini-Präparation (siehe Abschnitt 3.5.7) überprüft. Für den PCR-Screen wurde eine Bakterienkolonie in 25 µl Wasser resuspendiert und eine PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.2).

3.5.7 Präparation von Plasmid-DNA

Nur von Bakterienkulturen, welche im PCR-Screen positiv getestet worden waren, wurde eine Mini-Präparation hergestellt. Für die Mini-Präparation wurden 4 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurden mit einem UV-Vis-Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Schwerte) überprüft.

Um größere Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion eukaryotischer Zellen zu gewinnen, wurden Maxi-Präparationen hergestellt. Da hohe Konzentrationen Endotoxin eine Reduktion der Transfektionseffizienz zur Folge haben können (Weber et al., 1995), wurde ein Reagenzienkit zur Herstellung Endotoxin-freier Plasmid-DNA gewählt. Für die Maxi-Präparation wurden zunächst 4 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie beimpft. Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurde die Vorkultur in 100 ml frisches LB-Medium mit Antibiotikum transferiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Endofree Plasmid Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Auch hier wurden Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA mit dem UV-Vis-Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Schwerte) ermittelt. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA auf 1 µg/µl eingestellt.

3.5.8 TA-Klonierung mit pGEM-T easy

Die Amplifikate der RT-PCR wurden teilweise sequenziert, um nachzuweisen, dass das richtige Produkt entstanden war. Hierzu wurden die RT-PCR-Produkte zunächst über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel herausgelöst und mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) aufgereinigt. Anschließend wurden die RT-PCR-Produkte in das Plasmid pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA) eingefügt.

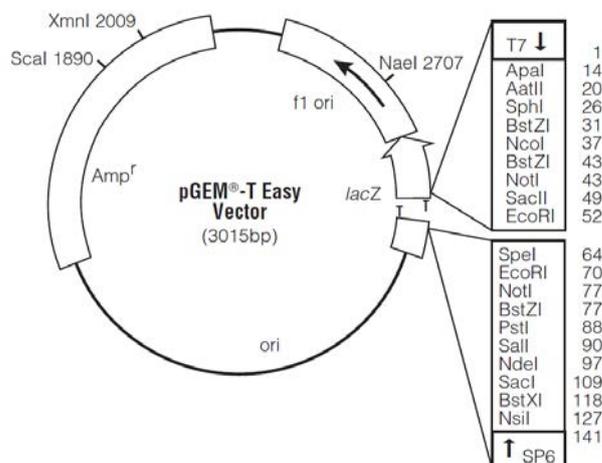


Abb. 3.3: Vektorkarte des Plasmids pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA).

Die multiple Klonierungsstelle (MCS) befindet sich im lacZ-Gen. Wird das Insert erfolgreich in den Vektor eingebracht, so wird die Transkription des lacZ-Gens unterbrochen und die Bakterienkolonien können durch Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden.

Das linearisierte Plasmid pGEM-T easy verfügt über Thymidinüberhänge, während die PCR-Produkte Adenosinüberhänge aufweisen. In 10 µl Ligationsansatz wurden 50 ng pGEM-T easy mit PCR-Produkt in Rapid Ligation Buffer mit 3 U T4 DNA Ligase (Promega, Madison, WI, USA) über Nacht bei 16°C inkubiert. Das Verhältnis Plasmid:Insert betrug dabei 1:3.

Die Ligationsansätze wurden anschließend in *E.coli* (K12 XL-1 blue) transformiert (siehe Abschnitt 3.5.6). Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal ausgestrichen. Je Ansatz wurden zwei weiße Bakterienkolonien gepickt und Mini-Präparationen hergestellt (siehe Abschnitt 3.5.7).

3.5.9 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung wurden Mini-Präparationen hergestellt (siehe Abschnitt 3.5.7). 15 µl Sequenzieransatz enthielten 1 µg Plasmid-DNA sowie 15 pmol Sequenzierprimer (siehe Abschnitt 3.11). Die Sequenzierung wurde von Eurofins MWG (Ebersberg) durchgeführt. Die Sequenzierungsdaten befinden sich im Anhang (siehe Anhang).

3.6 Rekombinante Protein-Expression

3.6.1 Herstellung eines Vektors zur Expression der alkalischen Phosphatase

Um die Isoformen PLAP bzw. TNAP rekombinant exprimieren zu können, wurde zunächst die cDNA durch PCR (siehe Abschnitt 3.5.2) aus den kommerziell erhältlichen Plasmiden IOH62504-pDEST15 (PLAP, 32 ng/µl) bzw. IOH14614-pDEST15 (TNAP, 31 ng/µl) (beide imaGenes, Berlin) vervielfältigt.

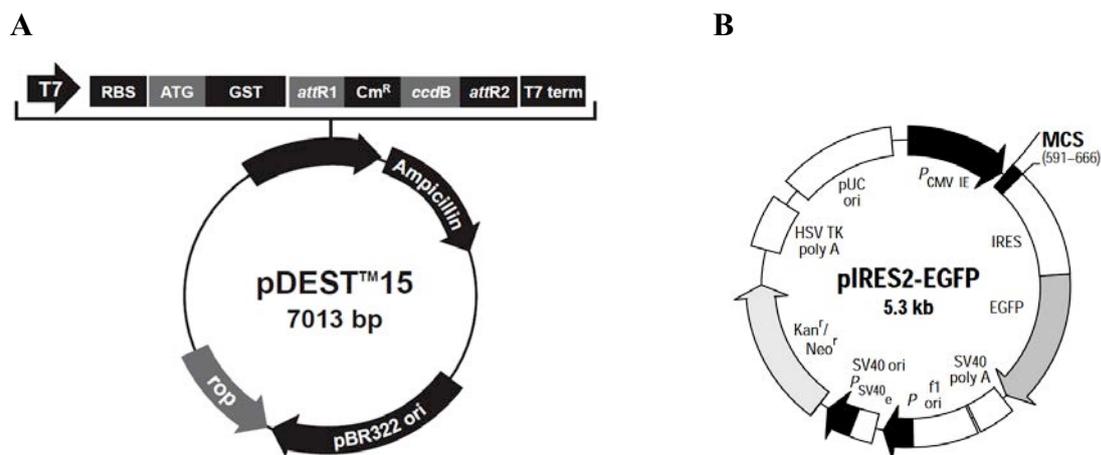


Abb. 3.4: Vektoren für die Expression der alkalischen Phosphatase.

(A) Vektorkarte des Plasmids pDEST15 (Invitrogen, Darmstadt). (B) Vektorkarte des Plasmids pIRES2-EGFP (BD Clontech, Heidelberg).

Um eine gerichtete Klonierung in den Zielvektor zu erreichen, wurde bei der Amplifikations-Reaktion über den *forward*-Primer eine NheI-Schnittstelle und über den *reverse*-Primer eine EcoRI-Schnittstelle mit je zwei Basenpaaren Überhang eingefügt.

Die PCR-Produkte wurden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) aufgereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte und der Zielvektor pIRES2-EGFP (BD Clontech, Heidelberg) wurden einem Restriktionsverdau mit NheI und EcoRI (beide Fermentas, St. Leon-Rot) unterworfen (siehe Abschnitt 3.5.4). Anschließend erfolgte die Ligation mit T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) (siehe Abschnitt 3.5.5). Plasmid und Insert wurden im Verhältnis 5:1 zur Ligation eingesetzt.

Die Ligationsansätze wurden in *E.coli* (K12 XL-1 blue) transformiert (siehe Abschnitt 3.5.6). Nach erfolgreichem PCR-Screen wurden Mini-Präparationen hergestellt (siehe Abschnitt 3.5.7) und die neu generierten Plasmide pIRES2-EGFP-PLAP bzw. pIRES2-EGFP-TNAP sequenziert (siehe Anhang).

3.6.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

HEK-293-Zellen wurden durch Lipofektion mit den Expressionsvektoren pIRES2-EGFP-PLAP bzw. pIRES2-EGFP-TNAP transfiziert. Als Kontrolle wurde pIRES2-EGFP ohne zusätzliches Insert mitgeführt. Zur Lipofektion wurden Lipofectamine 2000 bzw. Lipofectamine LTX (beide Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Die Zellen wurden am Vortag wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben abgelöst und in 35 mm-Kulturschalen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten.

Zur Transfektion mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Darmstadt) wurden 2 µg Plasmid-DNA (1 µg/µl) in 98 µl Opti-MEM (Invitrogen, Darmstadt) verdünnt (Mix A). Mix B bestand aus 6 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Darmstadt) und 94 µl Opti-MEM (Invitrogen, Darmstadt). Mix A und Mix B wurden für 20 s auf dem Vortex gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde durch Opti-MEM ersetzt. Dann wurden 200 µl der Reaktionslösung auf eine 35 mm-Kulturschale verteilt. Die Zellen wurden 5 h bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gehalten. Anschließend wurde das Medium gegen DMEM-Komplettmedium ausgetauscht und die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert.

Wurde zur Transfektion Lipofectamine LTX verwendet, so wurden die Zellen in 6-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden 2,5 µg Plasmid-DNA (1 µg/µl) in 489,5 µl Opti-MEM (Invitrogen, Darmstadt) verdünnt und anschließend 2 µl Reagenz PLUS (Invitrogen, Darmstadt) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde gründlich gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 6 µl Lipofectamine LTX (Invitrogen, Darmstadt) wurde erneut gemischt. Nach 30 min wurden 500 µl Reaktionslösung je Vertiefung zugetropft. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gehalten. 24 h später wurde der Erfolg der Transfektion durch Detektion der EGFP-Fluoreszenz überprüft (siehe Abschnitt 3.11).

3.6.3 Überexpression und affinitätschromatographische Reinigung von CD38

CD38⁺-HEK-293-Zellen wurden von Dr. Ralf Fliegert und Angelika Harneit (beide IBMI, UKE) durch Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem Vektor CD38pEXPR-IBA42 (IBA, Göttingen) hergestellt. Dies ermöglicht die rekombinante Expression von CD38 mit einer C-terminalen 6xHis-Markierung und einer N-terminalen Strep-Markierung. Zusätzlich ist eine Sekretionssequenz enthalten, so dass CD38 in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. CD38⁺-HEK-293-Zellen wurden wie Wildtyp-HEK-293-Zellen passagiert (siehe Abschnitt 3.1.3), jedoch in DMEM-Selektionsmedium gehalten. Für die Expression von CD38 wurden CD38⁺-HEK-293-Zellen bei der Passage 1:10 verdünnt. Dann wurden die Zellen über Nacht bei 5% CO₂ und 37°C im CO₂-Inkubator gehalten. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch Freestyle-293-Expressionsmedium (Invitrogen, Darmstadt) ersetzt. Dies ermöglicht das Wachstum der Zellen ohne Zugabe von Serum ins Medium. Serum im Zellkulturüberstand würde den Größenausschlussfilter zu schnell zusetzen, so dass mehrere Filtrationsschritte nötig wären.

Nach zwei weiteren Tagen wurde der Zellkulturüberstand geerntet, durch einen 10 kDa-Größenausschlussfilter (Centriprep, Millipore, Billerica, MA, USA) auf das ca. Vierzigfache konzentriert und CD38 über eine NiNTA-Säule (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers affinitätsgereinigt. Der Erfolg der Reinigung wurde mit Hilfe eines enzymatischen Assays überprüft (siehe Abschnitt 3.8.1). Das im Eluat enthaltene Imidazol inhibiert die NAADP-abbauende Aktivität von CD38. Daher wurde die Probe umgepuffert, in dem sie viermal mit je 500 µl BSA-haltigem HEPES-Puffer (40 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,1% BSA, pH 7,4) durch einen 10 kDa-Größenausschlussfilter (Microcon, Millipore, Billerica, MA, USA) filtriert wurde.

3.7 Proteinbiochemische Methoden

3.7.1 Präparation von Membranfraktionen aus eukaryotischen Zellen

Zur Präparation von Membranfraktionen wurden $1 \cdot 10^8$ Zellen pelletiert (Zentrifugation bei 500 g, 5 min, RT), zweimal in Calcium-Messpuffer gewaschen und in 5 ml Calcium-Messpuffer mit Proteaseinhibitor (Roche complete EDTA-free, Roche, Mannheim) resuspendiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (IKA-Labor Technik, Staufen) bei 1500 U/min in 30 Zügen. Nach Zentrifugation (500 g, 5 min, 4°C) wurde das Pellet erneut homogenisiert. Die gesammelten Überstände wurden zentrifugiert (2000 g, 10 min, 4°C), um Zellkerne und eventuell noch nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen. Das Pellet wurde verworfen, während der Überstand bei 10 000 g zentrifugiert wurde (30 min, 4°C). Das nun erhaltene Pellet wurde in Lysispuffer (110 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 7,2; mit Proteaseinhibitor *complete EGTA free*, Roche, Mannheim) resuspendiert und die Proteinkonzentration auf ca. 5 mg/ml eingestellt. Diese Präparation wurde P10-Präparation genannt. Der Überstand wurde weiter fraktioniert (Ultrazentrifugation bei 100 000 g, 90 min, 4°C). Das Pellet der Ultrazentrifugation wurde

in Lysispuffer durch vorsichtiges Resuspendieren gelöst und P100-Präparation genannt. Der Überstand der Ultrazentrifugation enthielt die cytosolische Fraktion und wurde als S100-Präparation bezeichnet. P10, P100 und S100 wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Zunächst wurden Verdünnungen der Proteinfractionen (1:10, 1:30 und 1:100) angesetzt. Dann wurden je $5\ \mu\text{l}$ der verdünnten Lösungen mit $250\ \mu\text{l}$ Bradford-Reagenz (BioRad, München) für 15 min bei Raumtemperatur in einer in 96-Loch-Mikrotiterplatte inkubiert. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte über eine BSA-Verdünnungsreihe. Die Detektion erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) bei $\lambda = 600\ \text{nm}$.

3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

P10-Präparationen wurden über diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem 3,9%-igen Sammelgel und einem 10 - 12,5%-igen Trenngel nach der Methode von Lämmli aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Dicke des Gels betrug $0,75\ \text{mm}$. Zur besseren Löslichkeit der hydrophoben Proteine der Membranfraktionen wurde teilweise die SDS-Konzentration im Gel und im Laufpuffer auf 0,4% SDS und im Probenpuffer auf 4% SDS erhöht. Sollte im nachfolgenden Western Blot CD38 nachgewiesen werden, so wurde die Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Alle anderen Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen (1,2% β -Mercaptoethanol) aufgetrennt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und nach Denaturierung (5 min, 95°C) je Probentasche $10 - 20\ \mu\text{g}$ Protein aufgetragen. Als Marker wurde *all blue prestained* (BioRad, München) mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von $100\ \text{V}$ für ca. 3 h.

3.7.3 Western Blotting

Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran wurde das Gel zunächst 30 min in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) äquilibriert. Für den Transfer von CD38 wurde ein geringer konzentrierter Puffer verwendet (10 mM Tris, 96 mM Glycin, 10% Methanol). Die PVDF-Membran (Millipore, Billerica, MA, USA) wurde durch 10-minütige Inkubation mit Methanol aktiviert, zweimal mit Wasser gespült und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert (15 min). Es wurde ein Western Blot im Tank-Blot-Verfahren unter Wasserkühlung im Kühlraum durchgeführt (Towbin et al., 1979). Der Transfer erfolgte für 1 h bei $400\ \text{mA}$. Das Polyacrylamid-Gel wurde dreimal mit Wasser gespült und anschließend über Nacht mit Biosafe Coomassie Stain (Bio-Rad, München) gefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde durch dreimaliges Spülen mit Wasser entfernt.

Die PVDF-Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur in TBS mit 5% Magermilchpulver (w/v) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Dann wurde die Membran in TBS gewaschen und mit dem Primärantikörper (siehe Abschnitt 3.13) in TBS-T mit 2,5% Magermilchpulver (w/v) über Nacht im Kühlraum inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (siehe Abschnitt 3.13) in TBS-T mit 2,5% Magermilchpulver (w/v) für 1 h bei Raumtemperatur. Dann wurde die Membran dreimal mit TBS-T und zweimal mit TBS gewaschen. Nun wurde die Membran für 2 min mit 2 ml ECL-Lösung (GE Healthcare, München) überschichtet, um die Aktivität der Peroxidase sichtbar zu machen. Die Chemilumineszenz wurde bei einer Expositionszeit von 0,5 min bis 5 min detektiert (Intelligent Dark Box, CAS 3000, FujiFilm, Tokyo, Japan).

3.7.4 DotBlot zur Validierung der Primärantikörper

Um zu testen, ob die Primärantikörper zur Detektion des jeweiligen Zielproteins geeignet waren, wurden DotBlots durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Methode angewandt, um die Inkubationsbedingungen für den Western Blot zu optimieren. Es wurden 5 µl Proteinlösung auf eine Nitrocellulosemembran getropft und 10 min bei Raumtemperatur gewartet, bis die Membran getrocknet war. Nun wurde die Membran 30 min bei Raumtemperatur in TBS mit 5% Magermilchpulver (w/v) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (siehe Abschnitt 3.13) unter verschiedenen Bedingungen. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (siehe Abschnitt 3.13) in TBS-T mit 2,5% Magermilchpulver (w/v) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Membran für 2 min mit 1 ml ECL-Lösung (GE Healthcare, München) überschichtet und die Chemilumineszenz bei einer Expositionszeit von 0,5 min bis 5 min detektiert (Intelligent Dark Box, CAS 3000, FujiFilm, Tokyo, Japan).

3.8 Enzymatische Assays

3.8.1 Fluorimetrischer Nachweis der NAD-Glykohydrolase-Aktivität

Das fluoreszierende NAD-Derivat 1,N⁶-etheno-NAD ermöglicht eine fluorimetrische Bestimmung der NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38 (Barrio et al., 1972). 1,N⁶-etheno-NAD weist eine schwache Fluoreszenz auf, da die Fluoreszenz der Etheno-Gruppe durch die Nachbarschaft der Nikotinamid-Gruppe vermindert wird (siehe Abb. 3.5A). Durch enzymatische Hydrolyse wird die Nikotinamid-Gruppe abgespalten, so dass 1,N⁶-etheno-ADPR entsteht. Das Fehlen der Fluoreszenz-löschenden Nikotinamid-Gruppe hat eine höhere Fluoreszenz zur Folge. Durch die Aktivität einer NAD-Glykohydrolase, wie beispielsweise CD38, entsteht also aus dem schwach fluoreszierenden Substrat 1,N⁶-

etheno-NAD das stark fluoreszierende Produkt 1,N⁶-etheno-ADPR. Aus der Zunahme der Fluoreszenzintensität kann die NAD-Glykohydrolase-Aktivität berechnet werden.

Allerdings ist dieser fluorimetrische Assay nicht spezifisch für CD38. Alle Enzyme, welche eine Abspaltung von Nikotinamid katalysieren, bewirken einen Anstieg der Fluoreszenz. So kann auch die Aktivität von Pyrophosphatasen oder anderen NAD-Glykohydrolasen zu einem Anstieg der Fluoreszenz führen. Beim Umsatz von 1,N⁶-etheno-NAD mit P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten entstehen beispielsweise auch 1,N⁶-etheno-AMP sowie 1,N⁶-etheno-Adenosin. Daher ist die aus den Fluoreszenzintensitäten berechnete Enzym-Aktivität auch keine exakte Bestimmung der spezifischen Aktivität von CD38. Der fluorimetrische Enzym-Assay mit dem Substrat 1,N⁶-etheno-NAD diente in der vorliegenden Arbeit als schnelle Methode zur Abschätzung der NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38.

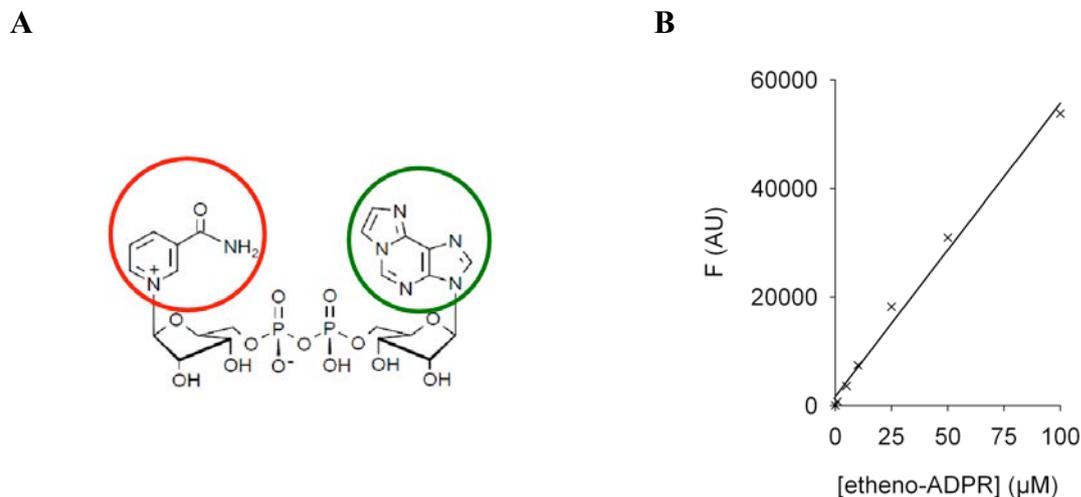


Abb. 3.5: 1,N⁶-etheno-NAD als Substrat für den Nachweis der NAD-Glykohydrolase-Aktivität.

(A) Struktur von 1,N⁶-etheno-NAD; grün umrandet: fluoreszierende Etheno-Gruppe; rot umrandet: Nikotinamid-Gruppe, welche die Fluoreszenz der Etheno-Gruppe vermindert. Im Enzym-Assay wird das schwach fluoreszierende 1,N⁶-etheno-NAD durch NAD-Glykohydrolasen unter Abspaltung von Nikotinamid zum stark fluoreszierenden 1,N⁶-etheno-ADPR umgesetzt. Aus dem Anstieg der Fluoreszenzintensität kann auf die Enzym-Aktivität geschlossen werden. Quelle: www.biolog.de. (B) Es wurde eine Eichgerade für das Produkt 1,N⁶-etheno-ADPR erstellt. Hierzu wurden steigende Konzentrationen 1,N⁶-etheno-ADPR in Calcium-Messpuffer in einem Gesamtvolumen von 200 μ l in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 410$ nm gemessen. Die Eichgerade diente zur Berechnung der Aktivität der NAD-Glykohydrolase im fluorimetrischen Enzym-Assay. Regressionskurve: $r^2 = 0,99$; $p < 0,001$.

Zum Nachweis der NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38 wurden 100 μ g/ml P10-Präparation mit 100 μ M 1,N⁶-etheno-NAD in Calcium-Messpuffer bei Raumtemperatur in einer Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in einem Gesamtvolumen von 200 μ l inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 410$ nm. Da 1,N⁶-etheno-NAD bereits etwas Fluoreszenz zeigt, wurden die Startwerte von den Endwerten abgezogen. Im Regelfall wurde eine

Dreifachbestimmung durchgeführt. Um die Produktzunahme berechnen zu können, wurde eine Eichgerade mit 1,N⁶-etheno-ADPR aufgenommen (siehe Abb. 3.5B).

Zudem wurde mit dem fluorimetrischen Enzym-Assay die Aktivität von rekombinantem, in *E.coli* bzw. HEK-293-Zellen exprimiertem CD38 gemessen. Die CD38-Präparation aus *E.coli* wurde von Angelika Harneit (IBM I, UKE) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung von CD38 in HEK-293-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben. 1 µg/ml CD38 wurden mit 100 µM 1,N⁶-etheno-NAD in Calcium-Messpuffer bei Raumtemperatur in einer Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert und die Fluoreszenzzunahme im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) vermessen.

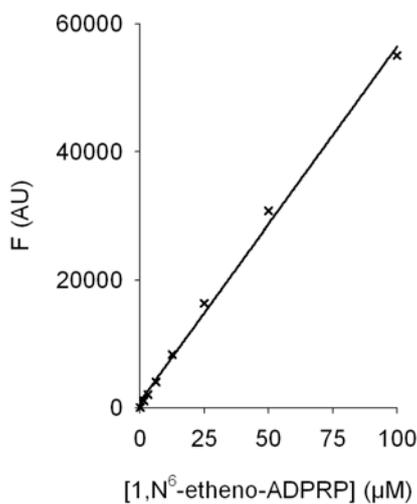


Abb. 3.6: 1,N⁶-etheno-NAADP als Substrat für den Nachweis der NAADP-Hydrolase-Aktivität von CD38.

Die Nikotinsäure-Gruppe des Substrats 1,N⁶-etheno-NAADP vermindert die Fluoreszenz der Etheno-Gruppe, so dass 1,N⁶-etheno-NAADP nur sehr schwach fluoresziert. Die Hydrolyse von 1,N⁶-etheno-NAADP durch CD38 führt zur Freisetzung des stark fluoreszierenden 1,N⁶-etheno-ADPRP. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden steigende Konzentrationen 1,N⁶-etheno-ADPRP in Calcium-Messpuffer in einem Gesamtvolumen von 100 µl in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 410 \text{ nm}$ gemessen. Die Eichgerade diente zur Abschätzung der 1,N⁶-etheno-NAADP-Hydrolase-Aktivität von CD38 im fluorimetrischen Enzym-Assay. Regressionskurve: $r^2 = 0,99$; $p < 0,001$.

Ein ähnlicher Enzym-Assay wurde für das Substrat 1,N⁶-etheno-NAADP entwickelt. Die Nikotinsäure-Gruppe vermindert, ähnlich wie die Nikotinamid-Gruppe von 1,N⁶-etheno-NAD, die Fluoreszenz der Etheno-Gruppe von 1,N⁶-etheno-NAADP. Durch HPLC-Analysen wurde nachgewiesen, dass P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten 1,N⁶-etheno-NAADP unter Abspaltung von Nikotinsäure zu 1,N⁶-etheno-ADPRP umsetzen, was einen Anstieg der Fluoreszenz zur Folge hat. Der Enzym-Assay mit dem Substrat 1,N⁶-etheno-NAADP kann also als schnelle Methode eingesetzt werden, um die Hydrolyse von NAADP durch CD38 abzuschätzen. Außerdem konnte mit dieser Methode die konzentrationsabhängige Inhibition des NAADP-Abbaus durch Imidazol getestet werden.

3.8.2 Colorimetrischer Nachweis der Phosphatase-Aktivität mit dem Substrat pNPP

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern. Um die enzymatische Aktivität zu bestimmen, wurde ein colorimetrischer Nachweis mit dem Substrat para-Nitrophenylphosphat (pNPP) verwendet. Der Serinrest im aktiven Zentrum der alkalischen Phosphatase greift nukleophil am Phosphoratom an. Para-Nitrophenol wird

abgespalten, während das Phosphat zunächst am Serinrest verbleibt (Schwartz und Lipmann, 1961). Im zweiten Schritt wird dann das Phosphat abgespalten. Die Freisetzung des Phosphates verläuft schneller, wenn sich in der Reaktionslösung ein Akzeptor wie beispielsweise Diethanolamin (DEA) befindet (Hoylaerts et al., 2006). Das gelbliche para-Nitrophenol lagert sich im Alkalischen zum para-Nitrophenon (pNP) um, was eine Farbvertiefung bewirkt (siehe Abb. 3.7A). Nach dem Gesetz von Lambert-Beer (Beer, 1852) ist die Konzentration des Farbstoffs proportional zur Absorption: $\text{Absorption} = \epsilon \cdot c \cdot d$, wobei ϵ der Extinktions- oder auch Absorptionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Probe sind. Da sich die Konzentration des Farbstoffes proportional zur Absorption verhält, kann mit Hilfe einer Eichgeraden die Konzentration im Reaktionsansatz berechnet werden. Die Bestimmung der Absorption erfolgt möglichst beim Absorptionsmaximum der Probe. Das Absorptionsmaximum von para-Nitrophenon liegt bei $\lambda = 405 \text{ nm}$. Der Extinktionskoeffizient ϵ bestimmt den dynamischen Bereich der Messung. Unter den verwendeten Bedingungen konnten Konzentrationen im Bereich von $5 \mu\text{M}$ bis $100 \mu\text{M}$ pNP bestimmt werden.

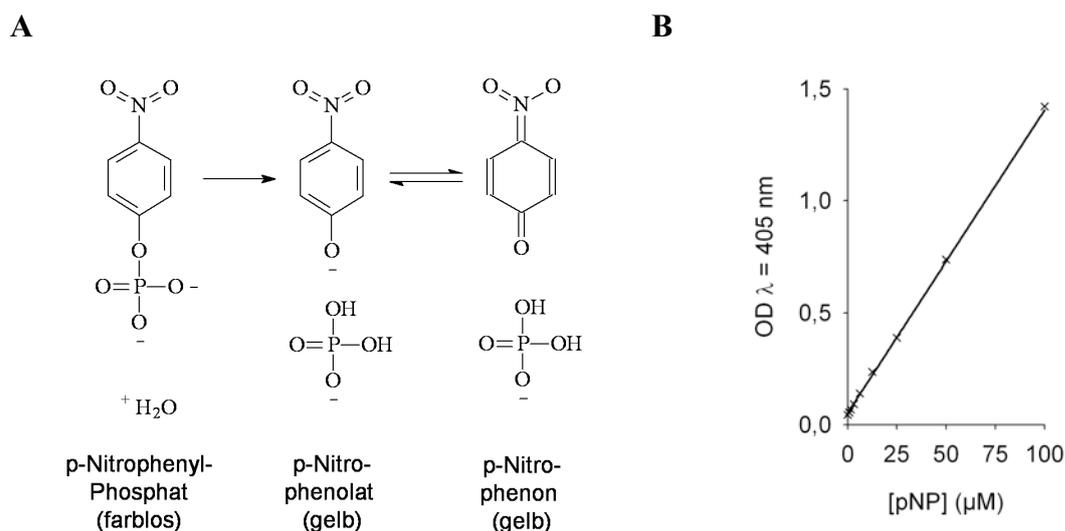


Abb. 3.7: Colorimetrischer Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase.

(A) Wird das farblose Substrat para-Nitrophenylphosphat durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert, so entsteht das gelbliche para-Nitrophenol, welches sich im Alkalischen zu para-Nitrophenon umlagert. Das Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes liegt bei $\lambda = 405 \text{ nm}$. (B) Es wurde eine Eichgerade erstellt, indem steigende Konzentrationen para-Nitrophenon (pNP) in DEA-Puffer in einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Die Absorption wurde bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ bestimmt. Regressionskurve: $r^2 = 0,99$; $p < 0,001$.

Zum Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurden im Regelfall $5 \mu\text{g/ml}$ P10-Präparation mit $5,5 \text{ mM}$ pNPP in Diethanolamin-Puffer (1 M DEA, 1 mM MgCl_2 , $\text{pH } 9,8$) bei Raumtemperatur in einer Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ inkubiert. Die Absorption wurde bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ im

Mikrotiterplatten-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) bestimmt.

Zum Nachweis der Aktivität der rekombinant exprimierten Isoformen der alkalischen Phosphatase wurden HEK-293-Zellen mit den Plasmiden pIRES2-EGFP-PLAP, pIRES2-EGFP-TNAP bzw. pIRES2-EGFP transfiziert (siehe Abschnitt 3.6.2). Nach 24 h wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst, zweimal in Calcium-Messpuffer gewaschen und dann die Zellzahl mit Calcium-Messpuffer auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Die EGFP-Fluoreszenz der Zellsuspension wurde im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$ gemessen und die Zellsuspensionen mit Calcium-Messpuffer verdünnt, bis die EGFP-Fluoreszenz in allen drei Ansätzen etwa gleich hoch war. Dann wurden je 50 μl Zellsuspension und 50 μl Substratlösung (11 mM pNPP in Diethanolamin-Puffer) in eine Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Es folgte die Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ im Mikrotiterplatten-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich).

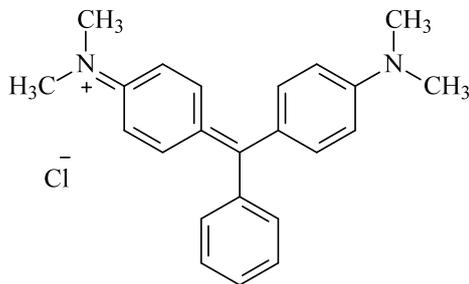
Im Regelfall wurden Triplikate der Reaktionsansätze gemessen. Mit dem Produkt der Reaktion para-Nitrophenon wurde eine Eichgerade erstellt (siehe Abb. 3.7B). So konnte aus den Absorptionswerten die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase berechnet werden.

3.8.3 Colorimetrischer Nachweis der Phosphat-Freisetzung durch Komplexbildung mit Molybdat und Malachitgrün

Die am häufigsten beschriebene Methode zum Nachweis der alkalischen Phosphatase ist der oben genannte Enzym-Assay mit dem Substrat pNPP. Allerdings ist in diesem Fall das Substrat vorgegeben. Soll die Dephosphorylierung eines anderen Substrates gemessen werden, so können die Reaktionsprodukte über HPLC analysiert werden (siehe Abschnitt 3.2). Eine einfachere und schnellere Methode besteht darin, die Phosphat-Freisetzung colorimetrisch mit Malachitgrün zu bestimmen (Baykov et al., 1988). Bei dieser Methode bildet sich im sauren Milieu ein gelblicher Komplex aus Ammoniumheptamolybdat und Phosphat. Durch Anlagerung von Malachitgrün entsteht ein grüner Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ liegt. Außerdem wird dadurch eine Steigerung der Sensitivität um das ca. Fünffache erreicht.

Zum Nachweis der Phosphataseaktivität wurden im Regelfall 5 $\mu\text{g/ml}$ P10-Präparation mit 40 μM Substrat in Triethanolaminpuffer (50 mM TEA, 2 mM MgCl_2 , pH 8) versetzt. Als Substrat wurde meist NAADP verwendet. Die Ansätze wurden 20 min bis 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Phosphatfreisetzung bestimmt: In die Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 80 μl Probe und 20 μl Malachitgrün-Nachweisreagenz (Malachit Green Phosphate Assay Kit, BioAssay Systems, Hayward, USA) pipettiert und zur Entwicklung des Farbkomplexes für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

A



B

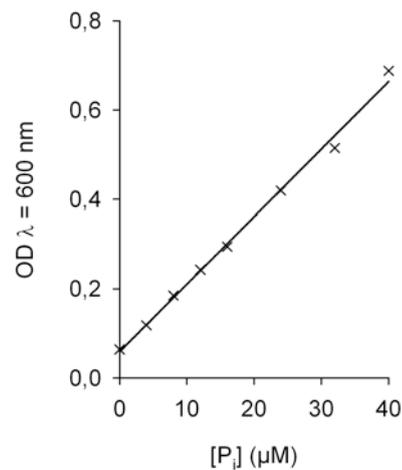


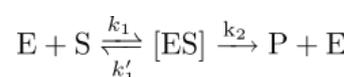
Abb. 3.8: Nachweis der Phosphatfreisetzung mit dem MalachitgrünAssay.

(A) Struktur von Malachitgrün. Beim Nachweis von P_i bildet dieses mit Ammoniummolybdat einen Komplex, der durch Anlagerung von Malachitgrün stabilisiert wird. Das Absorptionsmaximum des Farbkomplexes liegt bei λ = 600 nm. (B) Für die Eichgerade zum Malachitgrün-Assay wurden steigende Konzentrationen P_i in 80 μl TEA-Puffer verdünnt und anschließend mit 20 μl Malachitgrün-Nachweisreagenz versetzt. Die Absorption wurde bei λ = 600 nm gemessen. Regressionskurve: r² = 0,99; p < 0,001.

Da mit dieser Methode P_i nachgewiesen wird, muss darauf geachtet werden, dass sowohl Gefäße als auch Puffer frei von Phosphatrückständen sind. Die Absorption des Farbkomplexes wurde bei λ = 600 nm im Mikrotiterplatten-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich) gemessen. Aus den Werten der Eichgerade konnte die Menge an freigesetztem Phosphat und damit auch die spezifische Enzymaktivität berechnet werden. Mit dem verwendeten Malachitgrün-Nachweisreagenz können [P_i] im Bereich von 2 μM bis 40 μM untersucht werden. Um die Phosphatfreisetzung aus dem Umsatz von höheren Konzentrationen NAADP messen zu können, müssen die Proben vor Zugabe des Nachweisreagenzes verdünnt werden. Zur Bestimmung geringerer Konzentrationen empfiehlt es sich, die Proben zu konzentrieren und das Produkt NAAD über HPLC zu analysieren.

3.8.4 Enzymkinetik und Auswertung enzymatischer Assays

Die kinetischen Eigenschaften der alkalischen Phosphatase wurden nach Michaelis und Menten bestimmt (Michaelis und Menten, 1913). Das Substrat S bildet mit dem Enzym E den Enzym-Substrat-Komplex [ES]. Schließlich wird das Produkt frei und das Enzym steht für eine weitere Katalyse bereit. Für eine reversible Reaktion ergibt sich die folgende Reaktionsgleichung:



Es wird angenommen, dass das Substrat immer im Überschuss vorhanden ist und sich die Reaktion im Fließgleichgewicht (*steady state*) befindet. So kann davon ausgegangen

werden, dass die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes konstant ist. Unter diesen Bedingungen gilt die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Die Gleichung beschreibt eine Hyperbel. v_{max} ist die theoretische, maximale Umsatzgeschwindigkeit bei Substratsättigung. K_m ist die Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit ($v_{max}/2$). K_m gilt als Maß für die Affinität eines Enzyms zum Substrat. Je geringer der berechnete K_m -Wert ist, desto höher ist die Affinität des Enzyms zum Substrat. Die spezifische Aktivität ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) eines Enzyms berechnet sich aus der Umsatzgeschwindigkeit ($\mu\text{mol}/\text{min}$) unter Substratsättigung dividiert durch die Proteinmenge (mg). Bei enzymkinetischen Untersuchungen wird häufig auch die Wechselzahl (*turn over number*, k_{cat} , $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mol}$) bestimmt. Dies ist allerdings nur möglich, wenn die Untersuchungen mit hoch reinem Enzym durchgeführt werden und das Molekulargewicht des Enzyms bekannt ist.

Für die enzymkinetischen Analysen der alkalischen Phosphatase wurden zwei verschiedene Substrate eingesetzt. Zum einen wurde ein colorimetrischer Assay mit dem Substrat pNPP durchgeführt (siehe Abschnitt 3.8.2). Zum anderen wurde der Abbau von NAADP zu NAAD über HPLC verfolgt (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Die Reaktionsbedingungen wurden jeweils so eingestellt, dass die Produktbildung mit der Inkubationszeit linear zunahm. Unter diesen Bedingungen sollte das Substrat immer im Überschuss vorliegen und die Reaktion im Fließgleichgewicht (*steady state*) sein. Das in den Reaktionsansätzen gebildete Produkt wurde nach Kalibrierung mit den entsprechenden Standards quantifiziert. Dann wurde die Umsatzgeschwindigkeit berechnet und gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Aus der Regressionskurve konnten die Parameter K_m und v_{max} abgelesen werden.

3.9 Fluoreszenz-Mikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie wurde der Erfolg der Transfektion eukaryotischer Zellen überprüft (siehe Abschnitt 3.6.2). Die Mikroskopie erfolgte an einem digitalen Imaging System (Improvision Systems, Tübingen) unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (DM-IRBE, Leica, Solms) bei 40-facher Vergrößerung mit der Software OpenLab (Improvision, Tübingen). Als Lichtquelle für das Anregungslicht diente ein Polychrome II Monochromator (TILL Photonics, München). Die Anregung erfolgte bei $\lambda = 488 \text{ nm}$. Das Emissionslicht wurde durch einen dichroischen Spiegel und einen Emissionsfilter geleitet (EGFP-Filter, AHF Analysetechnik, Tübingen). Mit Hilfe einer CCD-Kamera (C4742-95, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) wurden von den Zellen Bilder mit Binning 2 aufgenommen, d.h. es wurden $2 \times 2 = 4$ Pixel zusammengefasst, so dass die Bilder eine Größe von 640×512 Pixel erreichten. Unter gleichen Bedingungen

wurden Aufnahmen von einem Längenmaßstab (Objektträger-Mikrometer, Plano, Wetzlar) gemacht. Den Graustufen der Bilder wurden nachträglich Farben zugeordnet und anhand der Bilder des Längenmaßstabs wurden Maßstabsbalken neben den Zellen eingefügt (Software OpenLab, Improvision, Tübingen).

3.10 Software und Datenanalyse

Die Aufnahme der Daten erfolgte mit der Software des jeweiligen Messgerätes. Anschließend wurden die Daten in Excel exportiert und analysiert. Die graphische Auftragung erfolgte mit SigmaPlot (Version 10.0, Systat Software, Erkrath). Die statistische Analyse erfolgte mit PASW Statistics (Version 18, IBM SPSS, Chicago, USA) und wurde durch Frau Susanne Sehner vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des UKE unterstützt. Wurden zwei Wertegruppen getestet, so wurde ein t-Test nach Student durchgeführt. In allen anderen Fällen wurde eine univariante Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Wurde aus den Daten eine Regressionskurve berechnet, so wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet, um die Güte der Regressionskurve beurteilen zu können. Anschließend wurde die Nullhypothese $r^2 = 0$ getestet und der p-Wert für die Regressionskurve ermittelt.

3.11 Primer

Die Sequenzen der Primer wurden teilweise der Literatur entnommen und teilweise mit dem Programm Primer 3 ([Frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm)) erstellt. Einige Primer wurden den allgemeinen Beständen des Labors entnommen (z.B. Sequenzierungsprimer). Soweit möglich wurde ein GC-Gehalt von 40% - 60% sowie eine Schmelztemperatur zwischen 55°C und 65°C gewählt. Mit Hilfe des Programms OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) wurden die Sequenzen der Primer auf Selbstkomplementarität bzw. die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Haarnadelstrukturen geprüft. Die Synthese der Primer wurde bei Eurofins MWG (Ebersberg) beauftragt.

Sequenzierungsprimer:

pGEM-T easy:

pGEM T sense 5' GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG 3'

pGEM T antisense 5' GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGG 3'

T7-Promotor:

T7 5' TTA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

T7T 5' CTA GTT ATT GCT CAG CGG T 3'

pIRES2-EGFP

CMV forward 5' CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG 3'

IRES reverse 5' CCT CAC ATT GCC AAA AGA CG 3'

Nachweis von CD38:

RT-PCR CD38:

38.1 for 5' GGC TCT CTA GGA GAG CCC AAC 3'

38.2 rev 5' CAC ACT CCC AAA AGT GCT GTT T 3'

nested PCR CD38:

CD38nested_for 5' CACCAAGCGCTTTCCCGAG 3'

CD38nested_rev 5' GAA TAC TGA AAC AGG GTT G 3'

Nachweis der alkalischen Phosphatase:

GCAP for 5' AGC TC TAC TCC ATA CCT G 3'

GCAP rev 5' CAC CCC CAT CCC GTA A 3'

PLAP for 5' CTC ATA CTC CAT GCC CA 3'

PLAP rev 5' CAC CCC CAT CCC ATC G 3'

IAP for 5' CTG CAG CCG GTT CCT GG 3'

IAP rev 5' GCA CCC CCA ACC CAT CG 3'

TNAP for 5' ACA TCT GAC CAC TGA CA 3'

TNAP rev 5' GAG ACA CCC ATC CC TC 3'

Amplifikation der cDNA der alkalischen Phosphatase zur Klonierung:

grün: genspezifischer Abschnitt, blau: Restriktions-Schnittstelle, rot: Start bzw. Stoppcodon

PLAP Nhe for 5' GCG CTA GCC GCC ACC ATG CTG GGG CCC TGC ATG C 3'

PLAP Eco rev 5' CGG AAT TCC TAG GGA GCA GTG GCC GTC 3'

TNAP Nhe for 5' GCG CTA GCC GCC ACC ATG ATT TCA CCA TTC TTA G 3'

TNAP Eco rev 5' CGG AAT TCC TAG AAC AGG ACG CTC AGG 3'

3.12 Plasmide

pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA)
IOH62504-pDEST15 (PLAP, 32 ng/μl, imaGenes, Berlin)
IOH14614-pDEST15 (TNAP, 31 ng/μl, imaGenes, Berlin)
pDEST15 (Invitrogen, Darmstadt)
pIRES2-EGFP (BD Clontech, Heidelberg)
pIRES2-EGFP-PLAP
pIRES2-EGFP-TNAP
pEXPR-IBA42 (IBA, Göttingen)
CD38pEXPR-IBA42

3.13 Antikörper

Primärantikörper

Anti-CD38 (AT1), monoklonal, Maus, 200 μg/ml, #sc7325, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Endverdünnung 1:200
Anti-HSC 70, monoklonal, Maus, 200 μg/ml, #sc7298, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Endverdünnung 1:5 000
Anti-beta-Aktin (AC-15), monoklonal, Maus, #A1978, Sigma-Aldrich, München; Endverdünnung 1:2 000
Anti-PLAP, monoklonal, Kaninchen, #ab16695, Abcam, Cambridge, UK; Endverdünnung 1:800
Anti-IAP, monoklonal, Maus, (500 μg/ml), #ab54776, Abcam, Cambridge, UK; Endverdünnung 1:800
Anti-TNAP, polyklonal, Kaninchen, (480 μg/ml), #ab97384, Abcam, Cambridge, UK; Endverdünnung 1:800
Anti-GCAP, monoklonal, Maus, (500 μg/ml), #MCA2926Z, AbdSerotec, Düsseldorf; Endverdünnung 1:200

Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen, Ziege, HRP-konjugiert, #111-035-045, Dianova, Hamburg; Endverdünnung 1:5 000
Anti-Maus, Ziege, HRP-konjugiert, #115-035-003, Dianova, Hamburg; Endverdünnung 1:5 000

3.14 Medien, Chemikalien und Reagenzien-Kits

3.14.1 Zellkultur

Biofreeze Einfriermedium (Biochrom, Berlin)
DMEM-Kulturmedium mit Glutamax I (Invitrogen, Darmstadt)
FCS (fötale Kälberserum) (Biochrom, Berlin)
G 418-Sulfat (Biochrom, Berlin)
NCS (Serum aus neugeborenen Kälbern) (Biochrom, Berlin)
PenStrep-Lösung (10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) (Invitrogen, Darmstadt)
RPMI-Kulturmedium mit Glutamax I (Invitrogen, Darmstadt)
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) (Biochrom, Berlin)

3.14.2 RP-HPLC

Methanol LiChrosolv Hypergrade (Merck, Darmstadt)
Tetrabutylammonium-phosphat (Sigma-Aldrich, München)

3.14.3 Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$

Carbachol (Sigma-Aldrich, München)
EGTA (Merck, Darmstadt)
Fura2-AM (Calbiochem, Merck, Darmstadt)

3.14.4 Quantifizierung der intrazellulären NAADP-Konzentration

ADP-Ribosyl-Cyclase aus *Aplysia californica* (A8950, Sigma-Aldrich, München)
Diaphorase (USB Affymetrix, Buckingham, UK)
Diethylether (Merck, Darmstadt)
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH, Sigma-Aldrich, München)
NADase aus *Neurospora crassa* (N9629, Sigma-Aldrich, München)
Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, München)

3.14.5 Molekularbiologische Methoden

Biosafe Coomassie Stain (Bio-Rad, München)
Bradford-Reagenz (BioRad, München)
DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 (Fermentas, St. Leon-Rot)
DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 (Promega, Madison, WI, USA)
ECL-Lösung (GE Healthcare, München)

Endofree Plasmid Maxi-Kit (Qiagen, Hilden)
FreeStyle 293 Expression Medium (Invitrogen, Darmstadt)
High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim)
LB-Medium (Carl Roth, Karlsruhe)
LB-Agar (Carl Roth, Karlsruhe)
Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Darmstadt)
Lipofectamine LTX (Invitrogen, Darmstadt)
Marker *all blue prestained* (BioRad, München)
Marker gene ruler 100 bp ladder plus (Fermentas, St. Leon-Rot)
Marker pUC (MspI) (Fermentas, St. Leon-Rot)
NiNTA-Säule (Qiagen, Hilden)
Opti-MEM (Invitrogen, Darmstadt)
*Pfu*Turbo-DNA-Polymerase (Agilent Technologies, Böblingen)
Proteaseinhibitor (Roche complete EDTA-free, Roche, Mannheim)
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
QIAshredder-Säulchen (Qiagen, Hilden)
Rapid Ligation Buffer (Promega, Madison, WI, USA)
Reagenz PLUS (Invitrogen, Darmstadt)
RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)
RNase freie DNase (Qiagen, Hilden)
SYBR Green II (Sigma-Aldrich, München).
TAE 50x (Qiagen, Hilden)
Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot)
Titan One Tube RT-PCR-Kit (Roche, Mannheim)

3.14.6 Enzymatische Assays

1,N⁶-etheno-Adenosin (Biolog, Bremen)
1,N⁶-etheno-ADPR (Biolog, Bremen)
1,N⁶-etheno-ADPRP (Biolog, Bremen)
1,N⁶-etheno-AMP (Biolog, Bremen)
1,N⁶-etheno-NAADP (Biolog, Bremen)
1,N⁶-etheno-NAD (Biolog, Bremen)
Malachitgrün-Nachweisreagenz (Malachit Green Phosphate Assay Kit, BioAssay Systems, Hayward, USA)

3.15 Puffer und Lösungen

3.15.1 Zellkultur

DMEM-Komplettmedium (DMEM-Kulturmedium mit Glutamax I, 10% FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin)

DMEM-Selektionsmedium (DMEM-Komplettmedium, 400 μ g/ml G418)

RPMI-Komplettmedium (RPMI-Kulturmedium mit Glutamax I, 7,5% NCS (v/v), 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin)

RPMI-Selektionsmedium (RPMI-Komplettmedium, 800 μ g/ml G418)

PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4)

3.15.2 RP-HPLC

Calcium-Messpuffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 1 mM NaH₂PO₄, 5 mM D-Glucose, pH 7,4)

HPLC-Puffer A (20 mM KH₂PO₄, 5 mM Tetrabutylammonium-phosphat, pH 6)

HPLC-Puffer B (50% HPLC-Puffer A, 50% Methanol, LiChrosolv Hypergrade, Merck, Darmstadt)

HPLC-Puffer C (30% HPLC-Puffer A, 70% Methanol, LiChrosolv Hypergrade, Merck, Darmstadt)

Phosphatpuffer (9,1 mM NH₂PO₄, pH 5)

Triethanolaminpuffer (40 m TEA, pH 9)

3.15.3 Bestimmung der [Ca²⁺]_i

Calcium-Messpuffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 1 mM NaH₂PO₄, 5 mM D-Glucose, pH 7,4)

EGTA-Lösung (400 mM EGTA/ 3 M Tris)

3.15.4 Quantifizierung der intrazellulären NAADP-Konzentration

Calcium-Messpuffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 1 mM NaH₂PO₄, 5 mM D-Glucose, pH 7,4)

HEPES-Puffer (40 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7,4)

Probenpuffer (10 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂, pH 8)

Tris-Puffer (10 mM Tris, pH 8)

Tris-Mg-Puffer (1 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂, pH 7,3)

3.15.5 Proteinbiochemische Methoden

BSA-haltiger HEPES-Puffer (40 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,1% BSA, pH 7,4)

Blockierlösung (TBS-T mit 2,5% - 5% (w/v) Magermilchpulver)

Laufpuffer für Gelelektrophorese (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1-0,4% (w/v) SDS, pH 8,5)

Lysispuffer (110 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 7,2; mit Proteaseinhibitor *complete EGTA free*, Roche, Mannheim)

SDS-Sammelgel (3.9%) (125 mM Tris, pH 6.8, 3,9% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/0.8%), 0,4% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED)

SDS-Trenngel (10-12%) (375 mM Tris, pH 8,8, 10-12% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%/0.8%), 0,4% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED)

SDS-Probenpuffer 6x (350 mM Tris, pH 6,8, 30% (v/v) Glycerol, 10% (w/v) SDS, 0,5 M DTT, 0,0012% Bromphenolblau)

SOC-Medium (2% (w/v) Trypton-Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 8,55 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, pH 7,0)

TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 7,4)

TBS-T (TBS mit 0,05% (w/v) Tween 20)

Transferpuffer allgemein (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol)

Transferpuffer für CD38 (10 mM Tris, 96 mM Glycin, 10% Methanol)

3.15.6 Enzymatische Assays

Calcium-Messpuffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM DEA-Puffer (1 M DEA, 1 mM MgCl₂, pH 9,8)

Diethanolamin-Puffer (1 M DEA, 1 mM MgCl₂, pH 9,8)

Triethanolaminpuffer (40 m TEA, 1,5 mM MgCl₂, pH 8)

3.16 Material

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

C₁₈-HPLC-Säule (HyPURITY ADVANCE, Partikelgröße 5 µm, 250 x 4,6 mm Thermo Scientific, Schwerte)

10 kDa-Größenausschlussfilter (Vivaspin2, Sartorius Stedim, Göttingen)

10 kDa-Größenausschlussfilter (Microcon, Millipore, Billerica, MA, USA)

Probenfilter (Minisart RC4, 0,2 µm, Sartorius Stedim, Göttingen)

Säulenkörper (3 ml) mit Fritte (Supelco, Sigma-Aldrich, München)

Längenmaßstab (Objektträger-Mikrometer, Plano, Wetzlar)

3.17 Geräte

HPLC-System mit binärer Pumpe G1312A, Autosampler (G1329A) mit Kühlung (G1330B), Säulenofen (G1316A), DAD-Detektor (G1315B), FLD-Detektor (G1312A) und ChemStation-Software (1200 Serie, Agilent Technologies, Böblingen)

Calcium-Imaging-System mit Polychrome II Monochromator (TILL Photonics, München), Fluoreszenzmikroskop (DM-IRBE, Leica, Solms), CCD-Kamera (C4742-95, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) und Openlab Software Version 4.0.2 (Improvision Systems, Heidelberg)

Blotting-Apparatur Trans-Blot Cell (BioRad, München)

CASY DT-Zellzähler (Schärfe System, Reutlingen)

CO₂-Inkubator (Heraeus, Hanau)

Gefriertrocknungsgerät (Snijerds Scientific, Tillburg, Niederlande)

Gelelektrophoreseapparatur (GNA100, Pharmacia, GE Healthcare, München)

Hämozytometer nach Neubauer (Hellma, Müllheim)

Imager (Intelligent Dark Box, CAS 3000 mit Software Aida 2D Densitometry, FujiFilm, Tokyo, Japan).

Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer (Infinite M200 mit Software i-control, Tecan, Grödig, Österreich)

PowerSupply Power Pack 25 (Biometra, Jena)

Potter-Elvehjem-Homogenisator (IKA-Labortechnik, Staufen)

Schüttler (Biometra, Jena)

Sterile Werkbank (BDK, Sonnenbühl-Genkingen)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Thermocycler (Eppendorf, Hamburg)

Thermoblock (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg)

Ultrazentrifuge (CU L-7 80 mit Titan-Festwinkelrotor Ti80, Beckmann Coulter, Unterschleißheim)

UV-Vis-Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Schwerte)

UV-Transilluminator (Bachhofer, Reutlingen)

Vortex VF2 (Jahnke und Kunkel, Staufen)

Zentrifuge (Varifuge 3.OR, Heraeus, Hanau)

Zentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau)

Zentrifuge (Cryofuge 8500i, Heraeus, Hanau)

Zentrifuge (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg)

4 Ergebnisse

Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von NAADP wurde erstmals 1995 im Seeigeelei beschrieben (Clapper et al., 1987; Lee und Aarhus, 1995). Auch in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen wurde das NAADP-Signalsystem nachgewiesen: Nach Stimulation der Zellen steigt die intrazelluläre NAADP-Konzentration rasch an und fällt innerhalb kurzer Zeit wieder auf das Basalniveau zurück (Gasser et al., 2006; Bruhn, 2008). Um eine funktionelle Calcium-Signalgebung sicherzustellen, muss die intrazelluläre NAADP-Konzentration präzise kontrolliert werden. Dies wird durch NAADP auf- und abbauende Enzyme gewährleistet, deren Identität trotz langjähriger Forschung noch nicht zweifelsfrei geklärt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollten Enzyme untersucht werden, die am NAADP-Metabolismus beteiligt sein könnten. Als Zellsysteme wurden Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen verwendet.

4.1 NAADP-Metabolismus in Jurkat-T-Lymphozyten

Der erste Teil der Untersuchungen beschäftigt sich mit dem NAADP-Metabolismus in Jurkat-T-Lymphozyten. Das Ektoenzym CD38 ist bis heute das einzige in Säugetieren beschriebene Enzym, welches *in vitro* die Bildung von NAADP katalysieren kann (Aarhus et al., 1995). Um die Rolle von CD38 für den NAADP-Metabolismus zu untersuchen, wurden enzymatische Studien an Wildtyp- und CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten durchgeführt.

4.1.1 CD38-*knock down*-Zellen zeigen verringerte NAD-Glykohydrolase-Aktivität

Die CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten waren durch Transfektion mit einem shRNA-Konstrukt gegen CD38 hergestellt worden (Bruhn, 2008). Zur Kontrolle wurden mit einem *scrambled*-Konstrukt transfizierte sowie Wildtyp-Jurkat-T-Lymphozyten mitgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob die CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten tatsächlich eine reduzierte Expression von CD38 aufwiesen. Dazu wurde untersucht, ob die Enzymaktivität von CD38 in den CD38-*knock down*-Zellen vermindert war.

Die NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38 kann in einem fluorimetrischen Enzym-Assay mit Hilfe des Substrates 1,N⁶-etheno-NAD bestimmt werden (Barrio et al., 1972). CD38 spaltet die Nikotinamid-Gruppe von 1,N⁶-etheno-NAD ab, welche die Fluoreszenz der Etheno-Gruppe vermindert. Dadurch entsteht aus dem schwach fluoreszierenden Substrat 1,N⁶-etheno-NAD das stark fluoreszierende Produkt 1,N⁶-etheno-ADPR. Die

Zunahme der Fluoreszenzintensität spiegelt somit die NAD-Glykohydrolase-Aktivität wider.

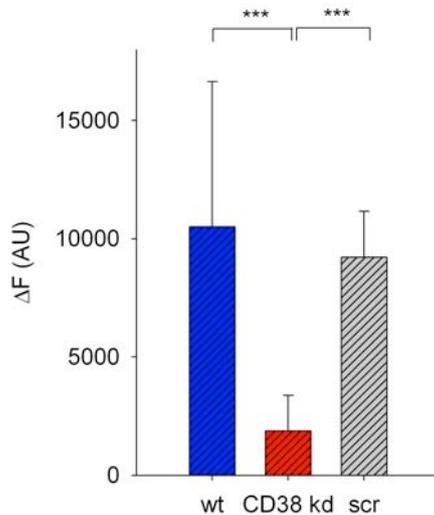


Abb. 4.1: CD38-knock down-Zellen zeigen eine verringerte NAD-Glykohydrolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp.

100 µg/ml P10-Präparationen von Wildtyp- (wt), *scrambled*- (scr) bzw. CD38-knock down-Jurkat-T-Lymphozyten (CD38 kd) wurden mit 100 µM 1,N⁶-etheno-NAD für 30 min inkubiert und die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 410$ nm gemessen. Das schwach fluoreszierende 1,N⁶-etheno-NAD wird durch CD38 unter Abspaltung von Nikotinamid zum stark fluoreszierenden 1,N⁶-etheno-ADPR umgesetzt. Wildtyp-Jurkat-T-Lymphozyten zeigen eine deutlich stärkere Aktivität der NAD-Glykohydrolase CD38 als CD38-knock down-Jurkat-T-Lymphozyten. Zur Kontrolle wurden mit einem *scrambled*-Konstrukt transfizierte Jurkat-T-Lymphozyten (scr) mitgeführt. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 8 – 9); *** p < 0,001 univariante Varianzanalyse.

P10-Präparationen von Wildtyp-Zellen zeigten eine Fluoreszenzzunahme um 10511 ± 6140 Einheiten, während in P10-Präparationen der *scrambled*-Kontrolle die Fluoreszenz um 9218 ± 1938 Einheiten zunahm. Dagegen wiesen die P10-Präparationen der CD38-knock down-Zellen eine Fluoreszenzzunahme um nur 1871 ± 1506 Einheiten auf (siehe Abb. 4.1). Die Expression von CD38 in den Wildtyp-Zellen veränderte sich im Laufe der Zeit stark, daher zeigten die Ergebnisse des Enzym-Assays eine hohe Variabilität. Die Zellen der *scrambled*-Kontrolle sowie die CD38-knock down-Zellen wurden in regelmäßigen Abständen durch Zellen aus kryokonservierten Beständen ersetzt. Daher wurden hier homogenere Werte gemessen.

Nach Kalibrierung mit einer 1,N⁶-etheno-ADPR-Eichgerade wurde für die Wildtyp-Zellen eine Aktivität von 2,27 nmol/mg/min und für die *scrambled*-Kontrolle eine Aktivität von 1,97 nmol/mg/min berechnet. In P10-Präparationen der CD38-knock down-Zellen hingegen betrug die Aktivität nur 0,27 nmol/mg/min. Damit wiesen die CD38-knock down-Zellen eine Reduktion der Enzym-Aktivität um 88% in Bezug auf den Wildtyp auf. Der *knock down* von CD38 konnte demnach auf Ebene der Enzymaktivität bestätigt werden.

4.1.2 CD38-knock down-Zellen weisen eine reduzierte NAADP-Syntheserate auf

Der in Abschnitt 4.1.1 beschriebene fluorimetrische Enzym-Assay ist nicht spezifisch für CD38. Jedes Enzym, welches die Fluoreszenz-vermindernde Nikotinamid-Gruppe vom Substrat 1,N⁶-etheno-NAD entfernt, trägt zum Anstieg der Fluoreszenz bei. Auf diese Weise könnten Pyrophosphatasen oder andere NAD-Glykohydrolasen das Ergebnis verfälschen. Im Folgenden wurde daher spezifisch die Aktivität von CD38 untersucht.

P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten wurden mit NADP und einem Überschuss an Nikotinsäure im sauren Milieu inkubiert. Im Anschluss wurde die Bildung des Produkts NAADP über Ionenpaar-RP-HPLC bestimmt, welche im Folgenden immer mit HPLC bezeichnet wird.

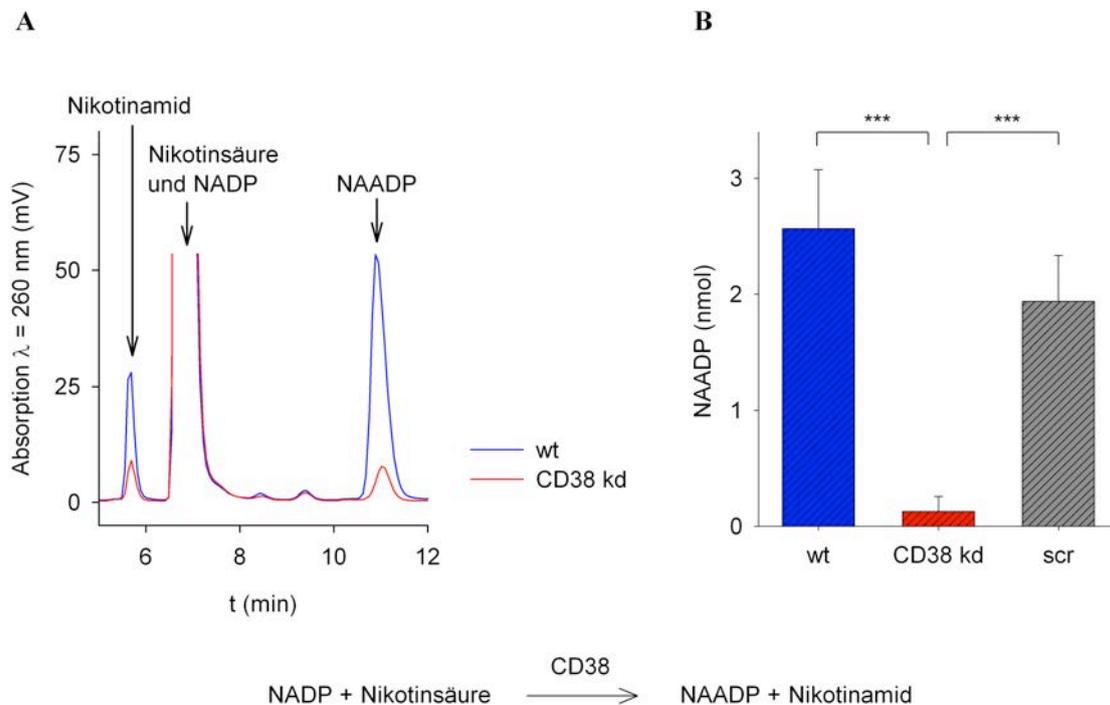


Abb. 4.2: CD38 kann *in vitro* die Synthese von NAADP katalysieren.

500 $\mu\text{g/ml}$ P10-Präparationen von Wildtyp- (wt), *scrambled*- (scr) bzw. CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten (CD38 kd) wurden mit 1 mM NADP und 10 mM Nikotinsäure bei $\text{pH} = 5$ für 1 h inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte durch HPLC über eine C_{18} -HyPURITY-ADVANCE-Säule. Die Detektion der Nukleotide erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. (A) Dargestellt sind repräsentative HPLC-Chromatogramme. CD38 katalysiert den Umsatz von NADP mit Nikotinsäure zu NAADP unter Freisetzung von Nikotinamid. In den Proben der Wildtyp-Zellen (blau) nahmen die Peaks von NAADP und Nikotinamid zu, während in den Proben der CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten (rot) nur wenig NAADP und Nikotinamid nachweisbar war. Aufgrund der großen Menge an Nikotinsäure ist NADP nicht als einzelner Peak erkennbar, sondern wird durch den Nikotinsäure-Peak verdeckt. (B) Nach Kalibrierung mit einem internen Standard wurde die NAADP-Produktion quantifiziert. Die NAADP-Bildung war in P10-Präparationen von CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten um bis zu 95% gegenüber dem Wildtyp reduziert. Zur Kontrolle wurden mit einem *scrambled*-Konstrukt transfizierte Jurkat-T-Lymphozyten (scr) mitgeführt. Diese zeigten im Bezug auf die NAADP-Synthese keinen Unterschied zum Wildtyp. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$). *** $p < 0,001$ univariante Varianzanalyse.

Nach 1 h Inkubation wurden in den Reaktionsansätzen mit P10-Präparationen von Wildtyp-Zellen $2,56 \text{ nmol} \pm 0,51 \text{ nmol}$ NAADP und in den Proben der *scrambled*-Kontrolle $1,94 \text{ nmol} \pm 0,40 \text{ nmol}$ NAADP gemessen. Dagegen war die NAADP-Menge in den Reaktionsansätzen der CD38-*knock down*-Zellen mit $0,13 \text{ nmol} \pm 0,13 \text{ nmol}$ deutlich geringer (siehe Abb. 4.2B). In Wildtyp-Zellen betrug die NAADP-bildende Aktivität $8,55 \text{ nmol/mg/min}$, während für die *scrambled*-Kontrolle eine Aktivität von

6,45 nmol/mg/min berechnet wurde. Dagegen belief sich die Aktivität in den CD38 *knock down*-Zellen auf nur 0,42 nmol/mg/min. Die CD38-*knock down*-Zellen zeigten damit eine Reduktion der CD38-Aktivität um bis zu 95% gegenüber dem Wildtyp. Die Expression von CD38 ist demnach in den CD38-*knock down*-Zellen stärker vermindert als die Ergebnisse des fluorimetrischen Enzym-Assays vermuten ließen (siehe Abschnitt 4.1.1).

4.1.3 CD38 *knock down*-Zellen zeigen einen verminderten Abbau von NAADP

Die in Abschnitt 4.1.2 dargestellte *in vitro* Synthese von NAADP durch CD38 wurde bereits 1995 beschrieben (Aarhus et al., 1995). In der so genannten Basenaustauschreaktion ersetzt CD38 die Nikotinamid-Gruppe von NADP durch eine Nikotinsäure-Gruppe und bildet so NAADP. Allerdings sind die Voraussetzungen für die Reaktion ein hoher Überschuss an Nikotinsäure und ein saures Reaktionsmilieu. Damit sind die Reaktionsbedingungen für die NAADP-Bildung recht unphysiologisch. Um die physiologische Rolle von CD38 im NAADP-Metabolismus zu untersuchen, wurden NAADP-Messungen an CD38-*knock out*-Mäusen (Soares et al., 2007) und an CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten (Bruhn, 2008) durchgeführt. Es zeigte sich, dass das Fehlen von CD38 die intrazelluläre NAADP-Konzentration nicht senkt, sondern im Gegenteil sogar eher erhöht. Daher stellte sich die Frage, ob CD38 *in vivo* nicht die NAADP-Synthese, sondern vielmehr den NAADP-Abbau katalysiert.

Um diese Hypothese zu testen, wurden P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten bei physiologischem pH-Wert mit NAADP inkubiert und die Reaktionsprodukte über HPLC analysiert.

In Wildtyp-Zellen wurde ein Anstieg der ADPRP-Menge um $339 \text{ pmol} \pm 44 \text{ pmol}$ gemessen, was einer Aktivität von 565 pmol/mg/min entspricht. Demgegenüber wurde in CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten ein Anstieg der ADPRP-Menge um $9 \text{ pmol} \pm 6 \text{ pmol}$ ermittelt, woraus sich eine Aktivität von 15 pmol/mg/min ergibt. Damit war die Aktivität in CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten um 97% reduziert (siehe Abb. 4.3).

Die NAADP-hydrolysierende Aktivität von CD38 wurde bereits 2006 beschrieben (Graeff et al., 2006). Allerdings ging man damals davon aus, dass der NAADP-Abbau nur im sauren Milieu stattfände. Ab einem pH-Wert von 7 wechselten die Experimentatoren das Puffersystem von Acetat zu Tris, woraufhin die NAADP-abbauende Aktivität zum Erliegen kam. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass der NAADP-Abbau auch im neutralen Milieu beobachtet werden kann, wenn das passende Puffersystem (in diesem Fall HEPES) gewählt wird. Tatsächlich wurde auch in den Experimenten zur NAADP-Synthese (siehe Abschnitt 4.1.2) beobachtet, dass bei längeren Inkubationszeiten das gebildete NAADP zu ADPRP metabolisiert wurde.

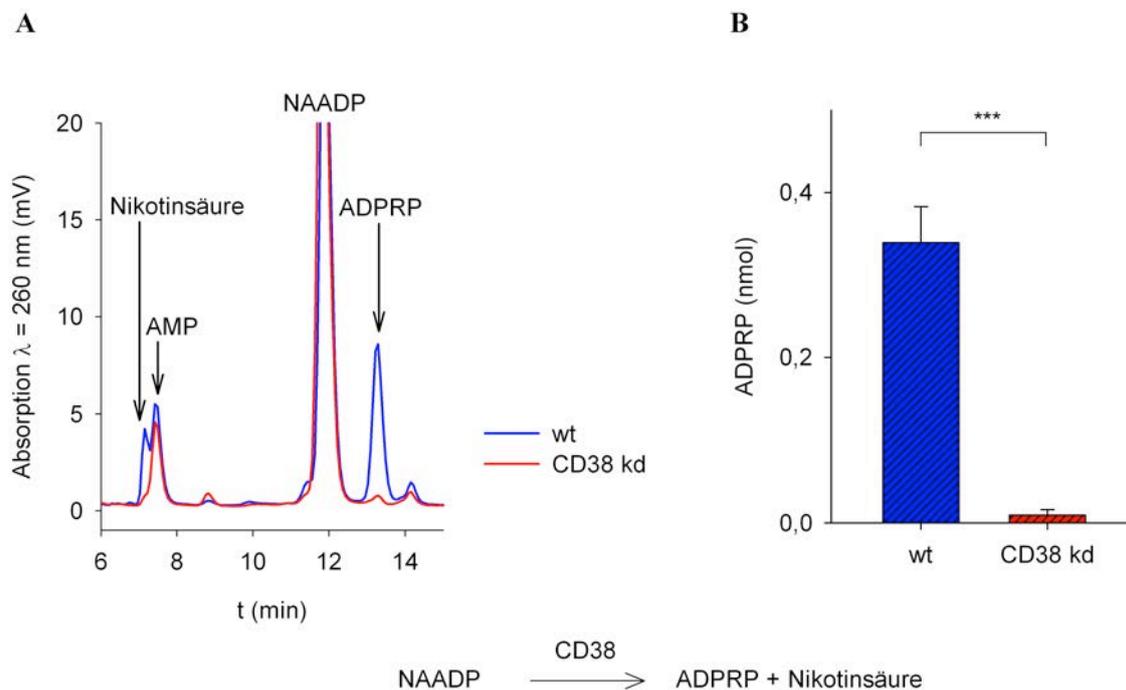


Abb. 4.3: CD38 katalysiert den Abbau von NAADP zu ADPRP in Jurkat-T-Lymphozyten.

1 mg/ml P10-Präparationen von Wildtyp- (wt) bzw. CD38 *knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten (CD38 kd) wurden mit 100 μM NAADP bei pH = 7,4 bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte durch HPLC über eine C₁₈-HyPURITY-ADVANCE-Säule. Die Detektion der Nukleotide erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm. (A) Dargestellt sind repräsentative HPLC-Chromatogramme. CD38 katalysiert den Umsatz von NAADP zu ADPRP und Nikotinsäure. Das Chromatogramm der Wildtyp-Zellen (blau) zeigt, dass die Peaks von Nikotinsäure und ADPRP zunehmen, während im Chromatogramm der CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten (rot) fast kein ADPRP detektiert werden konnte. (B) Die Quantifizierung des Produkts ADPRP erfolgte über eine Kalibrierung mit einem internen Standard. Der *knock down* von CD38 in Jurkat-T-Lymphozyten (CD38 kd) führte zu einer deutlich verringerten Bildung von ADPRP im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (wt). Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 5). *** p < 0,001 t-Test nach Student.

Substrat	Produkt	Reduktion CD38- <i>knock down</i> vs Wildtyp
1,N ⁶ -etheno-NAD	1,N ⁶ -etheno-ADPR + Nikotinamid	88%
NADP + Nikotinsäure	NAADP + Nikotinamid	95%
NAADP	ADPRP + Nikotinsäure	97%

Tab. 4.1. Reduktion der Enzymaktivität von CD38 durch einen *knock down*-Ansatz.

Zusammengestellt sind die untersuchten Reaktionen von CD38 in P10-Präparationen von Wildtyp und CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten. Es wurde jeweils die Reduktion der Enzymaktivität durch den *knock down*-Ansatz berechnet.

Die Ergebnisse zeigen, dass im sauren Milieu eine Synthese von NAADP möglich ist, welche bei geringer Expression von CD38 reduziert ist. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Expression von CD38 zu einem verlangsamten NAADP-

Abbau führt. Der Abbau von NAADP in Jurkat-T-Lymphozyten ist also abhängig von der Expression von CD38 und die NAADP-Abbaureaktion kann durch CD38 katalysiert werden.

Der Vergleich der Ergebnisse aus den Abschnitten 4.1.2 und 4.1.3 zeigt, dass CD38 *in vitro* zwei verschiedene Reaktionen katalysieren kann: Zum einen kann CD38 im sauren Milieu und bei einem Überschuss von Nikotinsäure NAADP aus NADP bilden. Zum anderen kann CD38 bei neutralem pH-Wert NAADP zu ADPRP und Nikotinsäure degradieren (siehe Abb. 4.4). Wie die Quantifizierung von endogenem NAADP in Gewebeproben von CD38-*knock out*-Mäusen (Soares et al., 2007) und in CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten (Bruhn, 2008) zeigt, ist CD38 *in vivo* für die Synthese von NAADP nicht notwendig. Möglicherweise besteht die biologische Funktion in der Katalyse des Abbaus von NAADP.

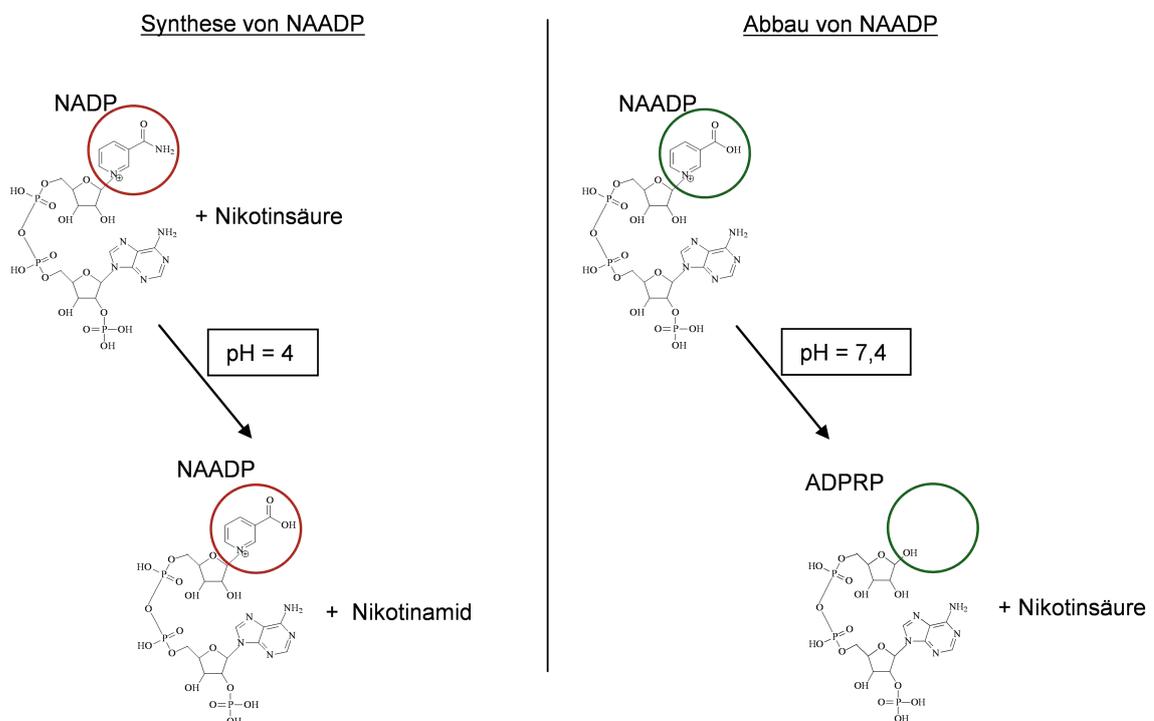


Abb. 4.4: CD38 kann sowohl die Synthese als auch den Abbau von NAADP katalysieren.

(A) CD38 ist bis heute das einzige in Säugetieren identifizierte Enzym, welches *in vitro* die Bildung von NAADP katalysieren kann. Die Basenaustauschreaktion findet im sauren Milieu und in Anwesenheit eines Überschusses an Nikotinsäure statt. (B) Bei physiologischem pH-Wert katalysiert CD38 den Abbau von NAADP zu ADPRP unter Freisetzung von Nikotinsäure. Untersuchungen an CD38-defizienten Zellen deuten darauf hin, dass CD38 *in vivo* nicht die NAADP-Synthese, sondern den NAADP-Abbau katalysiert.

4.2 Analyse der NAADP-abbauenden Aktivität von rekombinantem, affinitäts-gereinigtem CD38

4.2.1 HEK-293-Zellen exprimieren endogen kein CD38

Aus den in Abschnitt 4.1 beschriebenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das Enzym CD38 den NAADP-Abbau in Jurkat-T-Lymphozyten katalysiert. Um auszuschließen, dass diese Beobachtungen auf klonalen Effekten der CD38-*knock down*-Zelllinie beruhen, wurde CD38 rekombinant exprimiert und enzymatisch untersucht. Die Expression der humanen, extrazellulären Domäne von CD38 ist zwar möglich in *E.coli*, die Ausbeute an aktivem Enzym ist allerdings sehr gering (persönliche Mitteilung von Dr. Ralf Fliegert, IBM I, UKE). Dadurch wird die Expression sehr zeit- und materialaufwendig. Möglicherweise führen die Disulfidbrücken des Enzyms zu Schwierigkeiten bei der Faltung der korrekten 3D-Struktur des Proteins. Die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems könnte Abhilfe schaffen. Dazu musste eine Zelllinie ausgewählt werden, welche kein endogenes CD38 enthält.

Im Folgenden wurden nun HEK-293-Zellen auf ihre CD38-Expression getestet. Dazu wurde eine RT-PCR mit CD38-spezifischen Primern durchgeführt.

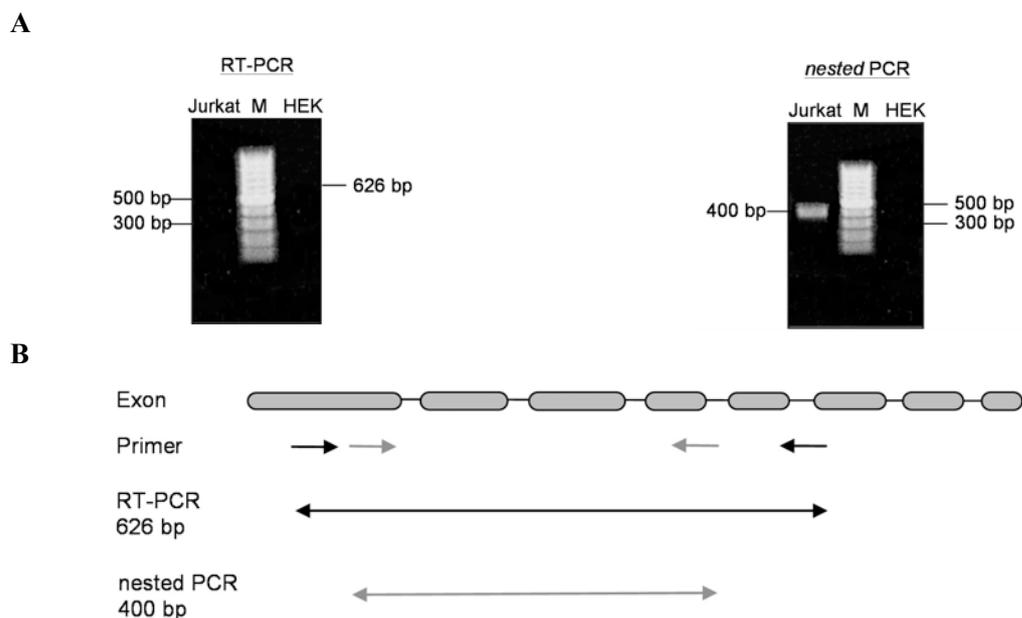


Abb. 4.5: HEK-293-Zellen zeigen keine Expression von CD38.

(A) Aus Jurkat-T-Lymphozyten und HEK-293-Zellen wurde Gesamt-RNA extrahiert. Dann wurde die für CD38 codierende Sequenz durch RT-PCR amplifiziert (links). Da das Amplifikat der RT-PCR im Agarosegel nicht sichtbar war, wurde eine *nested* PCR mit den RT-PCR-Ansätzen durchgeführt (rechts). Die erwartete Größe des Amplifikats betrug 400 bp. In Jurkat-T-Lymphozyten konnte die Expression von CD38 bestätigt werden. HEK-293-Zellen zeigten keine endogene Expression von CD38. Marker: Gene ladder 100 bp. Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel. Die RT-PCR wurde dreimal durchgeführt. (B) Schematische Darstellung der Exonstruktur von CD38. Die Pfeile markieren die Bindestellen der verwendeten Primer bzw. das Produkt der PCR.

Gesamt-RNA wurde aus HEK-293-Zellen isoliert und einer RT-PCR mit CD38-spezifischen Primern unterworfen. Es wurde ein Transkript einer Länge von 626 bp erwartet (siehe Abb. 4.5). Im Agarosegel war kein PCR-Produkt erkennbar, daher wurden die Ansätze zur *nested* PCR eingesetzt, deren Transkript eine Länge von 400 bp aufweisen sollte. Die Probe der HEK-293-Zellen zeigte keine Bande im Agarosegel (siehe Abb. 4.5A). Als Kontrolle wurden Proben von Jurkat-T-Lymphozyten mitgeführt. Hier zeigte sich eine Bande in Höhe von 400 bp, was der erwarteten Fragmentlänge entsprach. Die mRNA von CD38 konnte in HEK-293-Zellen nicht detektiert werden. Daher wurde davon ausgegangen, dass HEK-293-Zellen kein CD38 exprimieren.

4.2.2 Rekombinantes CD38 zeigt NAD-Glykohydrolase-Aktivität

Für die folgenden Untersuchungen wurden HEK-293-Zellen verwendet, welche die humane Isoform von CD38 ohne Transmembrandomäne mit einer N-terminalen 6xHis-Markierung und einer C-terminalen Strep-Markierung sowie einer Sekretionssequenz exprimieren.

Die Zellen wurden nach dem Passagieren zunächst über Nacht in DMEM-Kulturmedium gehalten. Dann wurde das Medium gegen Freestyle-Kulturmedium ausgetauscht, welches ein Wachstum der Zellen ohne Zugabe von Serum ermöglicht. Nach zwei Tagen wurden die Zellkulturüberstände geerntet, durch einen 10 kDa-Größenausschlussfilter konzentriert und über eine Affinitätssäule gereinigt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mit Hilfe eines fluorimetrischen Enzym-Assays überprüft.

Die NAD-Glykohydrolase-Aktivität im Überstand von CD38⁺-HEK-293-Zellen war doppelt so hoch wie im Überstand von Wildtyp-HEK-293-Zellen. Im Durchlauf und den drei Waschfraktionen wurden nur geringe Fluoreszenzwerte gemessen. Zellkulturüberstand, Durchlauf und Waschfraktion wiesen aufgrund von Phenolrot aus dem Kulturmedium eine rote Färbung auf. Dies kann die Bestimmung der Fluoreszenzintensität verfälschen. Das Eluat hingegen war klar, so dass die Fluoreszenzintensitäten zuverlässig gemessen werden konnten. Die Fluoreszenz im Eluat der CD38⁺-HEK-293-Zellen war um fast das Sechsfache im Bezug zum Wildtyp erhöht (siehe Abb. 4.6). Das Enzym CD38 konnte aus dem Überstand von CD38⁺-HEK-293-Zellen erfolgreich aufgereinigt werden.

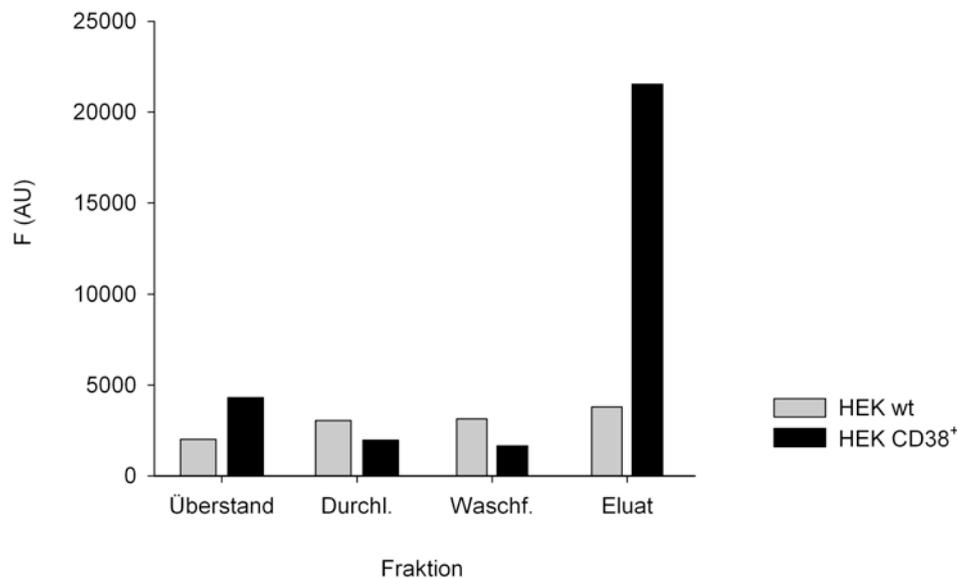


Abb. 4.6: Rekombinantes, affinitätsgereinigtes CD38 zeigt NAD-Glykohydrolase-Aktivität.

Zellkulturüberstand von Wildtyp- (wt) bzw. CD38⁺-HEK-293-Zellen wurde über einen 10 kDa-Größenausschlussfilter auf das ca. Vierzigfache konzentriert. Ein Aliquot wurde für die Aktivitätsanalyse zurückbehalten. Der restliche Überstand wurde über eine NiNTA-Säule gereinigt. Die Fraktionen Überstand, Durchlauf, Waschfraktion sowie das Eluat wurden mit Hilfe eines fluorimetrischen Enzym-Assays auf NAD-Glykohydrolase-Aktivität getestet. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde mit 100 μ M 1,N⁶-etheno-NAD inkubiert und nach 2 min die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 410$ nm gemessen. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines Versuchstages. Das schwach fluoreszierende 1,N⁶-etheno-NAD wird durch CD38 unter Abspaltung von Nikotinamid zum stark fluoreszierenden 1,N⁶-etheno-ADPR umgesetzt. Die Fraktionen von Wildtyp-HEK-293-Zellen zeigten kaum Fluoreszenzzunahme. Dagegen konnte im Überstand von CD38⁺-HEK-293-Zellen eine deutliche Enzymaktivität beobachtet werden, welche durch die Affinitätsreinigung angereichert wurde. Durch vergleichende Analyse mit gereinigtem, rekombinant in *E.coli* exprimiertem CD38 konnte die Konzentration an CD38 im Eluat der CD38⁺-HEK-293-Zellen auf 15 ng/ μ l geschätzt werden.

Allerdings enthielt das Eluat der Affinitätsreinigung 500 mM Imidazol. Dies beeinträchtigte die NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38 kaum: 500 mM Imidazol bewirkten nur eine Inhibition um ca. 15%. Imidazol könnte jedoch den Abbau von NAADP durch CD38 hemmen. Daher wurde das Eluat auf NAADP-abbauende Aktivität untersucht. Imidazol im Eluat führte zu einer Hemmung des NAADP-Abbaus und zu verzerrten Chromatogrammen bei der HPLC-Analyse.

Es galt zunächst herauszufinden, wie stark die Imidazol-Konzentration in den Eluaten gesenkt werden musste, um den NAADP-Abbau durch CD38 wieder zu erlauben. Die Aufnahme einer Konzentrations-Hemmbeziehung mit der HPLC-Analytik ist recht zeitaufwendig. Zudem verringerte Imidazol in den Proben die Qualität der HPLC-Chromatogramme, was die Auswertung deutlich erschwerte. Daher wurde als Alternative zur HPLC-Analytik ein fluorimetrischer Enzym-Assay mit dem Substrat 1,N⁶-etheno-NAADP entwickelt. In Vorexperimenten konnte durch HPLC bestätigt werden, dass das schwach fluoreszierende 1,N⁶-etheno-NAADP durch CD38 zum stark fluoreszierenden 1,N⁶-etheno-ADPRP umgesetzt wird. Durch die Einführung des fluorimetrischen Enzym-

Assays wurde die Bestimmung des NAADP-Abbaus im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer möglich. Der neue Enzym-Assay wurde verwendet, um eine schnelle Analyse der Konzentrations-Hemmbeziehung von Imidazol zu realisieren.

P10-Präparationen aus Jurkat-T-Lymphozyten, welche CD38 enthalten, wurden mit 1,N⁶-etheno-NAADP inkubiert und die Wirkung von steigenden Konzentrationen Imidazol auf die Fluoreszenzzunahme getestet.

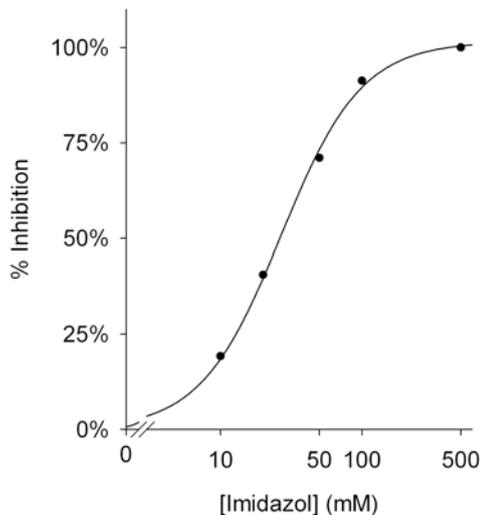


Abb. 4.7: Imidazol hemmt konzentrationsabhängig den Abbau von 1,N⁶-etheno-NAADP.

200 µg/ml P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten wurden mit 100 µM 1,N⁶-etheno-NAADP und steigenden Konzentrationen Imidazol für 40 min inkubiert und die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 410 \text{ nm}$ bestimmt. Das schwach fluoreszierende Substrat 1,N⁶-etheno-NAADP wurde zum stark fluoreszierenden 1,N⁶-etheno-ADPRP abgebaut. Die Entstehung von 1,N⁶-etheno-ADPRP wurde mit HPLC über eine C₁₈-HyPURITY ADVANCE-Säule verifiziert. Imidazol hemmt konzentrationsabhängig den Umsatz von 1,N⁶-etheno-NAADP. Aus der Regressionskurve wurde ein IC₅₀ von 27 µM berechnet. $r^2 = 0,99$; $p < 0,05$.

Der fluorimetrische Enzym-Assay zeigte, dass Imidazol konzentrationsabhängig den Umsatz von 1,N⁶-etheno-NAADP zu 1,N⁶-etheno-ADPRP verringerte. Der berechnete IC₅₀ belief sich auf 27 mM. Das Imidazol aus dem Eluat der Affinitätschromatographie musste also entfernt werden, um den Abbau von NAADP durch rekombinantes, gereinigtes CD38 untersuchen zu können.

4.2.3 Rekombinantes CD38 katalysiert den Abbau von NAADP zu ADPRP

Nachdem das Imidazol aus den CD38-Eluaten durch Umpufferung entfernt worden war, wurde erneut ein fluorimetrischer Enzym-Assay durchgeführt, um den Erhalt der Enzymaktivität zu verifizieren. Dann wurde das gereinigte CD38 für Untersuchungen zum NAADP-Abbau eingesetzt.

Rekombinantes, affinitätsgereinigtes CD38 wurde mit NAADP inkubiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsprodukte durch HPLC analysiert. Der NAADP-Peak verringerte sich mit der Zeit, während die Peaks von Nikotinsäure und ADPRP zunahm (siehe Abb. 4.8). Damit war bewiesen, dass rekombinantes, affinitätsgereinigtes CD38 bei pH = 7,4 in der Lage ist, NAADP zu ADPRP und Nikotinsäure umzusetzen.

Da der Assaypuffer BSA enthielt, war es nicht möglich, die Proteinmenge an CD38 in den Versuchsansätzen zu messen. Aus diesem Grund konnte die spezifische Aktivität von rekombinantem, affinitätsgereinigtem CD38 nicht berechnet werden.

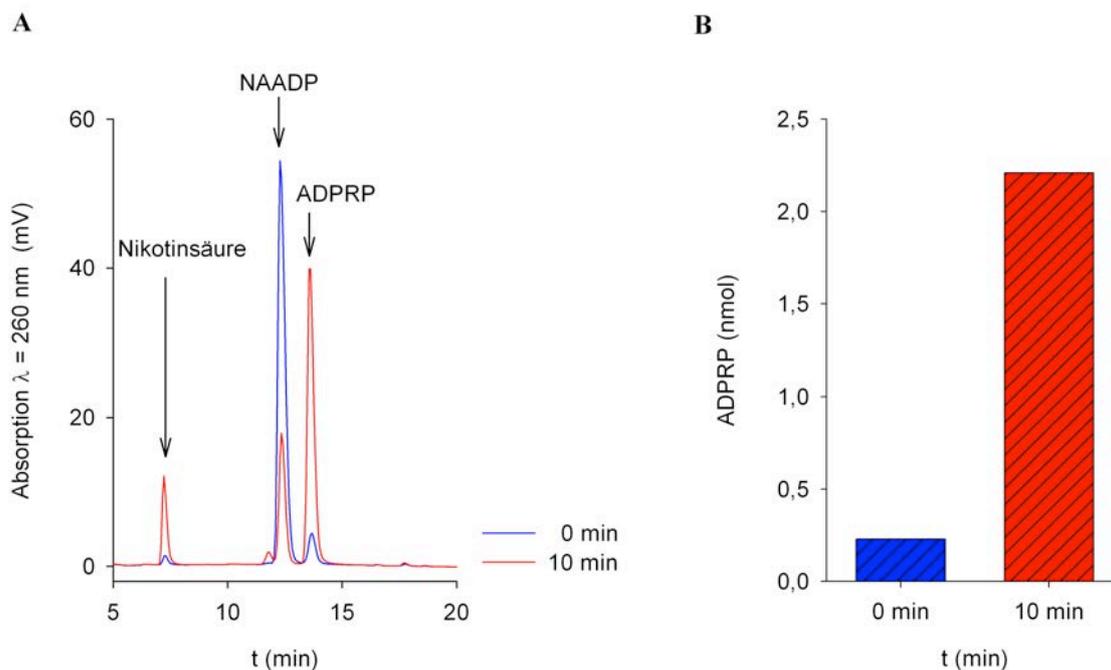


Abb. 4.8: Rekombinantes CD38 katalysiert den Abbau von NAADP zu ADPRP.

Überstand von CD38⁺-HEK-293-Zellen wurde affinitätsgereinigt und mit 100 μ M NAADP bei pH = 7,4 inkubiert. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte durch HPLC über eine C₁₈-HyPURITY-ADVANCE-Säule. Die Detektion der Nukleotide erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm. (A) Dargestellt sind repräsentative HPLC-Chromatogramme der Reaktionsprodukte. CD38 katalysiert den Umsatz von NAADP zu ADPRP und Nikotinsäure. (B) Die Quantifizierung des Produktes ADPRP erfolgte über eine Kalibrierung mit einem internen Standard. Aufgetragen sind die Werte eines repräsentativen Versuchstages.

Zusätzlich wurde die NAADP-metabolisierende Aktivität durch CD38 bestätigt, welches in *E.coli* exprimiert und kryokonserviert worden war. Die spezifische Aktivität des in *E.coli* exprimierten CD38 betrug 189 nmol/mg/min. Möglicherweise ist die spezifische Aktivität von frisch isoliertem CD38 noch höher. Vergleicht man die NAADP-metabolisierende Aktivität der P10-Präparationen von Wildtyp-Jurkat-T-Lymphozyten (565 pmol/mg/min) mit der Aktivität des in *E.coli* exprimierten CD38, so ergibt sich, dass die P10-Präparationen rechnerisch ca. 3 μ g CD38/mg Gesamtprotein enthalten und somit der Anteil von CD38 ca. 0,3% am Gesamtprotein der P10-Präparation beträgt.

Substrat	Produkt	Aktivität (nmol/mg/min)		
		CD38 kd	wt	recCD38
1,N ⁶ -etheno-NAD	1,N ⁶ -etheno-ADPR	0,27	2,27	390
NADP + NikSäure	NAADP + NikAmid	0,42	8,55	n.d.
NAADP	ADPRP	0,015	0,565	189

Tab. 4.2. Vergleich der durch CD38 katalysierten Reaktionen.

Zusammengestellt sind die untersuchten Reaktionen von CD38 und die jeweiligen spezifischen Aktivitäten in P10-Präparationen von Wildtyp- (wt), CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten (CD38 kd) und rekombinant exprimiertem CD38 (recCD38). n.d.: nicht bestimmt.

Aufgrund von Untersuchungen an Jurkat-T-Lymphozyten war die Hypothese aufgestellt worden, dass das Enzym CD38 den Abbau von NAADP zu ADPRP katalysiert. Durch die rekombinate Expression von CD38 konnte dies bewiesen werden.

4.3 NAADP-Metabolismus in HeLa-Zellen

Das NAADP-Signalsystem wurde in vielen verschiedenen Organismen und Zellsystemen beschrieben. Dennoch herrscht bis heute Unklarheit, welche Enzyme die Bildung und den Abbau von NAADP katalysieren. Um den NAADP-Metabolismus in HeLa-Zellen zu charakterisieren, sollte zunächst das NAADP-Signalsystem in HeLa-Zellen verifiziert werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit Carbachol stimuliert und Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ sowie der intrazellulären NAADP-Konzentration durchgeführt. Im Anschluss wurde untersucht, welche Enzyme am NAADP-Abbau in HeLa-Zellen beteiligt sein könnten.

4.3.1 Stimulation von HeLa-Zellen mit Carbachol führt zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$

Zunächst wurde die $[Ca^{2+}]_i$ in HeLa-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden mit Carbachol, einem Struktur analogon von Acetylcholin, stimuliert. Dies führt zur Aktivierung des muscarinischen Acetylcholinrezeptors, der zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört. Die Stimulation setzt eine Signalkaskade über $G_{\alpha q}$ in Gang (Ueda et al., 2004). In Folge dessen wird Phospholipase C β aktiviert, welche aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat den Botenstoff Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) bildet (Kirk et al., 1981). IP $_3$ wiederum setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei und führt so zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Streb et al., 1983).

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ in HeLa-Zellen lag bei $143 \text{ nM} \pm 53 \text{ nM}$. Die Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ Carbachol führte zu keiner signifikanten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$. Ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ konnte eine transiente Calcium-Antwort beobachtet werden: Nach Stimulation stieg die $[Ca^{2+}]_i$ bis innerhalb weniger Sekunden die maximale Calcium-Antwort erreicht war. Anschließend sank die $[Ca^{2+}]_i$ wieder auf ein basales Niveau zurück. Der Großteil der Zellen hatte nach 10 min das basale Niveau der $[Ca^{2+}]_i$ wieder erreicht. Die Höhe des Calcium-Peaks in HeLa-Zellen nahm mit steigenden Konzentrationen des Stimulus Carbachol zu. Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wurde quantifiziert und aus der Regressionskurve ein EC_{50} von $8 \mu\text{M}$ berechnet (siehe Abb. 4.9).

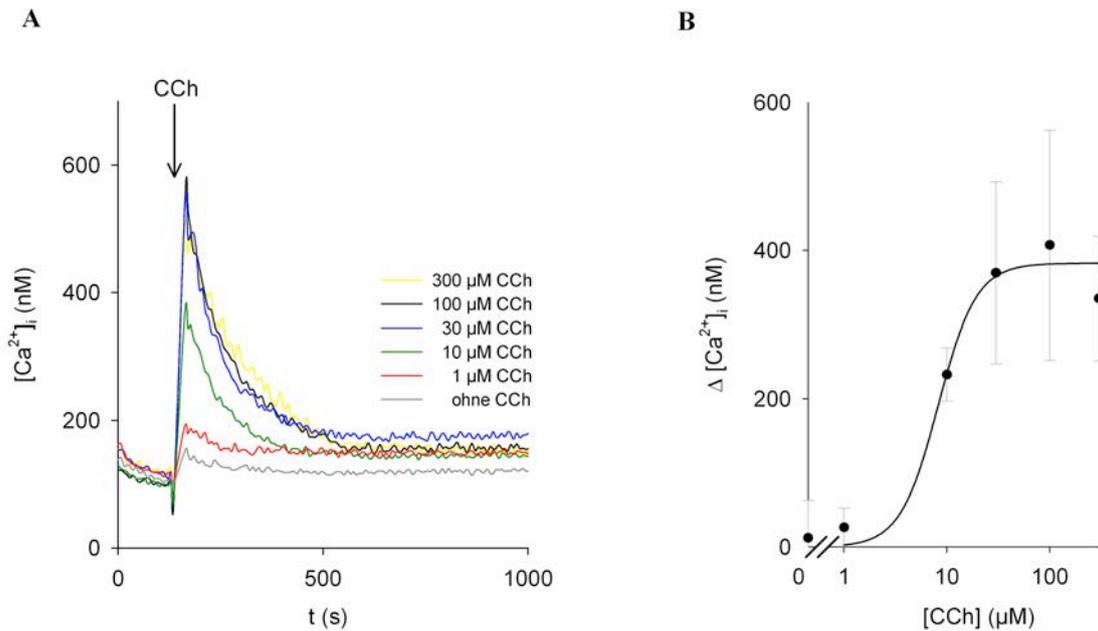


Abb. 4.9: Die $[Ca^{2+}]_i$ in HeLa-Zellen steigt konzentrationsabhängig nach Stimulation mit Carbachol.

(A) HeLa-Zellen wurden mit dem fluoreszierenden Calcium-Indikator Fura2-AM beladen. Zunächst wurde die basale $[Ca^{2+}]_i$ bestimmt. Dann wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Carbachol (CCh) stimuliert. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von Carbachol. Der durch Carbachol induzierte Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration wurde über einen Zeitraum von 1000 s verfolgt. (B) $\Delta [Ca^{2+}]_i$ wurde durch Bildung der Differenz aus der $[Ca^{2+}]_i$ vor Stimulation und der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation berechnet. Die Stimulation von HeLa-Zellen mit Carbachol bewirkt konzentrationsabhängig einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Aus der Regressionskurve ergibt sich ein EC_{50} von 8 μ M. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 2 - 5$). Regressionskurve: $r^2 = 0,80$; $p < 0,001$.

4.3.2 Stimulation von HeLa-Zellen mit Carbachol führt zum Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration

In Abschnitt 4.2.1 wurde gezeigt, dass die Stimulation des Acetylcholin-Rezeptors in HeLa-Zellen zu einer Calcium-Antwort führt. Im Folgenden wurde geprüft, ob die Stimulation mit Carbachol die Bildung des Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoffs NAADP bewirkt. Die NAADP-Konzentration kann mit Hilfe verschiedener Methoden gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein von Gasser und Bruhn entwickelter enzymatisch gekoppelter, fluorimetrischer Assay zur Quantifizierung der intrazellulären NAADP-Konzentration verwendet (Gasser et al., 2006). Hierbei wird nach Stimulation der Zellen die cytosolische Fraktion isoliert, über Säulenchromatographie gereinigt und das Eluat auf ein Vielfaches konzentriert. Das in den Proben enthaltene NAADP wird dann zunächst in NADP überführt und anschließend einer Amplifikationreaktion unterworfen, so dass eine höhere Sensitivität erzielt werden kann.

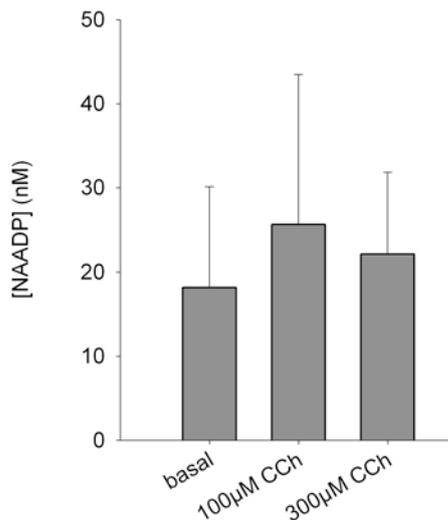


Abb. 4.10: Stimulation mit Carbachol induziert einen Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden für 5 min mit 100 µM bzw. 300 µM Carbachol stimuliert. Die Zellen wurden aufgeschlossen, die Zellextrakte über Säulenchromatographie gereinigt und das enthaltene NAADP durch einen fluorimetrischen NAADP-Cycling-Assay bestimmt. Mit Hilfe der Wiederfindungsrate wurde der Erfolg des Experiments kontrolliert. Die Wiederfindungsrate betrug $66\% \pm 10\%$. Die statistische Analyse mit SPSS ergab, dass zwar Unterschiede sichtbar sind, der Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration nach Stimulation mit Carbachol gegenüber dem Basalwert allerdings nicht signifikant war. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 5 - 6$).

HeLa-Zellen wurden mit Carbachol stimuliert, die cytosolische Fraktion isoliert und der NAADP-Gehalt durch den fluorimetrischen NAADP-Cycling-Assay nach Gasser quantifiziert (Gasser et al., 2006). Die basale NAADP-Konzentration betrug im Mittel 18 nM. 5 min nach Stimulation mit 100 µM Carbachol wurden 26 nM gemessen, während die Stimulation mit 300 µM Carbachol zu einem Anstieg auf 22 nM führte (siehe Abb. 4.10).

Die Stimulation des Acetylcholin-Rezeptors mit Carbachol führte zu einer Erhöhung der intrazellulären NAADP-Konzentration. Aufgrund der großen Streuung der Messwerte und geringen Anzahl an Experimenten war der Anstieg jedoch noch nicht signifikant. Dennoch konnte davon ausgegangen werden, dass nach Stimulation von HeLa-Zellen NAADP gebildet wird und im Anschluss auch wieder abgebaut wird.

4.3.3 HeLa-Zellen exprimieren kein CD38

Im ersten Teil der Arbeit wurde CD38 als NAADP-abbauendes Enzym in Jurkat-T-Lymphozyten vorgestellt. Um Hinweise zum Metabolismus von NAADP in HeLa-Zellen zu erhalten, wurde die CD38-Expression in HeLa-Zellen untersucht.

Zunächst wurde die NAD-Glykohydrolase-Aktivität in P10-Präparationen von HeLa-Zellen mit dem bereits in Abschnitt 4.1.1 vorgestellten fluorimetrischen Enzym-Assay durchgeführt (Barrio et al., 1972).

Die Inkubation von P10-Präparationen der Jurkat-T-Lymphozyten mit dem Substrat $1,N^6$ -etheno-NAD ergab eine Fluoreszenzzunahme um 4361 ± 1592 Einheiten, während die Fluoreszenz in den Proben der HeLa-Zellen nur um 885 ± 398 Einheiten anstieg (siehe Abb. 4.11). Die Aktivität wurde nach Kalibrierung mit einer $1,N^6$ -etheno-ADPR-Eichgerade berechnet. Jurkat-T-Lymphozyten zeigten eine Aktivität von 2,67 nmol/mg/min, während für HeLa-Zellen nur eine sehr schwache Aktivität von 0,36 nmol/mg/min bestimmt wurde.

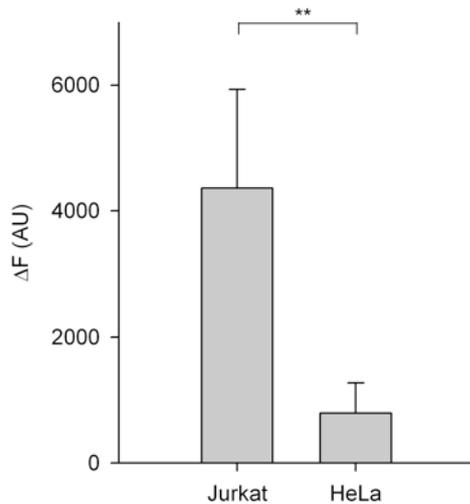


Abb. 4.11: HeLa-Zellen zeigen eine sehr schwache NAD-Glykohydrolase-Aktivität im Vergleich zu Jurkat-T-Lymphozyten.

100 µg/ml P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten bzw. HeLa-Zellen wurden mit 100 µM 1,N⁶-etheno-NAD für 30 min inkubiert und die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 410 \text{ nm}$ gemessen. Das schwach fluoreszierende 1,N⁶-etheno-NAD wird durch NAD-Glykohydrolasen wie beispielsweise CD38 unter Abspaltung von Nikotinamid zum stark fluoreszierenden 1,N⁶-etheno-ADPR umgesetzt. HeLa-Zellen weisen eine sehr schwache NAD-Glykohydrolase-Aktivität im Vergleich zu Jurkat-T-Lymphozyten auf. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 7 - 14$); ** $p < 0,001$ t-Test nach Student.

Da der fluorimetrische Enzym-Assay nicht spezifisch für CD38 ist, konnte nicht unterschieden werden, ob die gemessene Aktivität auf eine sehr geringe Menge CD38 oder auf die Aktivität von Pyrophosphatasen oder anderen NAD-Glykohydrolasen zurückzuführen war.

Im Folgenden wurde daher die Expression von CD38 durch Nachweis der CD38-mRNA über RT-PCR bzw. des Proteins CD38 durch Western Blot analysiert. Die Verwendung der CD38-spezifischen Primer erfolgte wie bereits in Abschnitt 4.2.1 beschrieben.

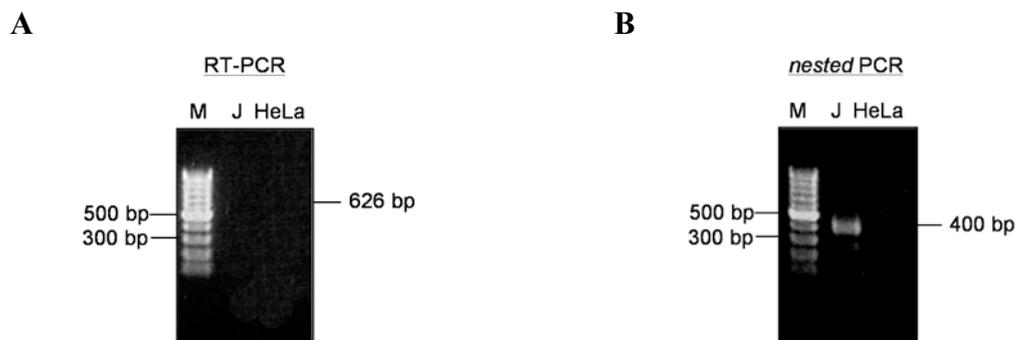


Abb. 4.12: In HeLa-Zellen ist die für CD38-kodierende mRNA nicht nachweisbar.

(A) Gesamt-RNA wurde aus Jurkat-T-Lymphozyten (J) und HeLa-Zellen extrahiert. Die für CD38 codierende Sequenz wurde durch RT-PCR amplifiziert und die Transkripte über ein 1%-iges Agarosegel aufgetrennt. (B) Da das Amplifikat der RT-PCR im Agarosegel nicht sichtbar war, wurde eine *nested* PCR mit den RT-PCR-Ansätzen durchgeführt. Die erwartete Größe des Amplifikats betrug 400 bp. In Jurkat-T-Lymphozyten konnte die Expression von CD38 verifiziert werden, während in HeLa-Zellen kein Amplifikat beobachtet wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel. Die RT-PCR wurde dreimal durchgeführt. Marker: Gene ladder 100 bp.

Zunächst wurde die Expression von CD38 auf mRNA-Ebene überprüft. Hierzu wurde eine RT-PCR mit Gesamt-RNA der HeLa-Zellen durchgeführt. Zum Vergleich wurden Proben von Jurkat-T-Lymphozyten mitgeführt. Es wurde ein Transkript einer Länge von 626 bp erwartet. Da im Agarosegel kein Amplifikat detektierbar war, wurde eine *nested* PCR mit

den RT-PCR-Ansätzen durchgeführt. In den Proben der Jurkat-T-Lymphozyten ließ sich eine Bande in der erwarteten Höhe von 400 bp nachweisen, während in HeLa-Zellen kein PCR-Produkt detektiert werden konnte (siehe Abb. 4.12).

Anschließend wurde die CD38-Expression auf Protein-Ebene untersucht. P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurden zur Western Blot-Analyse eingesetzt. Als Kontrolle wurden P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten mitgeführt. In Jurkat-T-Lymphozyten, welche als Positivkontrolle dienten, wurde im Western Blot eine Bande in Höhe von 42 kDa sichtbar, welche CD38 darstellt. Die Menge an CD38 in den jeweiligen Fraktionen unterschied sich je nach Präparation und Wachstumsphase der Zellen (siehe Abb. 4.13).

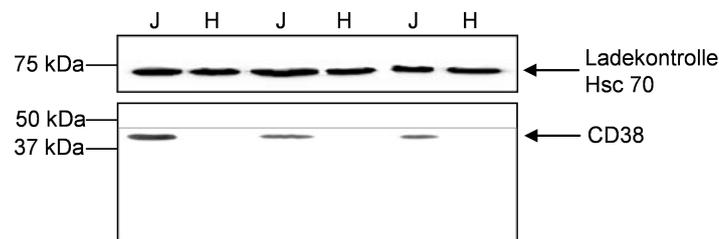


Abb. 4.13. In HeLa-Zellen kann das Protein CD38 im Western Blot nicht nachgewiesen werden.

P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten (J) und HeLa-Zellen (H) wurden an drei verschiedenen Versuchstagen hergestellt. Pro Spur wurden 15 µg Protein über ein 12,5%iges PA-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde geteilt, so dass der eine Abschnitt mit dem Antikörper gegen das Hitzeschock-Protein Hsc70 (als Ladekontrolle) und der zweite Abschnitt mit dem Antikörper gegen CD38 (AT1) inkubiert werden konnte. Die Expression von CD38 in Jurkat-T-Lymphozyten konnte bestätigt werden. In P10-Präparationen aus HeLa-Zellen konnte keine Bande angefärbt werden. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von vier Western Blot-Experimenten.

Dagegen wurde in den Proben der HeLa-Zellen keine Bande durch den anti-CD38-Antikörper angefärbt (siehe Abb. 4.13). Um sicher zu stellen, dass alle untersuchten Spuren im PA-Gel ungefähr gleiche Proteinmengen enthielten, wurde ein Teil der Membran mit einem Antikörper gegen das Hitzeschock-Protein Hsc70 inkubiert.

Die Expression von CD38 konnte in HeLa-Zellen weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene gezeigt werden. Dies könnte daran liegen, dass die Detektionsmethoden nicht sensitiv genug waren. Es wird aber davon ausgegangen, dass HeLa-Zellen in der Tat kein CD38 exprimieren.

Bezüglich des NAADP-Metabolismus in HeLa-Zellen stellte sich nun die Frage, welches Enzym in diesen Zellen den Abbau von NAADP katalysieren könnte. Zum NAADP-Metabolismus in Säugerzellen ist noch recht wenig bekannt. Zum einen wird die Rolle von CD38 als NAADP-abbauendes Enzym diskutiert. Zum anderen weist eine Publikation auf eine Phosphatase hin, welche NAADP zu NAAD zu degradieren kann (Berridge et al., 2002).

Die Untersuchungen an CD38-*knock out* Mäusen zeigen, dass die Expression von CD38 einen deutlichen Effekt auf die intrazelluläre NAADP-Konzentration in Thymus und Milz hat. Dagegen scheint die Expression von CD38 für die intrazelluläre Konzentration von NAADP im Herzen und in der Niere kaum eine Rolle zu spielen (Bruhn, 2008; Soares et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass im Bezug auf den NAADP-Metabolismus in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Wege beschritten werden können.

4.3.4 Enzymatische Charakterisierung des NAADP-Abbaus in HeLa-Zellen

Da HeLa-Zellen im Gegensatz zu Jurkat-T-Lymphozyten kein CD38 enthalten, muss in diesen Zellen ein anderes Enzym für den NAADP-Abbau verantwortlich sein. Im Folgenden wurden Proteinextrakte von HeLa-Zellen auf eine NAADP-abbauende Aktivität hin untersucht.

4.3.4.1 HeLa-Zellen enthalten eine NAADP-dephosphorylierende Aktivität

Um eine NAADP-abbauende Aktivität zu lokalisieren, wurden Proteinextrakte von HeLa-Zellen durch Ultrazentrifugation in drei Fraktionen getrennt: Eine Fraktion, die vornehmlich Proteine leichter Membranen enthielt (P10), eine Fraktion, in der Proteine schwerer Membranen angereichert waren (P100) und eine Fraktion mit cytosolischen Proteinen (S100). Die verschiedenen Proteinfractionen wurden mit 20 μM NAADP inkubiert und die Reaktionsprodukte über HPLC analysiert.

Die HPLC-Analysen zeigten, dass alle Proteinfractionen eine Aktivität enthielten, welche NAADP zu NAAD dephosphorylieren konnte (siehe Abb. 4.14A). Die untersuchte NAADP-abbauende Aktivität ist demnach eine Phosphatase.

Nach 15 min Inkubation der P10-Fractionen mit 20 μM NAADP wurden 200 pmol \pm 35 pmol NAADP zu NAAD umgesetzt, was einer Aktivität von 333 pmol/mg/min entspricht. Durch P100-Fractionen wurden im Mittel 70 pmol \pm 99 pmol NAAD freigesetzt, woraus sich eine Aktivität von 117 pmol/mg/min ergibt. Die geringste Bildung von NAAD zeigten S100-Fractionen. Hier wurden 41 pmol \pm 13 pmol NAAD gemessen und daraus eine Aktivität von 68 pmol/mg/min errechnet. Damit enthalten P10-Fractionen die höchste Aktivität. In den folgenden Experimenten wurden immer P10-Fractionen verwendet.

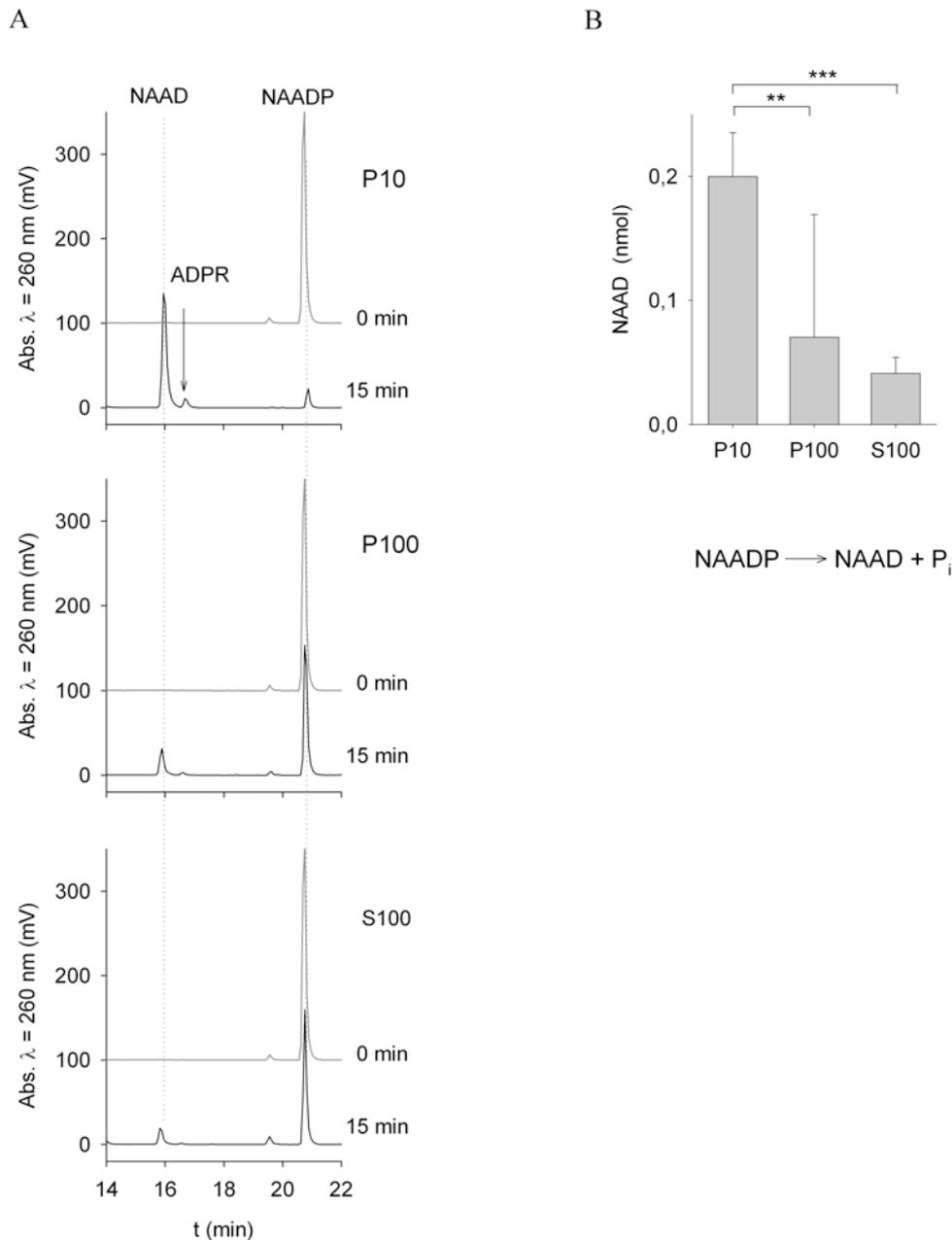


Abb. 4.14: Nachweis einer NAADP-abbauenden Aktivität in Membranfraktionen von HeLa-Zellen.

1 mg/ml cytosolische Präparationen (S100), sowie Präparationen schwerer (P100) und leichter Membranfraktionen (P10) von HeLa-Zellen wurden mit 20 μM NAADP bei 37°C für 15 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über eine C_{18} -Multohyp-Säule mittels HPLC analysiert. Die Detektion der Nukleotide erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm. (A) Dargestellt sind repräsentative HPLC-Chromatogramme zum Startzeitpunkt sowie nach 15 min Inkubationszeit. Die NAADP-abbauende Aktivität dephosphoryliert NAADP zu NAAD. Somit handelt es sich bei dem beteiligten Enzym um eine Phosphatase. (B) Die Quantifizierung des Produktes NAAD erfolgte über die Kalibrierung mit einem internen Standard. Die NAAD-Produktion durch P10-Fraktionen war höher als durch P100-Fraktionen. Die Inkubation von NAADP mit S100-Fraktionen führte nur zu einer schwachen Produktion von NAAD. Die enzymatische Aktivität in S100-Fraktionen war vermutlich durch Freisetzung einer löslichen Form der Phosphatase bedingt. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4$). ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ univariante Varianzanalyse.

4.3.4.2 Das pH-Optimum der NAADP-abbauenden Aktivität liegt bei 9

In vorangegangenen Experimenten wurde festgestellt, dass NAADP in HeLa-Zellen durch eine Phosphatase abgebaut wird. In Säugetieren sind verschiedene Klassen von Phosphatasen bekannt, welche durch biochemische Assays differenziert werden können, z.B. durch ihre Sensitivität gegenüber Inhibitoren oder das pH-Optimum der katalysierten Reaktion. Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, wurde das pH-Optimum des NAADP-Abbaus bestimmt. Hierzu wurden P10-Präparationen von HeLa-Zellen mit 20 μM NAADP bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Als Puffersystem dienten MES (pH = 5 – 6), TEA (pH = 7 - 9) sowie DEA (pH = 10 – 11).

Es zeigte sich, dass die NAAD-Bildung mit steigendem pH zunahm und anschließend wieder abfiel (siehe Abb. 4.15). Die maximale Aktivität zeigte sich bei pH = 9: Hier wurden $1,68 \text{ nmol} \pm 0,87 \text{ nmol}$ NAAD gemessen. Aus der Regressionskurve wurde ein optimaler pH-Wert von 8,7 errechnet. Da das pH-Optimum der Aktivität im Alkalischen liegt, handelt es sich bei der NAADP-abbauenden Aktivität in HeLa-Zellen wahrscheinlich um eine alkalische Phosphatase.

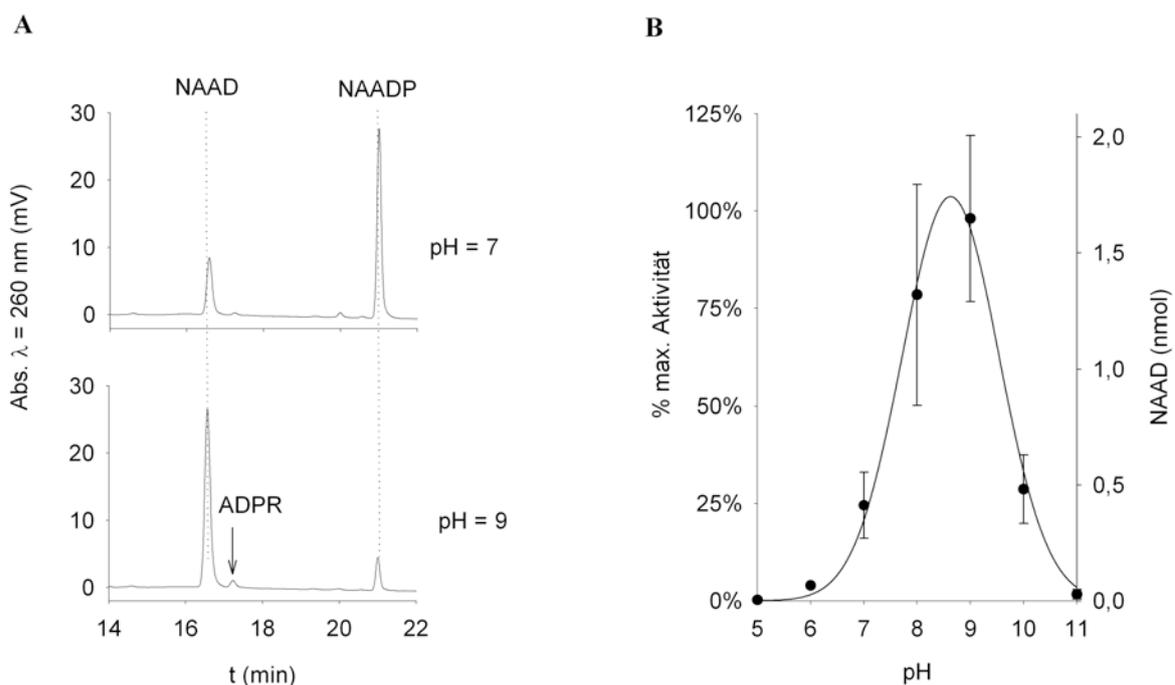


Abb. 4.15: Untersuchung des pH-Optimums der NAADP-abbauenden Aktivität in Membranfraktionen von HeLa-Zellen.

1 $\mu\text{g/ml}$ P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurden mit 20 μM NAADP bei 37°C für 5 min bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über eine C_{18} -Multohyp-Säule mittels HPLC analysiert. Die Detektion der Nukleotide erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. (A) Dargestellt sind repräsentative HPLC-Chromatogramme der Reaktionsprodukte nach 5 min Inkubation bei pH = 7 bzw. pH = 9. (B) Die NAAD-Produktion wurde mit Hilfe eines internen Standards quantifiziert und auf die maximale Aktivität normiert. Die höchste enzymatische Aktivität wurde bei pH = 9 gemessen. Damit ist das NAADP-abbauende Enzym in HeLa-Zellen wahrscheinlich eine alkalische Phosphatase. Puffer: pH = 5 - 6: MES; pH = 7 - 9: TEA; pH = 10 - 11: DEA. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 2 - 4$). Regressionskurve: $r^2 = 0,66$; $p < 0,001$.

4.3.4.3 Physiologische Konzentrationen an NAADP werden in HeLa-Zellen dephosphoryliert

Die ersten Experimente zum NAADP-Abbau wurden mit micromolaren Konzentrationen an NAADP durchgeführt, um in einem für die HPLC-Analytik vorteilhaften Konzentrationsbereich arbeiten zu können. Allerdings liegen die intrazellulären NAADP-Konzentrationen in HeLa-Zellen im nanomolaren Bereich (siehe Abb. 4.10). Um zu untersuchen, ob die entdeckte NAADP-abbauende Aktivität auch endogen vorkommende NAADP-Konzentrationen metabolisieren kann, wurden die Experimente mit 20 nM, 50 nM und 100 nM NAADP als Substrat wiederholt. Derart geringe Mengen an NAADP unterschreiten allerdings das Detektionslimit der bis dahin durchgeführten HPLC-Analysen. Daher musste die Empfindlichkeit des Nachweises optimiert werden.

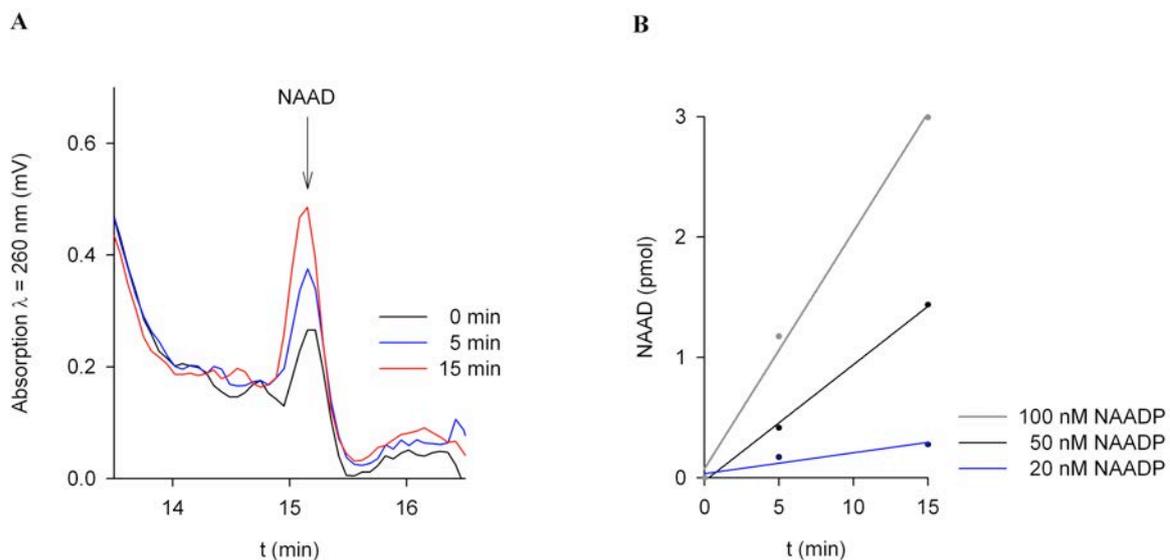


Abb. 4.16: Alkalische Phosphatase aus HeLa-Zellen metabolisiert physiologische Konzentrationen des Substrats NAADP.

Die physiologische NAADP-Konzentration in HeLa-Zellen liegt im Bereich von 10 – 100 nM. 500 ng/ml P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen NAADP in TEA-Puffer bei pH 9 inkubiert und die Produktbildung über die Zeit verfolgt. Um die geringen Mengen des Produkts detektieren zu können, wurde der fünffache Reaktionsansatz hergestellt, gefriergetrocknet und in einem Fünftel des Volumens rekonstituiert. Die Analyse der Nukleotide erfolgte durch HPLC über eine C₁₈-Multohyp-Säule. (A) Dargestellt sind repräsentative HPLC-Chromatogramme der Reaktionsansätze mit 50 nM NAADP als Substrat. Der NAAD-Peak nimmt mit der Inkubationszeit zu. (B) In allen Proben nimmt die NAAD-Menge über die Zeit zu. Physiologische Konzentrationen des Substrates NAADP können durch alkalische Phosphatase umgesetzt werden. Dargestellt sind repräsentative Experimente.

Anschließend wurde der Elutionsgradient schrittweise angepasst, bis der NAAD-Peak eine möglichst schmale, spitze Form aufwies. Schließlich wurde für jede Reaktion ein fünffacher Ansatz vorbereitet, lyophilisiert und in einem Fünftel des Volumens resuspendiert. Diese fünffach konzentrierten Proben wurden über HPLC analysiert.

Der Umsatz von NAADP verhielt sich über den beobachteten Zeitraum von 15 min linear zur Inkubationszeit. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphatase der HeLa-Zellen NAADP in Konzentrationen von 20 nM, 50 nM sowie 100 nM dephosphoryliert (siehe Abb. 4.16). Damit ist die Phosphatase in der Lage physiologische NAADP-Konzentrationen umzusetzen.

4.3.4.4 Die Produktbildung von NAAD zeigt eine lineare Zunahme über die Zeit

Im Folgenden sollte die NAADP-abbauende Aktivität weiter charakterisiert werden und die Parameter K_m und v_{max} nach Michaelis und Menten bestimmt werden. Um eine Kinetik der Aktivität aufnehmen zu können, wurden einige Vorexperimente durchgeführt und die Einstellungen für HPLC-Analytik optimiert.

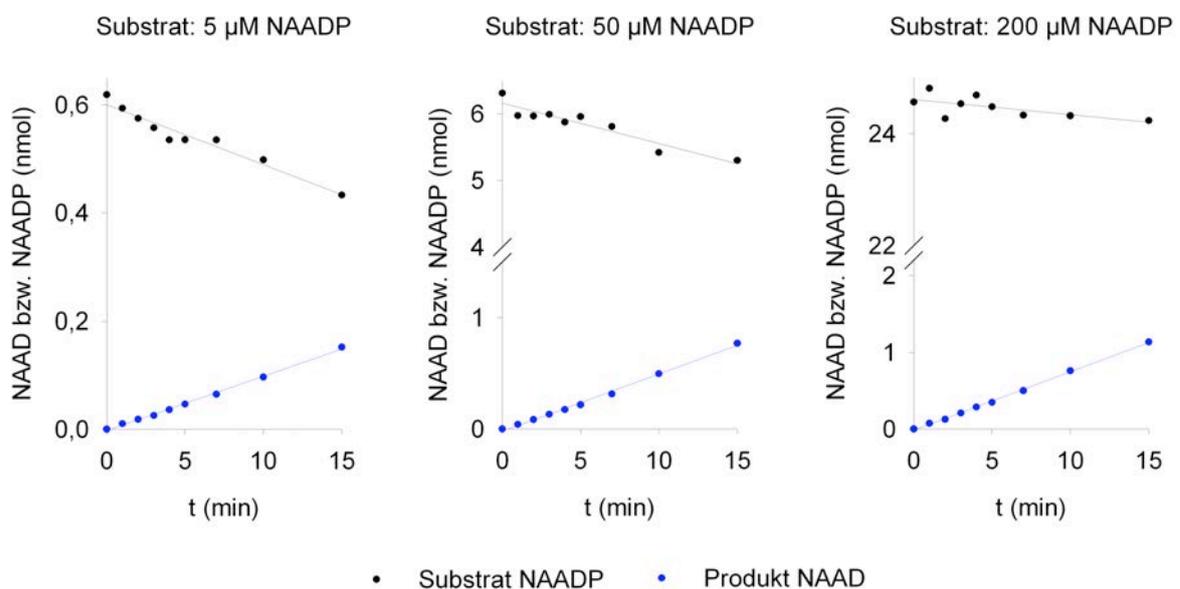


Abb. 4.17: Untersuchung der NAADP-abbauenden Aktivität in Membran-fractionen von HeLa-Zellen.

500 ng/ml P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen NAADP in TEA-Puffer bei pH 9 inkubiert und die Produktbildung über die Zeit verfolgt. Die Analyse der Nukleotide erfolgte durch HPLC über eine C_{18} -Multohyp-Säule. Während der ersten 15 min der Reaktion nimmt die Substratmenge (NAADP) kontinuierlich ab, während die Menge des Produkts NAAD linear mit der Zeit zunimmt. Dieser Zusammenhang ist über einen weiten Konzentrationsbereich (5 µM bis 200 µM) gewährleistet und ist Voraussetzung für die kinetische Charakterisierung nach Michaelis und Menten.

Für die Bestimmung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit v_{max} nach Michaelis und Menten, wird angenommen, dass sich die Reaktionspartner im Fließgleichgewicht (*steady state*) befinden. Daher wurde im Folgenden untersucht, unter welchen Reaktionsbedingungen die Zunahme des Produktes linear mit der Zeit zunimmt (siehe Abb. 4.17). Für NAADP-Konzentrationen von 5 µM bis 200 µM ist dieser Zusammenhang

unter optimierten Reaktionsbedingungen in einem Zeitraum von 0 min bis 15 min gewährleistet.

4.3.4.5 Die NAADP-abbauende Aktivität folgt der Michaelis-Menten-Kinetik

Unter den optimierten Reaktionsbedingungen wurde dann die enzymatische Charakterisierung nach Michaelis und Menten durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Substrate eingesetzt: zum einen NAADP, um die Parameter für den NAADP-Metabolismus zu berechnen; zum anderen para-Nitrophenylphosphat (pNPP), welches häufig zum colorimetrischen Nachweis der Aktivität von alkalischen Phosphatasen eingesetzt wird. Mit pNPP wurden allgemein die Parameter für eine alkalische Phosphatase bestimmt.

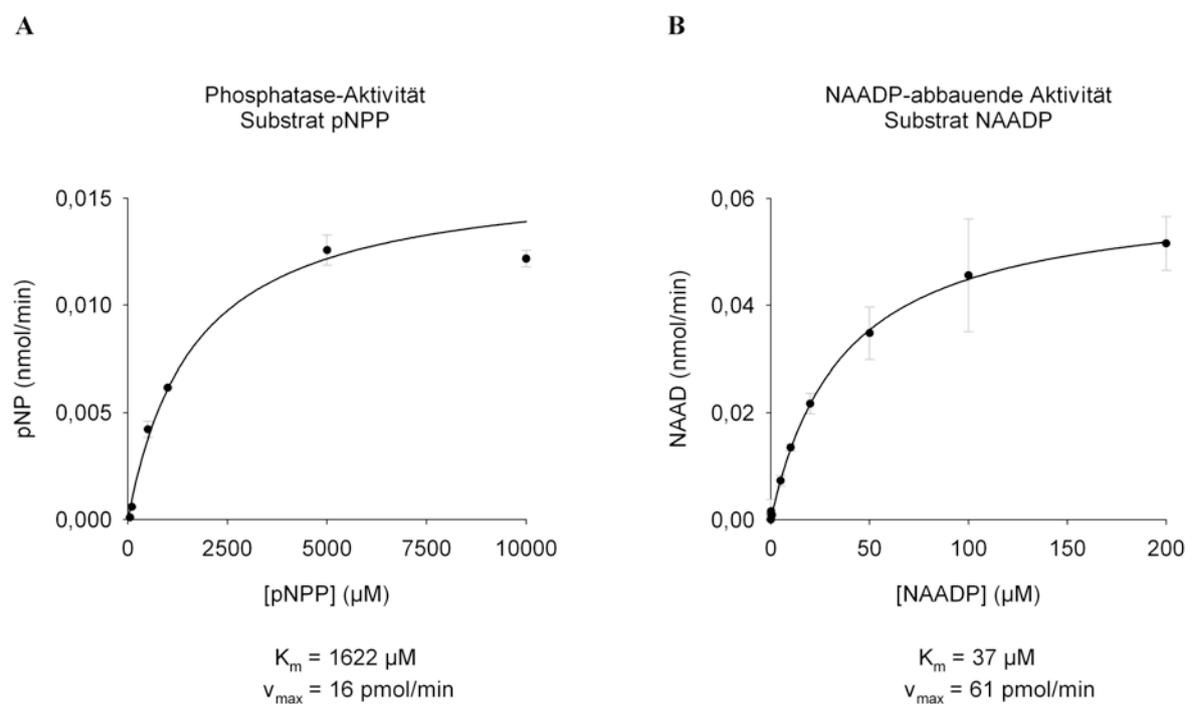


Abb. 4.18: Kinetische Charakterisierung der alkalischen Phosphatase nach Michaelis und Menten.

(A) 200 ng/ml P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen para-Nitrophenylphosphat (pNPP) in DEA-Puffer bei pH 9,8 inkubiert. Die Absorption des Reaktionsproduktes para-Nitrophenon (pNP) wurde bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ bestimmt und die gebildete Menge des Produktes pNP mit Hilfe eines internen Standards quantifiziert. Regressionskurve: $r^2 = 0,98$; $p < 0,001$. (B) 500 ng/ml P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen NAADP in TEA-Puffer bei pH 9 inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte über eine C_{18} -Multohyp-Säule über HPLC. Die Detektion von NAAD erfolgte durch Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. Die Produktbildung von NAAD wurde durch eine Kalibrierung mit einem internen Standard quantifiziert. Regressionskurve: $r^2 = 0,95$; $p > 0,001$. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 1 - 6$). Die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase betrug bei beiden Substraten ca. $0,8 \mu\text{mol/mg/min}$.

Die Umsatzgeschwindigkeit der Phosphatase wurde bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen und gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Aus der Regressionskurve konnten die Parameter K_m und v_{max} nach Michaelis und Menten abgelesen werden (siehe Abb. 4.18). Die Charakterisierung der Phosphatase-Aktivität mit dem Substrat pNPP ergab einen K_m -Wert von $1622 \mu\text{M} \pm 285 \mu\text{M}$ und v_{max} von $16 \text{ pmol/min} \pm 1 \text{ pmol/min}$. Die spezifische Aktivität betrug ca. 810 nmol/mg/min .

Die Berechnung der Parameter des NAADP-Abbaus dagegen ergab einen K_m -Wert von $37 \mu\text{M} \pm 4 \mu\text{M}$ und v_{max} von $61 \text{ pmol/min} \pm 3 \text{ pmol/min}$. Die spezifische Aktivität des NAADP-Abbaus betrug 817 nmol/mg/min .

Der K_m -Wert gibt Aufschluss über die Affinität des Substrates zum Enzym und zeigt, dass NAADP deutlich affiner an das katalytische Zentrum gebunden wird als pNPP.

4.3.4.6 HeLa-Zellen exprimieren drei Isoformen der alkalischen Phosphatase

Die humane alkalische Phosphatase kommt in vier Isoformen vor (Millán, 1992). Diese wurden nach ihrer gewebsspezifischen Expression benannt: Die ubiquitär vorkommende gewebunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP) ist genetisch am wenigsten mit den anderen Isoformen verwandt (Abb. 4.19B). Die gewebsspezifischen Isoformen sind Keimzell-spezifische alkalische Phosphatase (GCAP), plazentale alkalische Phosphatase (PLAP) sowie intestinale alkalische Phosphatase (IAP).

Um zu herauszufinden, welche der Isoformen für den NAADP-Abbau in HeLa-Zellen verantwortlich ist, wurde die Expression der verschiedenen Isoformen über RT-PCR untersucht.

Aus HeLa-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und mit Exon-überspannenden Primern, welche für die jeweilige Isoform spezifisch waren, zur RT-PCR eingesetzt. Die PCR-Ansätze mit spezifischen Primern für PLAP, IAP und TNAP zeigten im Agarosegel je eine Bande in der erwarteten Größe (siehe Abb. 4.19A). Die PCR-Produkte wurden durch TA-Klonierung in den Vektor pGEM-T easy eingefügt und anschließend sequenziert. So wurde bestätigt, dass die korrekten PCR-Produkte gebildet worden waren. Das GCAP-spezifische Primerpaar generierte kein PCR-Amplifikat. Es konnte also mRNA der Isoformen PLAP, IAP sowie TNAP, nicht aber der Isoform GCAP nachgewiesen werden.

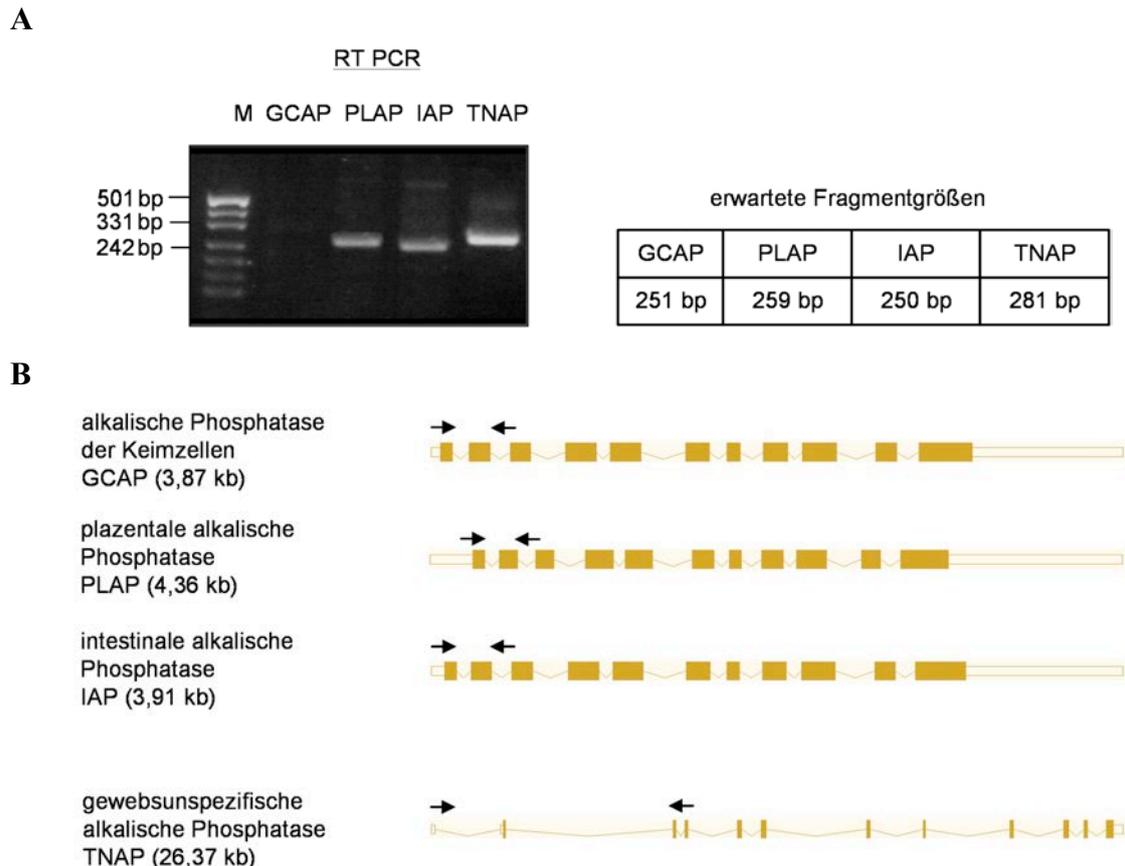


Abb. 4.19: In HeLa-Zellen ist die mRNA von drei Isoformen der alkalischen Phosphatase nachweisbar. Bisher sind vier Isoformen der humanen alkalischen Phosphatase bekannt, die entsprechend der gewebsspezifischen Expression benannt wurden: Keimzell-spezifische alkalische Phosphatase (GCAP), plazentale alkalische Phosphatase (PLAP), intestinale alkalische Phosphatase (IAP) sowie die ubiquitär exprimierte, gewebunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP). (A) Nachweis der mRNA der verschiedenen Isoformen der alkalischen Phosphatase durch RT-PCR. Gesamt-RNA wurde aus HeLa-Zellen extrahiert und eine RT-PCR mit Exon-überspannenden Isotyp-spezifischen Primern durchgeführt. Die Proben wurden über ein 2%-iges Agarosegel aufgetrennt. Die PCR-Produkte zeigten die erwarteten Fragmentgrößen. Es konnte mRNA, welche für PLAP, IAP und TNAP kodiert, nachgewiesen werden. Die RT-PCR mit den GCAP-spezifischen Primern führte zu keinem sichtbaren PCR-Produkt. Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel. Die RT-PCR wurde dreimal durchgeführt. Marker: pUC (MspI). (B) Exonstruktur der Gene der alkalischen Phosphatasen. Exons sind durch Blöcke dargestellt, während Linien für Introns stehen. Die Pfeile markieren die Bindungsstellen für die Primer der RT-PCR.

Die Expression der Isoformen der alkalischen Phosphatase wurde im Anschluss auf Protein-Ebene untersucht. Hierzu wurden P10-Präparationen von HeLa-Zellen über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die verschiedenen Isoformen der alkalischen Phosphatase mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Die Inkubation mit Isoform-spezifischen Antikörpern gegen PLAP, IAP sowie TNAP zeigten je eine deutliche Bande in Höhe von ca. 75 kDa (siehe Abb. 4.20). Das Molekulargewicht der alkalischen Phosphatasen sollte aufgrund der Aminosäuresequenz ca. 57 kDa betragen. Die im Western Blot detektierten Banden verliefen allerdings auf der Höhe von ca. 75 kDa, da die Phosphatasen eine starke Glykosylierung aufweisen (Garattini et al., 1986). Je nach Konzentration des Antikörpers können auch Dimere bzw. geringe Mengen nicht

glykosylierter Phosphatase sichtbar gemacht werden. Ein Teil der PVDF-Membran wurde mit einem Antikörper gegen β -Aktin als Ladekontrolle inkubiert. So wurde sichergestellt, dass alle Proben etwa gleiche Proteinmengen enthielten.

Im Western Blot wurden die Ergebnisse der RT-PCR bestätigt: Die Expression der drei Isoformen PLAP, IAP und TNAP in HeLa-Zellen konnte auf mRNA- und Protein-Ebene gezeigt werden. Die Expression der Isoform GCAP konnte weder über RT-PCR noch über Western Blot nachgewiesen werden.

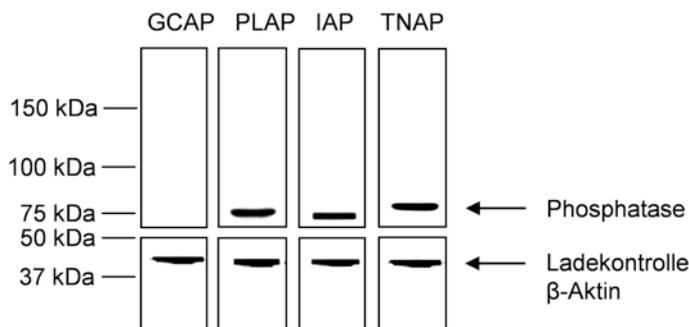


Abb. 4.20. Im Western Blot können drei Isoformen der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. Je 10 μ g P10-Präparationen aus HeLa-Zellen wurden über ein 10%-iges PA-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde geteilt, so dass der eine Abschnitt mit dem für die jeweilige Isoform spezifischen Antikörper und der zweite Abschnitt mit dem Antikörper gegen β -Aktin (als Ladekontrolle) inkubiert werden konnte. Die Expression von PLAP, IAP und TNAP in HeLa-Zellen konnte bestätigt werden. Das scheinbare Molekulargewicht liegt mit ca. 75 kDa etwas höher als das aufgrund der Aminosäure-Sequenz berechnete Molekulargewicht (57 kDa), da die alkalischen Phosphatasen glykosyliert vorliegen. Mit dem für GCAP spezifischen Antikörper konnte keine Bande angefärbt werden. Die Abbildung zeigt repräsentativ eine Aufnahme von drei Western Blots.

4.3.4.7 Isoformen der alkalischen Phosphatase können durch spezifische Inhibitoren differenziert werden

Im vorangegangenen Abschnitt der Arbeit wurde die Expression dreier Isoformen der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen gezeigt. Allerdings lassen die Ergebnisse der RT-PCR und des Western Blots keine Aussage über die relative Expressionshöhe der jeweiligen Isoform zu. Um diese Frage zu klären, wurden Enzym-Assays mit Inhibitoren durchgeführt, welche die verschiedenen Isoformen in unterschiedlichem Maße hemmen.

IC ₅₀ (mM)	TNAP	IAP	PLAP	GCAP
L-Leucin	> 50 ¹	n.d.	9 ³	0,5 ³
L-Phenylalanin	> 50 ² bzw. 19 ⁴	3 ²	4 ² bzw. 0,6 ³	0,6 ³
L-Homo-Arginin	4 ² bzw. 1 ⁴	> 50 ²	> 50 ^{2,4}	n.d.

Tab. 4.3. Übersicht Isoform-spezifischer Inhibitoren.

Die Isoformen der alkalischen Phosphatase können aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Aminosäure-basierten Inhibitoren unterschieden werden. Die ermittelten IC₅₀-Werte schwanken je nach Publikation geringfügig. n.d.: nicht bestimmt. ¹ Fishman und Sie, 1970; ² Herz, 1985; ³ Hoylaerts et al., 1992; ⁴ Kozlenkov et al., 2004.

Die Enzym-Assays wurden mit P10-Präparationen der HeLa-Zellen durchgeführt. Als Substrat wurde zum einen pNPP verwendet, um die Phosphatase-Aktivität im Allgemeinen zu testen. Zum anderen wurde NAADP eingesetzt, um die Wirkung der Inhibitoren auf den NAADP-Abbau zu untersuchen. L-Homo-Arginin hemmt vor allem die Aktivität der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (TNAP) (Fishman und Sie, 1970), während die gewebspezifischen alkalischen Phosphatasen weitgehend unbeeinträchtigt bleiben (siehe Tab. 4.3). L-Phenylalanin hemmt TNAP erst in millimolaren Konzentrationen, unterdrückt dagegen die Aktivität der gewebspezifischen alkalischen Phosphatasen bereits in hohen mikromolaren Konzentrationen (Herz, 1985).

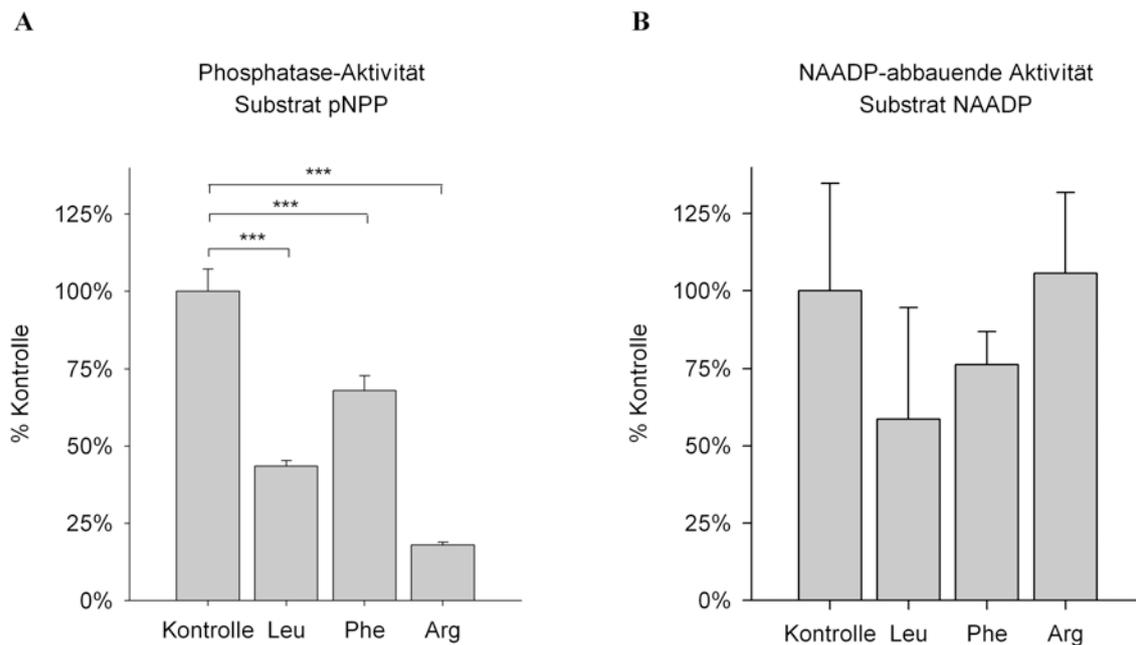


Abb. 4.21: Die Isoformen der alkalischen Phosphatase können durch Inhibitoren unterschieden werden.

(A) 1 µg/ml P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurden für 10 min auf Eis mit 10 mM Inhibitor vorinkubiert. Dann wurden 5,5 mM para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zugegeben und die Reaktionsansätze für 20 min bei RT inkubiert. Die Absorption des Reaktionsprodukts wurde bei $\lambda = 405$ nm bestimmt. Alle Inhibitoren bewirkten eine Verminderung der Phosphatase-Aktivität gegenüber der Kontrolle. Am deutlichsten war die Inhibition durch L-Homo-Arginin (Arg) erkennbar. L-Homo-Arginin hemmt vor allem die gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (TNAP), was darauf hindeutet, dass hauptsächlich TNAP am Umsatz von pNPP beteiligt ist. (B) 1 µg/ml P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurden für 10 min auf Eis mit 10 mM Inhibitor vorinkubiert. Dann wurden 10 µM NAADP Substrat hinzugefügt und nach 30 min die Reaktion gestoppt. Die Phosphat-Freisetzung wurde durch den colorimetrischen Malachit-Grün-Assay detektiert. L-Phenylalanin (Phe) und L-Leucin (Leu) bewirkten eine Verminderung der Phosphat-Freisetzung aus NAADP, während L-Homo-Arginin keine inhibitorische Wirkung zeigte. L-Phenylalanin und L-Leucin hemmen vor allem die gewebspezifischen Isoformen GCAP, PLAP und IAP. Da L-Phenylalanin und L-Leucin den NAADP-Abbau hemmen und L-Homo-Arginin keinen Effekt auf den NAADP-Abbau zeigt, katalysieren wahrscheinlich die gewebspezifischen Isoformen, nicht aber TNAP die Dephosphorylierung von NAADP. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 4 - 8). *** p < 0,001 univariante Varianzanalyse.

Gegen L-Leucin ist TNAP unempfindlich, während die intestinale und plazentale Isoform durch L-Leucin gehemmt werden. Die Wirkung von L-Leucin auf die Keimzell-spezifische Isoform ist noch ausgeprägter (Hoylaerts et al., 1992). Daher sollte L-Leucin eine Unterscheidung zwischen TNAP, IAP bzw. PLAP sowie GCAP ermöglichen.

Der Umsatz von pNPP wurde durch alle Inhibitoren signifikant gehemmt. Die stärkste Wirkung zeigte L-Homo-Arginin. Daraus kann geschlossen werden, dass der größte Anteil der gemessenen Phosphatase-Aktivität durch TNAP getragen wird (siehe Abb. 4.21A).

Der NAADP-Abbau wird durch L-Homo-Arginin nicht beeinträchtigt. L-Phenylalanin und L-Leucin hingegen vermindern den Abbau von NAADP (siehe Abb. 4.21B). Da diese Inhibitoren hauptsächlich auf die gewebsspezifischen Isoformen wirken und die Expression von GCAP in HeLa-Zellen nicht gezeigt werden konnte, katalysieren wahrscheinlich IAP und/oder PLAP den Abbau von NAADP.

Die Aktivität der Isoformen IAP und PLAP kann mit den oben genannten Inhibitoren nicht unterschieden werden. Es sind bereits Substanzen charakterisiert, deren IC_{50} -Werte für eine bestimmte Isoform gegenüber den anderen Isoformen um bis zu drei Zehnerpotenzen geringer sind (Chung et al., 2010; Lanier et al., 2010). Mit diesen Inhibitoren wäre es möglich, eindeutigere Ergebnisse zu erhalten als mit den hier verwendeten Inhibitoren. Allerdings sind diese Substanzen nicht kommerziell erhältlich.

4.4 Vergleich der Expression der alkalischen Phosphatase in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen

Für den NAADP-Abbau in HeLa-Zellen und Jurkat-T-Lymphozyten sind wahrscheinlich unterschiedliche Enzyme verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass CD38 aus Jurkat-T-Lymphozyten in der Lage ist, NAADP zu degradieren. Allerdings ist das Enzym CD38 in HeLa-Zellen nicht nachweisbar. Dort scheint die alkalische Phosphatase diese Rolle zu übernehmen. Im Folgenden sollte nun getestet werden, ob Jurkat-T-Lymphozyten eine alkalische Phosphatase enthalten.

4.4.1 Jurkat-T-Lymphozyten zeigen keine Aktivität der alkalischen Phosphatase

Für die Enzym-Assays wurden P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten verwendet. Auch hier wurden die beiden Substrate pNPP und NAADP eingesetzt, um die Phosphatase-Aktivität zu bestimmen.

In Enzym-Assays mit dem Substrat pNPP wurde in Jurkat-T-Lymphozyten eine mittlere OD von 0,09 Einheiten gemessen. Dieser Wert lag auf einer Höhe mit den Kontrollansätzen ohne Protein. Nach Abzug der Hintergrundabsorption konnte keine Aktivität der alkalischen Phosphatase in Jurkat-T-Lymphozyten mehr berechnet werden (siehe Abb. 4.22A). Dagegen wurde in HeLa-Zellen eine mittlere OD von 0,67 Einheiten bestimmt. Daraus ergab sich nach Kalibrierung mit dem Reaktionsprodukt pNP eine Aktivität von 4 nmol/min. Damit konnte die Funktionalität des Assays bestätigt werden.

In den Enzym-Assays mit dem Substrat NAADP wurde in Jurkat-T-Lymphozyten eine Phosphatkonzentration von $0,89 \mu\text{M} \pm 0,03 \mu\text{M}$ beobachtet. Allerdings war der Unterschied zu den Kontrollmessungen mit P10-Präparationen ohne Substrat nicht signifikant. Daher wurde davon ausgegangen, dass P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten keine NAADP-abbauende Phosphatase enthalten. Als Kontrolle wurden Proben von HeLa-Zellen mitgeführt. Hier wurde eine Zunahme der Phosphatkonzentration von $24,17 \mu\text{M} \pm 0,15 \mu\text{M}$ berechnet, was einer Phosphatase-Aktivität von 97 nmol/min entspricht.

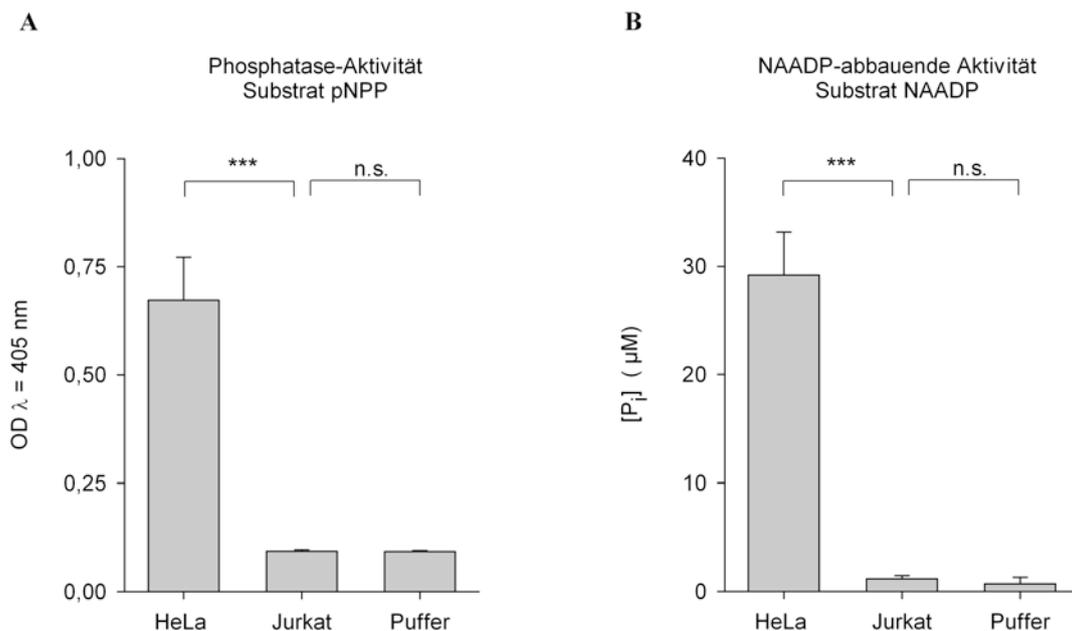


Abb. 4.22: Jurkat-T-Lymphozyten zeigen keine Aktivität der alkalischen Phosphatase.

(A) $5 \mu\text{g/ml}$ P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen wurden mit $5,5 \text{ mM}$ para-Nitrophenylphosphat inkubiert und die Absorption des Reaktionsprodukts bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ bestimmt. Es konnte keine Aktivität der alkalischen Phosphatase in Jurkat-T-Lymphozyten detektiert werden. (B) $5 \mu\text{g/ml}$ P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen wurden mit $40 \mu\text{M}$ NAADP inkubiert. Die Phosphat-Freisetzung wurde durch den colorimetrischen Malachit-Grün-Assay detektiert und mit Hilfe eines internen Standards quantifiziert. In den Proben der Jurkat-T-Lymphozyten konnte keine Phosphat-Freisetzung aus NAADP nachgewiesen werden. Die Zellen enthielten demnach keine aktive alkalische Phosphatase. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4 - 8$). *** $p < 0,001$; n.s.: $p > 0,05$ univariante Varianzanalyse.

Der Vergleich der beiden Enzym-Assays zeigte, dass das Substrat NAADP deutlich schneller dephosphoryliert wird (97 nmol/min) als das colorimetrische Substrat pNPP (4 nmol/min). Die Ergebnisse beider Enzym-Assays deuten darauf hin, dass P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten keine Phosphatase enthalten, die in der Lage ist, NAADP zu dephosphorylieren.

4.4.2 Die Expression einer alkalischen Phosphatase ist in Jurkat-T-Lymphozyten weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene nachweisbar

In Enzym-Assays konnte keine Aktivität der alkalischen Phosphatase in Jurkat-T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Nun wurde die Expression der alkalischen Phosphatase in Jurkat-T-Lymphozyten auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht.

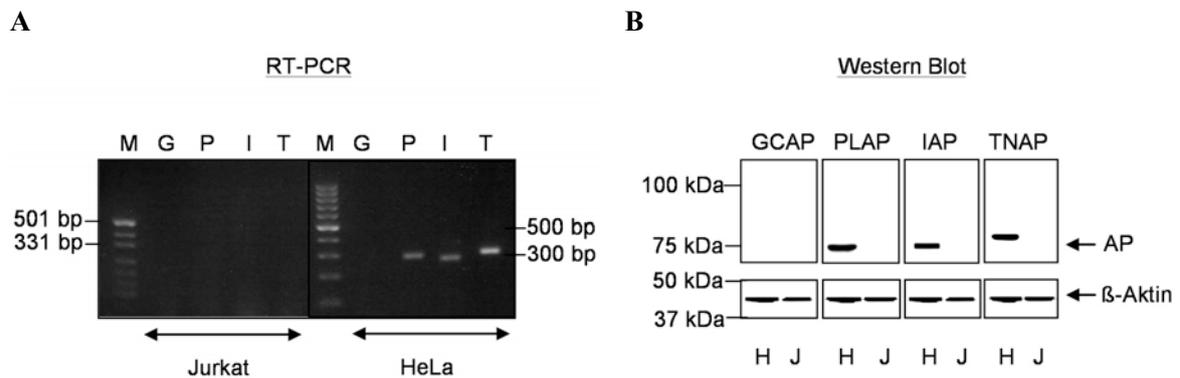


Abb. 4.23: Jurkat-T-Lymphozyten exprimieren keine alkalische Phosphatase.

(A) Gesamt-RNA wurde aus Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen extrahiert und eine RT-PCR mit Exon-überspannenden Isotyp-spezifischen Primern durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden über ein 2%-iges Agarosegel aufgetrennt und zeigten die erwarteten Fragmentgrößen. Die Expression der verschiedenen Isoformen der alkalische Phosphatase in HeLa-Zellen konnte bestätigt werden. In Jurkat-T-Lymphozyten konnte keine mRNA der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. G: GCAP, P: PLAP, I: IAP, T: TNAP. Marker links: pUC (MspI), Marker rechts: Gene ladder 100 bp. (B) Pro Spur wurden 10 μ g P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten (J) bzw. HeLa-Zellen (H) über ein 10%-iges PA-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Expression der drei Isoformen in HeLa-Zellen konnte bestätigt werden. Jurkat-T-Lymphozyten zeigten keine endogene Expression der alkalischen Phosphatase. Das scheinbare Molekulargewicht (75 kDa) der Phosphatasen lag aufgrund der Glykosylierung höher als das aus der Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht (57 kDa). Als Ladekontrolle diente der Nachweis mit einem β -Aktin-spezifischen Antikörper.

RT-PCR und Western Blot wurden analog zu den Untersuchungen aus Abschnitt 4.3.4.6 durchgeführt. In Jurkat-T-Lymphozyten konnte keine mRNA detektiert werden, welche für alkalische Phosphatase kodiert (siehe Abb. 4.23A). Ebenso wenig konnte alkalische Phosphatase aus Jurkat-T-Lymphozyten im Western Blot nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.23B). Als Kontrolle wurden Proben von HeLa-Zellen mitgeführt.

4.5 Untersuchung der Aktivität von rekombinant exprimierter alkalischer Phosphatase

In Abschnitt 4.3.4 wurde die alkalische Phosphatase als NAADP-abbauendes Enzym beschrieben. Durch Experimente mit spezifischen Inhibitoren wurde versucht, die Aktivität auf eine Isoform einzugrenzen, was nicht zweifelsfrei gelang. Im Folgenden wurden nun die Isoformen TNAP und PLAP rekombinant exprimiert und auf ihre NAADP-abbauende Aktivität getestet.

4.5.1 HEK-293-Zellen exprimieren endogen keine alkalische Phosphatase

Die rekombinante Expression der humanen Isoformen TNAP und PLAP in *E.coli* ergab nur geringe Ausbeuten an aktiver Phosphatase. Die Isoform PLAP wurde bereits in verschiedenen Expressionssystemen wie *E.coli* (Beck und Burtscher, 1994), Insektenzellen (Zhang et al., 2001), Hefezellen (Chen et al., 2004) sowie COS-Zellen (Berger et al., 1987; Kozlenkov et al., 2004) exprimiert. Die Expression gelang am Effizientesten im eukaryotischen System. Da im Labor keine COS-Zellen zur Verfügung standen, wurden HEK-293-Zellen als Expressionssystem ausgewählt.

Um die Eignung der HEK-293-Zellen als Expressionssystem zu überprüfen, wurden zunächst P10-Präparationen von HEK-293-Zellen auf Phosphatase-Aktivität untersucht.

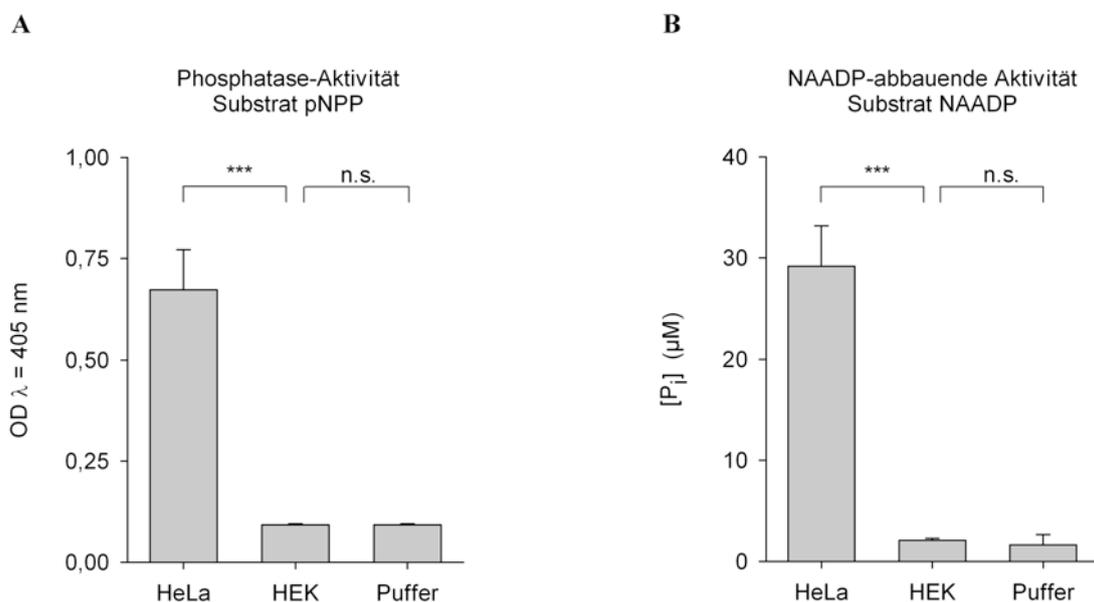


Abb. 4.24: HEK-293-Zellen zeigen keine Aktivität der alkalischen Phosphatase.

(A) 5 µg/ml P10-Präparationen von HEK-293-Zellen bzw. HeLa-Zellen wurden mit 5,5 mM para-Nitrophenylphosphat (pNPP) inkubiert und die Absorption des Reaktionsprodukts bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ bestimmt. Es konnte keine Aktivität der alkalischen Phosphatase in HEK-293-Zellen nachgewiesen werden. (B) 5 µg/ml P10-Präparationen von HEK-293-Zellen bzw. HeLa-Zellen wurden mit 40 µM NAADP für 20 min inkubiert. Die Phosphat-Freisetzung wurde durch den colorimetrischen Malachit-Grün-Assay bestimmt und mit Hilfe eines internen Standards quantifiziert. An HEK-293-Zellen konnte keine Phosphat-Freisetzung aus NAADP nachgewiesen werden. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 4 - 8$). *** $p < 0,001$; n.s. $p > 0,05$ univariante Varianzanalyse.

In den Proben der HEK-293-Zellen wurde mit dem Substrat pNPP eine mittlere OD von 0,09 Einheiten ermittelt (siehe Abb. 4.24A). Kontrollansätze ohne Protein wiesen einen Wert in etwa gleicher Höhe auf. Nachdem die Absorptionen der Kontrolle abgezogen waren, konnte keine Aktivität der alkalischen Phosphatase mehr berechnet werden. Die Funktionalität des Assays wurde durch Analysen an HeLa-Zellen kontrolliert. Hier wurde eine mittlere OD von 0,67 Einheiten gemessen. Die Kalibrierung erfolgte durch eine

Eichgerade mit dem Reaktionsprodukt pNP. Für die Proben der HeLa-Zellen wurde eine Aktivität von 4 nmol/min ermittelt.

Die Enzym-Assays mit dem Substrat NAADP zeigten ein ähnliches Bild. In den Proben der HEK-293-Zellen wurde eine Phosphatkonzentration von $2,31 \mu\text{M} \pm 0,05 \mu\text{M}$ bestimmt (siehe Abb. 4.24B). Dieser Wert war geringfügig höher als die Phosphatkonzentration in Kontrollansätzen ohne Substrat. Die statistische Analyse ergab allerdings, dass dieser kleine Unterschied nicht signifikant war. Auch in diesem Enzym-Assay wurden Proben von HeLa-Zellen mitgeführt. Hier wurde eine Phosphatfreisetzung von $24,17 \mu\text{M} \pm 0,15 \mu\text{M}$ ermittelt, was einer Phosphataseaktivität von 97 nmol/min entspricht. In Enzym-Assays mit den Substraten pNPP und NAADP konnte keine Aktivität der alkalischen Phosphatase in HEK-293-Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden durch RT-PCR und Western Blot überprüft. Es wurden die gleichen Primer und Antikörper wie in Abschnitt 4.3.4.6 verwendet.

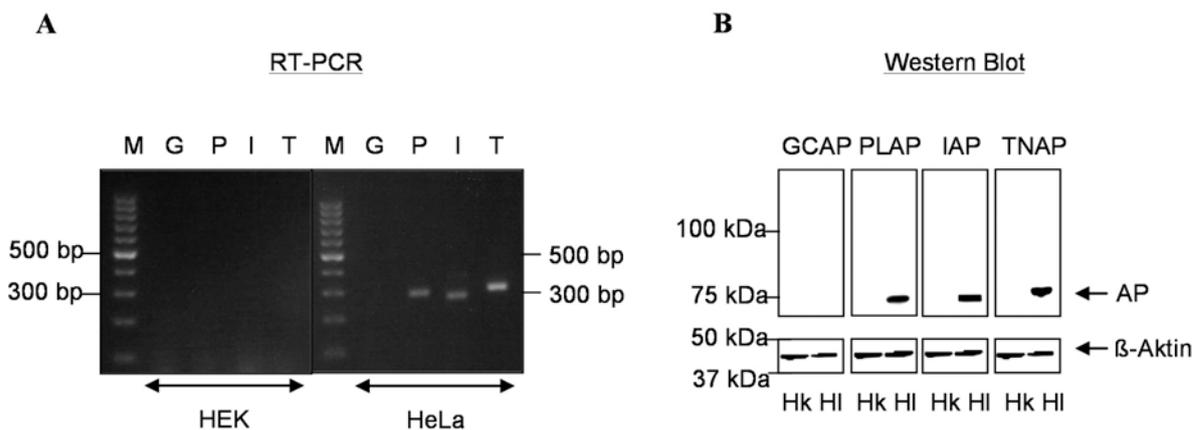


Abb 4.25: Alkalische Phosphatase ist in HEK-293-Zellen nicht nachweisbar.

(A) Aus HEK-293-Zellen bzw. HeLa-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR mit Exon-überspannenden Isotyp-spezifischen Primern durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden über ein 2%-iges Agarosegel aufgetrennt. In HEK-293-Zellen konnte keine mRNA der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. Die Expression der verschiedenen Isoformen der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen konnte bestätigt werden. G: GCAP, P: PLAP, I: IAP, T: TNAP. Marker: Gene ladder 100 bp. (B) Pro Spur wurden 10 μg P10-Präparationen von HEK-293-Zellen (Hk) bzw. HeLa-Zellen (Hl) über ein 10%-iges unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. In HEK-293-Zellen konnte keine Isoform der alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Die Expression der drei Isoformen in HeLa-Zellen wurde verifiziert. Aufgrund der Glykosylierung lag das scheinbare Molekulargewicht der Phosphatasen bei 75 kDa statt 57 kDa. Ein Teil der PVDF-Membran wurde mit einem β -Aktin-spezifischen Antikörper behandelt, um zu zeigen, dass die einzelnen Spuren gleiche Proteinmengen enthielten.

Weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene konnte eine der vier Isoformen der alkalischen Phosphatase in HEK-293-Zellen detektiert werden (siehe Abb. 4.25). HEK-293-Zellen eignen sich also als System für die rekombinante Expression von alkalischer Phosphatase.

4.5.2 Transient mit alkalischer Phosphatase transfizierte HEK-293-Zellen zeigen Phosphatase-Aktivität

Als Expressionsvektor wurde pIRES2-EGFP verwendet. Dieser enthält im Anschluss an den CMV-Promotor und die multiple Klonierungsstelle (MCS) eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), worauf die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) folgt (siehe Abschnitt 3.6.1). Das Zielgen wird exprimiert, ohne dass die Faltung durch an das Protein angeheftete Markierungen beeinträchtigt würde. Gleichzeitig wird EGFP gebildet, wobei sich die EGFP-Fluoreszenz proportional zur Expression des Zielgens verhält. Auf diese Weise ermöglicht die EGFP-Fluoreszenz eine Kontrolle der Transfektion und gibt Aufschluss über die Höhe der Expression.

Die cDNA für die Isoformen TNAP und PLAP wurde aus kommerziell erhältlichen Vektoren durch PCR vervielfältigt. Bei der Amplifikations-Reaktion wurde über den *forward*-Primer eine NheI-Schnittstelle und über den *reverse*-Primer eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt. Dies ermöglichte eine gerichtete Klonierung in den Zielvektor pIRES2-EGFP. HEK-293-Zellen wurden durch Lipofektion mit den Expressionsvektoren transfiziert. Als Kontrolle wurde pIRES2-EGFP ohne Insert mitgeführt.

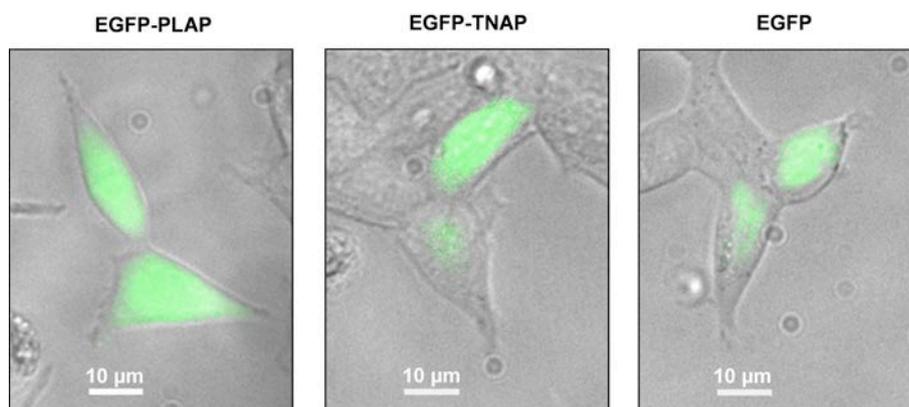


Abb. 4.26: Transient transfizierte HEK-293-Zellen zeigen EGFP-Fluoreszenz.

HEK-293-Zellen wurden mit pIRES2-EGFP-PLAP, pIRES2-EGFP-TNAP bzw. pIRES2-EGFP transfiziert und nach 24 h fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Transfektionseffizienz wurde anhand der EGFP-Fluoreszenz abgeschätzt. Die EGFP-Fluoreszenz verteilt sich gleichmäßig über den Zellkörper. Da EGFP nicht an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist, kann von der EGFP-Fluoreszenz nicht auf die Lokalisation der alkalische Phosphatase geschlossen werden.

24 h nach Transfektion konnte im Mikroskop EGFP-Fluoreszenz in HEK-293-Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.26). Aus dem Anteil der fluoreszierenden Zellen wurde auf die Transfektionseffizienz geschlossen. Diese war je nach Versuchstag recht unterschiedlich (50% - 90%). Im Allgemeinen zeigten mit pIRES2-EGFP-PLAP transfizierte Zellen eine sehr hohe Fluoreszenzintensität und mittlere Transfektionseffizienz. Dagegen wiesen mit pIRES2-EGFP-TNAP transfizierte Zellen meist eine kaum sichtbare Fluoreszenz bei sehr hoher Transfektionseffizienz auf. Bei mit

pIRES2-EGFP transfizierten Kontroll-Zellen wurden mittlere Fluoreszenzintensitäten bei hoher Transfektionseffizienz beobachtet. Da Zielprotein und EGFP vom gleichen Vektor abgelesen werden, sollte die Fluoreszenzintensität das Expressionslevel des Zielproteins widerspiegeln.

Mit Hilfe eines colorimetrischen Enzym-Assays wurde untersucht, ob das rekombinant exprimierte Zielprotein Phosphatase-Aktivität zeigt.

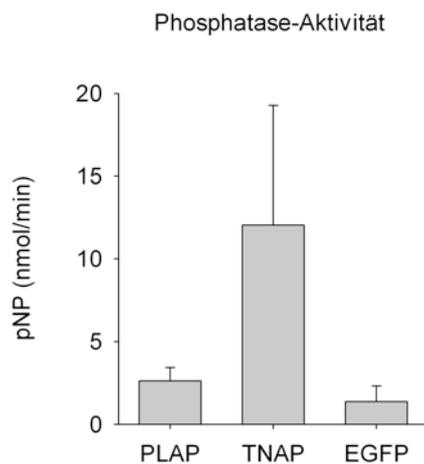


Abb. 4.27: Transient transfizierte HEK-293-Zellen weisen Aktivität der alkalische Phosphatase auf.

HEK-293-Zellen wurden transient mit pIRES2-EGFP-PLAP, pIRES2-EGFP-TNAP bzw. dem Kontrollvektor pIRES2-EGFP transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 5,5 mM para-Nitrophenylphosphat inkubiert und die Absorption des Reaktionsprodukts pNP bei $\lambda = 405$ nm bestimmt. Mit pIRES2-EGFP-PLAP bzw. pIRES2-EGFP-TNAP transfizierte Zellen zeigten Phosphatase-Aktivität. Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$).

HEK-293-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit dem Substrat pNPP inkubiert und die Enzymaktivität bestimmt. Zellen, die mit pIRES2-EGFP-PLAP bzw. pIRES2-EGFP-TNAP transfiziert worden waren, zeigten Phosphatase-Aktivität (siehe Abb. 4.27). In Kontrollzellen (pIRES2-EGFP) hingegen wurden Absorptionswerte im Bereich des Hintergrundes ermittelt. Die Isoformen PLAP und TNAP können demnach als aktive alkalische Phosphatase in HEK-293-Zellen exprimiert werden.

4.5.3 Rekombinant exprimierte alkalische Phosphatase katalysiert den Abbau von NAADP

Um den NAADP-Abbau durch alkalische Phosphatase zu untersuchen, wurden transient transfizierte Zellen mit NAADP inkubiert und die NAAD-Bildung mit Hilfe der HPLC verfolgt.

Beide Isoformen der alkalische Phosphatase waren in der Lage, NAADP zu NAAD zu dephosphorylieren (siehe Abb. 4.28A). Damit konnte der NAADP-Abbau in HeLa-Zellen noch nicht auf eine Isoform eingegrenzt werden. Es wurde versucht, die Zellzahl so einzustellen, dass alle Proben die gleiche EGFP-Fluoreszenz aufwiesen. Damit sollte trotz unterschiedlicher Transfektionseffizienzen eine gleiche Menge Phosphatase pro Ansatz erreicht werden. Fluoreszenzintensität und Phosphatase-Aktivität verhielten sich allerdings nicht direkt proportional zueinander. Dies liegt womöglich daran, dass in Suspension die

EGFP-Fluoreszenz von Zellen mittlerer Expressionstärke und Transfektionseffizienz ungefähr gleich hoch ist, wie die Fluoreszenz von Zellen mit hoher Expressionstärke und schwacher Transfektionseffizienz.

Um herauszufinden, ob eine der Isoformen eine höhere Affinität zum Substrat NAADP hat, wurde der Quotient aus dem Umsatz von NAADP und pNPP berechnet. Je nach Versuchstag zeigte die Isoform PLAP bzw. die Isoform TNAP eine höhere Affinität zum Substrat NAADP. Im Mittel zeigte keine der beiden Isoformen der alkalischen Phosphatase eine eindeutige Präferenz für das Substrat NAADP.

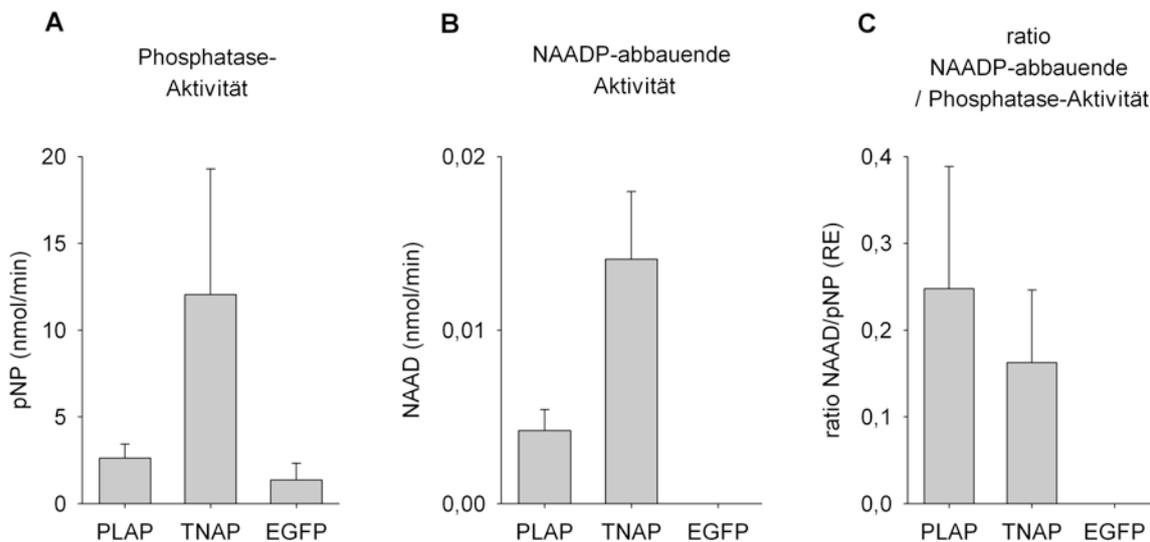


Abb. 4.28: Transient transfizierte HEK-293-Zellen katalysieren den Abbau von NAADP.

HEK-293-Zellen wurden transient mit pIRES2-EGFP-PLAP, pIRES2-EGFP-TNAP bzw. dem Kontrollvektor pIRES2-EGFP transfiziert und nach 24 h untersucht. (A) Die Phosphatase-Aktivität der transfizierten Zellen wurde mit dem Substrat pNPP nachgewiesen (siehe auch Abb. 4.27). (B) Transfizierte Zellen wurden mit 100 μ M NAADP inkubiert und die Produktbildung über 1 h verfolgt. Die NAAD-Bildung wurde über eine C₁₈-HyPURITY-ADVANCE-Säule mittels HPLC analysiert und mit einem internen Standard kalibriert. Mit pIRES2-EGFP-PLAP bzw. pIRES2-EGFP-TNAP transfizierte Zellen zeigen NAADP-abbauende Aktivität. Mit dem Kontrollvektor transfizierte Zellen zeigten keine Bildung von NAAD. (C) Um zu untersuchen, ob eine der rekombinanten alkalischen Phosphatasen NAADP als Substrat bevorzugt, wurde der Quotient aus dem pNPP-Umsatz und dem NAADP-Abbau gebildet. Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm SEM (n = 5).

Die Transfektionsexperimente zeigten, dass die Isoformen PLAP und TNAP den Abbau von NAADP zu NAAD zu katalysieren können. So konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem NAADP-abbauenden Enzym in HeLa-Zellen um eine alkalische Phosphatase handelt.

Die am NAADP-Metabolismus beteiligten Enzyme sind in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen verschieden. Jurkat-T-Lymphozyten exprimieren das Enzym CD38, welches NAADP zu ADPRP und Nikotinsäure umsetzt. CD38 konnte in HeLa-Zellen nicht nachgewiesen werden. In P10-Präparationen von HeLa-Zellen katalysiert die alkalische

Phosphatase den Abbau von NAADP: NAADP wird unter Freisetzung von P_i zu NAAD degradiert. Die alkalische Phosphatase wiederum konnte in Jurkat-T-Lymphozyten nicht detektiert werden. Unterschiedliche Zellsysteme verwenden demnach unterschiedliche Strategien, um den Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoff NAADP abzubauen.

5 Diskussion

Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von NAADP wurde zunächst im Seeigeelei entdeckt (Lee und Aarhus, 1995) und in den Folgejahren in unterschiedlichen Zellen von Mensch (Berg et al., 2000), Tier (Cancela et al., 1999) und Pflanze (Navazio et al., 2000) sowie in Bakterien (Churamani et al., 2004) bestätigt. Im Gegensatz zu den Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffen IP_3 und cADPR, kann NAADP bereits in geringen nanomolaren Konzentrationen ein Ca^{2+} aus dem ER freisetzen (Lee und Aarhus, 1995). Da die endogenen Konzentrationen von NAADP deutlich geringer sind als die der Botenstoffe cADPR und IP_3 , sind zum Nachweis von NAADP wesentlich empfindlichere Methoden erforderlich. Diese experimentellen Schwierigkeiten haben dazu beigetragen, dass die Fragen zu Bildung und Abbau von NAADP noch ungeklärt sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum NAADP-Metabolismus in Jurkat-T-Lymphozyten sowie in HeLa-Zellen durchgeführt. In beiden Zelllinien wurden Enzyme identifiziert, welche NAADP degradieren können und so einen möglichen Abbauweg für NAADP darstellen. Um die Untersuchungen durchführen zu können, wurde zunächst eine Methode zur Quantifizierung des Substrats NAADP und der gebildeten Abbauprodukte erarbeitet. Zudem wurde die intrazelluläre NAADP-Konzentration in HeLa-Zellen vor und nach Stimulation mit Carbachol bestimmt. Auch hierzu musste eine geeignete Methode gewählt werden.

5.1 Methoden zur Quantifizierung von NAADP

Zur Quantifizierung von NAADP stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Der Nachweis von NAADP gelang erstmals mit Hilfe des Radio-Rezeptor-Assays, wobei man sich die Bindung von NAADP an natürliche NAADP-Bindestellen des Seeigeeleis zu Nutze machte (Patel et al., 2000). Ferner wurde ein fluorimetrischer, Enzym-gekoppelter Assay entwickelt, bei dem das Signal durch eine zyklische Amplifikationsreaktion verstärkt wurde (Graeff und Lee, 2002). Das Prinzip des Cycling-Assays wurde in den Folgejahren optimiert und abgewandelt (Gasser et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007). Die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methoden werden im Folgenden kurz beschrieben.

5.1.1 Quantifizierung von NAADP durch den Radio-Rezeptor-Assay

Der Radio-Rezeptor-Assay ist bis heute die am häufigsten verwendete Methode und weist die höchste Empfindlichkeit auf (Patel et al., 2000; Lewis et al., 2007). Bei dieser Methode werden zunächst die Zellen aufgeschlossen und die Zellextrakte einer chromatographischen Reinigung unterzogen. Anschließend werden die Extrakte mit Homogenaten aus Seeigeelei inkubiert, so dass das in den Extrakten enthaltene NAADP mit den natürlichen NAADP-Bindestellen des Seeigeeleis irreversible Bindungen eingeht. Nun wird eine definierte Menge [P^{32}]-NAADP zu den Ansätzen hinzugegeben, wodurch die übrigen Bindestellen abgesättigt werden. Ungebundenes [P^{32}]-NAADP wird entfernt und die Proben werden im Szintillationszähler vermessen. Je mehr NAADP in den Extrakten enthalten ist, desto weniger [P^{32}]-NAADP wird im Szintillationszähler detektiert. Wird nach dem gleichen Prinzip eine Eichkurve erstellt, so kann die endogene NAADP-Konzentration in den Zellen errechnet werden. 40 fmol NAADP sind mit dieser Methode gerade noch nachweisbar (Patel et al., 2000).

Um die Empfindlichkeit der NAADP-Bestimmung zu erhöhen und die Durchführung zu beschleunigen, wurde der Radio-Rezeptor-Assay weiterentwickelt (Lewis et al., 2007). Nach der neueren Methode werden die Zellen vor der Messung in Medium mit Kaliumacetat gehalten, da K^+ die Bindung von NAADP an die natürlichen Bindestellen des Seeigeeleis um etwa das Dreifache erhöht (Lewis et al., 2007). Außerdem werden die Zellen mit dem membranpermeablen Ca^{2+} -Chelator 1,2-Bis(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraacetatsäure-Acetomethylester (BAPTA-AM) inkubiert. Auf diese Weise soll der Abbau von NAADP durch Ca^{2+} -aktivierbare Enzyme während der Probenaufbereitung unterdrückt werden. Aufgrund des Aufschlusses der Zellen mit Perchlorsäure und der anschließenden Neutralisation mit Kaliumhydrogencarbonat kann auf die chromatographische Aufreinigung der Zellextrakte verzichtet werden. Dies verhindert Verluste durch den Reinigungsschritt und ermöglicht zusätzlich eine schnellere Durchführung des Experiments. Ferner erfolgt die Bestimmung der Radioaktivität nicht mehr mit dem Szintillationszähler, sondern durch digitale Radiographie, was die Erzeugung von radioaktivem Abfall vermindert. Der Radio-Rezeptor-Assay ist spezifisch für NAADP und wird nicht durch endogene Adeninnukleotide wie NAD, NAAD, NADP, NADPH oder cADPR beeinträchtigt. Dies vereinfacht die Probenvorbereitung. Der wichtigste Vorteil der Methode besteht in der hohen Empfindlichkeit. Das Detektionslimit liegt hier bei 100 amol NAADP. Allerdings ist der Nachweis trotz der Weiterentwicklung des Assays mit großem Aufwand verbunden: So müssen vor allem genügend Seeigel gehalten werden, um eine kontinuierliche Versorgung mit Seeigeeiern zu ermöglichen. Außerdem könnten Enzyme, die in den Seeigeelei-Homogenaten enthalten sind, NAADP metabolisieren und so die NAADP-Bestimmung verfälschen. Zudem muss für den Assay [P^{32}]-NAADP in einer zweistufigen Reaktion hergestellt und über HPLC gereinigt werden.

5.1.2 Quantifizierung von NAADP durch fluorimetrische Cycling-Assays

Eine Alternative stellen fluorimetrische Enzym-gekoppelte NAADP-Cycling-Assays dar. Allen diesen Assays ist gemeinsam, dass zunächst Adeninnukleotide wie NAD, NAAD oder NADP aus den Proben entfernt werden müssen. Dies erfolgt durch Vorbehandlung der Proben mit hydrolytischen Enzymen. Zudem müssen Zellextrakte meist vor der Analyse chromatographisch aufgereinigt werden.

2002 wurde der erste Assay dieser Art veröffentlicht (Graeff und Lee, 2002). Durch mehrere enzymatisch katalysierte Reaktionen wird in einem zellfreien System ein NAADP-abhängiges Fluoreszenzsignal generiert. Dabei wird zunächst NAADP zu NAAD dephosphoryliert und anschließend durch die Nikotinamidmononukleotid-Adenylyltransferase (NMN-AT) zu NAD umgewandelt. Dann wird NAD unter Verbrauch von Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase zu NADH reduziert. Die Oxidation von NADH zu NAD erfolgt durch die Diaphorase, welche im gleichen Schritt Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin reduziert. NAD wird in einer zyklischen Reaktion reduziert und wieder oxidiert, was zur Anreicherung des fluoreszierenden Indikators Resorufin und damit zur Verstärkung des Signals führt. Ein Molekül NAD kann innerhalb einiger Stunden zur Bildung von ca. 1000 Molekülen des Indikators Resorufin führen (Graeff und Lee, 2002). Mit Hilfe dieses NAADP-Cycling-Assays ist die Quantifizierung von nanomolaren Konzentrationen NAADP möglich. Allerdings ist die NMN-AT nicht kommerziell erhältlich, sondern muss aus Schweineleber extrahiert und aufgereinigt werden (Magni et al., 1997). Zudem müssen die Proben über Nacht mit hydrolytischen Enzymen vorbehandelt werden, um eine Beeinträchtigung des Assays durch Adeninnukleotide wie NAD, NAAD, oder cADPR zu verhindern. Das Detektionslimit des Assays liegt bei 900 fmol NAADP. Daher wurde mit dieser Methode bisher nur die NAADP-Konzentration in NAADP-Standards, nicht aber in Zellen bestimmt.

Eine Variation des NAADP-Cycling-Assays wurde von Yamaguchi entwickelt (Yamaguchi et al., 2007). In diesem Assay wird NAADP zunächst, wie in dem von Graeff und Lee beschriebenen Assay, zu NAAD dephosphoryliert. NAAD wird dann durch eine bakterielle NAD-Synthetase zu NAD umgesetzt. Zur Amplifikationsreaktion werden Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Diaphorase eingesetzt. NAD wird unter Verbrauch von Glucose-6-Phosphat zu NADH reduziert. Bei der Oxidation von NADH zu NAD durch die Diaphorase wird das farblose p-Iodonitrotetrazolium-Violett reduziert, so dass das rote p-Iodonitrotetrazolium-Formazan entsteht. Der colorimetrische Nachweis ist mit einem Detektionslimit von 4 pmol deutlich weniger empfindlich als der von Graeff vorgestellte fluorimetrische Nachweis (Graeff und Lee, 2002) und diente bisher nur der Quantifizierung von NAADP-Standards. Für die Bestimmung von NAADP in Zellextrakten reicht die Empfindlichkeit des Assays nicht aus.

Der einzige NAADP-Cycling-Assay mit dem die NAADP-Konzentration von Zellen bestimmt werden konnte, wurde 2006 veröffentlicht (Gasser et al., 2006). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Assays wird hier NAADP durch die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* mit einem Überschuss von Nikotinamid zu NADP umgesetzt (siehe

Abb. 5.1). Zur Amplifikation werden die gleichen Enzyme wie in dem von Yamaguchi beschriebenen Assay verwendet (Yamaguchi et al., 2007). Als Indikator hingegen dient das von Graeff eingesetzte Resorufin (Graeff und Lee, 2002). Bei dem NAADP-Cycling-Assay nach Gasser wird NADP unter Verwendung von Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu NADH reduziert. NADH wiederum wird durch die Diaphorase zu NAD oxidiert, wobei im gleichen Schritt das farblose Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Mit diesem Assay konnten bis zu 25 fmol NAADP in den Proben nachgewiesen werden (Gasser et al., 2006). Zum Zeitpunkt der Entwicklung des Assays waren alle verwendeten Enzyme kommerziell verfügbar. Allerdings wurde inzwischen der Vertrieb der NADase aus *Neurospora crassa*, welche essentiell für die Vorbehandlung der Proben ist, eingestellt.

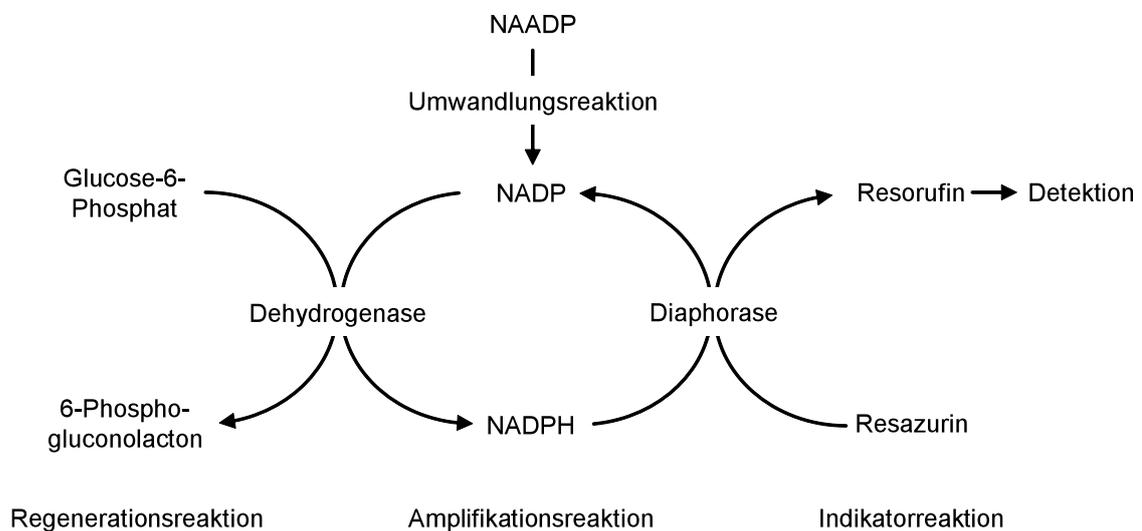


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des NAADP-Cycling-Assays.

NAADP kann durch einen zyklischen Enzym-Assay nachgewiesen werden. Hierzu wird das in den Proben enthaltene NAADP durch die ADP-Ribosylcyclase zu NADP umgesetzt. Das entstandene NADP wird durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase unter Verbrauch von Glucose-6-Phosphat reduziert. Durch die Diaphorase wird das Nukleotid wieder oxidiert. Im gleichen Schritt wird Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin reduziert, dessen Entstehung im Fluoreszenz-Photometer detektiert wird. Durch den zyklischen Aufbau des Assays kann ein Molekül NAADP zur Bildung von bis zu 1000 Resorufinmolekülen führen, was eine starke Amplifikation des Signals bewirkt (Graeff und Lee, 2002). (Abb. verändert nach Gasser et al., 2006).

Der Vorteil aller NAADP-Cycling-Assays besteht darin, dass sie in einem zellfreien System durchgeführt werden können und trotz des Verzichts auf radioaktive Nachweismethoden eine relativ hohe Empfindlichkeit aufweisen. Nachteilig wirkt sich aus, dass NAADP in Cycling-Assays nur indirekt vermessen werden kann. Zudem nimmt die Quantifizierung aufgrund der Probenvorbereitung und der Amplifikationsreaktion teilweise bis zu drei Tage in Anspruch.

Zur Quantifizierung von intrazellulären NAADP-Konzentrationen sind lediglich der Radio-Rezeptor-Assay sowie der NAADP-Cycling-Assay nach Gasser geeignet, da nur mit diesen Methoden eine ausreichend hohe Empfindlichkeit erreicht werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der NAADP-Cycling-Assay nach Gasser für die NAADP-Bestimmungen gewählt, vor allem weil die verwendeten Enzyme im Gegensatz zu Seeigel-Homogenaten in kontrollierter Qualität kommerziell erhältlich waren. Zudem konnte durch den fluorimetrischen Assay eine radioaktive Nachweismethode und die damit verbundene radioaktive Strahlung vermieden werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit dem NAADP-Cycling-Assay nach Gasser die NAADP-Konzentration in HeLa-Zellen vor und nach Stimulation mit Carbachol bestimmt. Für einen Messpunkt wurden dabei $1 \cdot 10^8$ HeLa-Zellen verwendet. Ein Teil-Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Konzentrations-Wirkbeziehung für den Stimulus Carbachol herauszuarbeiten. Die NAADP-Bestimmungen mussten aber eingestellt werden, da die Versorgung mit dem für den Assay essentiellen Enzym NADase aus *Neurospora crassa* nicht mehr gewährleistet war. Um die Quantifizierung intrazellulärer NAADP-Konzentrationen wieder aufzunehmen, müsste entweder der NAADP-Cycling-Assay modifiziert oder das notwendige Enzym selbst hergestellt werden. Zudem könnte eine Weiterentwicklung der im Folgenden beschriebenen Methoden eine schnellere Quantifizierung ermöglichen.

5.1.3 Quantifizierung von NAADP durch SERS

Als neuartiger Ansatz zur Quantifizierung von NAADP gilt die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (*surface enhanced raman spectroscopy*, SERS) (Vitol et al., 2010). Sie verspricht die direkte Vermessung von Proben ohne chromatographische Aufreinigung und enzymatische Umwandlungsreaktionen, wodurch eine deutliche Zeit- und Materialersparnis erzielt wird. Bei dieser Methode werden wenige Mikroliter der Probe auf eine mit Gold beschichtete Glasoberfläche aufgebracht und im Raman-Spektrometer vermessen. Es konnte gezeigt werden, dass NAADP ein charakteristisches SERS-Spektrum aufweist und von Adeninnukleotiden wie NAD, NADP und cADPR unterschieden werden kann. Das Detektionslimit für NAADP-Standards beträgt 20 fmol (Vitol et al., 2010). Ferner konnte beobachtet werden, dass die Stimulation von Zellen eine Veränderung der SERS-Spektren bewirkt, welche wahrscheinlich auf den Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration zurückzuführen sind. Die vorgestellte Methode dient zunächst nur als Beweis, dass die Bestimmung von NAADP durch SERS grundsätzlich möglich ist. Um NAADP aus Zellextrakten quantifizieren zu können, müsste die Methode noch weiterentwickelt werden.

5.1.4 Quantifizierung von NAADP durch HPLC-Analytik

Eine weitere Möglichkeit, die NAADP-Konzentration zu bestimmen, stellt die HPLC-Analytik dar. Mit Hilfe der Ionenpaar-RP-HPLC können Nukleotide analysiert werden, wobei das Detektionslimit meist bei 5 - 10 pmol liegt (Werner, 1993). Die Sensitivität der Methode kann durch Verwendung von fluoreszierenden Nukleotiden wie beispielsweise Etheno-Derivaten erhöht werden, so dass bis zu 500 fmol Nukleotid nachgewiesen werden können (Gasser, 2005; Ohkura et al., 1994). Allerdings ist diese Methode nur für enzymkinetische Untersuchungen zum Metabolismus von Nukleotiden sinnvoll, bei denen das Etheno-Nukleotid das natürliche Nukleotid ersetzt. Für die Bestimmung von NAADP aus Zellextrakten kann diese Methode nicht angewendet werden, da es nicht möglich ist, spezifisch NAADP aus Zellextrakten mit einem Fluorophor zu markieren. Zudem ist die Methode mit einem Detektionslimit von 500 fmol NAADP noch nicht empfindlich genug. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ionenpaar-RP-HPLC weiter entwickelt, so dass 200 fmol – 1 pmol der natürlichen Nukleotide NAAD bzw. NAADP nachgewiesen werden konnten. Der Vorteil der HPLC-Analytik besteht vor allem darin, dass die Nukleotide direkt gemessen werden können. Dadurch entfallen die oben beschriebenen Komplikationen des Radio-Rezeptor-Assays und der NAADP-Cycling-Assays wie die Haltung von Seeigeln, die Aufreinigung hydrolytischer Enzyme und die Umwandlungsreaktionen (siehe Abschnitte 5.1.1 und 5.1.2). Außerdem können mit Hilfe der HPLC-Analytik viele endogene Adeninnukleotide wie cADPR, NAD, NADP und NAADP analysiert werden. Der Radio-Rezeptor-Assay hingegen ist ausschließlich zur Detektion von NAADP geeignet (Patel et al., 2000). Die Cycling-Assays weisen ein etwas weiteres Spektrum auf. So sind Cycling-Assays für die Quantifizierung einer Reihe von Nukleotiden wie NAD (Kato et al., 1973), NADP (Stephon et al., 1992), cADPR (Graeff und Lee, 2002) und NAADP (Graeff und Lee, 2002; Gasser et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007) bekannt. Allerdings muss das nachzuweisende Nukleotid im Regelfall zu NAD oder NADP umgesetzt werden, so dass für jede Anwendung ein eigener Assay mit individuellem Enzymmix entworfen werden muss. Dagegen können mit einer HPLC-Methode verschiedene Nukleotide und sogar verschiedene Nukleotide gleichzeitig analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der enzymatische Abbau von nanomolaren Konzentrationen NAADP verfolgt und die Bildung von 200 fmol – 1 pmol des Produkts NAAD durch HPLC-Analytik vermessen. Zudem wurde mit dieser Methode eine Kinetik nach Michaelis und Menten für den Abbau von NAADP zu NAAD aufgenommen. Zur Quantifizierung zellulärer NAADP-Konzentrationen wurde die HPLC-Analytik bisher noch nicht eingesetzt. Um die endogene NAADP-Konzentration in Jurkat-T-Lymphozyten oder HeLa-Zellen nachzuweisen, müsste die Nachweismethode ein Detektionslimit von 100 fmol erreichen (Gasser, 2005). Es wäre also eine Weiterentwicklung der Methode notwendig, welche die Empfindlichkeit der Nachweismethode erhöht. Eine Möglichkeit bestünde darin, die Probenaufbereitung effizienter zu gestalten, so dass mehr NAADP aus der Probe auf die HPLC-Säule

aufgetragen werden kann. Bei der chromatographischen Aufreinigung der Proben für den NAADP-Cycling-Assay nach Gasser wird jede Probe in drei Fraktionen aufgeteilt, die NAADP-Konzentration getrennt bestimmt und anschließend die Summe gebildet (siehe Abschnitt 3.4.2). Würden diese drei Fraktionen vereinigt und gemeinsam analysiert, so wäre das Signal dreimal so hoch und könnte mit einer etwas weniger empfindlichen Methode erfasst werden. Des Weiteren werden die Proben bei dem NAADP-Cycling-Assay nach Gasser auf ein Volumen von 1,5 ml eingestellt (siehe Abschnitt 3.4.4). Würde man die Proben dagegen auf ein Volumen von nur 300 μ l reduzieren, so würde man die Konzentration und damit die Signalstärke um das Fünffache erhöhen.

Der NAADP-Cycling-Assay nach Gasser war in der Calcium Signaling Group am IBM I des UKE lange Zeit die Methode der Wahl, um intrazelluläre NAADP-Konzentrationen zu bestimmen. Allerdings ist das Enzym NADase, welches essentiell für die Vorbehandlung der Proben ist, nicht mehr kommerziell erhältlich. Durch Optimierung der HPLC-Analytik und der Probenvorbereitung könnte eine Alternative zum NAADP-Cycling-Assay geschaffen werden. Mit der neuen Methode wäre die Quantifizierung von NAADP langfristig unabhängig von der Verfügbarkeit hydrolytischer Enzyme.

5.1.5 Quantifizierung von Botenstoffen durch FRET

Die oben beschriebenen Methoden erlauben nur eine Endpunktbestimmung der zellulären NAADP-Konzentration. Es wäre aber interessant, die NAADP-Konzentration in der Zelle in Echtzeit zu verfolgen. Für andere Botenstoffe sind fluoreszente oder lumineszente Indikatoren bekannt, welche die Veränderung der Konzentration des Botenstoffs sichtbar werden lassen und eine Beobachtung dieser Veränderung im Mikroskop in Echtzeit ermöglichen. Der erste Indikator zur Verfolgung des Ca^{2+} -Signals war Cameleon (Miyawaki et al., 1997). Dieser Indikator ist ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin und der Ca^{2+} /Calmodulin-bindenden Domäne der Myosin leichte Kettenkinase (M13 Domäne), welches an einem Ende das blaue Fluoreszenzprotein (*cyan fluorescent protein*, CFP) und am anderen Ende das gelbe Fluoreszenzprotein (*yellow fluorescent protein*, YFP) trägt (Miyawaki et al., 1997). Steigt die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle, so bindet Ca^{2+} an Calmodulin, was wiederum die Anlagerung der M13-Domäne nach sich zieht. Dies induziert eine Konformationsänderung des Fusionsproteins, so dass CFP und YFP in räumliche Nähe gelangen. Wird nun das CFP durch Licht der Wellenlänge $\lambda = 440$ nm angeregt, so wird die Anregungsenergie auf YFP übertragen. Das von YFP emittierte Signal kann dann detektiert werden. CFP fungiert in diesem System als Fluoreszenz-Donor, während YFP die Rolle als Fluoreszenz-Akzeptor einnimmt. Dieses Phänomen wird Förster-Resonanzenergietransfer oder auch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) genannt (Lottspeich und Engels, 2008). Der Energietransfer kann nur stattfinden, wenn CFP und YFP nah genug beieinander sind. Der ideale Abstand beträgt im Regelfall 5 - 10 nm. Wird im Experiment Emission durch YFP detektiert, so bedeutet dies im Umkehrschluss, dass sich CFP und YFP in räumlicher Nähe

zueinander befinden und die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle gestiegen ist (Miyawaki et al., 1997).

Basierend auf diesem Prinzip wurden eine Reihe von Indikatoren zum Nachweis von Botenstoffen wie beispielsweise zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (Adams et al., 1991), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (Sato et al., 2000), Diacylglycerol (Oancea et al., 1998) und IP_3 (Tanimura et al., 2004) entwickelt. Die Methode ermöglicht es, den jeweiligen Botenstoff in der lebenden Zelle zu visualisieren und auch lokale Änderungen der Botenstoff-Konzentration zu beobachten. Essentiell für die FRET-basierten Indikatoren ist die Expression einer spezifischen Bindedomäne für den nachzuweisenden Botenstoff. So wurde beispielsweise für den FRET-basierten IP_3 -Indikator die IP_3 -Bindedomäne des IP_3 -Rezeptors verwendet (Tanimura et al., 2004). Allerdings ist die NAADP-Bindedomäne des NAADP-Rezeptors noch nicht bekannt. Als NAADP-Rezeptoren kommen TPCs und Ryanodinrezeptoren in Frage. Studien mit dem klein-molekularen NAADP-Antagonisten Ned-19 deuten darauf hin, dass dieser spezifisch an TPC bindet und auch dazu verwendet werden kann, die Lokalisation von TPC in der Zelle zu markieren (Naylor et al., 2009). Zudem zeigen die Untersuchungen mit Ned-19, dass TPC zwei Bindestellen für NAADP besitzt: Eine hoch affine Bindestelle, welche eine schnelle Inaktivierung des Kanals vermittelt und eine niedrig affine Bindestelle, welche die schnelle Öffnung des Kanals induziert (Rosen et al., 2009). Die molekulare Identifikation der Bindestelle ist aber bisher noch nicht gelungen. Der zweite NAADP-Rezeptor ist der Ryanodinrezeptor. Elektrophysiologische Studien zeigen, dass die Bindung von NAADP an den Ryanodinrezeptor I die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöht (Hohenegger et al., 2002). Des Weiteren steigert NAADP die Anlagerung von Ryanodin an den Ryanodinrezeptor I (Dammermann et al., 2009). Da der Ryanodinrezeptor nur im offenen Zustand Ryanodin binden kann, dienen diese Bindungsstudien als Nachweis für die Öffnung des Kanals (Pessah et al., 1986). Der NAADP-Antagonist BZ194 vermindert die NAADP-induzierte Öffnung des Ryanodinrezeptors (Dammermann et al., 2009). Möglicherweise binden NAADP und BZ194 an die gleiche oder an nah beieinander liegende Bindestellen am Ryanodinrezeptor. NAADP-Antagonisten wie BZ194 könnten zur Aufklärung der NAADP-Bindestelle am Ryanodinrezeptor beitragen. Über den Ryanodinrezeptor ist außerdem bekannt, dass die Offenwahrscheinlichkeit durch die 12-kDA-FK506-Bindeproteine FKBP12 und FKBP12.6 reguliert wird. Die Bindeproteine dienen wahrscheinlich dazu, den Ryanodinrezeptor im geschlossenen Zustand zu halten (Brillantes et al., 1994). Die Bindung von cADPR verdrängt FKBP12.6 vom Ryanodinrezeptor und ermöglicht damit eine Öffnung des Kanals (Noguchi et al., 1997; Tang et al., 2001). Es wäre möglich, dass die Wirkung von NAADP auf den Ryanodinrezeptor ebenso durch Verdrängung der Bindeproteine vermittelt wird. Die Bindestelle von FKBP12 bzw. FKBP12.6 am Ryanodinrezeptor I bzw. II wird intensiv untersucht (Xin et al., 1999; Lee et al., 2004; Samsó et al., 2006; Cornea et al., 2010) und könnte Hinweise auf eine NAADP-Bindestelle ergeben. Wäre die NAADP-Bindestelle

bekannt, so könnte diese als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines FRET-basierten Indikators für NAADP dienen.

5.2 Enzymologie von CD38

In der vorliegenden Arbeit wurde der NAADP-Metabolismus in Jurkat-T-Lymphozyten untersucht. Dabei lag der Fokus auf dem Ektoenzym CD38. Um Einblick in die Rolle von CD38 für den NAADP-Metabolismus zu gewinnen, wurden enzymatische Studien mit Wildtyp- und CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten durchgeführt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der Zellversuche durch rekombinant exprimiertes CD38 bestätigt. CD38 ist ein multifunktionelles Enzym, das NAD-Glykohydrolase-, ADP-Ribosylcyclase-, cADPR-Hydrolase- sowie NAADP-Hydrolase-Aktivität besitzt (siehe Abb. 5.2).

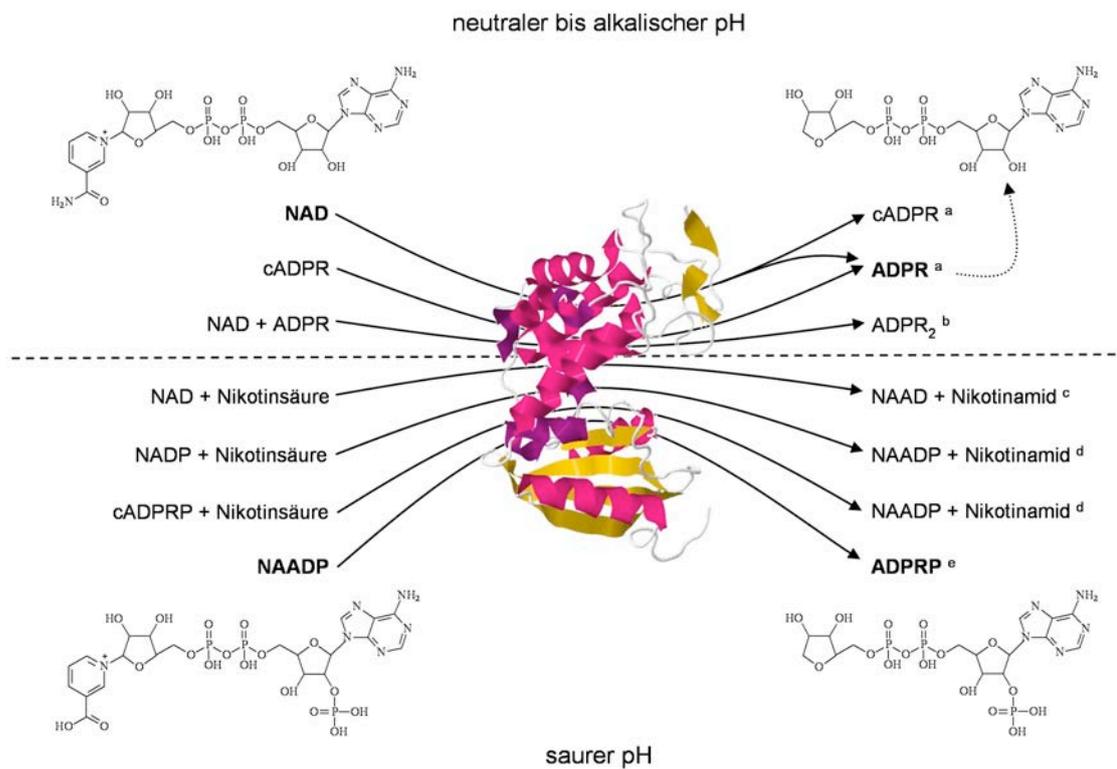


Abb. 5.2: Übersicht der durch CD38 katalysierten Reaktionen.

Das multifunktionelle Enzym CD38 ist in der Lage, verschiedene Nukleotide umzusetzen. CD38 kann sowohl Ca²⁺-mobilisierende Botenstoffe bilden als auch abbauen. ^a Howard et al., 1993; ^b De Flora et al., 1997; ^c Moreschi et al., 2006; ^d Aarhus et al., 1995; ^e Graeff et al., 2006. 3D-Struktur des CD38-Monomers von www.pdb.com.

Wird NAD als Substrat eingesetzt, so entstehen unter Abspaltung der Nikotinamid-Gruppe die Ca^{2+} -mobilisierenden Botenstoffe cADPR bzw. ADPR. Da CD38 auch cADPR-Hydrolase-Aktivität besitzt, kann auch cADPR in ADPR überführt werden (Howard et al., 1993). Werden dagegen NAD oder NADP in Gegenwart eines Überschusses an Nikotinsäure in die Reaktion eingesetzt, so katalysiert CD38 die so genannte Basenaustauschreaktion: Hierbei wird die Nikotinamid-Gruppe von NAD bzw. NADP gegen die Nikotinsäure ausgetauscht, so dass NAAD bzw. NAADP entstehen (Aarhus et al., 1995). Ebenso kann die Nikotinamid-Gruppe von NAD durch ADPR ersetzt werden, so dass dimeres ADPR entsteht (De Flora et al., 1997). Eine weitere Variation der Basenaustauschreaktion ist die Inkubation von 2'-Phospho-cADPR (cADPRP) mit einem Überschuss Nikotinsäure, welche die Bildung von NAADP zur Folge hat (Moreschi et al., 2006). Zudem kann CD38 NAADP zu ADPRP hydrolysieren (Graeff et al., 2006), was den Abbau des Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffs zur Folge hat. CD38 kann also zum einen Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoffe generieren, zum anderen aber auch Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoffe abbauen. Im Folgenden werden die CD38-katalysierten Reaktionen detaillierter beschrieben.

5.2.1 Hydrolyse von NAD durch CD38

In eigenen Arbeiten wurde zunächst die NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38 untersucht. Diese Experimente dienten gleichzeitig zum Nachweis, dass die CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine deutlich reduzierte Expression von CD38 aufwiesen.

Wie bereits erwähnt, katalysiert CD38 die Hydrolyse von NAD, wobei cADPR und ADPR entstehen. CD38 bildet vor allem ADPR (97-99% des Produkts) (Howard et al., 1993; Schubert und Lund, 2004), während die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* das Substrat NAD hauptsächlich zu cADPR umsetzt (Lee und Aarhus, 1991). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von CD38 und der ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica*, so finden sich zehn konservierte Cysteinreste (States et al., 1992). Drei weitere Cysteinreste sind ausschließlich in CD38 von Säugern vorhanden und nicht in der ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* (Tohgo et al., 1994). Führt man zwei der entsprechenden Cysteinreste in die Sequenz der ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* ein, so erlangt diese cADPR-Hydrolase-Aktivität. cADPR und ADPR werden nun mit fast gleicher Umsatzgeschwindigkeit gebildet (Tohgo et al., 1994). Im Gegenzug führt die Mutation der beiden Cysteinreste C119 und C201 in CD38 zum Verlust der cADPR-Hydrolase-Aktivität, so dass aus dem Substrat NAD fast ausschließlich cADPR gebildet wird (Tohgo et al., 1994). Auch durch andere Mutationen kann das Produktverhältnis von cADPR:ADPR verschoben werden. Durch Punktmutationen im TLEDTL-Motiv von CD38 kann eine bis zu 70-fache Zunahme der Cyclase-Aktivität induziert werden (Lund et al., 1999). Die Doppelmutation T221F/E146A führt dazu, dass NAD durch CD38 zu 94% zu cADPR umgesetzt wird und kaum noch ADPR entsteht

(Graeff et al., 2009). Diese Studien weisen darauf hin, dass nur wenige Aminosäurereste darüber entscheiden, ob das Enzym vornehmlich Cyclase- oder Hydrolase-Aktivität zeigt. Der zugrunde liegende katalytische Mechanismus scheint bei CD38 und der ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* sehr ähnlich zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass zunächst ein CD38-ADP-Ribosyl-Zwischenprodukt gebildet wird. Ist das aktive Zentrum für H₂O gut zugänglich, so wird das Zwischenprodukt hydrolysiert und ADPR freigesetzt. Ist dies hingegen nicht der Fall, so findet ein intramolekularer Angriff statt und cADPR wird gebildet (Schuber und Lund, 2004).

Ein Vergleich der spezifischen Aktivität von CD38 und der ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* ist nur bedingt möglich, da die ermittelten Werte von Publikation zu Publikation sehr unterschiedlich ausfallen. In einer Studie, in der die beiden Enzyme direkt miteinander verglichen wurden, zeigte die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* mit 500 µmol/mg/min eine ca. fünffach höhere spezifische Aktivität als CD38 (98 µmol/mg/min) (Graeff et al., 1994). Der K_m-Wert für humanes CD38 liegt bei 11 – 14 µM (Graeff et al., 1994; Graeff et al., 2009), während für die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* ein K_m-Wert von ca. 40 µM bestimmt wurde (Cakir-Kiefer et al., 2000; Graeff et al., 1994). Die spezifische Aktivität für die Hydrolyse von NAD durch humanes CD38 reicht von 700 µmol/mg/min (Aarhus et al., 1995) bis 81 nmol/mg/min (Graeff et al., 2009). Diese Ergebnisse wurden mit humanem CD38 erzielt, welches in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert wurde. Dagegen wurde für die eigenen Experimente humanes CD38 in *E.coli* bzw. HEK-293-Zellen hergestellt. Die in der Literatur veröffentlichten Werte wurden durch die Quantifizierung der ADPR-Bildung über HPLC erzielt. In eigenen Experimenten wurde die Aktivität von CD38 mit Hilfe eines fluorimetrischen Assays untersucht, bei dem die Hydrolyse von 1,N⁶-etheno-NAD zum fluoreszierenden 1,N⁶-etheno-ADPR bestimmt wurde (siehe Abschnitt 3.8.1). So wurde für das rekombinant exprimierte CD38 eine spezifische Aktivität von 390 nmol/mg/min bestimmt. Damit liegt die ermittelte Aktivität von CD38 im unteren Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38 in P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten mit dem Substrat 1,N⁶-etheno-NAD bestimmt. Es wurde eine spezifische Aktivität von 2,27 nmol/mg/min ermittelt, die durch den CD38-*knock down*-Ansatz auf 0,27 nmol/mg/min gesenkt werden konnte (siehe Tab. 4.1). Damit war bewiesen, dass die CD38-Expression in den CD38-*knock down*-Zellen deutlich reduziert war. Die Reduktion im Bezug auf den Wildtyp betrug 88%. Auch in der Literatur ist die NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38 in Zellextrakten beschrieben. So wurde beispielsweise in NGM-Zellen eine spezifische Aktivität von 0,3 nmol/mg/min gemessen, die durch Überexpression von CD38 auf 0,8 nmol/mg/min gesteigert werden konnte (Higashida et al., 2007). Diese Werte erscheinen im Hinblick auf die eigenen Ergebnissen recht niedrig. Der Grund dafür ist die hohe Expression von CD38 in den untersuchten Wildtyp-Jurkat-T-Lymphozyten. Vergleicht man die Aktivität des isolierten Enzyms CD38 mit der Aktivität der P10-Präparationen, so ergibt sich ein

rechnerischer Anteil von ca. 0,6% CD38 am Gesamtprotein der P10-Präparationen (ca. 6µg CD38/mg Gesamtprotein).

5.2.2 Katalyse der Basenaustauschreaktion durch CD38

Um Hinweise zur Bedeutung von CD38 für den NAADP-Metabolismus zu erhalten, wurde die NAADP-bildende Aktivität in Wildtyp- und CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten bestimmt. Die NAADP-Bildung erfolgt über die Basenaustauschreaktion, eine Reaktion, welche sowohl durch CD38 als auch durch die ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia californica* katalysiert werden. Bei dieser Reaktion wird zunächst die Nikotinamid-Gruppe von NAD abgespalten und ein CD38-ADP-Ribosyl-Zwischenprodukt gebildet. Bei saurem pH-Wert kann anstelle von H₂O Nikotinsäure als Reaktionspartner eintreten, so dass NAAD entsteht (Aarhus et al., 1995). Werden NADP und Nikotinsäure zur Reaktion eingesetzt, so wird durch die Basenaustauschreaktion NAADP gebildet. Auch das im ersten Zwischenschritt der Basenaustauschreaktion abgespaltene Nikotinamid kann als Reaktionspartner dienen. Um die Rückreaktion zu vermeiden, ist ein mindestens fünffacher Überschuss an Nikotinsäure in Bezug auf NAD bzw. NADP notwendig. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei einem pH-Wert von 4 (Aarhus et al., 1995). Ist der pH-Wert zu hoch oder die Nikotinsäure-Konzentration zu gering, so findet anstelle der Basenaustauschreaktion die Hydrolyse des Substrats statt.

Die spezifische Aktivität von CD38 für die Bildung von NAADP aus den Substraten NADP und Nikotinsäure wird von Aarhus mit 23 µmol/mg/min angegeben (Aarhus et al., 1995), während Graeff eine Aktivität von 37 nmol/mg/min beschreibt (Graeff et al., 2006). Deutlich geringer ist dagegen die Aktivität in Zellextrakten: In β-Zellen des Pankreas wurde eine Aktivität von nur 0,1 nmol/mg/min ermittelt (Cosker et al., 2010). In eigenen Experimenten wurde die NAADP-bildende Aktivität in P10-Präparationen aus Jurkat-T-Lymphozyten gemessen, die mit 8,5 nmol/mg/min deutlich höher lag. Wie bereits in Abschnitt 5.2.1 erwähnt, zeigen Jurkat-T-Lymphozyten eine sehr hohe Expression von CD38, was die hohe Aktivität in den Zellextrakten widerspiegelt. Bei verminderter Expression von CD38 wurden nur noch 0,4 nmol/mg/min gemessen, was einer Reduktion um 95% entspricht. Demgegenüber war die Aktivität der Hydrolyse von 1,N⁶-etheno-NAD in CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten um 88% reduziert (siehe Abschnitt 5.2.1). Die verringerte Expression von CD38 wirkt sich demnach deutlicher auf die NAADP-Bildung als auf die Hydrolyse von 1,N⁶-etheno-NAD aus.

Eine weitere Möglichkeit, NAADP durch die Basenaustauschreaktion zu generieren, ist der Umsatz von cADPRP mit Nikotinsäure (Moreschi et al., 2006). Voraussetzungen für diese Reaktion sind ebenfalls ein Überschuss an Nikotinsäure und ein saurer pH-Wert. Da cADPRP auch in Zellextrakten nachgewiesen werden konnte, wurde die Reaktion als neuer Syntheseweg für die intrazelluläre Bildung von NAADP vorgeschlagen. Die spezifische Aktivität von CD38 für diese Reaktion beträgt 130 nmol/mg/min (Moreschi et al., 2006). Die NAADP-bildende Aktivität in HL60-Zellen, deren CD38-Expression durch Retinsäure

induziert worden war, belief sich auf 12 pmol/mg/min und ist damit deutlich geringer als die NAADP-Bildung aus NADP und Nikotinsäure (Moreschi et al., 2006).

Ein ungewöhnliches Nukleotid wird ebenfalls durch die Basenaustauschreaktion gebildet: Das CD38-ADP-Ribosyl-Zwischenprodukt kann mit einem weiteren Molekül ADPR reagieren, wobei eine Bindung zwischen dem N¹ des ersten Adenins und dem anomeren C-Atom des zweiten ADPR-Moleküls ausgebildet wird, so dass dimeres ADPR entsteht (De Flora et al., 1997). Die biologische Funktion des dimeren ADPR ist noch unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es die Ca²⁺-freisetzende Wirkung von cADPR verstärkt (De Flora et al., 1997).

5.2.3 Hydrolyse von NAADP durch CD38

Eine weitere Reaktion, welche durch CD38 katalysiert werden kann, ist die Hydrolyse von NAADP. Auch diese Reaktion hätte Auswirkungen auf das NAADP-Signalsystem. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der NAADP-Abbau in Wildtyp- und CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten untersucht. Zusätzlich wurden die enzymatischen Studien mit rekombinant exprimiertem CD38 wiederholt, um die Ergebnisse zu überprüfen.

Die Hydrolyse von NAADP durch CD38 führt zur Freisetzung von ADPRP und Nikotinsäure (Graeff et al., 2006). Im Gegensatz zur Hydrolyse von cADPR und NAD, welche bevorzugt bei neutralem bis alkalischem pH-Wert abläuft (Aarhus et al., 1995), liegt das pH-Optimum der NAADP-Hydrolyse bei pH 5 (Graeff et al., 2006). Daher wird angenommen, dass NAADP protoniert vorliegen muss, damit der Abbau stattfinden kann. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Hydrolyse von NADP weitgehend unabhängig vom pH-Wert ist (Graeff et al., 2006). Außerdem weisen Mutationsstudien darauf hin, dass der Austausch von Glutamat 146 im aktiven Zentrum von CD38 zum nicht geladenen Glycin die pH-Abhängigkeit der Reaktion vermindert (Graeff et al., 2006). Laut Strukturanalysen ist Glutamat 146 an der Bindung des Substrates beteiligt, so dass sich die negativen Ladungen von Glutamat 146 und der Nikotinsäure-Gruppe von NAADP abstoßen würden (Graeff et al., 2006). Die Protonierung der Nikotinsäure-Gruppe bzw. das Entfernen der negativen Ladung im aktiven Zentrum würde diese Abstoßung verhindern und damit auch die pH-Abhängigkeit der Reaktion verringern. Die spezifische Aktivität für die Hydrolyse von NAADP bei pH 5 durch CD38 wurde mit 2,6 µmol/mg/min angegeben, wohingegen bei pH 7 nur noch 20% der Aktivität detektiert werden konnten (Graeff et al., 2006). In eigenen Experimenten wurde eine spezifische Aktivität von 189 nmol/mg/min berechnet, wobei die Untersuchungen bei pH 7,4 durchgeführt wurden. Damit liegt die Aktivität des selbst isolierten CD38 etwas unter dem von Graeff angegebenen Wert. Die Hydrolyse von NAADP durch Zellextrakte wurde von Graeff ebenfalls untersucht. Die Aktivität in Hirnzellen betrug 500 pmol/mg/min, während die Aktivität von Milzzellen einen Wert von 410 pmol/mg/min erreichte (Graeff et al., 2006). P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten zeigten in eigenen Analysen eine Aktivität von 565 pmol/mg/min. Die NAADP-abbauende Aktivität in Jurkat-T-

Lymphozyten liegt damit im erwarteten Bereich. Durch die verringerte CD38-Expression in den *knock down*-Zellen wurde die spezifische Aktivität auf 15 pmol/mg/min reduziert, wodurch sich eine Verminderung um 97% ergibt. Die Reduktion der CD38-Expression hat demnach in Jurkat-T-Lymphozyten eine etwas stärkere Wirkung auf den NAADP-Abbau als auf die NAADP-Bildung (siehe Abschnitt 5.2.2).

Der NAADP-Abbau wurde mit Hilfe der HPLC quantifiziert. Im Gegensatz dazu war die NAD-Glykohydrolase-Aktivität von CD38 mit einem fluorimetrischen Assay bestimmt worden. Analog zu diesem Assay wurde ein neuer fluorimetrischer Assay für den NAADP-Abbau entwickelt. Durch den fluorimetrischen Assay wird eine deutliche Material- und Zeitersparnis gegenüber der HPLC-Analytik erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde 1,N⁶-etheno-NAADP als Substrat eingesetzt und mit P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten inkubiert. Im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer wurde eine starke Zunahme der Fluoreszenz beobachtet, was auf eine Freisetzung von 1,N⁶-etheno-ADPRP schließen ließ. HPLC-Analysen bestätigten, dass 1,N⁶-etheno-NAADP zu 1,N⁶-etheno-ADPRP hydrolysiert wurde. Für den Abbau von 1,N⁶-etheno-NAADP zu 1,N⁶-etheno-ADPRP durch CD38 aus P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten wurde eine spezifische Aktivität von 484 pmol/mg/min ermittelt. NAADP und 1,N⁶-etheno-NAADP werden demnach fast gleich schnell umgesetzt (565 pmol/mg/min vs. 484 pmol/mg/min; siehe Tab.5.2). Die Bildung von 1,N⁶-etheno-ADPRP aus dem Substrat 1,N⁶-etheno-NAADP kann im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Photometer in Echtzeit verfolgt werden. Demgegenüber ist für die Bildung von ADPRP aus dem Substrat NAADP nur eine Endpunktbestimmung möglich, d.h. für die Aufnahme einer Kinetik müssten die Proben vieler Inkubationszeitpunkte mit der Ionenpaar-RP-HPLC einzeln analysiert werden. Die hier zum ersten Mal vorgestellte Umsetzung von 1,N⁶-etheno-NAADP durch CD38 kann folglich als schnelle und zuverlässige Methode eingesetzt werden, um den Abbau von NAADP durch CD38 zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die neue Methode verwendet, um eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Inhibition des NAADP-Abbaus durch Imidazol aufzunehmen und den IC₅₀ des Inhibitors Imidazol zu bestimmen.

Vergleicht man die NAADP-metabolisierende Aktivität der P10-Präparationen von Wildtyp-Jurkat-T-Lymphozyten (0,5 nmol/mg/min) mit der Aktivität des in *E.coli* exprimierten CD38 (189 nmol/mg/min), so kann der Anteil von CD38 am Gesamtprotein der P10-Präparation auf ca. 0,3% geschätzt werden. In Abschnitt 5.2.1 wurde ein Anteil von CD38 am Gesamtprotein von 0,6% berechnet. Die ermittelten Werte können zur Abschätzung der CD38-Expression dienen und fallen je nach P10-Präparation etwas unterschiedlich aus.

Hydrolyse von NAD zu ADPR

rekombinant exprimiertes CD38		Aktivität in Zellextrakten		
Aktivität nmol/mg/min	Quelle	Zelllinie	Aktivität nmol/mg/min	Quelle
700 000	Aarhus et al., 1995	NGM wt	0,28	Higashida et al., 2007
81	Graeff et al., 2009	NGM CD38 ⁺	0,80	Higashida et al., 2007
115	Liu et al., 2006	JMP wt	2,27	eigene Daten ¹
390	eigene Daten ¹	JMP CD38kd	0,27	eigene Daten ¹

Synthese von NAADP aus NADP und Nikotinsäure

rekombinant exprimiertes CD38		Aktivität in Zellextrakten		
Aktivität nmol/mg/min	Quelle	Zelllinie	Aktivität nmol/mg/min	Quelle
23 000	Aarhus et al., 1995	β-Zellen	0,1	Cosker et al., 2010
37	Graeff et al., 2006	JMP wt	8,5	eigene Daten
		JMP CD38kd	0,4	eigene Daten

Hydrolyse von NAADP zu ADPRP (bei neutralem pH)

rekombinant exprimiertes CD38		Aktivität in Zellextrakten		
Aktivität nmol/mg/min	Quelle	Zelllinie	Aktivität nmol/mg/min	Quelle
520	Graeff et al., 2006	JMP wt	0,57	eigene Daten
189	eigene Daten	JMP wt	0,48	eigene Daten ²
		JMP CD38kd	0,15	eigene Daten
		Gehirnzellen	0,50	Graeff et al., 2006
		Milzzellen	0,41	Graeff et al., 2006

Tab. 5.1: Vergleich der Reaktionen und spezifischen Aktivitäten von CD38.

Aufgelistet sind die durch CD38 katalysierten Reaktionen und die jeweilige spezifische Aktivität von rekombinant exprimiertem CD38 bzw. CD38 aus Zellextrakten. (¹ Hydrolyse von 1,N⁶-etheno-NAD zu 1,N⁶-etheno-ADPR; ² Hydrolyse von 1,N⁶-etheno-NAADP zu 1,N⁶-etheno-ADPRP).

5.3 CD38 und NAADP-Metabolismus**5.3.1 Bildung von NAADP im Seeigelei**

Viele Erkenntnisse zum NAADP-Signalsystem wurden zunächst am Seeigelei gewonnen und später in Säugerzellen bestätigt. So wurde auch die Ca²⁺-freisetzende Wirkung von NAADP vor 15 Jahren im Seeigelei entdeckt (Lee und Aarhus, 1995). Die molekularen Mechanismen des NAADP-Signalsystems wie beispielsweise die Struktur-Wirkbeziehung von NAADP, die beteiligten NAADP-Rezeptoren und die responsiven Ca²⁺-Speicher wurden größtenteils aufgeklärt (Mándi und Bak, 2008). Die Fragen zum Metabolismus von NAADP hingegen blieben lange unverstanden. Vor Kurzem konnte im Seeigelei eine Familie von ADP-Ribosylcyclasen gefunden werden, die NAADP-bildende Aktivität aufweisen (Churamani et al., 2007). Es wurden vier Isoformen dieser ADP-Ribosylcyclasen untersucht und SpARC1-4 (*Strongylocentrotus purpuratus* ADP-Ribosylcyclase) genannt. Es zeigte sich, dass SpARC1 ein lösliches, im Lumen des ER

lokalisiertes Enzym darstellt. Die enzymatische Charakterisierung ergab, dass SpARC1 *in vitro* hauptsächlich den Umsatz von NGD zu cGDPR katalysiert und nur eine geringe NAADP-bildende Aktivität aufweist (Churamani et al., 2007). Daher wird davon ausgegangen, dass SpARC1 *in vivo* für die Bildung von cADPR, nicht aber von NAADP verantwortlich ist. SpARC2-4 hingegen sind in der Plasmamembran verankert. SpARC2 zeigt im Gegensatz zu SpARC1 hauptsächlich NAADP-bildende Aktivität und setzt kaum cADPR oder cGDPR frei (Churamani et al., 2008). Vermutlich ist SpARC2 im Seeigelei für die Synthese von NAADP verantwortlich. SpARC3 zeigt wie SpARC2 eine Präferenz für die NAADP-Synthese, wobei die Substratspezifität nicht ganz so stark ausgeprägt ist. SpARC4 wiederum bildet vor allem cADPR und weist nur eine sehr schwache NAADP-Produktion auf (Ramakrishnan et al., 2010). Erstaunlicherweise findet nach dem Austausch eines hochkonservierten Tyrosinrestes fast nur noch die Basenaustauschreaktion und kaum noch die Cyclase-Reaktion statt (Ramakrishnan et al., 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ADP-Ribosylcyclasen im Seeigelei auch in sauren, intrazellulären Kompartimenten zu finden sind (Davis et al., 2008). Die verschiedenen Isoformen der SpARC sind wahrscheinlich entstanden, um die Bildung der Botenstoffe NAADP und cADPR in unterschiedlichen Kompartimenten zu ermöglichen (Ramakrishnan et al., 2010). Da die Botenstoffe im Cytosol wirken, aber in einem Kompartiment bzw. außerhalb der Zelle gebildet werden, ist ein Transportsystem notwendig. In der Tat zeigten pharmakologische Untersuchungen, dass NAD über Transporter ins Lumen aufgenommen und zu cADPR umgesetzt wird. cADPR gelangt schließlich über einen anderen Transportmechanismus ins Cytosol, wobei aber die Transporter nicht zweifelsfrei identifiziert sind (Davis et al., 2008).

5.3.2 Bildung von NAADP in Säugerzellen

Da das NAADP-Signalsystem des Seeigeleis viele Analogien zu den Mechanismen in Säugerzellen aufweist, lag die Vermutung nahe, dass auch in Säugerzellen eine ADP-Ribosylcyclase für die NAADP-Bildung verantwortlich sei. In Säugerzellen finden sich die ADP-Ribosylcyclasen CD38 und CD157, welche Homologien zu den ADP-Ribosylcyclasen in Seeigel, Seehase (*Aplysia californica*) und Pärchenegeln (*Schistosoma mansoni*) aufweisen (Malavasi et al., 2008). Das einzige in Säugerzellen identifizierte Enzym, welches in der Lage ist, NAADP zu bilden, stellt CD38 dar (Aarhus et al., 1995). Die Rolle von CD38 für das Ca^{2+} -Signalsystem wurde in verschiedenen Zellsystemen untersucht und konzentriert sich vor allem auf seine Funktion als cADPR-bildendes Enzym. Die fehlende CD38-Expression verhindert die Bildung von cADPR und setzt damit das cADPR-Signalsystem ausser Kraft (Partida-Sánchez et al., 2001; Soares et al., 2007). Da die Systeme der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe miteinander verzahnt sind, wirkt sich die Inhibition oder verminderte Expression von CD38 über die Hemmung des cADPR-Signalsystems wahrscheinlich auch negativ auf das NAADP-Signalsystem und die Entstehung von Ca^{2+} -Signalen im Allgemeinen aus. Dies würde die Ergebnisse

pharmakologischer Studien erklären, welche eine Beteiligung von CD38 am NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Signal postulieren (Kim et al., 2010; Mushtaq et al., 2011).

Andererseits konnte in Azinuszellen des Pankreas gezeigt werden, dass die Expression von CD38 nicht nur essentiell für das NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Signal ist, sondern auch direkt Einfluss auf die Bildung von NAADP nach Stimulation nimmt. In CD38-defizienten Azinuszellen konnte kein NAADP nachgewiesen werden (Cosker et al., 2010). Auch in lymphokin-aktivierten Killerzellen wird nach Stimulation weniger NAADP gebildet, wenn CD38 fehlt. Allerdings ist die basale NAADP-Konzentration in diesen Zellen von der CD38-Expression unbeeinflusst (Rah et al., 2010). Demnach müsste in der ruhenden Zelle ein anderes Enzym für die Bildung von NAADP verantwortlich sein. In der Tat konnte bereits eine ADP-Ribosylcyclase-Aktivität in CD38-defizienten Zellen festgestellt werden (Ceni et al., 2003). Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass CD38 in Azinuszellen des Pankreas die Funktion des NAADP-bildenden Enzyms übernimmt (Cosker et al., 2010). Dagegen verfügen andere Zelltypen offenbar über ein weiteres, noch nicht identifiziertes NAADP-bildendes Enzym (Ceni et al., 2003).

Da das aktive Zentrum von CD38 im Extrazellulärraum liegt, wäre es auch denkbar, dass durch CD38 NAADP gebildet wird, welches dann als parakriner Botenstoff wirkt. In der Tat wurde bereits gezeigt, dass Zellen durch extrazelluläres NAADP stimuliert werden können, indem NAADP den Purinorezeptor P2Y_{11} aktiviert (Moreschi et al., 2008). Damit würde NAADP ein parakrin wirkendes Adeninnukleotid darstellen (Billington et al., 2006; Billington und Genazzani, 2007). CD38 könnte also für die Bildung von NAADP im Extrazellulärraum verantwortlich sein, während ein intrazelluläres, noch nicht identifiziertes Enzym die Bildung des intrazellulären NAADP katalysiert.

5.3.3 Abbau von NAADP in Säugerzellen und CD38

CD38 galt lange als das NAADP-bildende Enzym in Säugerzellen, da kein anderes NAADP-bildendes Enzym identifiziert werden konnte. Die Synthese von NAADP durch CD38 ist allerdings mit einigen Schwierigkeiten behaftet, da die Basenaustauschreaktion nur unter relativ unphysiologischen Bedingungen stattfindet: Ein saures Milieu ($\text{pH} \leq 5$) und ein hoher Überschuss an Nikotinsäure gegenüber NADP sind die Voraussetzungen für die Bildung von NAADP durch CD38. Ob diese Umstände *in vivo* gegeben sind, ist bisher noch nicht gezeigt.

Um die Rolle von CD38 für die NAADP-Synthese zu untersuchen, wurden NAADP-Bestimmungen an CD38-*knock out*-Mäusen durchgeführt. NAADP konnte in Gewebeproben von Uterus, Herz, Leber, Niere, Milz und Thymus nachgewiesen werden, was bedeutet, dass CD38 offensichtlich für die Bildung von NAADP nicht erforderlich ist (Soares et al., 2007; Bruhn, 2008). Demnach stellt die zuvor erwähnte Studie an Extrakten des Pankreas wohl eine Ausnahme dar (Cosker et al., 2010). Die Untersuchungen an den CD38-*knock out*-Mäusen ergaben außerdem, dass die NAADP-Konzentration in einigen

Gewebe der CD38-*knock out*-Maus, nämlich in Uterus, Leber, Milz und Thymus, gegenüber der Wildtyp-Maus deutlich erhöht war (Soares et al., 2007; Bruhn, 2008). Des Weiteren können β -Zellen des Pankreas nach Stimulation trotz fehlender Expression von CD38 NAADP bilden (Kim et al., 2008). CD38-defiziente Zellen des Myometriums zeigen nach Stimulation sogar eine stärkere Zunahme der intrazellulären NAADP-Konzentration als CD38-exprimierende Zellen (Soares et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden an HL-60-Zellen erhalten, deren CD38-Expression durch Zugabe von Retinsäure erhöht worden war (Soares et al., 2007). Auch in Jurkat-T-Lymphozyten konnte beobachtet werden, dass die verminderte Expression von CD38 zu leicht erhöhten intrazellulären NAADP-Konzentrationen führt (Bruhn, 2008). Die NAADP-Quantifizierungen in myometrischen Zellen, HL-60-Zellen und Jurkat-T-Lymphozyten ließen deutlich werden, dass die intrazelluläre NAADP-Konzentration umso geringer ist, je stärker CD38 exprimiert wird (Soares et al., 2007; Bruhn, 2008). Zum einen könnte dies einen ausgleichenden Mechanismus der Zellen darstellen, das Fehlen des Botenstoffs cADPR zu kompensieren, der bei Abwesenheit von CD38 nicht mehr gebildet werden kann (Soares et al., 2007). Zum anderen könnte CD38 direkt Einfluss auf die NAADP-Konzentration nehmen, indem es NAADP hydrolysiert. In der Tat ist bekannt, dass CD38 in der Lage ist, NAADP durch Abspaltung der Nikotinsäure-Gruppe abzubauen, wobei ADPRP freigesetzt wird (Graeff et al., 2006). Bereits die Untersuchungen zur Synthese von NAADP durch die Basenaustauschreaktion zeigten, dass bei langer Inkubationszeit sowohl NAADP als auch ADPRP im Reaktionsansatz detektiert werden konnten (Chini und Dousa, 1995). Eigene Experimente bestätigten, dass NAADP durch CD38 gebildet werden kann, dass aber mit zunehmender Inkubationszeit die NAADP-Menge wieder abnimmt und ADPRP entsteht. Daher war davon auszugehen, dass NAADP zwar durch CD38 gebildet, dann aber zu ADPRP weiter metabolisiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von NAADP durch CD38 untersucht. Hierbei wurde zunächst die NAADP-hydrolysierende Aktivität in Wildtyp- bzw. CD38-*knock down*-Jurkat-T-Lymphozyten analysiert. Anschließend wurden die Reaktionen mit rekombinant exprimiertem CD38 bestätigt. Diese Experimente zeigten, dass CD38 die Nikotinsäure-Gruppe von NAADP abspaltet und so ADPRP freisetzt. Die Funktion von CD38 als NAADP-abbauendes Enzym würde die erhöhten NAADP-Konzentrationen in CD38-defizienten Zellen erklären (Soares et al., 2007; Bruhn, 2008). In P10-Präparationen von Jurkat-T-Lymphozyten wurde bei physiologischem pH-Wert eine spezifische Aktivität des NAADP-Abbaus von 565 pmol/mg/min gemessen. Bei der Herstellung von P10-Präparationen werden aus $1 \cdot 10^9$ Zellen ca. 10 mg Protein gewonnen. In Jurkat-T-Lymphozyten wird nach Stimulation der Zellen NAADP gebildet und wieder abgebaut, wobei ca. 22 pmol NAADP/ $1 \cdot 10^9$ Zellen/min hydrolysiert werden (Bruhn, 2008). Dies entspricht einer Aktivität von 2,2 pmol/mg/min. Die Aktivität von CD38 würde demnach ausreichen, um den NAADP-Abbau in Jurkat-T-Lymphozyten zu katalysieren. Möglicherweise spielt CD38 eine Rolle für den Metabolismus von NAADP, indem es die zelluläre NAADP-Konzentration senkt. Dies würde zu einer Unterbrechung des NAADP-vermittelten Ca^{2+} -

Signals führen. Bei der Hydrolyse von NAADP wird außerdem Nikotinsäure frei, welches den Ryanodinrezeptor hemmt (Dammermann et al., 2009). Das Produkt des NAADP-Abbaus kann somit die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER vermindern. Durch den Abbau von NAADP könnte auch die Desensibilisierung des NAADP-Signalsystems verhindert werden. Damit wäre gewährleistet, dass das NAADP-Signalsystem jederzeit als Schrittmacher der Ca^{2+} -Signalgebung zur Verfügung steht.

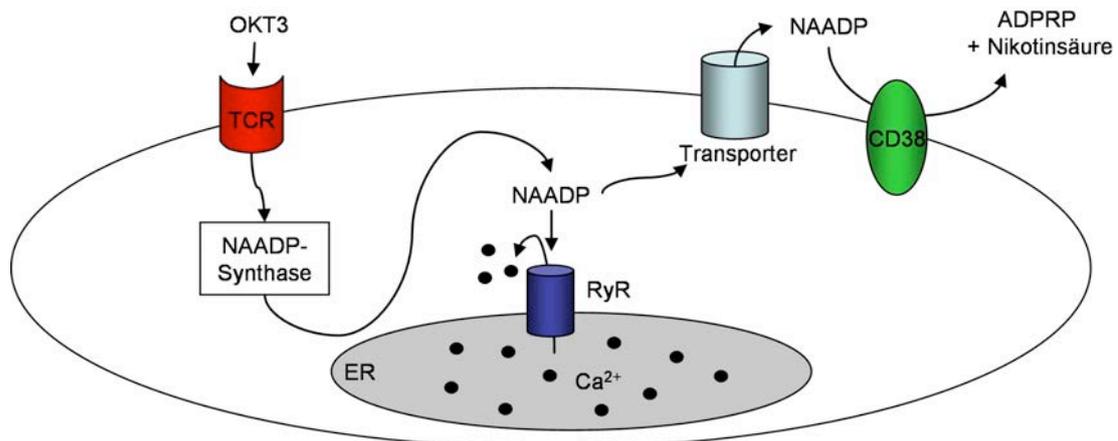


Abb. 5.3: Modell zu Wirkung und Metabolismus von NAADP in Jurkat-T-Lymphozyten.

Stimulation von Jurkat-T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR) durch den anti-CD3-Antikörper OKT3 führt zur intrazellulären Bildung von NAADP. NAADP setzt durch Bindung an den Ryanodinrezeptor (RyR) Ca^{2+} aus dem ER frei. Möglicherweise wird NAADP über Transporter oder über Connexin 43 in den Extrazellulärraum gebracht, wo es durch CD38 zu ADPRP und Nikotinsäure hydrolysiert wird.

Problematisch ist in diesem Zusammenhang die Lokalisation von CD38, da CD38 als membranständiges Ektoenzym beschrieben wurde (Reinherz et al., 1980), NAADP aber im Cytosol wirkt. Dennoch kann CD38 auch intrazellulär vorkommen. So wurde die Lokalisation von CD38 in der inneren Kernmembran beschrieben, wobei allerdings das aktive Zentrum im Nukleoplasma lag (Adebanjo et al., 1999). Auch das Vorhandensein von CD38 in Endosomen wurde beobachtet, wobei die katalytische Aktivität ebenfalls nicht im Cytosol sondern im Lumen zu finden war (Cosker 2010). Wenn CD38 in der Zelle die Funktion des NAADP-abbauenden Enzyms einnimmt, müsste NAADP durch Transporter aus dem Cytosol zum aktiven Zentrum von CD38 gebracht werden. An Astrozyten konnte gezeigt werden, dass NAADP über Connexin 43 in die Zellen gelangen kann (Heidemann et al., 2005). Da diese Kanäle nicht gerichtet sind, wäre auch der Transport aus der Zelle heraus möglich (Bruzzone et al., 2001). Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass ein kleiner Teil der CD38-Moleküle eine inverse Orientierung in der Membran aufweist, so dass sich das aktive Zentrum des Enzym im Cytosol befindet (Ohta et al., 2011). Dies würde den Abbau von NAADP im Cytosol ermöglichen.

Als bestätigt gilt, dass CD38 Einfluss auf das NAADP-Signalsystem und damit auf die Ca^{2+} -Signalgebung nimmt (Mándi und Bak, 2008; Mushtaq et al., 2011). Dabei scheint CD38, entgegen früherer Annahmen, nicht für die Bildung, sondern für den Abbau des Botenstoffs NAADP eine Rolle zu spielen.

5.4 Enzymologie der alkalischen Phosphatasen

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von HeLa-Zellen mit Carbachol einen schnellen Anstieg der intrazellulären NAADP-Konzentration bewirkt, dem ein schneller Abfall der NAADP-Konzentration folgt (Bruhn, 2008). Demnach müssen in HeLa-Zellen Mechanismen zum Auf- und Abbau von NAADP vorhanden sein. Für den Metabolismus von NAADP in Jurkat-T-Lymphozyten wurde CD38 als Schlüsselenzym vorgeschlagen. Allerdings konnte in HeLa-Zellen die Expression von CD38 weder über RT-PCR noch über Western-Blot nachgewiesen werden. Daher war davon auszugehen, dass HeLa-Zellen ein anderes Enzym besitzen, welches NAADP degradieren kann. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal eine NAADP-abbauende Aktivität in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Diese dephosphoryliert NAADP zu NAAD, wobei das pH-Optimum der Reaktion im Alkalischen liegt. Die detektierte NAADP-abbauende Aktivität in HeLa-Zellen ist demnach eine alkalische Phosphatase. Es sind vier Isoformen der humanen alkalischen Phosphatase bekannt, die sich in der gewebsspezifischen Expression, der Hemmung durch Inhibitoren und der Hitzestabilität unterscheiden (Herz, 1985). Wie auch bei CD38 handelt es sich hierbei um multifunktionelle Enzyme, die verschiedene Substrate umsetzen können. Dennoch geht man davon aus, dass im lebenden Organismus nur die Substrate umgesetzt werden, die für die jeweilige Funktion der alkalischen Phosphatase relevant sind.

Der Reaktionsmechanismus der alkalischen Phosphatasen wurde zunächst an der alkalischen Phosphatase von *E.coli* entschlüsselt (Coleman, 1992; Holtz und Kantrowitz, 1999). Später wurde die Kristallstruktur des plazentalen Isoenzym der alkalischen Phosphatase aufgeklärt und der Reaktionsmechanismus bestätigt (Kozlenkov et al., 2002). Das im aktiven Zentrum lokalisierte Zn^{2+} -Ion Zn_2 aktiviert das katalytische Serin S92, so dass die Hydroxylgruppe deprotoniert vorliegt (siehe Abb. 5.4). Nun erfolgt der nukleophile Angriff des Serins auf die Esterbindung des Substrats und die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Serin und Phosphatgruppe (Schwartz und Lipmann, 1961). Das Phosphat wird dabei durch Arginin 166 koordiniert (Kozlenkov et al., 2002). Das zweite im aktiven Zentrum positionierte Zn^{2+} -Ion Zn_1 stabilisiert die negative Ladung des dephosphorylierten Produkts und erleichtert dadurch die Reaktion (Holtz und Kantrowitz, 1999). Dann wird das Produkt aus dem aktiven Zentrum entlassen. Um das katalytische Serin wiederherzustellen, wird durch Zn_1 ein Wassermolekül aktiviert, welches die Esterbindung zwischen Serin und Phosphat angreift.

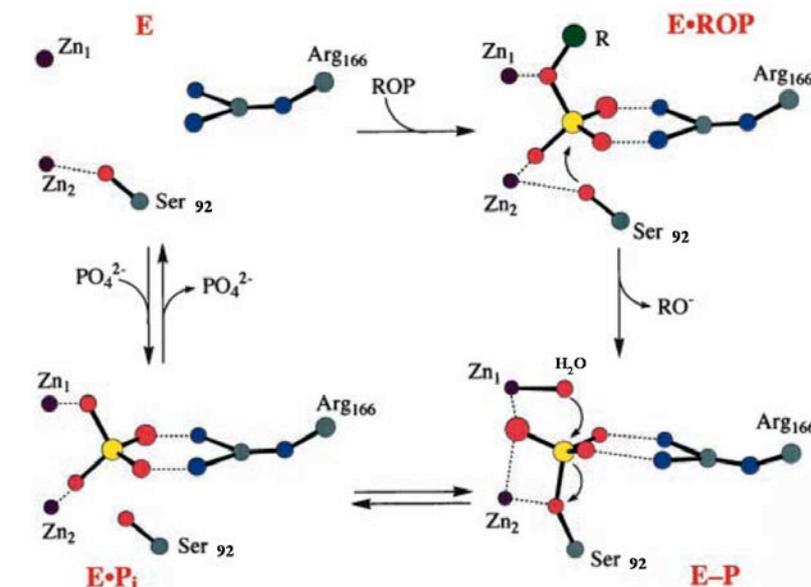


Abb. 5.4: Reaktionsmechanismus der Hydrolyse von Phosphatestern durch die alkalische Phosphatase. Im aktiven Zentrum der alkalischen Phosphatase (E) wird die Hydroxylgruppe von Serin 92 durch Zn_2 aktiviert, so dass ein Angriff auf die Esterbindung stattfinden kann. Dabei wird der Enzym-Substrat-Komplex (E·ROP) gebildet. Die Phosphat-Gruppe des Substrats wird kovalent an Serin 92 gebunden, so dass ein Enzym-Phosphat-Zwischenprodukt (E·P) entsteht. Das dephosphorylierte Produkt (RO^-) wird freigesetzt und die Phosphat-Gruppe auf ein Wassermolekül übertragen. Nun steht das Enzym für einen weiteren Reaktionszyklus zur Verfügung. Abb. verändert nach Holtz et al., 1999.

Das Phosphat wird nun auf das Wassermolekül übertragen und das Enzym steht für eine neue Katalyse bereit (Coleman, 1992). Das freigesetzte Phosphat kann auch auf einen Phosphatakzeptor im Puffer, wie beispielsweise Ethanolamin oder Tris, übertragen werden, was eine Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit der alkalischen Phosphatase zur Folge hat (Dayan und Wilson, 1964; Wilson et al., 1964; Hoylaerts et al., 2006). Damit besitzen die alkalischen Phosphatasen nicht nur Phosphatase- sondern auch Transphosphorylase-Aktivität. Allerdings wird das phosphorylierte Produkt bei längerer Inkubationszeit auch wieder dephosphoryliert (Harkness, 1968).

Das pH-Optimum der alkalischen Phosphatasen liegt im alkalischen Bereich und damit nicht im physiologischen pH-Bereich. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass das pH-Optimum mit abnehmender Substratkonzentration sinkt (Folley und Kay, 1935; Morton, 1957; Harkness, 1968). In eigenen Experimenten wurde das pH-Optimum der alkalischen Phosphatase aus HeLa-Zellen bei unterschiedlichen pNPP-Konzentrationen bestimmt. Aus den ermittelten Werten wurde eine Regressionskurve berechnet, deren Extrapolation auf ein pH-Optimum von 7,6 bei einer Substratkonzentration von 100 nM pNPP schließen ließ. Falls sich das pH-Optimum der NAADP-abbauenden Reaktion mit sinkender NAADP-Konzentration in gleicher Weise verschöbe, läge das pH-Optimum der Reaktion bei physiologischen NAADP-Konzentrationen im physiologischen pH-Bereich. Allerdings ließen sich die Ergebnisse des pNPP-Assays nicht durch HPLC-Analysen bestätigen.

5.4.1 Substrate der TNAP

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen charakterisiert. Da vier humane Isoformen der alkalischen Phosphatase bekannt sind, wurde die Expression der verschiedenen Isoformen in HeLa-Zellen untersucht. Die Isoformen TNAP, IAP und PLAP konnten über RT-PCR und Western Blot nachgewiesen werden, während die Isoform GCAP nicht detektiert werden konnte. Dennoch kann die Expression der GCAP in HeLa-Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden, da das Signal möglicherweise unter der Nachweisgrenze lag.

Um herauszufinden, welche der Isoformen in HeLa-Zellen am NAADP-Metabolismus beteiligt sein könnte, wurde zunächst die Aktivität der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen näher charakterisiert. Da sich die Isoformen in ihrer Substratspezifität und enzymatischen Aktivität unterscheiden, werden im Folgenden zunächst die Charakteristika der in HeLa-Zellen detektierten Isoformen TNAP, IAP und PLAP beschrieben.

Die Funktion der TNAP besteht hauptsächlich darin, Pyrophosphat (PP_i), den Inhibitor der Knochenmineralisierung, zu hydrolysieren und so den Knochenaufbau zu regulieren (Whyte, 1994). Gleichzeitig wird durch die Reaktion P_i für die Bildung von Hydroxyapatit zur Verfügung gestellt (Fallon et al., 1980). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase kann durch einen Assay mit dem farblosen Substrat pNPP bestimmt werden, welches durch Dephosphorylierung zum gelblichen pNP umgesetzt wird (Herz und Nitowsky, 1962). Die Hydrolyse des natürlichen Substrats PP_i verläuft ca. doppelt so schnell wie die Dephosphorylierung von pNPP (Moss et al., 1967). Das zweite natürliche Substrat der TNAP ist Pyridoxal-5-phosphat (PLP) (Smith und Peters, 1981; Wilson et al., 1983), welches eines der häufigsten Coenzyme darstellt. Der Abbau von PLP erfolgt nur etwa halb so schnell wie der Abbau von pNPP (Smith und Peters, 1981).

Weitere Substrate der TNAP *in vitro* sind die Adeninnukleotide AMP, ADP und ATP sowie die Uridinnukleotide UMP, UDP und UTP. Die K_m -Werte liegen im Bereich von 10 – 40 μM , wobei mit zunehmender Phosphorylierung des Substrats der K_m -Wert steigt und die Umsatzgeschwindigkeit sinkt (Say et al., 1991; Demenis und Leone, 2000). Ferner ist die TNAP in der Lage, Glucose-1-Phosphat, Glucose-6-Phosphat, Fructose-1-Phosphat sowie β -Glycerophosphat zu dephosphorylieren (Say et al., 1991). Zudem finden sich Hinweise, dass die TNAP Phosphodiesterase-Aktivität besitzt und beispielsweise cAMP und ADPR degradieren kann (Rezende et al., 1994; Zhang et al., 2005). Der K_m -Wert liegt hier mit 300 μM aber deutlich höher als bei der Dephosphorylierung von AMP oder ADP (Rezende et al., 1994). Aufgrund der Phosphodiesterase-Aktivität kann TNAP das Substrat ATP auch zu AMP und PP_i umsetzen (Zhang et al., 2005). Somit kann die alkalische Phosphatase sowohl die Bildung als auch den Abbau von PP_i katalysieren. In eigenen Experimenten mit den Substraten cAMP, cGMP, cADPR und ADPR konnte keine Phosphodiesterase-Aktivität der alkalischen Phosphatase von HeLa-Zellen festgestellt werden. Möglicherweise tritt die Phosphodiesterase-Aktivität nur unter bestimmten Bedingungen zutage oder sie ist eine spezifische Reaktion der TNAP.

Welche der oben genannten Substrate im lebenden Organismus durch die TNAP umgesetzt werden, ist nicht vollständig geklärt. Bisher werden nur PP_i (Henthorn et al., 1992; Millán et al., 2008) und PLP (Waymire et al., 1995) als physiologische Substrate angesehen, da ihre Relevanz durch Studien an Patienten mit defizienter TNAP bzw. an TNAP-*knock out*-Mäusen bestätigt ist

5.4.2 Substrate der IAP

Die IAP zeigt eine ebenso breite Substratspezifität wie die TNAP. Die IAP katalysiert die Dephosphorylierung verschiedener Adenin- und Uridinnukleotide, wobei eine etwas höhere Umsatzgeschwindigkeit und etwas geringere K_m -Werte als bei der TNAP erreicht werden (Eaton und Moss, 1967). Des Weiteren ist die IAP in der Lage, Phospholipide verschiedener Kettenlänge zu hydrolysieren (Sumikawa et al., 1990). Dies ist besonders wichtig für die Funktion der IAP bei der Aufnahme von Nahrungsfetten (Narisawa et al., 2003). Wie auch die TNAP ist die IAP in der Lage, PP_i zu bilden. Als Substrate für die PP_i -Synthese können ATP, ADP, Glucose-6-Phosphat, pNPP oder auch PP_i dienen. Zum Aufbau von PP_i wird das durch Hydrolyse der Substrate gewonnene P_i eingesetzt (Nayudu und de Meis, 1989). Die PP_i -bildende Aktivität ist dabei etwa 1000-fach geringer als die Hydrolase-Aktivität. Interessanterweise kann die PP_i -Synthese durch Absenken des pH-Wertes von pH 8,5 auf pH 6,0 erhöht werden (Nayudu und de Meis, 1989). Das Produkt PP_i wird allerdings nach wenigen Minuten wieder zu P_i hydrolysiert. Auch die Transphosphorylierung von Thiamin zu Thiaminmonophosphat durch Übertragung der Phosphat-Gruppe von β -Glycerophosphat oder Kreatinphosphat ist beschrieben, wobei die Aktivität ebenfalls um mehrere Zehnerpotenzen geringer ausfiel als die Phosphatase-Aktivität (Rindi et al., 1995).

Wie die TNAP kann auch die IAP *in vitro* eine große Vielfalt an Substraten umsetzen. Als verifizierte physiologische Substrate der IAP gelten ATP (Mizumori et al., 2009), Phospholipide (Narisawa et al., 2003) und Liposaccharide (Poelstra et al., 1997).

5.4.3 Substrate der PLAP

Das Isoenzym PLAP ist, wie auch die beiden oben beschriebenen Isoenzyme, in der Lage, *in vitro* eine Reihe von Substraten zu dephosphorylieren. Allerdings zeigen die verschiedenen Isoenzyme unterschiedliche Substratspezifität. Die PLAP kann verschiedene Adenin- und Uridinnukleotide abbauen, wobei im Gegensatz zu den Untersuchungen an der TNAP und der IAP keine Korrelation zwischen Umsatzgeschwindigkeit und Anzahl der Phosphat-Gruppen beobachtet wurde (Harkness, 1968). Auch in eigenen Experimenten zeigte sich, dass die Phosphatfreisetzung aus verschiedenen Adeninnukleotiden durch die alkalische Phosphatase aus HeLa-Zellen ungefähr gleich hoch ist. Des Weiteren können Glucose-6-Phosphat, β -Glycerophosphat, Phosphoserin und PP_i als Substrate der PLAP dienen (Harkness, 1968). Im Gegensatz zur TNAP erreicht die Hydrolyse von PP_i nur ca.

20% der Umsatzrate von pNPP. Auch Phospholipide und Polyphosphate können durch die PLAP hydrolysiert werden (Sumikawa et al., 1990; Lorenz und Schröder, 2001).

Die PLAP besitzt, wie die Isoformen TNAP und IAP, nicht nur Phosphatase-Aktivität, sondern auch Transphosphorylase-Aktivität. So ist beispielsweise die Phosphorylierung von Glucose in Anwesenheit von P_i , pNPP, oder β -Glycerophosphat beschrieben, wobei β -Glycerophosphat den produktivsten Phosphatdonor darstellt (Harkness, 1968). Die PLAP kann demnach nicht nur den Abbau, sondern auch die Synthese von Glucose-6-Phosphat katalysieren. Allerdings wird das gebildete Glucose-6-Phosphat innerhalb weniger Stunden wieder dephosphoryliert.

Bisher konnte noch keines der oben beschriebenen Substrate als physiologisches Substrat der PLAP bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Isoformen TNAP und IAP stehen für die Untersuchungen der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung der PLAP keine *knock out*-Tiere zur Verfügung. Auch wurden bisher keine krankheitsauslösenden Mutationen der PLAP beobachtet. Bislang ist lediglich bekannt, dass die Expression der PLAP die Proliferation fördert, nicht aber, welches Substrat für diese Wirkung notwendig ist (She et al., 2000).

Die enzymatischen Untersuchungen der alkalischen Phosphatasen zeigen, dass diese *in vitro* eine Reihe von Substraten umsetzen können. *In vivo* katalysieren die alkalischen Phosphatasen jedoch nur die Dephosphorylierung ihrer spezifischen Substrate. Möglicherweise wird die Aktivität der jeweiligen alkalischen Phosphatase durch die gewebspezifische Expression sowie die lokale Verfügbarkeit der Substrate reguliert.

5.5 NAADP-Metabolismus in HeLa-Zellen

5.5.1 Expression und Aktivität der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen

Die Expression der verschiedenen Isoformen der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen wurde bereits vielfach untersucht, variiert aber von Sublinie zu Sublinie (Herz und Nitowsky, 1962; Elson und Cox, 1969; Singer und Fishman, 1974; Fishman und Singer, 1975; Lin et al., 1976; Vergote et al., 1987). Es sind HeLa-Sublinien bekannt, welche fast ausschließlich die PLAP exprimieren, während in anderen hauptsächlich die TNAP nachgewiesen wurde. Zudem ist bekannt, dass das Expressionsprofil der Isoformen je nach Lebensstadium des Organismus bzw. Zellzyklus variiert (Vorbrodts und Borun, 1979; Komoda et al., 1986). Dies könnte das unterschiedliche Expressionsprofil der HeLa-Sublinien erklären. In den meisten HeLa-Sublinien wurde eine hohe Expression der PLAP und eine etwas geringere Expression der GCAP festgestellt (Elson und Cox, 1969; Singer und Fishman, 1974; Herz, 1985).

Da weder RT-PCR noch Western-Blot-Analyse eine Aussage darüber erlauben, in welchem Maße die verschiedenen Isoformen exprimiert werden, wurden Inhibitorstudien durchgeführt (siehe Tab. 5.2). Es wurde festgestellt, dass das Substrat pNPP vor allem

durch die TNAP umgesetzt wurde. Demgegenüber wurde die Phosphat-Freisetzung aus NAADP vor allem durch die PLAP oder die IAP katalysiert. Die Unterscheidung der Aktivität der PLAP und der IAP ist mit konventionellen Inhibitorstudien nicht möglich. Mittlerweile sind zwar spezifische Inhibitoren für die PLAP bzw. die IAP bekannt (Chung et al., 2010; Lanier et al., 2010). Diese sind allerdings nicht kommerziell erhältlich und konnten daher in der vorliegenden Arbeit nicht eingesetzt werden.

		gewebunspezifische alkalische Phosphatase	gewebsspezifische alkalische Phosphatasen		
		TNAP	IAP	PLAP	GCAP
RT-PCR		+++	++	+	-
Western Blot		+	+	+	-
Aktivität	Substrat pNPP	hoch	gering		
	Substrat NAADP	gering	hoch		

Tab. 5.2: Überblick über Expression und Aktivität der Isoformen der alkalischen Phosphatasen in HeLa-Zellen.

In der Tabelle wurden die Daten der Expressionsanalysen und Enzym-Assays zusammengestellt. Aufgrund der Inhibitorstudien wird angenommen, dass in HeLa-Zellen die Isoformen PLAP bzw. IAP den Abbau von NAADP katalysieren.

HeLa-Zellen weisen meist eine sehr hohe Expression der PLAP auf (Elson und Cox, 1969; Singer und Fishman, 1974; Herz, 1985). Dagegen liegen in der Literatur keine Berichte zur Aktivität der IAP in HeLa-Zellen vor. Daher wurde angenommen, dass auch in der untersuchten HeLa-Zelllinie die Expression der IAP im Vergleich zur TNAP bzw. PLAP sehr gering sei. Folglich wäre in der untersuchten HeLa-Zelllinie vor allem die PLAP für den Abbau von NAADP verantwortlich.

Weitere Hinweise, dass der Großteil der alkalischen Phosphatase-Aktivität in HeLa-Zellen der PLAP geschuldet ist, finden sich in den enzymatischen Charakteristika des Enzyms. So konnte beispielsweise keine Phosphodiesterase-Aktivität in HeLa-Zellen nachgewiesen werden, welche aber für die TNAP beschrieben ist (Rezende et al., 1994; Zhang et al., 2005). Außerdem konnte in eigenen Experimenten kein Zusammenhang zwischen der Umsatzgeschwindigkeit für den Abbau von Adeninnukleotiden und dem Grad der Phosphorylierung festgestellt werden. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Studien zur PLAP (Harkness, 1968) und steht im Gegensatz zu den für die TNAP und IAP beobachteten Ergebnissen (Demenis und Leone, 2000; Say et al., 1991).

5.5.2 NAADP-Abbau in HeLa-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen charakterisiert. Zunächst wurde die Phosphatase-Aktivität mit dem Substrat pNPP untersucht. Für die Dephosphorylierung von pNPP zu pNP wurde ein K_m -Wert von 1,6 mM und eine spezifische Aktivität von 810 nmol/mg/min ermittelt. Für HeLa-Zellen sind verschiedene Werte der spezifischen Aktivität beschrieben, die sich je nach Sublinie unterscheiden. So findet sich in HeLa-Zellen mit hoher Expression der PLAP eine

Aktivität von 90 nmol/mg/min bis 750 nmol/mg/min, während für eine Sublinie mit hoher TNAP-Expression eine Aktivität von bis zu 3200 nmol/mg/min angegeben wird (Singer und Fishman, 1974). Die Phosphatase-Aktivität in den untersuchten HeLa-Zellen liegt damit im Bereich der Sublinie, die vor allem die PLAP exprimiert. Der ermittelte K_m -Wert dagegen ist etwas höher als die in der Literatur beschriebenen K_m -Werte, welche von 330 μM bis 450 μM reichen (Hoylaerts et al., 1992; Di Mauro et al., 2002; Kozlenkov et al., 2002; Wennberg et al., 2002).

Des Weiteren wurde der Abbau von NAADP durch P10-Präparationen aus HeLa-Zellen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass HeLa-Zellen eine NAADP-abbauende Aktivität besitzen. Außerdem wurde zum ersten Mal der Abbau physiologischer Konzentrationen von NAADP (bis zu 20 nM) zu NAAD analysiert. Die enzymatische Charakterisierung nach Michaelis-Menten ergab einen K_m -Wert von 37 μM und eine spezifische Aktivität von 817 nmol/mg/min. Die Affinität der Phosphatase für NAADP ($K_m = 37 \mu\text{M}$) ist damit um mehr als das 40-fache höher als für das Substrat pNPP ($K_m = 1622 \mu\text{M}$). In der Literatur liegen keine Angaben zu K_m -Werten bezüglich des NAADP-Abbaus durch alkalische Phosphatasen vor. Die K_m -Werte für die Dephosphorylierung von Adeninnukleotiden belaufen sich auf 10 – 40 μM (Demenis und Leone, 2000; Picher et al., 2003). Der für NAADP ermittelte K_m -Wert stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Daten für Adeninnukleotide überein.

Substrat	v (nmol/mg/min)	Quelle	K_m (μM)	Quelle
pNPP	90	Singer und Fishman, 1974	350	Hoylaerts et al., 1992
pNPP	3 2000	Singer und Fishman, 1974	450	Di Mauro et al., 2002
pNPP	13 000	Moss et al., 1967	360	Kozlenkov et al., 2002
pNPP	810	eigene Daten	1 622	eigene Daten
ATP	94 000	Demenis und Leone, 2000	17	Demenis und Leone, 2000
ATP	1,2	Picher et al., 2003	36	Picher et al., 2003
AMP	5,3	Ohkubo et al., 2000	19	Ohkubo et al., 2000
NAADP	817	eigene Daten	37	eigene Daten

Tab. 5.3: Übersicht der durch alkalische Phosphatasen katalysierten Reaktionen.

Aufgelistet sind die spezifischen Aktivitäten und K_m -Werte für die Dephosphorylierung des angegebenen Substrates.

Die spezifische Aktivität für den Abbau von Adeninnukleotiden durch die alkalische Phosphatase variiert je nach Veröffentlichung sehr stark und liegt zwischen 1,2 nmol/mg/min und 94 $\mu\text{mol/mg/min}$ (Demenis und Leone, 2000; Picher et al., 2003). Die in HeLa-Zellen detektierte Aktivität für den Abbau von NAADP zu NAAD liegt damit eher im unteren Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte.

Nach Stimulation mit Carbachol steigt in HeLa-Zellen die NAADP-Konzentration. Innerhalb der ersten 5 min nach dem Erreichen des NAADP-Peaks fällt die NAADP-Konzentration wieder ab, wobei ca. 9,7 pmol NAADP/ $1 \cdot 10^9$ Zellen/min metabolisiert werden (Bruhn, 2008). Da beim Aufschluss von $1 \cdot 10^9$ Zellen ca. 10 mg Protein in P10-Präparationen gewonnen werden, entspricht dies einer Aktivität von ca. 1 pmol/mg/min. In

P10-Präparationen von HeLa-Zellen wurde eine NAADP-abbauende Aktivität von 817 nmol/mg/min gemessen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase in HeLa-Zellen wäre also hoch genug, um NAADP abzubauen und das Ruheniveau der NAADP-Konzentration wieder herzustellen.

Mit dem Abbau zu NAAD verliert NAADP seine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung (Lee und Aarhus, 1997; Chini und De Toledo, 2002). Auf diese Weise kann zum einen das NAADP-vermittelte Ca^{2+} -Signal abgeschaltet werden. Zum anderen wird die Desensibilisierung des NAADP-Signalsystems verhindert, so dass NAADP als Schrittmacher-Funktion der Ca^{2+} -Signalgebung bereit steht.

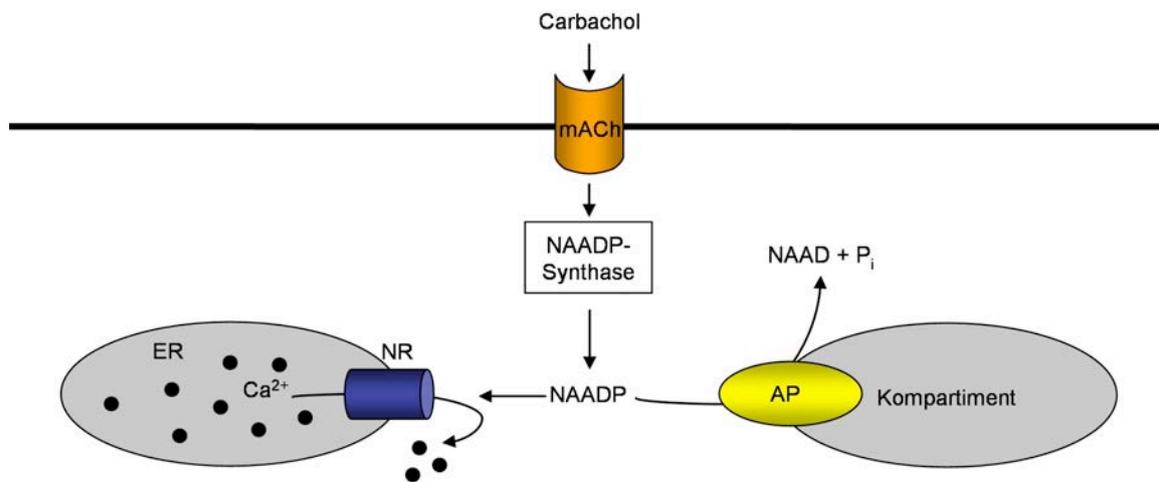


Abb. 5.5: Modell zu Wirkung und Metabolismus von NAADP in HeLa-Zellen

Nach Stimulation des muscarinischen Acetylcholinrezeptors (mACh) durch Carbachol wird in HeLa-Zellen NAADP gebildet. Dieses bindet an den NAADP-Rezeptor (NR) und setzt so Ca^{2+} aus dem ER frei. Der NR in HeLa-Zellen ist wahrscheinlich der Ryanodinrezeptor. NAADP kann durch alkalische Phosphatase (AP) zu NAAD dephosphoryliert werden, wobei die AP in der Plasmamembran oder einer intrazellulären Membran lokalisiert sein kann.

Allerdings ist die alkalische Phosphatase als ein in der Plasmamembran verankertes Ektoenzym bekannt (Low, 1989). NAADP müsste demnach über die Plasmamembran in den Extrazellulärraum gebracht werden, wie schon für den Abbau von NAADP durch CD38 diskutiert (siehe Abschnitt 5.3.3). Aber auch die intrazelluläre Lokalisation der alkalischen Phosphatase beispielsweise im ER, im Golgi-Apparat, in Lysosomen und Mitochondrien konnte gezeigt werden (Sasaki und Fishman, 1973; Lin et al., 1976; Benham et al., 1977; Tokumitsu et al., 1981; Wilson et al., 1981). An Saponin-permeabilisierten BeWo- und HeLa-Zellen wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Cytosol nachgewiesen (Tokumitsu et al., 1981). Die intrazellulär lokalisierte Phosphatase-Aktivität konnte durch L-Phenylalanin, nicht aber durch Levamisol gehemmt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität eher auf die PLAP als die TNAP zurückzuführen ist (Tokumitsu et al., 1981). Wenn die beschriebene,

intrazelluläre Aktivität auch NAADP abbauen könnte, wäre der Transport von NAADP in den Extrazellulärraum nicht mehr nötig.

Sowohl für den Umsatz von NAADP durch CD38 als auch durch die alkalische Phosphatase sind zwei Modelle vorstellbar: Zum einen kann NAADP aus der Zelle heraustransportiert werden und im Extrazellulärraum degradiert werden (siehe Abb. 5.4). Zum anderen kann NAADP durch in intrazellulären Membranen lokalisiertes Enzym abgebaut werden (siehe Abb. 5.5).

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass HeLa-Zellen NAADP zu NAAD abbauen. Die Ergebnisse der enzymatischen Charakterisierung legen nahe, dass dabei vor allem die plazentale Isoform der alkalischen Phosphatase eine Rolle spielt. Für dieses Isoenzym ist bisher noch kein physiologisches Substrat bestätigt. Inwiefern die PLAP eine Rolle für das NAADP-Signalsystem und die Ca^{2+} -Signalgebung in HeLa-Zellen spielt, ist noch nicht geklärt.

5.6 Vergleich des NAADP-Abbaus in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die multifunktionellen Enzyme CD38 und alkalische Phosphatase charakterisiert, welche den Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoff NAADP metabolisieren können. Es wurde nachgewiesen, dass CD38 aus Jurkat-T-Lymphozyten NAADP zu ADRPR hydrolysiert. Untersuchungen zur Struktur-Wirkbeziehung von NAADP zeigten, dass der Botenstoff seine Ca^{2+} -freisetzende Wirkung verliert, wenn die Nikotinsäure-Gruppe entfernt wird (Lee und Aarhus, 1997). Ferner wurde eine NAADP-abbauende Aktivität in HeLa-Zellen detektiert. Allerdings exprimieren HeLa-Zellen kein CD38. Diese Zellen bilden eine alkalische Phosphatase, welche NAADP zu NAAD dephosphoryliert. Der Verlust der 2'-Phosphat-Gruppe der südlichen Ribose hat zur Folge, dass kein NAADP-vermitteltes Ca^{2+} -Signal mehr ausgelöst werden kann (Lee und Aarhus, 1997). Diese Phosphatase-Aktivität wiederum ist nicht in Jurkat-T-Lymphozyten zu finden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen unterschiedliche Strategien entwickelt haben, um den Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoff NAADP abzubauen (siehe Abb. 5.6).

Es ist durchaus nicht ungewöhnlich, dass ein Botenstoff durch unterschiedliche Enzyme metabolisiert wird. So kann beispielsweise der Ca^{2+} -freisetzende Botenstoff IP_3 durch IP_3 -5'-Phosphatasen zu Inositol-1,4-bisphosphat dephosphoryliert werden. Dies geht mit dem Verlust der Ca^{2+} -freisetzenden Wirkung einher und unterbricht das Ca^{2+} -Signal (Downes et al., 1982; Storey et al., 1984). Andererseits kann IP_3 auch durch IP_3 -spezifische 3'-Kinasen zum Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat (IP_4) phosphoryliert (Irvine et al., 1986). IP_4 kann zwar keine Ca^{2+} -Freisetzung über den IP_3 -Rezeptor induzieren, fördert aber den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran (Irvine, 1992). Zusätzlich dient IP_4 als Substrat für die Bildung höher phosphorylierter Inositolphosphate, wie beispielsweise Inositolhexakisphosphat, welches u.a. eine Rolle beim mRNA-Export spielt (Miller et al., 2004). Je nach Zelltyp ist die Aktivität der IP_3 -5'-Phosphatase bzw. 3'-Kinase stärker

ausgeprägt (De Smedt et al., 1997). In beiden Fällen wird die Wirkung von IP₃ auf den IP₃-Rezeptor beendet. Allerdings unterscheidet sich die Wirkung auf andere Signalprozesse der Zelle je nachdem, ob der Abbau des Botenstoffs durch die 5'-Phosphatase oder 3'-Kinase katalysiert wird.

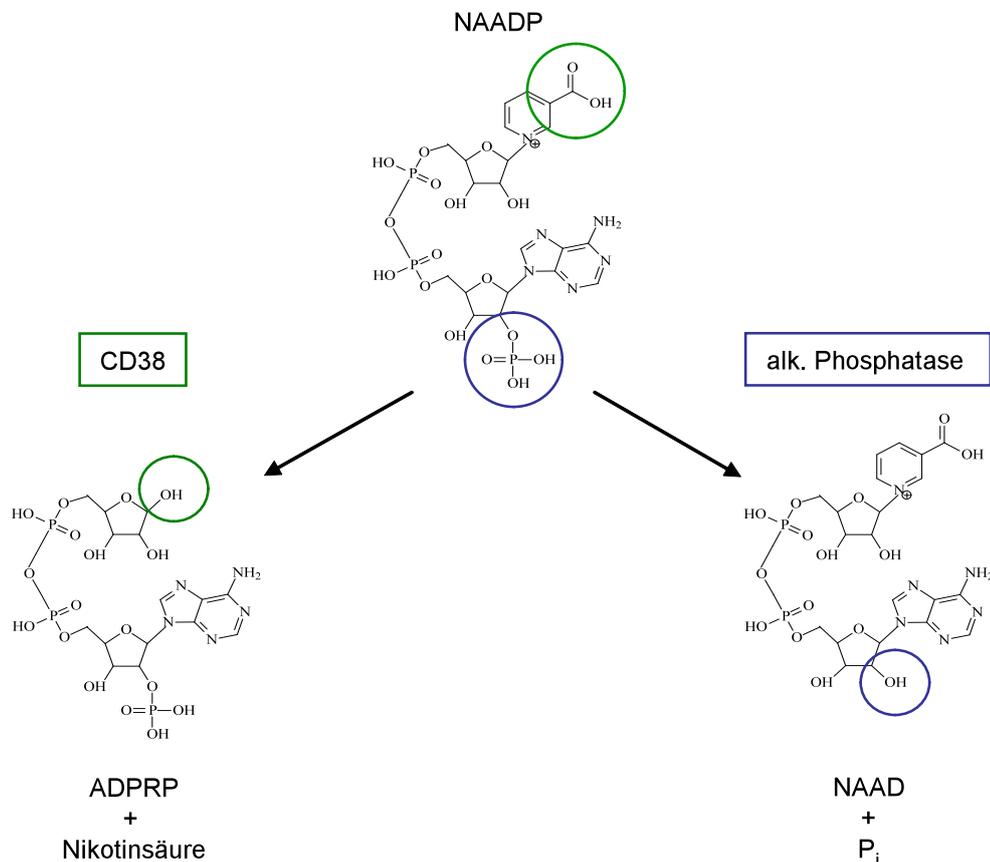


Abb. 5.6: Reaktionsschema des NAADP-Abbaus in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen.

Der NAADP-Abbau wird in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen durch verschiedene Enzyme katalysiert. In Jurkat-T-Lymphozyten katalysiert das Enzym CD38 den Abbau von NAADP zu ADPRP und Nikotinsäure. Dagegen wird NAADP in HeLa-Zellen durch die alkalische Phosphatase zu NAAD dephosphoryliert. Beide Reaktionen führen dazu, dass NAADP seine Ca²⁺-freisetzende Wirkung verliert (Lee und Aarhus, 1997).

Möglichweise spiegelt die unterschiedliche Expression von CD38 und alkalischer Phosphatase in den untersuchten Zelllinien die Interaktion mit anderen Signalwegen wider. So beeinflusst die Expression von CD38 sowohl das NAADP-Signalsystem (Bruhn, 2008; Mándi und Bak, 2008) als auch das cADPR-Signalsystem (Partida-Sánchez et al., 2001; Soares et al., 2007), was wiederum eine veränderte Ca²⁺-Signalgebung zur Folge hat. Andererseits reguliert CD38 in T-Lymphozyten über seine Funktion als Ektoenzym auch die Aktivität von ADP-Ribosyltransferasen (Krebs et al., 2005).

Ein Zusammenhang zwischen alkalischer Phosphatase und dem NAADP-vermittelten Ca²⁺-Signal ist bisher noch nicht beschrieben. In eigenen Untersuchungen wurde zum ersten Mal beobachtet, dass die alkalische Phosphatase der HeLa-Zellen NAADP

metabolisieren kann. Damit könnte die alkalische Phosphatase Einfluss auf das NAADP-Signalsystem nehmen, was folglich auch Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Signalgebung hätte. Andererseits nimmt die alkalische Phosphatase in ihrer Funktion als Ektoenzym Einfluss auf die Signaltransduktion über Purinorezeptoren (Picher et al., 2003; Mizumori et al., 2009).

Die beiden Enzyme CD38 und alkalische Phosphatase sind also in der Lage, NAADP zu metabolisieren. Gleichzeitig wirken sie aber auch auf andere Signalwege. Möglicherweise entstanden je nach Zelltyp andere Strategien zur Verknüpfung unterschiedlicher Signalwege.

6 Zusammenfassung

Ca^{2+} ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, der viele unterschiedliche Zellfunktionen wie beispielsweise Exozytose, Muskelkontraktion und Transkription kontrolliert. Um eine solche Vielfalt zu ermöglichen, wird die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zeitlich und räumlich präzise reguliert. Gewährleistet wird dies durch das komplexe Zusammenspiel der Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoffe *D-myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), cyclische ADP-Ribose (cADPR), und Nikotinsäureadenin dinukleotid-2'-phosphat (NAADP) sowie Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -Speichern.

Eine besondere Rolle kommt dabei dem Botenstoff NAADP zu, der als Schrittmacher der Ca^{2+} -Signalgebung dient. Zudem ist NAADP der wirksamste Ca^{2+} -freisetzende Botenstoff und löst schon in nanomolaren Konzentrationen ein Ca^{2+} -Signal aus. Mikromolare Konzentrationen NAADP dagegen können den NAADP-Signalweg inaktivieren und damit die Ca^{2+} -Signalgebung unterbrechen. Daher ist eine präzise Regulation der intrazellulären NAADP-Konzentration Voraussetzung für eine funktionelle Signalübertragung. Die Fragen zum Metabolismus von NAADP sind allerdings noch weitgehend ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden NAADP-abbauende Aktivitäten in Jurkat-T-Lymphozyten und HeLa-Zellen untersucht.

Lange Zeit hielt man das Ektoenzym CD38 für die Synthese von NAADP verantwortlich. Experimente an *CD38-knock down*-Zelllinien und *CD38-knock out*-Mäusen deuten jedoch daraufhin, dass CD38 am Abbau von NAADP beteiligt sein könnte. Für die Untersuchungen an Jurkat-T-Lymphozyten wurden CD38-exprimierende Wildtyp-Zellen sowie *CD38-knock down*-Zellen verwendet. Zunächst wurde die verminderte Expression von CD38 in den *knock down*-Zellen bestätigt und die Enzymaktivität von CD38 mit Hilfe von fluoreszierenden Substraten analysiert. Im Anschluss wurden HPLC-Analysen durchgeführt, die zeigten, dass CD38 im sauren Milieu NAADP bilden kann. Im neutralen Milieu hingegen wird NAADP durch CD38 zu 2-Phospho-ADP-Ribose und Nikotinsäure abgebaut. Die katalytischen Eigenschaften konnten an rekombinant in HEK-293-Zellen exprimiertem CD38 bestätigt werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem NAADP-Abbau in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen exprimieren das Enzym CD38 nicht. Dennoch konnte in diesem Zellsystem eine NAADP-abbauende Aktivität nachgewiesen werden. In HeLa-Zellen muss demnach ein anderes Enzym für den NAADP-Abbau verantwortlich sein. Zunächst konnte gezeigt werden, dass NAADP zu NAAD dephosphoryliert wird. Im Anschluss wurde die neue NAADP-abbauende Aktivität enzymkinetisch mittels colorimetrischer Enzymaktivitätsassays sowie HPLC-Analytik untersucht. Im Zuge dieser Experimente wurde zum ersten Mal eine HPLC-Methode entwickelt, welche die Analytik von 200 fmol – 1 pmol NAADP bzw. NAAD erlaubte. Die Bestimmung des pH-Optimums der

Abbau-Reaktion sowie Inhibitionsversuche legten nahe, dass es sich bei der untersuchten Aktivität um eine alkalische Phosphatase handelte. Die Expression alkalischer Phosphatasen in HeLa-Zellen konnte durch RT-PCR und Western Blot nachgewiesen werden. Die rekombinante Expression der alkalischen Phosphatase in HEK-293-Zellen bestätigte, dass NAADP durch das Enzym umgesetzt wird und damit ein neues Substrat für die alkalische Phosphatase darstellt.

Untersuchungen zur Struktur-Wirkbeziehung der Ca^{2+} -Freisetzung durch NAADP im Seeigeelei zeigten drei mögliche Abbauwege für NAADP: 1. Die Entfernung der Nikotinsäure-Gruppe, 2. die Dephosphorylierung an 2'-Position der Ribose sowie 3. die Deamidierung des Adenins. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Enzyme am Abbau von NAADP beteiligt sind. Während in Jurkat-T-Lymphozyten durch CD38 die Nikotinsäure-Gruppe von NAADP entfernt wird, wird in HeLa-Zellen NAADP durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Die beiden Zellsysteme haben demnach unterschiedliche Strategien entwickelt, um den Ca^{2+} -freisetzenden Botenstoff NAADP abzubauen. Zusätzlich nehmen die multifunktionellen Enzyme CD38 und alkalische Phosphatase Einfluss auf weitere Signalwege. Möglicherweise entstanden je nach Zelltyp andere Strategien zur Verknüpfung verschiedener Signalwege.

7 Abstract

Ca^{2+} is a universal second messenger regulating a wide variety of cell functions such as exocytosis, muscle contraction and gene transcription. The concerted interplay of the Ca^{2+} -releasing second messengers D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3), cyclic ADP ribose (cADPR) and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) as well as Ca^{2+} pumps and Ca^{2+} stores encodes specific messages by varying calcium signals in space, amplitude and time. Thus, the cell exploits the variability of Ca^{2+} signals to control a multitude of pathways.

NAADP plays a pivotal role as a trigger for the development of global Ca^{2+} signals. Furthermore, NAADP is the most potent Ca^{2+} -releasing second messenger known to date: It induces Ca^{2+} signals at concentrations in the low nanomolar range. At the same time, micromolar concentrations of NAADP can desensitize the NAADP signaling pathway and thus interrupt the Ca^{2+} signal. Therefore, precise control of the intracellular NAADP concentration is essential for functional Ca^{2+} signaling. However, the molecular mechanisms of NAADP metabolism remain to be elucidated. In the present study, NAADP metabolizing activities in Jurkat T lymphocytes and HeLa cells were investigated.

For a long time, the enzyme CD38 was considered responsible for the synthesis of NAADP. Recent insights from CD38 deficient cells and CD38 knock out mice, however, indicated that CD38 might instead be involved in NAADP degradation. To shed light on this issue, this study compared wild type Jurkat T lymphocytes expressing CD38 to CD38 knock down cells. First, reduced expression of CD38 in CD38 knock down cells was verified by analyzing enzyme activity utilizing fluorescent substrates. Then, NAADP formation by CD38 at acidic pH was analyzed by HPLC. At neutral pH however, NAADP was metabolized to ADP-ribose 2'-phosphate and nicotinic acid by CD38. The catalytic properties of CD38 were confirmed by experiments with CD38 recombinantly expressed in HEK-293 cells.

The second part of this study focused on NAADP metabolism in HeLa cells. HeLa cells do not express CD38 but possess NAADP degrading activity. This indicates that HeLa cells feature a different enzyme responsible for the metabolism of NAADP. Initially, NAADP was shown to be degraded to NAAD, which implies that the NAADP degrading activity is executed by a phosphatase. The newly discovered activity was characterized by colorimetric enzyme assays and HPLC. To make this possible, a new HPLC method was developed which allowed for the first time the detection of very small amounts of NAADP and NAAD (200 fmol – 1 pmol). The determination of the pH optimum and inhibitor studies suggested that the newly discovered activity was an alkaline phosphatase. The expression of alkaline phosphatase in HeLa cells was demonstrated by RT-PCR and Western blot. Subsequent recombinant expression of this alkaline phosphatase in HEK-293

cells confirmed that NAADP is degraded by the enzyme and therefore might function as a new substrate for alkaline phosphatase.

Analysis of the structural determinants of the Ca^{2+} -releasing NAADP function revealed three possible pathways for the degradation of NAADP: 1st removal of the nicotinic acid group, 2nd dephosphorylation of the 2' position of the ribose and 3rd deamidation of the adenine. The results of the present study indicate that different cell types use different pathways for the degradation of NAADP. While in Jurkat T lymphocytes CD38 removes the nicotinic acid group of NAADP, in HeLa cells alkaline phosphatase dephosphorylates NAADP. Thus, these cell types developed a different strategy to metabolize the Ca^{2+} releasing second messenger NAADP. This might be important for cross talk between different signaling pathways as the multifunctional enzymes CD38 and alkaline phosphatase also act on other signaling pathways.

8 Literaturverzeichnis

- Aarhus, R., Graeff, R.M., Dickey, D.M., Walseth, T.F. und Lee, H.C. (1995). ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J. Biol. Chem.*, 270: 30327-30333.
- Abraham, R.T. und Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 301-308.
- Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S. und Tsien, R.Y. (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature*, 349: 694-697.
- Adebanjo, O.A., Anandatheerthavarada, H.K., Koval, A.P., Moonga, B.S., Biswas, G., Sun, L. et al. (1999). A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis. *Nat. Cell Biol.*, 1: 409-414.
- Allbritton, N.L., Oancea, E., Kuhn, M.A. und Meyer, T. (1994). Source of nuclear calcium signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 12458-12462.
- Badminton, M.N., Kendall, J.M., Rembold, C.M. und Campbell, A.K. (1998). Current evidence suggests independent regulation of nuclear calcium. *Cell Calcium*, 23: 79-86.
- Barrio, J.R., Secrist, J.A.3. und Leonard, N.J. (1972). A fluorescent analog of nicotinamide adenine dinucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69: 2039-2042.
- Bates, J.M., Akerlund, J., Mittge, E. und Guillemin, K. (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host & Microbe*, 2: 371-382.
- Baykov, A.A., Evtushenko, O.A. und Avaeva, S.M. (1988). A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.*, 171: 266-270.
- Beck, R. und Burtscher, H. (1994). Expression of human placental alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 5: 192-197.
- Beech, D.J. (2005). TRPC1: store-operated channel and more. *Pflugers Arch.*, 451: 53-60.
- Beer, A. (1852). Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik und Chemie*, 86: 78-88.
- Benham, F., Cottell, D.C., Franks, L.M. und Wilson, P.D. (1977). Alkaline phosphatase activity in human bladder tumor cell lines. *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 266-274.

- Berg, I., Potter, B.V., Mayr, G.W. und Guse, A.H. (2000). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca²⁺-signaling. *J. Cell Biol.*, 150: 581-588.
- Berger, J., Howard, A.D., Gerber, L., Cullen, B.R. und Udenfriend, S. (1987). Expression of active, membrane-bound human placental alkaline phosphatase by transfected simian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 4885-4889.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. und Lipp, P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature*, 395: 645-648.
- Berridge, M.J., Lipp, P. und Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1: 11-21.
- Berridge, G., Cramer, R., Galione, A. und Patel, S. (2002). Metabolism of the novel Ca²⁺-mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via a 2'-specific Ca²⁺-dependent phosphatase. *Biochem. J.*, 365: 295-301.
- Billington, R.A., Thuring, J.W., Conway, S.J., Packman, L., Holmes, A.B. und Genazzani, A.A. (2004). Production and characterization of reduced NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate). *Biochem. J.*, 378: 275-280.
- Billington, R.A., Bruzzone, S., De Flora, A., Genazzani, A.A., Koch-Nolte, F., Ziegler, M. et al. (2006a). Emerging Functions of Extracellular Pyridine Nucleotides. *Mol. Med.*, 12: 324-327.
- Billington, R.A., Bellomo, E.A., Floriddia, E.M., Erriquez, J., Distasi, C. und Genazzani, A.A. (2006b). A transport mechanism for NAADP in a rat basophilic cell line. *FASEB J.*, 20: 521-523.
- Billington, R.A. und Genazzani, A.A. (2007). PPADS is a reversible competitive antagonist of the NAADP receptor. *Cell Calcium*, 41: 505-511.
- Bootman, M.D., Taylor, C.W. und Berridge, M.J. (1992). The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca²⁺ spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.*, 267: 25113-25119.
- Bourne, H.R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 134-142.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brailoiu, E., Churamani, D., Pandey, V., Brailoiu, G.C., Tuluc, F., Patel, S. et al. (2006). Messenger-specific role for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.*, 281: 15923-15928.

- Brailoiu, E., Churamani, D., Cai, X., Schrlau, M.G., Brailoiu, G.C., Gao, X. et al. (2009). Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J. Cell Biol.*, 186: 201-209.
- Brillantes, A.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinisky, E., Ondriasová, E., Moschella, M.C. et al. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77: 513-523.
- Bruhn, S. (2008). NAADP, CD38 und Ca^{2+} -Signalling: Komplexes Wechselspiel bei der Aktivierung von T-Lymphozyten. Dissertation, Universität Hamburg.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L. und De Flora A (2001). Connexin 43 hemi channels mediate Ca^{2+} -regulated transmembrane NAD^+ fluxes in intact cells. *FASEB J.*, 15: 10-12.
- Cakir-Kiefer, C., Muller-Steffner, H. und Schuber, F. (2000). Unifying mechanism for Aplysia ADP-ribosyl cyclase and CD38/ NAD^+ glycohydrolases. *Biochem. J.*, 349: 203-210.
- Calcraft, P.J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X. et al. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459: 596-600.
- Cancela, J.M., Churchill, G.C. und Galione, A. (1999). Coordination of agonist-induced Ca^{2+} -signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature*, 398: 74-76.
- Cancela, J.M., Van Coppenolle, F., Galione, A., Tepikin, A.V. und Petersen, O.H. (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.
- Cancela, J.M., Charpentier, G. und Petersen, O.H. (2003). Co-ordination of Ca^{2+} signalling in mammalian cells by the new Ca^{2+} -releasing messenger NAADP. *Pflugers Arch.*, 446: 322-327.
- Ceni, C., Muller-Steffner, H., Lund, F., Pochon, N., Schweitzer, A., De Waard, M. et al. (2003). Evidence for an intracellular ADP-ribosyl cyclase/ NAD^+ -glycohydrolase in brain from CD38-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 278: 40670-40678.
- Chen, Y., Chang, T. und Chang, G. (2004). Functional expression, purification, and characterization of the extra stable human placental alkaline phosphatase in the *Pichia pastoris* system. *Protein Expr. Purif.*, 36: 90-99.
- Chini, E.N. und Dousa, T.P. (1995). Enzymatic synthesis and degradation of nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP), a Ca^{2+} -releasing agonist, in rat tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 209: 167-174.
- Chini, E.N., Beers, K.W. und Dousa, T.P. (1995). Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.*, 270: 3216-3223.

- Chini, E.N. und De Toledo, F.G.S. (2002). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new intracellular second messenger?. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 282: C1191-8.
- Christensen, K.A., Myers, J.T. und Swanson, J.A. (2002). pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell. Sci.*, 115: 599-607.
- Chung, T.D.Y., Sergienko, E. und Millán, J.L. (2010). Assay format as a critical success factor for identification of novel inhibitor chemotypes of tissue-nonspecific alkaline phosphatase from high-throughput screening. *Molecules*, 15: 3010-3037.
- Churamani, D., Carrey, E.A., Dickinson, G.D. und Patel, S. (2004). Determination of cellular nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) levels. *Biochem. J.*, 380: 449-454.
- Churamani, D., Boulware, M.J., Geach, T.J., Martin, A.C.R., Moy, G.W., Su, Y. et al. (2007). Molecular characterization of a novel intracellular ADP-ribosyl cyclase. *PLoS ONE*, 2: e797.
- Churamani, D., Boulware, M.J., Ramakrishnan, L., Geach, T.J., Martin, A.C.R., Vacquier, V.D. et al. (2008). Molecular characterization of a novel cell surface ADP-ribosyl cyclase from the sea urchin. *Cell. Signal.*, 20: 2347-2355.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S. und Galione, A. (2002). NAADP mobilizes Ca^{2+} from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell*, 111: 703-708.
- Clapham, D.E. (1995a). Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature*, 375: 634-635.
- Clapham, D.E. (1995b). Calcium signaling. *Cell*, 80: 259-268.
- Clapper, D.L., Walseth, T.F., Dargie, P.J. und Lee, H.C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 262: 9561-9568.
- Coleman, J.E. (1992). Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21: 441-483.
- Cornea, R.L., Nitu, F.R., Samsó, M., Thomas, D.D. und Fruen, B.R. (2010). Mapping the ryanodine receptor FK506-binding protein subunit using fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.*, 285: 19219-19226.
- Cosker, F., Cheviron, N., Yamasaki, M., Menteyne, A., Lund, F.E., Moutin, M. et al. (2010). The Ecto-enzyme CD38 Is a Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Synthase That Couples Receptor Activation to Ca^{2+} Mobilization from Lysosomes in Pancreatic Acinar Cells. *J. Biol. Chem.*, 285: 38251-38259.

- Dammermann, W. und Guse, A.H. (2005). Functional ryanodine receptor expression is required for NAADP-mediated local Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 280: 21394-21399.
- Dammermann, W., Zhang, B., Nebel, M., Cordinieri, C., Odoardi, F., Kirchberger, T. et al. (2009). NAADP-mediated Ca^{2+} signaling via type 1 ryanodine receptor in T cells revealed by a synthetic NAADP antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106: 10678-10683.
- Davis, L.C., Morgan, A.J., Ruas, M., Wong, J.L., Graeff, R.M., Poustka, A.J. et al. (2008). Ca^{2+} signaling occurs via second messenger release from intraorganelle synthesis sites. *Curr. Biol.*, 18: 1612-1618.
- Dayan, J. und Wilson, I.B. (1964). The phosphorylation of TRIS by alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 81: 620-623.
- De Flora, A., Guida, L., Franco, L. und Zocchi, E. (1997a). The CD38/cyclic ADP-ribose system: a topological paradox. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 1149-1166.
- De Flora, A., Guida, L., Franco, L., Zocchi, E., Bruzzone, S., Benatti, U. et al. (1997b). CD38 and ADP-ribosyl cyclase catalyze the synthesis of a dimeric ADP-ribose that potentiates the calcium-mobilizing activity of cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.*, 272: 12945-12951.
- De Smedt, F., Missiaen, L., Parys, J.B., Vanweyenberg, V., De Smedt, H. und Erneux, C. (1997). Isoprenylated human brain type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase controls Ca^{2+} oscillations induced by ATP in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 17367-17375.
- Demenis, M.A. und Leone, F.A. (2000). Kinetic characteristics of ATP hydrolysis by a detergent-solubilized alkaline phosphatase from rat osseous plate. *IUBMB Life*, 49: 113-119.
- Di Mauro, S., Manes, T., Hesse, L., Kozlenkov, A., Pizauro, J.M.J., Hoylaerts, M.F. et al. (2002). Kinetic characterization of hypophosphatasia mutations with physiological substrates. *J. Bone Miner. Res.*, 17: 1383-1391.
- Doellgast, G.J. und Benirschke, K. (1979). Placental alkaline phosphatase in Hominidae. *Nature*, 280: 601-602.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K. und Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392: 933-936.
- Downes, C.P., Mussat, M.C. und Michell, R.H. (1982). The inositol trisphosphate phosphomonoesterase of the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.*, 203: 169-177.
- Eaton, R.H. und Moss, D.W. (1967). Action of purified alkaline phosphatases from human liver and small intestine on nucleoside phosphates. *Biochem. J.*, 104: 65P.

- Eliakim, R., Mahmood, A. und Alpers, D.H. (1991). Rat intestinal alkaline phosphatase secretion into lumen and serum is coordinately regulated. *Biochim. Biophys. Acta*, 1091: 1-8.
- Elson, N.A. und Cox, R.P. (1969). Production of fetal-like alkaline phosphatase by HeLa cells. *Biochem. Genet.*, 3: 549-561.
- Fallon, M.D., Whyte, M.P. und Teitelbaum, S.L. (1980). Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by L-tetramisole prevents in vitro cartilage calcification. *Lab. Invest.*, 43: 489-494.
- Fedde, K.N. und Whyte, M.P. (1990). Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: normal and hypophosphatasia fibroblast study. *Am. J. Hum. Genet.*, 47: 767-775.
- Fishman, W.H., Inglis, N.R., Green, S., Anstiss, C.L., Gosh, N.K., Reif, A.E. et al. (1968). Immunology and biochemistry of Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer. *Nature*, 219: 697-699.
- Fishman, W. und Sie, H.G. (1970). L-homoarginine; an inhibitor of serum "bone and liver" alkaline phosphatase. *Clin. Chim. Acta*, 29: 339-341.
- Fishman, W.H. und Singer, R.M. (1975). Placental alkaline phosphatase: regulation of expression in cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 259: 261-272.
- Folley, S.J. und Kay, H.D. (1935). The alkaline phosphomonoesterase of the mammary gland. *Biochem. J.*, 29: 1837-1850.
- Francis, M.D., Russell, R.G. und Fleisch, H. (1969). Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science*, 165: 1264-1266.
- Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Zocchi, E., Usai, C. und De Flora, A. (1998). The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes. *FASEB J.*, 12: 1507-1520.
- Galperin, M.Y., Bairoch, A. und Koonin, E.V. (1998). A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Protein Sci.*, 7: 1829-1835.
- Garattini, E., Hua, J.C., Pan, Y.C. und Udenfriend, S. (1986). Human liver alkaline phosphatase, purification and partial sequencing: homology with the placental isozyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 245: 331-337.
- Gasser, A. (2005). Untersuchungen zu Calcium-mobilisierenden Adenin-Nukleotiden in humanen T-Lymphocyten. Dissertation, Universität Hamburg.

- Gasser, A., Bruhn, S. und Guse, A.H. (2006). Second messenger function of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate revealed by an improved enzymatic cycling assay. *J. Biol. Chem.*, 281: 16906-16913.
- Geddes, K. und Philpott, D.J. (2008). A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology*, 135: 8-12.
- Gerasimenko, J.V., Maruyama, Y., Yano, K., Dolman, N.J., Tepikin, A.V., Petersen, O.H. et al. (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, J.V., Sherwood, M., Tepikin, A.V., Petersen, O.H. und Gerasimenko, O.V. (2006). NAADP, cADPR and IP3 all release Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J. Cell. Sci.*, 119: 226-238.
- Gettins, P. und Coleman, J.E. (1983). ^{31}P nuclear magnetic resonance of phosphoenzyme intermediates of alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 258: 408-416.
- Gey, G.O., Coffman, W.D. und Kubicek, M.T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12: 264-265.
- Goldberg, R.F., Austen, W.G.J., Zhang, X., Munene, G., Mostafa, G., Biswas, S. et al. (2008). Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 3551-3556.
- Graeff, R.M., Mehta, K. und Lee, H.C. (1994). GDP-ribosyl cyclase activity as a measure of CD38 induction by retinoic acid in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 722-727.
- Graeff, R. und Lee, H.C. (2002a). A novel cycling assay for nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate with nanomolar sensitivity. *Biochem. J.*, 367: 163-168.
- Graeff, R. und Lee, H.C. (2002b). A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar sensitivity. *Biochem. J.*, 361: 379-384.
- Graeff, R., Liu, Q., Kriksunov, I.A., Hao, Q. und Lee, H.C. (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.
- Graeff, R., Liu, Q., Kriksunov, I.A., Kotaka, M., Oppenheimer, N., Hao, Q. et al. (2009). Mechanism of cyclizing NAD to cyclic ADP-ribose by ADP-ribosyl cyclase and CD38. *J. Biol. Chem.*, 284: 27629-27636.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, 36: 59-74.

- Griffin, C.A., Smith, M., Henthorn, P.S., Harris, H., Weiss, M.J., Raducha, M. et al. (1987). Human placental and intestinal alkaline phosphatase genes map to 2q34-q37. *Am. J. Hum. Genet.*, 41: 1025-1034.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260: 3440-3450.
- Guida, L., Bruzzone, S., Sturla, L., Franco, L., Zocchi, E. und 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.
- Guse, A.H., Roth, E. und Emmrich, F. (1993). Intracellular Ca^{2+} pools in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem. J.*, 291 (Pt 2): 447-451.
- Guse, A.H., da Silva, C.P., Berg, I., Skapenko, A.L., Weber, K., Heyer, P. et al. (1999). Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*, 398: 70-73.
- Guse, A.H. (2004). Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr. Med. Chem.*, 11: 847-855.
- Harkness, D.R. (1968). Studies on human placental alkaline phosphatase. II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126: 513-523.
- Harris, H. (1990). The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta*, 186: 133-150.
- Heidemann, A.C., Schipke, C.G. und Kettenmann, H. (2005). Extracellular application of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate induces Ca^{2+} signaling in astrocytes in situ. *J. Biol. Chem.*, 280: 35630-35640.
- Hellmich, M.R. und Strumwasser, F. (1991). Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul.*, 2: 193-202.
- Henthorn, P.S., Raducha, M., Fedde, K.N., Lafferty, M.A. und Whyte, M.P. (1992). Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 9924-9928.
- Herz, F. und Nitowsky, H.M. (1962). Alkaline phosphatase activity of human cell cultures: kinetic and physical-chemical properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96: 506-515.
- Herz, F. (1985). Alkaline phosphatase isozymes in cultured human cancer cells. *Experientia*, 41: 1357-1361.
- Higashida, H., Bowden, S.E.H., Yokoyama, S., Salmina, A., Hashii, M., Hoshi, N. et al. (2007). Overexpression of human CD38/ADP-ribosyl cyclase enhances acetylcholine-induced Ca^{2+} signalling in rodent NG108-15 neuroblastoma cells. *Neurosci. Res.*, 57: 339-346.

- Hinshaw, J.E., Carragher, B.O. und Milligan, R.A. (1992). Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell*, 69: 1133-1141.
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R., Drobny, H. und Zidar, A. (2002). Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem. J.*, 367: 423-431.
- Holtz, K.M. und Kantrowitz, E.R. (1999). The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Lett.*, 462: 7-11.
- Holtz, K.M., Stec, B. und Kantrowitz, E.R. (1999). A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *J. Biol. Chem.*, 274: 8351-8354.
- Hoshi, K., Amizuka, N., Oda, K., Ikehara, Y. und Ozawa, H. (1997). Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem. Cell Biol.*, 107: 183-191.
- Howard, M., Grimaldi, J.C., Bazan, J.F., Lund, F.E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R.M. et al. (1993). Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*, 262: 1056-1059.
- Hoylaerts, M.F., Manes, T. und Millán, J.L. (1992). Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. *Biochem. J.*, 286 (Pt 1): 23-30.
- Hoylaerts, M.F., Ding, L., Narisawa, S., Van Kerckhoven, S. und Millan, J.L. (2006). Mammalian alkaline phosphatase catalysis requires active site structure stabilization via the N-terminal amino acid microenvironment. *Biochemistry*, 45: 9756-9766.
- Hsu, H.H. und Camacho, N.P. (1999). Isolation of calcifiable vesicles from human atherosclerotic aortas. *Atherosclerosis*, 143: 353-362.
- Hui, M. und Tenenbaum, H.C. (1998). New face of an old enzyme: alkaline phosphatase may contribute to human tissue aging by inducing tissue hardening and calcification. *Anat. Rec.*, 253: 91-94.
- Humbert, J.P., Matter, N., Artault, J.C., Köppler, P. und Malviya, A.N. (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J. Biol. Chem.*, 271: 478-485.
- Imboden, J.B. und Stobo, J.D. (1985). Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.*, 161: 446-456.

- Irvine, R.F., Letcher, A.J., Heslop, J.P. und Berridge, M.J. (1986). The inositol tris/tetrakisphosphate pathway--demonstration of Ins(1,4,5)P₃ 3-kinase activity in animal tissues. *Nature*, 320: 631-634.
- Irvine, R.F. und Divecha, N. (1992). Phospholipids in the nucleus--metabolism and possible functions. *Semin. Cell Biol.*, 3: 225-235.
- Irvine, R.F. (1992). Is inositol tetrakisphosphate the second messenger that controls Ca²⁺ entry into cells?. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, 26: 161-185.
- Ishibashi, K., Suzuki, M. und Imai, M. (2000). Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270: 370-376.
- Jerala, R. (2007). Structural biology of the LPS recognition. *Int. J. Med. Microbiol.*, 297: 353-363.
- Kato, T., Berger, S.J., Carter, J.A. und Lowry, O.H. (1973). An enzymatic cycling method for nicotinamide-adenine dinucleotide with malic and alcohol dehydrogenases. *Anal. Biochem.*, 53: 86-97.
- Kim, E.E. und Wyckoff, H.W. (1990). Structure of alkaline phosphatases. *Clin. Chim. Acta*, 186: 175-187.
- Kim, B., Park, K., Yim, C., Takasawa, S., Okamoto, H., Im, M. et al. (2008). Generation of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose by glucagon-like peptide-1 evokes Ca²⁺ signal that is essential for insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Diabetes*, 57: 868-878.
- Kim, S., Cho, B.H. und Kim, U. (2010). CD38-mediated Ca²⁺ signaling contributes to angiotensin II-induced activation of hepatic stellate cells: attenuation of hepatic fibrosis by CD38 ablation. *J. Biol. Chem.*, 285: 576-582.
- Kinnear, N.P., Boittin, F., Thomas, J.M., Galione, A. und Evans, A.M. (2004). Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1. *J. Biol. Chem.*, 279: 54319-54326.
- Kinnear, N.P., Wyatt, C.N., Clark, J.H., Calcraft, P.J., Fleischer, S., Jeyakumar, L.H. et al. (2008). Lysosomes co-localize with ryanodine receptor subtype 3 to form a trigger zone for calcium signalling by NAADP in rat pulmonary arterial smooth muscle. *Cell Calcium*, 44: 190-201.
- Kirk, C.J., Creba, J.A., Downes, C.P. und Michell, R.H. (1981). Hormone-stimulated metabolism of inositol lipids and its relationship to hepatic receptor function. *Biochem. Soc. Trans.*, 9: 377-379.
- Komoda, T., Koyama, I., Nagata, A., Sakagishi, Y., DeSchryver-Kecskemeti, K. und Alpers, D.H. (1986). Ontogenic and phylogenic studies of intestinal, hepatic, and

- placental alkaline phosphatases. Evidence that intestinal alkaline phosphatase is a late evolutionary development. *Gastroenterology*, 91: 277-286.
- Kozlenkov, A., Manes, T., Hoylaerts, M.F. und Millán, J.L. (2002). Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 277: 22992-22999.
- Kozlenkov, A., Le Du, M.H., Cuniasse, P., Ny, T., Hoylaerts, M.F. und Millán, J.L. (2004). Residues determining the binding specificity of uncompetitive inhibitors to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J. Bone Miner. Res.*, 19: 1862-1872.
- Krebs, C., Adriouch, S., Braasch, F., Koestner, W., Leiter, E.H., Seman, M. et al. (2005). CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins. *J. Immunol.*, 174: 3298-3305.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lallès, J. (2010). Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.*, 68: 323-332.
- Langhorst, M.F., Schwarzmann, N. und Guse, A.H. (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.
- Lanier, M., Sergienko, E., Simão, A.M., Su, Y., Chung, T., Millán, J.L. et al. (2010). Design and synthesis of selective inhibitors of placental alkaline phosphatase. *Bioorg. Med. Chem.*, 18: 573-579.
- Le Du, M.H., Stigbrand, T., Taussig, M.J., Menez, A. und Stura, E.A. (2001). Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 276: 9158-9165.
- Lee, H.C., Walseth, T.F., Bratt, G.T., Hayes, R.N. und Clapper, D.L. (1989). Structural determination of a cyclic metabolite of NAD^+ with intracellular Ca^{2+} -mobilizing activity. *J. Biol. Chem.*, 264: 1608-1615.
- Lee, H.C. und Aarhus, R. (1991). ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes NAD^+ into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul.*, 2: 203-209.
- Lee, H.C. und Aarhus, R. (1995). A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.*, 270: 2152-2157.
- Lee, H.C. und Aarhus, R. (1997). Structural determinants of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate important for its calcium-mobilizing activity. *J. Biol. Chem.*, 272: 20378-20383.

- Lee, E.H., Rho, S., Kwon, S., Eom, S.H., Allen, P.D. und Kim, D.H. (2004). N-terminal region of FKBP12 is essential for binding to the skeletal ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, 279: 26481-26488.
- Lerner, F., Niere, M., Ludwig, A. und Ziegler, M. (2001). Structural and functional characterization of human NAD kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288: 69-74.
- Lewis, A.M., Masgrau, R., Vasudevan, S.R., Yamasaki, M., O'Neill, J.S., Garnham, C. et al. (2007). Refinement of a radioreceptor binding assay for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Anal. Biochem.*, 371: 26-36.
- Lin, C.W., Sasaki, M., Orcutt, M.L., Miyayama, H. und Singer, R.M. (1976). Plasma membrane localization of alkaline phosphatase in HeLa cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 24: 659-667.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E.J. et al. (2005). STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr. Biol.*, 15: 1235-1241.
- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M.J. und Bootman, M.D. (1997). Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J.*, 16: 7166-7173.
- Liu, Q., Kriksunov, I.A., Graeff, R., Munshi, C., Lee, H.C. und Hao, Q. (2006). Structural basis for the mechanistic understanding of human CD38-controlled multiple catalysis. *J. Biol. Chem.*, 281: 32861-32869.
- Llinas, P., Stura, E.A., Ménez, A., Kiss, Z., Stigbrand, T., Millán, J.L. et al. (2005). Structural studies of human placental alkaline phosphatase in complex with functional ligands. *J. Mol. Biol.*, 350: 441-451.
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A.J., He, X., Smith, D.A., Elliot-Smith, E., Sillence, D.J. et al. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.*, 14: 1247-1255.
- Lorenz, B. und Schröder, H.C. (2001). Mammalian intestinal alkaline phosphatase acts as highly active exopolyphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1547: 254-261.
- Lottspeich, F. und Engels, J. (2008). Bioanalytik. *Springer*, 2. Auflage.
- Low, M.G. (1989). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 988: 427-454.
- Lui, P.P., Kong, S.K., Fung, K.P. und Lee, C.Y. (1998). The rise of nuclear and cytosolic Ca^{2+} can be uncoupled in HeLa cells. *Pflugers Arch.*, 436: 371-376.
- Lund, F.E., Muller-Steffner, H.M., Yu, N., Stout, C.D., Schuber, F. und Howard, M.C. (1999). CD38 signaling in B lymphocytes is controlled by its ectodomain but occurs independently of enzymatically generated ADP-ribose or cyclic ADP-ribose. *J. Immunol.*, 162: 2693-2702.

- Morton, R.K. (1957). The kinetics of hydrolysis of phenyl phosphate by alkaline phosphatases. *Biochem. J.*, 65: 674-682.
- MacKenzie, A.B., Surprenant, A. und North, R.A. (1999). Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 868: 716-729.
- MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B. und Green, N.M. (1985). Amino-acid sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, 316: 696-700.
- Macgregor, A., Yamasaki, M., Rakovic, S., Sanders, L., Parkesh, R., Churchill, G.C. et al. (2007). NAADP controls cross-talk between distinct Ca^{2+} stores in the heart. *J. Biol. Chem.*, 282: 15302-15311.
- Magni, G., Emanuelli, M., Amici, A., Raffaelli, N. und Ruggieri, S. (1997). Purification of human nicotinamide-mononucleotide adenylyltransferase. *Meth. Enzymol.*, 280: 241-247.
- Mak, D.O., McBride, S. und Foskett, J.K. (1998). Inositol 1,4,5-trisphosphate activation of inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 15821-15825.
- Makiya, R. und Stigbrand, T. (1992). Placental alkaline phosphatase as the placental IgG receptor. *Clin. Chem.*, 38: 2543-2545.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A.L., Ortolan, E. et al. (2008). Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.*, 88: 841-886.
- Malo, M.S., Alam, S.N., Mostafa, G., Zeller, S.J., Johnson, P.V., Mohammad, N. et al. (2010). Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut*, 59: 1476-1484.
- Martin, D., Tucker, D.F., Gorman, P., Sheer, D., Spurr, N.K. und Trowsdale, J. (1987). The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37. *Ann. Hum. Genet.*, 51: 145-152.
- McComb, R., Bowers, G.J. und Posen, S. (1979). Alkaline phosphatase. *Plenum Press New York*.
- Meissner, G. (2004). Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium*, 35: 621-628.
- Miao, D. und Scutt, A. (2002). Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J. Histochem. Cytochem.*, 50: 333-340.
- Michaelis, L. und Menten, M.L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49: 333-369.

- Miller, A.L., Suntharalingam, M., Johnson, S.L., Audhya, A., Emr, S.D. und Wente, S.R. (2004). Cytoplasmic inositol hexakisphosphate production is sufficient for mediating the Gle1-mRNA export pathway. *J. Biol. Chem.*, 279: 51022-51032.
- Millán, J.L. (1992). Alkaline phosphatase as a reporter of cancerous transformation. *Clin. Chim. Acta*, 209: 123-129.
- Millán, J.L., Narisawa, S., Lemire, I., Loisel, T.P., Boileau, G., Leonard, P. et al. (2008). Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.*, 23: 777-787.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. et al. (1997). Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388: 882-887.
- Mizumori, M., Ham, M., Guth, P.H., Engel, E., Kaunitz, J.D. und Akiba, Y. (2009). Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum. *J. Physiol. (Lond.)*, 587: 3651-3663.
- Mojzisoová, A., Krizanová, O., Záciková, L., Komínková, V. und Ondrias, K. (2001). Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflugers Arch.*, 441: 674-677.
- Moreschi, I., Bruzzone, S., Melone, L., De Flora, A. und Zocchi, E. (2006). NAADP⁺ synthesis from cADPRP and nicotinic acid by ADP-ribosyl cyclases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345: 573-580.
- Moreschi, I., Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Nicholas, R.A. et al. (2008). NAADP⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor. *Cell Calcium*, 43: 344-355.
- Moss, D.W., Eaton, R.H., Smith, J.K. und Whitby, L.G. (1967). Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. *Biochem. J.*, 102: 53-57.
- Mullins, F.M., Park, C.Y., Dolmetsch, R.E. und Lewis, R.S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106: 15495-15500.
- Murphy, K., Travers, P. und Walpot, M. (2008). Janeway's immunobiology. *Garland Science*, 7th edition: chapter 6.
- Mushtaq, M., Nam, T. und Kim, U. (2011). Critical role for CD38-mediated Ca^{2+} signaling in thrombin-induced procoagulant activity of mouse platelets and hemostasis. *J. Biol. Chem.*.
- Mándi, M. und Bak, J. (2008). Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) and Ca^{2+} mobilization. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 28: 163-184.

- Mészáros, L.G., Bak, J. und Chu, A. (1993). Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Nature*, 364: 76-79.
- Nakano, T., Inoue, I., Alpers, D.H., Akiba, Y., Katayama, S., Shinozaki, R. et al. (2009). Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 297: G207-14.
- Narisawa, S., Huang, L., Iwasaki, A., Hasegawa, H., Alpers, D.H. und Millán, J.L. (2003). Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol. Cell. Biol.*, 23: 7525-7530.
- Narisawa, S., Harmey, D., Yadav, M.C., O'Neill, W.C., Hoylaerts, M.F. und Millán, J.L. (2007). Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. *J. Bone Miner. Res.*, 22: 1700-1710.
- Navazio, L., Bewell, M.A., Siddiqua, A., Dickinson, G.D., Galione, A. und Sanders, D. (2000). Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 8693-8698.
- Naylor, E., Arredouani, A., Vasudevan, S.R., Lewis, A.M., Parkesh, R., Mizote, A. et al. (2009). Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. *Nat. Chem. Biol.*, 5: 220-226.
- Nayudu, R.V. und de Meis, L. (1989). Energy transduction at the catalytic site of enzymes: hydrolysis of phosphoester bonds and synthesis of pyrophosphate by alkaline phosphatase. *FEBS Lett.*, 255: 163-166.
- Noguchi, N., Takasawa, S., Nata, K., Tohgo, A., Kato, I., Ikehata, F. et al. (1997). Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca²⁺ from islet microsomes. *J. Biol. Chem.*, 272: 3133-3136.
- Oancea, E., Teruel, M.N., Quest, A.F. und Meyer, T. (1998). Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J. Cell Biol.*, 140: 485-498.
- Ohkubo, S., Kimura, J. und Matsuoka, I. (2000). Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells: a key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response. *Br. J. Pharmacol.*, 131: 1667-1672.
- Ohkura, Y., Kai, M. und Nohta, H. (1994). Fluorogenic reactions for biomedical chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.*, 659: 85-107.
- Ohta, Y., Kitanaka, A., Mihara, K., Imataki, O., Ohnishi, H., Tanaka, T. et al. (2011). Expression of CD38 with intracellular enzymatic activity: a possible explanation for the insulin release induced by intracellular cADPR. *Mol. Cell. Biochem.*

- Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch.*, 77: 4-12.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. und Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 552-565.
- Partida-Sánchez, S., Cockayne, D.A., Monard, S., Jacobson, E.L., Oppenheimer, N., Garvy, B. et al. (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, G.C. und 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.
- Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C. et al. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, 411: 595-599.
- Pessah, I.N., Francini, A.O., Scales, D.J., Waterhouse, A.L. und Casida, J.E. (1986). Calcium-ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.*, 261: 8643-8648.
- Picher, M., Graff, R.D. und Lee, G.M. (2003a). Extracellular nucleotide metabolism and signaling in the pathophysiology of articular cartilage. *Arthritis Rheum.*, 48: 2722-2736.
- Picher, M., Burch, L.H., Hirsh, A.J., Spychala, J. und Boucher, R.C. (2003b). Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem.*, 278: 13468-13479.
- Pitt, S.J., Funnell, T.M., Sitsapesan, M., Venturi, E., Rietdorf, K., Ruas, M. et al. (2010). TPC2 is a novel NAADP-sensitive Ca^{2+} release channel, operating as a dual sensor of luminal pH and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.*, 285: 35039-35046.
- Poelstra, K., Bakker, W.W., Klok, P.A., Kamps, J.A., Hardonk, M.J. und Meijer, D.K. (1997). Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *Am. J. Pathol.*, 151: 1163-1169.
- Povinelli, C.M. und Knoll, B.J. (1991). Trace expression of the germ-cell alkaline phosphatase gene in human placenta. *Placenta*, 12: 663-668.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A. und Hogan, P.G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443: 230-233.
- Putney, J.W.J. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7: 1-12.

- Rah, S., Mushtaq, M., Nam, T., Kim, S.H. und Kim, U. (2010). Generation of cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate by CD38 for Ca²⁺ signaling in interleukin-8-treated lymphokine-activated killer cells. *J. Biol. Chem.*, 285: 21877-21887.
- Ramakrishnan, L., Muller-Steffner, H., Bosc, C., Vacquier, V.D., Schuber, F., Moutin, M. et al. (2010). A single residue in a novel ADP-ribosyl cyclase controls production of the calcium-mobilizing messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J. Biol. Chem.*, 285: 19900-19909.
- Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H. und Schlossman, S.F. (1980). Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 1588-1592.
- Rezende, A.A., Pizauro, J.M., Ciancaglini, P. und Leone, F.A. (1994). Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate. *Biochem. J.*, 301 (Pt 2): 517-522.
- Rosen, D., Lewis, A.M., Mizote, A., Thomas, J.M., Aley, P.K., Vasudevan, S.R. et al. (2009). Analogues of the nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) antagonist Ned-19 indicate two binding sites on the NAADP receptor. *J. Biol. Chem.*, 284: 34930-34934.
- Samsó, M., Shen, X. und Allen, P.D. (2006). Structural characterization of the RyR1-FKBP12 interaction. *J. Mol. Biol.*, 356: 917-927.
- Sasaki, M. und Fishman, W.H. (1973). Ultrastructural studies on Regan and non-Regan isoenzymes of alkaline phosphatase in human ovarian cancer cells. *Cancer Res.*, 33: 3008-3018.
- Sato, M., Hida, N., Ozawa, T. und Umezawa, Y. (2000). Fluorescent indicators for cyclic GMP based on cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha and green fluorescent proteins. *Anal. Chem.*, 72: 5918-5924.
- Say, J.C., Ciuffi, K., Furriel, R.P., Ciancaglini, P. und Leone, F.A. (1991). Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim. Biophys. Acta*, 1074: 256-262.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. und Gey, G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, 97: 695-710.
- Schneider, U., Schwenk, H.U. und Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer*, 19: 621-626.

- Schuber, F. und 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.
- Schwartz, J.H. und Lipmann, F. (1961). Phosphate incorporation into alkaline phosphatase of *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 47: 1996-2005.
- Sergienko, E.A. und Millán, J.L. (2010). High-throughput screening of tissue-nonspecific alkaline phosphatase for identification of effectors with diverse modes of action. *Nat Protoc*, 5: 1431-1439.
- She, Q.B., Mukherjee, J.J., Chung, T. und Kiss, Z. (2000a). Placental alkaline phosphatase, insulin, and adenine nucleotides or adenosine synergistically promote long-term survival of serum-starved mouse embryo and human fetus fibroblasts. *Cell. Signal.*, 12: 659-665.
- She, Q.B., Mukherjee, J.J., Huang, J.S., Crilly, K.S. und Kiss, Z. (2000b). Growth factor-like effects of placental alkaline phosphatase in human fetus and mouse embryo fibroblasts. *FEBS Lett.*, 469: 163-167.
- Singaravelu, K. und Deitmer, J.W. (2006). Calcium mobilization by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) in rat astrocytes. *Cell Calcium*, 39: 143-153.
- Singer, R.M. und Fishman, W.H. (1974). Characterization of two HeLa sublines: TCRC-1 produces Regan isoenzyme and TCRC-2, non-Regan isoenzyme. *J. Cell Biol.*, 60: 777-780.
- Smith, G.P. und Peters, T.J. (1981). Subcellular localization and properties of pyridoxal phosphate phosphatases of human polymorphonuclear leukocytes and their relationship to acid and alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 661: 287-294.
- Smith, M., Weiss, M.J., Griffin, C.A., Murray, J.C., Buetow, K.H., Emanuel, B.S. et al. (1988). Regional assignment of the gene for human liver/bone/kidney alkaline phosphatase to chromosome 1p36.1-p34. *Genomics*, 2: 139-143.
- Soares, S., Thompson, M., White, T., Isbell, A., Yamasaki, M., Prakash, Y. et al. (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.
- Srikanth, S., Jung, H., Kim, K., Souda, P., Whitelegge, J. und Gwack, Y. (2010). A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nat. Cell Biol.*, 12: 436-446.
- States, D.J., Walseth, T.F. und Lee, H.C. (1992). Similarities in amino acid sequences of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 495.

- Stephon, R.L., Niedbala, R.S., Schray, K.J. und Heindel, N.D. (1992). An enzymatic cycling procedure for beta-NADP⁺ generated by 3'-phosphodiesterase, 2':3'-cyclic nucleotide. *Anal. Biochem.*, 202: 6-9.
- Stigbrand, T. (1984). Present status and future trends of human alkaline phosphatases. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 166: 3-14.
- Storey, D.J., Shears, S.B., Kirk, C.J. und Michell, R.H. (1984). Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate to inositol in liver. *Nature*, 312: 374-376.
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. und 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.
- Sumikawa, K., Okochi, T. und Adachi, K. (1990). Differences in phosphatidate hydrolytic activity of human alkaline phosphatase isozymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1046: 27-31.
- Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O., González, R., Ballester, I., Nieto, A., Gálvez, J. et al. (2004). Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem. Pharmacol.*, 68: 2317-2326.
- Tang (2001). . *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282: 1304-1310.
- Tanimura, A., Nezu, A., Morita, T., Turner, R.J. und Tojyo, Y. (2004). Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1,4,5-trisphosphate in single living cells. *J. Biol. Chem.*, 279: 38095-38098.
- Tohgo, A., Takasawa, S., Noguchi, N., Koguma, T., Nata, K., Sugimoto, T. et al. (1994). Essential cysteine residues for cyclic ADP-ribose synthesis and hydrolysis by CD38. *J. Biol. Chem.*, 269: 28555-28557.
- Tokumitsu, S., Tokumitsu, K. und Fishman, W.H. (1981b). Intracellular alkaline phosphatase activity in cultured human cancer cells. *Histochemistry*, 73: 1-13.
- Tokumitsu, S., Tokumitsu, K. und Fishman, W.H. (1981a). Immunocytochemical demonstration of intracytoplasmic alkaline phosphatase in HeLa TCRC-1 cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 1080-1087.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 4350-4354.
- Ueda, H., Morishita, R., Narumiya, S., Kato, K. und Asano, T. (2004). Galphq/11 signaling induces apoptosis through two pathways involving reduction of Akt phosphorylation and activation of RhoA in HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, 298: 207-217.

- Uhlén, P. und Fritz, N. (2010). Biochemistry of calcium oscillations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396: 28-32.
- Vergote, I., Onsrud, M. und Nustad, K. (1987). Placental alkaline phosphatase as a tumor marker in ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.*, 69: 228-232.
- Vitol, E.A., Brailoiu, E., Orynbayeva, Z., Dun, N.J., Friedman, G. und Gogotsi, Y. (2010). Surface-enhanced Raman spectroscopy as a tool for detecting Ca^{2+} mobilizing second messengers in cell extracts. *Anal. Chem.*, 82: 6770-6774.
- Von Euler, H. und Funke, Y. (1912). *Z. Physiol. Chem.*, 77: 488.
- Vorbrodt, A. und Borun, T.W. (1979). Ultrastructural cytochemical studies of plasma membrane phosphatase activities during the HeLa S3 cell cycle. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1596-1603.
- Wilson, I.B., Dayan, J. und Cyr, K. (1964). Some properties of alkaline phosphatase from escherichia coli. transphosphorylation . *J. Biol. Chem.*, 239: 4182-4185.
- Waymire, K.G., Mahuren, J.D., Jaje, J.M., Guilarte, T.R., Coburn, S.P. und MacGregor, G.R. (1995). Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat. Genet.*, 11: 45-51.
- Weber, M., Möller, K., Welzeck, M. und Schorr, J. (1995). Short technical reports. Effects of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells. *BioTechniques*, 19: 930-940.
- Wennberg, C., Kozlenkov, A., Di Mauro, S., Fröhlander, N., Beckman, L., Hoylaerts, M.F. et al. (2002). Structure, genomic DNA typing, and kinetic characterization of the D allozyme of placental alkaline phosphatase (PLAP/ALPP). *Hum. Mutat.*, 19: 258-267.
- Werner, A. (1993). Reversed-phase and ion-pair separations of nucleotides, nucleosides and nucleobases: analysis of biological samples in health and disease. *J. Chromatogr.*, 618: 3-14.
- Whyte, M.P. (1994). Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr. Rev.*, 15: 439-461.
- Williams, D.A., Fogarty, K.E., Tsien, R.Y. und Fay, F.S. (1985). Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature*, 318: 558-561.
- Wilson, P.D., Rustin, G.J. und Peters, T.J. (1981). The ultrastructural localization of human neutrophil alkaline phosphatase in normal individuals during pregnancy and in patients with chronic granulocytic leukaemia. *Histochem. J.*, 13: 31-43.
- Wilson, P.D., Smith, G.P. und Peters, T.J. (1983). Pyridoxal 5'-phosphate: a possible physiological substrate for alkaline phosphatase in human neutrophils. *Histochem. J.*, 15: 257-264.

- Xin, H.B., Rogers, K., Qi, Y., Kanematsu, T. und Fleischer, S. (1999). Three amino acid residues determine selective binding of FK506-binding protein 12.6 to the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, 274: 15315-15319.
- Yamaguchi, F., Ohshima, T. und Sakuraba, H. (2007). An enzymatic cycling assay for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate using NAD synthetase. *Anal. Biochem.*, 364: 97-103.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, A.J., Churchill, G.C., Patel, S., Ashcroft, S.J.H. et al. (2004). Organelle selection determines agonist-specific Ca^{2+} signals in pancreatic acinar and beta cells. *J. Biol. Chem.*, 279: 7234-7240.
- Yamasaki, M., Thomas, J.M., Churchill, G.C., Garnham, C., Lewis, A.M., Cancela, J. et al. (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.
- Zhang, F., Wolff, M.W., Williams, D., Busch, K., Lang, S.C., Murhammer, D.W. et al. (2001). Affinity purification of secreted alkaline phosphatase produced by baculovirus expression vector system. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 90: 125-136.
- Zhang, L., Balcerzak, M., Radisson, J., Thouverey, C., Pikula, S., Azzar, G. et al. (2005). Phosphodiesterase activity of alkaline phosphatase in ATP-initiated Ca^{2+} and phosphate deposition in isolated chicken matrix vesicles. *J. Biol. Chem.*, 280: 37289-37296.
- Zhang, F. und 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.
- Zhu, M.X., Ma, J., Parrington, J., Calcraft, P.J., Galione, A. und Evans, A.M. (2010). Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 298: C430-41.
- Zocchi, E., Daga, A., Usai, C., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S. et al. (1998). Expression of CD38 increases intracellular calcium concentration and reduces doubling time in HeLa and 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 273: 8017-8024.
- Zong, X., Schieder, M., Cuny, H., Fenske, S., Gruner, C., Rötzer, K. et al. (2009). The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca^{2+} -release from lysosomal stores. *Pflugers Arch.*, 458: 891-899.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. H. Guse für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung der technischen und finanziellen Mittel. Ebenso möchte ich mich für seinen kompetenten Rat in wissenschaftlichen Fragen und die engagierte Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. U. Wienand danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Susanne Sehner vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des UKE für die Einführung in die statistische Auswertung der Daten.

Herzlich bedanken möchte ich mich besonders bei Dr. Ralf Fliegert und Angelika Harneit für die Bereitstellung von CD38⁺-HEK-293-Zellen und CD38.

Allen früheren und jetzigen Kollegen, insbesondere Dr. Ralf Fliegert, Angelika Harneit, Kathrin Jung, Tanja Kirchberger, Merle Nebel, Dr. Cornelia Siebrands und Karin Weber danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft, die zahlreichen Diskussionen wissenschaftlicher Fragen und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Zudem danke ich der ehemaligen TA-Schülerin Sonja Pannwitz für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung.

Meinem Mann und meiner Familie Mann danke ich für ihre liebevolle Unterstützung.

10 Anhang

10.1 Veröffentlichungen

Fliegert, R., Glassmeier, G., Schmid, F., Cornils, K., Genisyuerek, S., Harneit, A., Schwarz, J. R. und Guse, A.H. (2007). Modulation of Ca²⁺ entry and plasma membrane potential by human TRPM4b. *FEBS J.*, 274, 704-13.

Kirchberger, T., Moreau, C., Wagner, G. K., Fliegert, R., Siebrands, C. C., Nebel, M., Schmid, F., Harneit, A., Odoardi, F., Flügel, A., Potter, B. V. L. und Guse, A.H. (2009). 8-Bromo-cyclic inosine diphosphoribose: towards a selective cyclic ADP-ribose agonist. *Biochem. J.*, 422, 139-49.

Dammermann, W., Zhang, B., Nebel, M., Cordiglieri, C., Odoardi, F., Kirchberger, T., Kawakami, N., Dowden, J., Schmid, F., Dornmair, K., Hohenegger, M., Flügel, A., Guse, A. H. und Potter, B.V.L. (2009). NAADP-mediated Ca²⁺ signaling via type 1 ryanodine receptor in T cells revealed by a synthetic NAADP antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 10678-83.

10.2 Kongressbeiträge

Macasieb, J., Schmid, F., Guse, A.H., Fliegert, R. (2007). Regulation of TRPM4b by intracellular adenine nucleotides. Tagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM), Hamburg, 16.-19. September 2007.

Dammermann, W., Cordiglieri, C., Zhang, B., Schmid, F., Nebel, M., Odoardi, F., Kawakami, N., Potter, B.V.L., Flügel, A. und Guse, A.H. (2007). The NAADP/calcium signaling pathway: a major signal transducer in proliferation and cytokine production of CD4⁺ effector T cells. Tagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM), Hamburg, 16.-19. September 2007.

Nebel, M., Schmid, F., Zhang, B., Cordiglieri, C., Odoardi, F., Odoardi, F., Potter, B.V.L., Flügel, A. und Guse, A.H. (2008). Global and local calcium signaling upon APC T cell interaction. NAD Meeting, Hamburg, 14.-17. September 2008 und 10th Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells (Meeting of the European Calcium Society), Leuven/Belgien, 17.-20. September 2008.

Schmid, F., Guse, A. H. (2010). New insights into NAADP metabolism, 11th Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells (Meeting of the European Calcium Society), Warschau/Polen, 6.-9. September 2010.

Kirchberger, T., Moreau, C., Wagner, G.K., Fliegert, R., Siebrands, C., Nebel, M., Schmid, F., Harneit, A., Odoardi, F., Flügel, A., Potter, B.V.L., Guse, A.H. (2010). Ca²⁺ mobilization in T-lymphocytes by 8-Br-N1-cIDPR, an analogue of the second messenger cADPR. 11th Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells (Meeting of the European Calcium Society), Warschau/Polen, 6.-9. September 2010.

10.3 HPLC-Programme

ADPRP7

Agilent 1100/1200 Binary Pump 1

Control
 Column Flow 1.00 ml/min
 Stoptime 40.00 min
 Posttime Off

Solvents
 Solvent A 100.0 % (Puffer A)
 Solvent B 0.0 % (Puffer B)

PressureLimits
 Minimum Pressure 0 bar
 Maximum Pressure 400 bar

Timetable

Time	Solv.B (%)	Flow (ml/min)
0	0	1
5	0	1
30	60	1
32	60	1
34	0	1
40	0	1

Agilent 1100/1200 Diode Array Detector 1

Signals

Signal	Store	Signal,Bw	Reference,Bw [nm]
A:	Yes	254 10	360 100
B:	Yes	270 10	360 100
C:	Yes	260 10	360 100
D:	Yes	205 10	Off
E:	No	260 10	360 60

Agilent 1100/1200 Column Thermostat 1

Temperature settings
 Left temperature : 25.0°C
 Right temperature : Same as left

ADPRP7 mit Fluoreszenzdetektion

Agilent 1100/1200 Binary Pump 1

Control

Column Flow 1.00 ml/min
 Stoptime 40.00 min
 Posttime Off

Solvents

Solvent A 100.0 % (Puffer A)
 Solvent B 0.0 % (Puffer B)

PressureLimits

Minimum Pressure 0 bar
 Maximum Pressure 400 bar

Timetable

Time	Solv.B (%)	Flow (ml/min)
0	0	1
5	0	1
30	60	1
32	60	1
34	0	1
40	0	1

Agilent 1100/1200 Diode Array Detector 1

Signal Store Signal,Bw Reference,Bw [nm]

A: Yes 254 10 360 100
 B: Yes 270 10 360 100
 C: Yes 260 10 360 100
 D: Yes 205 10 Off
 E: No 260 10 360 60

Agilent 1100/1200 Fluorescence Detector 1

Excitation : 250 nm
 Emission : 410 nm

Agilent 1100/1200 Column Thermostat 1

Temperature settings

Left temperature : 25.0°C
 Right temperature : Same as left

FS_30Bmod19

=====

Agilent 1100/1200 Binary Pump 1

Control

Column Flow 0.80 ml/min
Stoptime 29.00 min
Posttime Off

Solvents

Solvent A 70.0 % (Puffer A)
Solvent B 30.0 % (Puffer B)

PressureLimits

Minimum Pressure 0 bar
Maximum Pressure 400 bar

Timetable

Time	Solv.B (%)	Flow (ml/min)
0	30	0.8
4	30	0.8
10	60	0.8
13	100	0.8
20	100	0.8
22	30	0.8
29	30	0.8

=====

Agilent 1100/1200 Diode Array Detector 1

Signals

Signal	Store	Signal,Bw	Reference,Bw [nm]
A:	Yes	254 10	360 100
B:	Yes	270 10	360 100
C:	Yes	260 10	360 100
D:	Yes	205 10	Off
E:	No	260 10	360 60

=====

Agilent 1100/1200 Column Thermostat 1

Temperature settings

Left temperature : 20.0°C
Right temperature : Same as left

FSCADPR_30Bmod04

 Agilent 1100/1200 Binary Pump 1

Control

Column Flow 0.80 ml/min
 Stoptime 40.00 min
 Posttime Off

Solvents

Solvent A 70.0 % (Puffer A)
 Solvent B 30.0 % (Puffer B)

PressureLimits

Minimum Pressure 0 bar
 Maximum Pressure 400 bar

Timetable

Time	Solv.B (%)	Flow (ml/min)
0	30	0.8
3.5	30	0.8
17	80	0.8
27	90	0.8
31	100	0.8
33	100	0.8
35	30	0.8
40	30	0.8

 Agilent 1100/1200 Diode Array Detector 1

Signals

Signal	Store	Signal,Bw	Reference,Bw [nm]
A:	Yes	254 10	360 100
B:	Yes	270 10	360 100
C:	Yes	260 10	360 100
D:	Yes	205 10	Off
E:	No	260 10	360 60

 Agilent 1100/1200 Column Thermostat 1

Temperature settings

Left temperature : 20.0°C
 Right temperature : Same as left

NAADP V22

 Agilent 1100/1200 Binary Pump 1

Control
 Column Flow 1.00 ml/min
 Stoptime 30.00 min
 Posttime Off

Solvents
 Solvent A 50.0 % (Puffer A)
 Solvent B 50.0 % (Puffer C)

PressureLimits
 Minimum Pressure 0 bar
 Maximum Pressure 400 bar

Timetable

Time	Solv.B (%)	Flow (ml/min)
0	50	1
5	50	1
13	100	1
23	100	1
25	50	1
30	50	1

 Agilent 1100/1200 Diode Array Detector 1

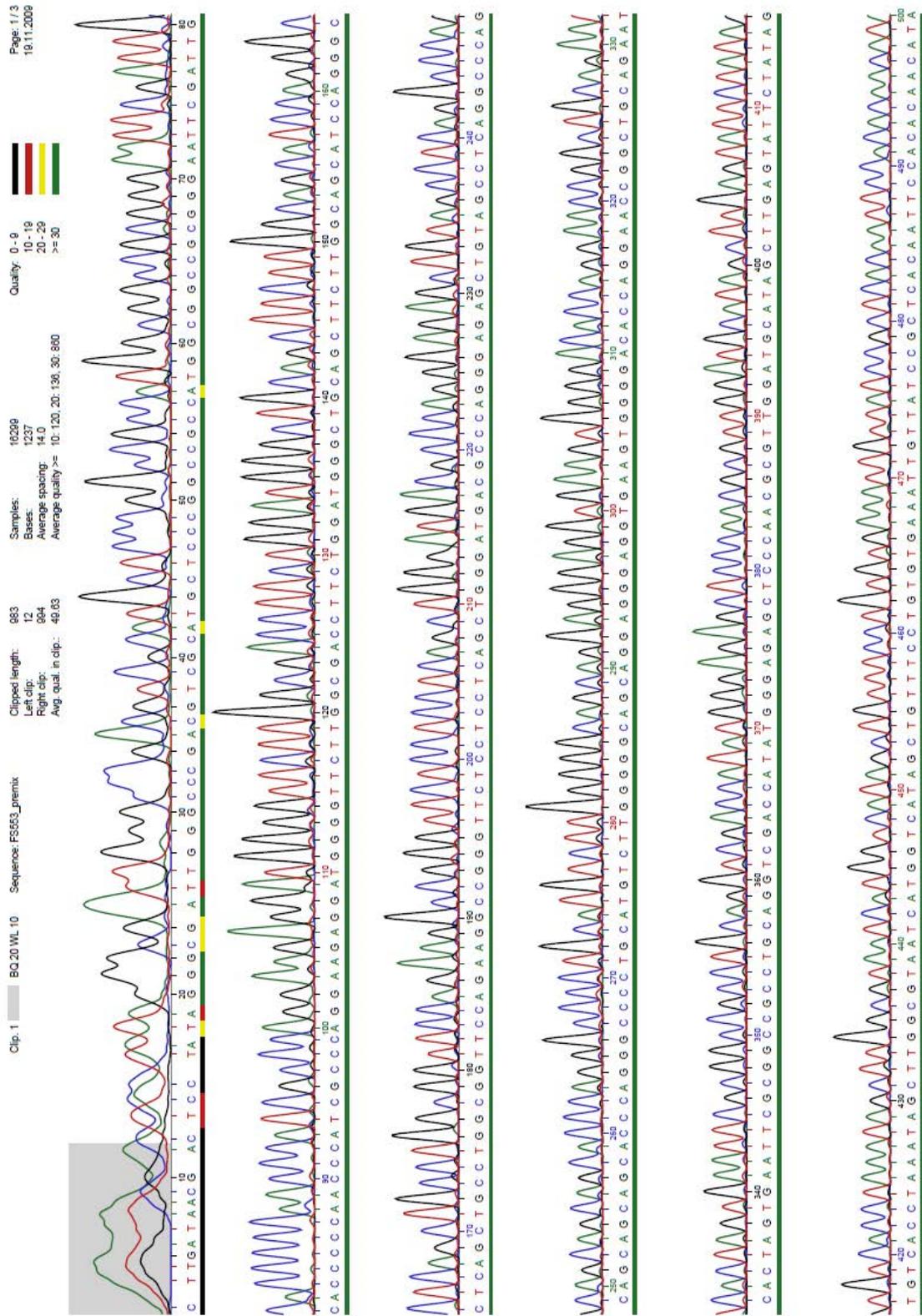
Signals

Signal	Store	Signal,Bw	Reference,Bw [nm]
A:	Yes	254 10	360 100
B:	Yes	270 10	360 100
C:	Yes	260 10	360 100
D:	Yes	205 10	Off
E:	No	260 10	360 60

 Agilent 1100/1200 Column Thermostat 1

Temperature settings
 Left temperature : 30.0°C
 Right temperature : Same as left

IAP



TNAP

