

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Tübingen**

Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

**Einfluss des Kofaktors NAD^+/NADH der
S-Adenosylhomocystein-Hydrolase
auf die Adenosinbindung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Angelika Lüdtkke**

**aus
Ulm**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald
2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Kömpf

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bisheriger Kenntnisstand	1
1.2	Eigene Fragestellung	13
2	Untersuchungsgut und Methoden.....	14
2.1	Das Enzym SAH-Hydrolase	14
2.1.1	Reinigung des Enzyms	14
2.1.2	Überprüfung der Reinheit des Enzyms	15
2.1.3	Proteinbestimmung	15
2.1.4	Reduktion der SAH-Hydrolase.....	15
2.1.5	Bestimmung der NAD ⁺ /NADH-Verhältnisse der SAH-Hydrolase	16
2.1.5.1	HPLC	16
2.1.5.2	³ H-NAD ⁺	17
2.2	Der Radioligand ³ H-Adenosin.....	17
2.3	Theoretische Grundlagen.....	19
2.3.1	Prinzip der spezifischen Bindung	19
2.3.2	Rezeptorbindungsstudien.....	21
2.3.2.1	Zeitabhängige Assoziation	21
2.3.2.2	Zeitabhängige Dissoziation	22
2.3.2.3	Konzentrationsabhängige Sättigung	22
2.4	Filtration.....	24
2.4.1	Die Filtrationsapparatur	24
2.4.2	Die Filter	26
2.4.3	Filtrationsvorgang	26
2.4.4	Messung der Radioaktivität.....	27
2.5	Bestimmung der Adenosin-Bindungsstellen mittels Azido- ³ H-Adenosin.	27
2.5.1	Markierung der SAH-Hydrolase mit Azido- ³ H-Adenosin	27
2.5.2	Sequenzierung der Azido- ³ H-Adenosin-markierten Peptide.....	28
2.6	Berechnungen und Statistik	28
3	Ergebnisse	29
3.1	NAD ⁺ /NADH-Verhältnisse an der SAH-Hydrolase	29
3.2	Zeitabhängige Bindungskinetik.....	29

3.3	Konzentrationsabhängige Sättigung	33
3.3.1	³ H-Adenosin-Konzentration bis 250 nM	33
3.3.2	³ H-Adenosin-Konzentration bis 60 μM	37
3.4	Bestimmung der Adenosin-Bindungsstellen an der SAH-Hydrolase ..	41
4	Diskussion.....	42
4.1	NAD ⁺ /NADH-Quotient	42
4.2	Zeitabhängige Assoziation und Dissoziation.....	43
4.3	Konzentrationsabhängige Sättigung	45
4.4	Adenosin-Bindungsstellen an der SAH-Hydrolase.....	49
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	53

Verzeichnis der Abkürzungen

ADA	Adenosindesaminase
Ado	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BHMT	Betain-Homocystein S-Methyltransferase
B_{\max}	Bindungsmaximum
Bq	Becquerel
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CYA	Adenylatzyklase
Ci/mmol	Curie pro Millimol
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethyl-Cellulose
DEAE-Sepharose	Diethylaminoethyl-Sepharose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Decays per minute, Zerfallsaktivität
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
GBq/mmol	Gigabecquerel pro Millimol
GF/B	Glasfaser-Filterpapier vom Typ B
^3H -Adenosin	Tritium-markiertes Adenosin
^3H -NAD ⁺	Tritium-markiertes NAD ⁺
HPLC	Hochdruck-Chromatographie
k^1	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k^{-1}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K_d	Dissoziationskonstante
kDA	Kilodalton
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
[L]	Ligand
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation

Verzeichnis der Abkürzungen

METH	5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein S-Methyltransferase
MeV	Megavolt
MG	Molekulargewicht
NAD/NAD ⁺ /NADH	Nikotinamiddinukleotid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PD1	Phosphodiesterase 1
PEI	Polythylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
[R]	Rezeptor
[RL]	Rezeptor-Ligand-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAH-H	S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel- Elektrophorese
Stammlsg.	Stammlösung
TBq/mmol	Terabecquerel pro Millimol
TFA	Trifluoressigsäure
zpm	Zerfälle pro Minute

1 Einleitung

1.1 Bisheriger Kenntnisstand

Die S-Adenosylhomocystein (SAH) Hydrolase katalysiert die reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und L-Homocystein und wurde schon 1959 von De la Haba und Cantoni beschrieben.

Das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion liegt mit einer Gleichgewichtskonstanten von $K_{eq} = 10^{-6}$ M auf der Seite der Synthese von SAH aus Adenosin und Homocystein (De la Haba & Cantoni, 1959). *In vivo* jedoch erfolgt die Reaktion hauptsächlich in Richtung der Hydrolyse, was darauf zurückzuführen ist, dass Adenosin und Homocystein in der Zelle schnell verstoffwechselt werden (De la Haba & Cantoni, 1959; Cortese et al., 1974; Crooks et al., 1979; Eloranta, 1977).

Das Enzym SAH-Hydrolase ist bei allen untersuchten zoologischen Spezies, wie zum Beispiel Hund, Ratte, Huhn, Kaninchen (Walker & Duerre, 1975), sowie beim Menschen (Hershfield, 1978) zu finden. Hershfield wies die SAH-Hydrolase in der menschlichen Plazenta nach, und in den folgenden Jahren wurde das Enzym auch in einer Reihe weiterer Organe wie Lymphblasten, Erythrozyten (Hershfield et al., 1979), Leber (Ueland et al., 1979) und Fibroblasten (Kaminska & Fox, 1980) gefunden.

Walker und Duerre (1975) konnten zeigen, dass die Enzymaktivität der SAH-Hydrolase in Leber, Pankreas und Nieren verschiedener Spezies am höchsten ist, gefolgt von Milz und Hoden. Herz und Gehirn weisen die niedrigste Aktivität auf.

Die SAH-Hydrolase wurde auch bei Prokaryonten gefunden. Shimizu et al. (1984) untersuchten die SAH-Hydrolase bei *Alcaligenes faecalis* und Porcelli et al. (1993) am thermoazidophilen Bakterium *Sulfolobus solfactorius*.

Außerdem wurde das Enzym in Mikroorganismen wie Hefe (Duerre & Schlenk, 1962; Duerre, 1968) und sogar in Pflanzen (Walker & Duerre, 1975; Jakubowski & Guranowski, 1981) nachgewiesen.

Dass dieses Enzym eines der konserviertesten Enzyme ist, zeigt ein Vergleich der Aminosäuresequenz des menschlichen Enzyms mit dem der Ratte.

Die Aminosäuresequenz der SAH-Hydrolase der Ratte stimmt zu 97% mit der des menschlichen Enzyms, und zu 52% mit der Sequenz des Enzyms bei *Plasmodium falciparum* überein (Creedon et al., 1994).

Abgesehen von dem Prokaryonten *Alcaligenes faecalis* (Shimizu et al., 1984) und den Samen der gelben Lupine (Guranowski & Pawelkiewicz, 1977) handelt es sich bei allen untersuchten SAH-Hydrolasen um Tetramere, die ein Molekulargewicht zwischen 180 und 200 kDa aufweisen (Døskeland & Ueland, 1982). Das Molekulargewicht pro Untereinheit liegt bei 45 bis 48 kDa (Palmer & Abeles, 1976; Sugden & Corbin, 1976; Ueland & Døskeland, 1977; Hershfield, 1978; Richards et al., 1978; Ueland et al., 1978; Palmer & Abeles, 1979; Schatz et al., 1979; Fujioka & Takata, 1981; Døskeland & Ueland, 1982).

Eine DNA-Sequenz aus 1299 Nukleotiden kontrolliert die Expression einer Polypeptidkette mit einem Massengewicht von 47,7 kDa (Coulter-Karis & Hershfield, 1989).

Durch Ampholine-Gelelektrophorese wurden isoelektrische Punkte zwischen 5,3 und 6,0 gemessen (Richards et al., 1978).

Hershfield und Francke (1982) konnten zeigen, dass sich der Genlocus der SAH-Hydrolase beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 20 befindet, auf dem auch der Locus der Adenosindesaminase kartiert ist.

Beim Menschen wurde für die SAH-Hydrolase ein elektrophoretisch darstellbarer Polymorphismus nachgewiesen. Drei Phänotypen SAH-Hydrolase 1, SAH-Hydrolase 2-1 und SAH-Hydrolase 2 werden von zwei kodominanten Allelen SAH-Hydrolase *1 und SAH-Hydrolase *2 kontrolliert (Bissbort et al., 1983).

Die Hauptaufgabe der SAH-Hydrolase ist die reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und Homocystein (De la Haba & Cantoni, 1959).

Dies ist in Vertebraten der einzige bekannte Abbauweg des SAH (Cantoni & Chiang, 1980).

Mit dem folgenden Schema soll ein Überblick über die Stoffwechselwege von SAH, Adenosin und Homocystein gegeben werden:

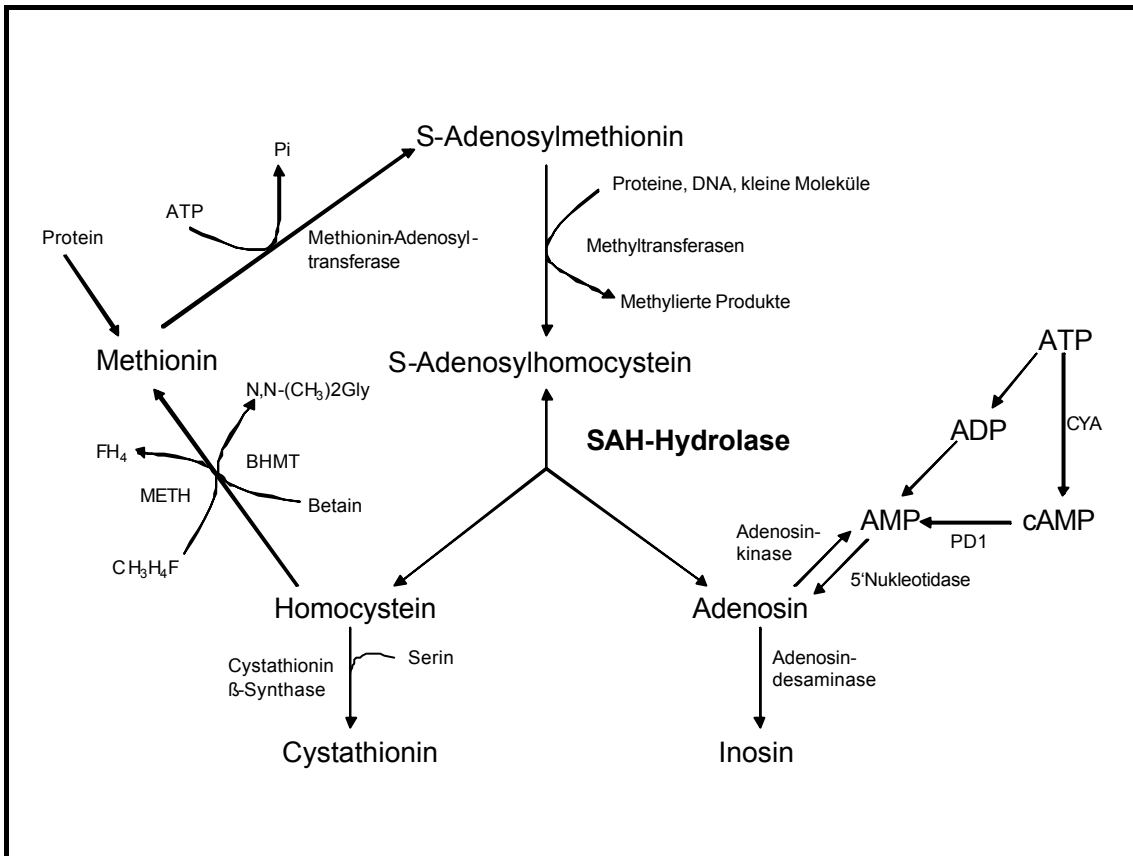


Abb.1: Überblick über die Stellung der SAH-Hydrolase im Stoffwechsel (Kloor et al., 2002).

- BHMT – Betain-Homocystein S-Methyltransferase
- CYA – Adenylatzyklase
- METH – 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein S-Methyltransferase
- PD1 – Phosphodiesterase 1

Das gebildete Adenosin kann auf zwei verschiedenen Wegen abgebaut werden:

Es wird entweder durch die Adenosindesaminase zu Inosin desaminiert, das dann zu Harnsäure abgebaut wird, oder es wird mit Hilfe der Adenosinkinase phosphoryliert und so zu AMP umgewandelt (Fox & Kelley, 1978).

Da der K_m -Wert der Adenosinkinase für Adenosin kleiner ($0,9\mu\text{M}$) ist als derjenige der Adenosindesaminase ($90\mu\text{M}$) (Lloyd & Schrader, 1993), wird das gebildete Adenosin vorwiegend zu AMP phosphoryliert. Liegt in der Zelle jedoch eine hohe Konzentration an ATP vor, wird Adenosin hauptsächlich durch die Adenosindesaminase zu Inosin verstoffwechselt (Fox & Kelley, 1978).

Im Organismus erfüllt Adenosin zahlreiche Aufgaben.

Es bewirkt am Herzen durch die Hemmung der Adenylatzyklase eine Vasodilatation der Koronararterien (Schrader et al., 1981; Schütz et al., 1981; Webster & Olsson, 1981; Berne et al., 1983; Kitakaze et al., 1993).

In der Niere erzeugt Adenosin eine Vasokonstriktion (Osswald & Gleiter, 1993) und reguliert verschiedene Nierenfunktionen wie die glomeruläre Filtrationsrate, die Elektrolyte-Exkretion und die Freisetzung von Renin und Erythropoietin (Osswald, 1984; Osswald et al., 1991).

Desweiteren erfolgt durch Adenosin eine Hemmung der Lipolyse im Fettgewebe (Fredholm & Sollevi, 1981), der Thrombozytenaggregation, der de novo Pyrimidinsynthese (Aranow, 1961; Green & Chan, 1973; Hilz & Kaukel, 1973; Snyder & Seegmiller, 1976) sowie der Neurotransmittersynthese (Spielman & Osswald, 1978).

Allgemein wird Adenosin eine vagotrope Wirkung zugeschrieben, und Füllgraf und Palm (1997) entdeckten eine bronchokonstriktorische Wirkung.

In der Zelle kann Homocystein nur durch die Hydrolyse von SAH durch die SAH-Hydrolase hergestellt werden (Cantoni & Chiang, 1980).

Der Abbau hingegen kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen:

- (I) die Remethylierung des Homocystein zu Methionin kann entweder durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase oder durch die Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase erfolgen;
- (II) die Metabolisierung zu Cystein findet über Cystathionin durch die Cystathionin- β -Synthetase statt (Mudd & Poole, 1975).

Ein erhöhter Plasmaspiegel an Homocystein wird als Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit angesehen (Nygard et al., 1997).

Eine hemmende Wirkung auf die Hydrolyse von SAH *in vitro* haben sowohl Adenosin als auch Homocystein. Unter physiologischen Bedingungen jedoch werden diese Produkte in der Zelle sofort metabolisiert, so dass dieser hemmende Effekt nicht auftritt (De la Haba & Cantoni, 1959). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann es jedoch zur Akkumulation von Adenosin oder Homocystein in der Zelle kommen. Ein Anstieg dieser Metabolite führt zur Synthese von SAH. Dadurch steigt in der Zelle der SAH-Spiegel (Johnston & Kredich, 1979; Kredich & Hershfield, 1979; Kredich & Martin, 1980) auf Werte von 30-60 μM (Kloor et al., 2002).

SAH entsteht jedoch nicht nur aus der Synthese durch die SAH-Hydrolase, sondern ist auch Produkt bei allen S-Adenosylmethionin (SAM) -abhängigen Transmethylierungsreaktionen. Dabei wird eine aktivierte Methylgruppe vom SAM auf verschiedenste Makromoleküle wie Proteine, RNA, DNA und Polysaccharide, sowie auf kleine Moleküle wie Histamine, Phospholipide, Norepinephrin und Katecholamine übertragen (Keller & Borchardt, 1988). Aufgrund des hohen Potentials des SAM, Methylgruppen zu übertragen, ist dies der wichtigste biologische Transmethylierungsweg (Cantoni, 1975).

Da SAH Methyltransferasen in Form einer Produkthemmung beeinflussen kann, reguliert die Aktivität der SAH-Hydrolase indirekt alle SAM-abhängigen Methyltransferasen (Deguchi & Barchas, 1971; Pugh et al., 1977; Hasobe et al., 1989). Da die SAH-Hydrolase als einziges Enzym den Abbau von SAH katalysiert (Cantoni, 1986), ist dies ein wichtiger Rückkoppelungsmechanismus. Durch Hemmung der SAH-Hydrolase und nachfolgende Erhöhung des intrazellulären SAH-Gehalts können antivirale (Wolfe & Borchardt, 1991; Patil et al., 1992; Liu et al., 1993; Villalon et al., 1993; Wnuk et al., 1994), antiparasitische (Bitonti et al., 1990; Henderson et al., 1992), antiarthritische und immunosuppressive Effekte (Wolos et al., 1993 a; Wolos et al., 1993 b) erzielt werden.

Die antivirale Wirkung beruht auf der Hemmung der Methyltransferasen durch den erhöhten SAH-Gehalt und als Folge davon auf einer Hypomethylierung der cap-Struktur der viralen mRNA (Wolfe & Borchardt, 1991; Liu et al., 1992). Ein solcher SAH-Hydrolase-Inhibitor mit einem breiten antiviralen Wirkspektrum ist (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine ((S)-DHPA), ein synthetisches Adenosin-Analogon (De Clercq et al., 1978). Natürliche Adenosin-Analoga und ebenfalls Inhibitoren der ersten Generation sind Neplanocin, Aristeromycin und D-Eriteradenin (Yuan et al., 1996).

Die Interaktion dieser Analoga mit der Adenosindesaminase und der Adenosinkinase führte zu unerwünschten sekundären metabolischen Effekten, die durch die Synthese einer zweiten Generation von SAH-Hydrolase-Hemmern reduziert bzw. ganz vermieden wurden. Als Beispiel für diese Inhibitoren wäre (1'R,2'S,3'R)-9-(2',3'-dihydroxycyclopenten-1-yl)Adenin (DHCeA) zu nennen (Hasobe et al., 1987; Hasobe et al., 1988; Narayanan et al., 1988; De Clercq et al., 1989; Ault-Riche et al., 1993).

Stockand et al. (1999) konnten zeigen, dass die SAH-Hydrolase durch den Abbau von SAH als Endprodukt von Methylierungsreaktionen wichtig für den Aldosteron-induzierten Na^+ -Transport ist. Dieser Na^+ -Transport ist von einer Aldosteron-sensitiven substratspezifischen Transmethylierungsreaktion abhängig, wobei SAH als Endprodukt anfällt. Wird die SAH-Hydrolase-Aktivität durch einen Inhibitor gehemmt oder die Expression des Enzyms durch ein Antisense-Oligonukleotid verringert, lässt sich eine Abnahme des Aldosteron-abhängigen Natriumstroms durch eine geringere Offen-Wahrscheinlichkeit der epithelialen Natriumkanäle feststellen (Stockand et al., 2001). Ebenfalls die Arbeitsgruppe um Stockand et al. (1999) berichtete von einer Induktion der Aktivität der SAH-Hydrolase durch Aldosteron, wobei jedoch noch nicht klar ist, ob dabei die Proteinmenge oder nur die Aktivität schon vorhandenen Proteins erhöht wird. Vermutet wird eine Induktion auf posttranslationaler Ebene, da Steroide keinen Effekt auf die Expression der SAH-Hydrolase haben.

Die Aufgabe eines intrazellulären Adenosinspeicherproteins kommt der SAH-Hydrolase aufgrund ihrer Adenosin-Bindungsfähigkeit zu (Hershfield & Kredich, 1978; Ueland & Helland, 1983).

Da die SAH-Hydrolase einen Teil des Adenosins in einem Komplex fest bindet, wird das gebundene Adenosin vor dem Abbau durch die Adenosindesaminase geschützt. Dieses Phänomen wird Sequestrierung genannt (Sæbø & Ueland, 1979).

Aus der Literatur ist bekannt, dass Adenosin an die SAH-Hydrolase mit Affinitäten von 9 nM bis 500 nM bindet. Alle Angaben weisen dabei ausschließlich auf eine Adenosin-Bindungsstelle hin (Hershfield & Kredich, 1978; Palmer & Abeles, 1979).

Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die SAH-Hydrolase zwei Adenosin-Bindungsstellen besitzt und außerdem cAMP binden kann (Olsson, 1978). Für das cAMP liegt nur eine Bindungsstelle vor, die jedoch identisch mit einer der Adenosin-Bindungsstellen ist. Aiyar und Hershfield (1985) stellten dies fest, als sich zeigte, dass Adenosin das radioaktiv markierte cAMP vollständig vom Enzym verdrängen kann, cAMP das radioaktive Adenosin jedoch nur partiell.

Ueland und Døskeland (1978) fanden außerdem heraus, dass Adenosin in seinem Dissoziationsverhalten schnelle und langsame Komponenten aufweist, während cAMP eine Kinetik 1. Ordnung zeigt und die Dissoziation sehr schnell erfolgt.

Die SAH-Hydrolase besteht aus vier strukturell gleichen Untereinheiten (Yongbo et al., 1999), die im Stoffwechsel als Tetramer die gleiche Rolle spielen (Gomi et al., 1985), jedoch kristallographisch (Yongbo et al., 1999) unabhängig voneinander sind. Jede dieser vier Untereinheiten setzt sich aus 431 Aminosäuren zusammen (Gomi et al., 1989) und enthält als Kofaktor ein Molekül fest gebundenes NAD^+ , das am katalytischen Mechanismus des Enzyms beteiligt ist (Palmer & Abeles, 1976; Palmer & Abeles, 1979).

Die Aufklärung der sekundären, tertiären und quartären Struktur der SAH-Hydrolase gelang Hu et al. (1999).

Sie fanden heraus, dass eine Untereinheit der SAH-Hydrolase aus drei Domänen besteht:

Hierbei handelt es sich um die katalytische Domäne (Aminosäuren 1 bis 181 und 352 bis 402), die NAD⁺-Bindungsdomäne (Aminosäuren 182 bis 351) und die C-terminale Domäne (Aminosäuren 403 bis 431).

Das NAD⁺-Molekül ist in einer Vertiefung in der NAD⁺-Bindungsdomäne gebunden und wird über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brückenbindungen festgehalten. Dabei befindet sich der Nikotinamid-Teil des NAD⁺-Moleküls in der Nähe der katalytischen Domäne, während der Adeninteil weit von der katalytischen Domäne entfernt ist.

Zudem sind die NAD⁺-Bindungsdomänen, die sich in der Nähe des Zentrums des Tetramers befinden, untereinander eng verbunden, was zur Stabilität der SAH-Hydrolase beiträgt.

Die katalytischen Domänen hingegen liegen weiter vom Zentrum entfernt und treten nur wenig miteinander in Wechselwirkung (Hu et al., 1999).

Innerhalb der katalytischen Domäne liegt die Substratbindungsstelle, in die ein Adenosin-Molekül ohne große strukturelle Änderungen gut hineinpasst (Gomi & Fujioka, 1984).

Im Gegensatz zu den C-terminalen Domänen und den NAD⁺-Bindungsstellen sind die katalytischen Domänen mobil, was für den katalytischen Mechanismus notwendig ist. Diese hohe Mobilität ist auf die einzigartige Struktur des Tetramers zurückzuführen.

Die Besonderheit hierbei ist die spezielle Formierung der vier Untereinheiten, die im Zentrum einen Kanal entstehen lässt (Abb.2).

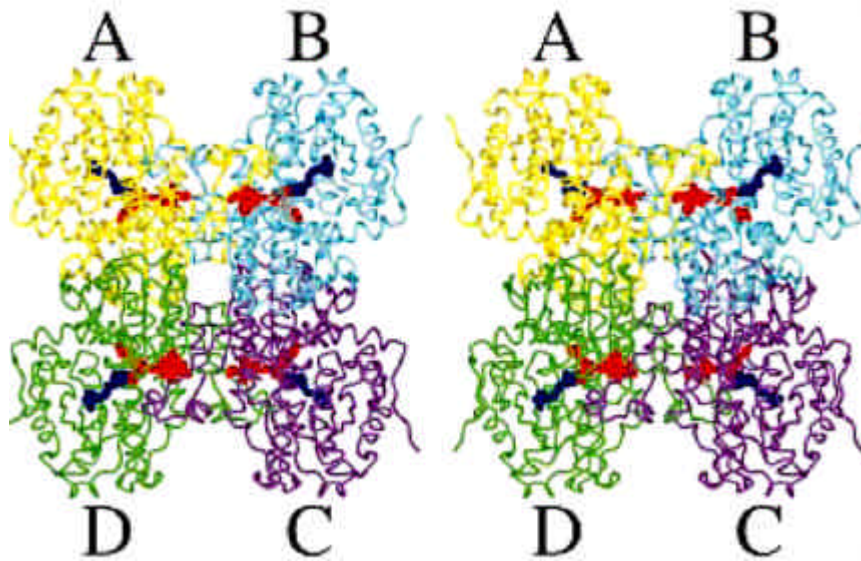


Abb.2: Tetramerische Struktur der SAH-Hydrolase. A bis D kennzeichnen die Untereinheiten des Enzyms; fest gebundene NAD^+ -Moleküle sind rot und SAH-Moleküle blau markiert. (Hu et al., 1999).

Diese besondere Formation gewährleistet also einen stabilen molekularen Rahmen und flexible katalytische Zentren zugleich (Hu et al., 1999).

Die Bindung von Adenosin an die SAH-Hydrolase führt nun dazu, dass der Kofaktor NAD^+ reduziert und das Protein somit enzymatisch inaktiviert wird (Palmer & Abeles, 1979). Die gleichen Autoren (1982) führten das unterschiedliche Dissoziationsverhalten von Adenosin und cAMP auf diesen Mechanismus zurück. Durch die Reduktion des NAD^+ zu NADH wird das Protein inaktiviert und geht in eine geschlossene Form über, die das Adenosin gleichermaßen festhält. Diese Reduktion wird durch die 3'-OH-Gruppe des Adenosin verursacht. Das cAMP enthält keine 3'-OH-Gruppe und kann deshalb das Enzym weder inaktivieren, noch in eine geschlossene Form überführen. Deshalb kann cAMP verhältnismäßig leicht wieder vom Protein verdrängt werden.

Hu et al. (1999) fanden aus der Kristallstruktur heraus, dass die SAH-Hydrolase in einer offenen Form vorliegt, wenn die Substratbindungsstelle innerhalb der

katalytischen Domäne nicht besetzt ist und in die geschlossene Form übergeht, sobald ein Substrat an das Enzym bindet (Hu et al., 1999; Turner et al., 1998).

Dies ist ein wichtiger Mechanismus bei der Katalysereaktion der SAH-Hydrolase (Komoto et al., 2000), denn durch die Rotation der katalytischen Domäne um 18° wird die Lücke zwischen der katalytischen und der NAD^+ -Bindungsdomäne geschlossen, und das NAD^+ -Molekül wird in die Nähe des gebundenen Substrats gebracht (Hu et al., 1999).

Somit wird erreicht, dass der Ribosering des Substrates fast parallel zum Nikotinamidring des NAD^+ liegt und ein für die Reaktion notwendiger Wasserstoffaustausch leicht möglich wird.

Sobald die katalytische Reaktion abgelaufen ist, geht das Enzym wieder in die offene Form über, und die Produkte werden freigesetzt (Komoto et al., 2000).

Im Folgenden soll die Katalysereaktion genauer erklärt und veranschaulicht werden:

Da es sich um eine reversible Reaktion handelt, kann der hier beschriebene Stoffwechselweg in beide Richtungen (Hydrolyse und Synthese) verfolgt werden.

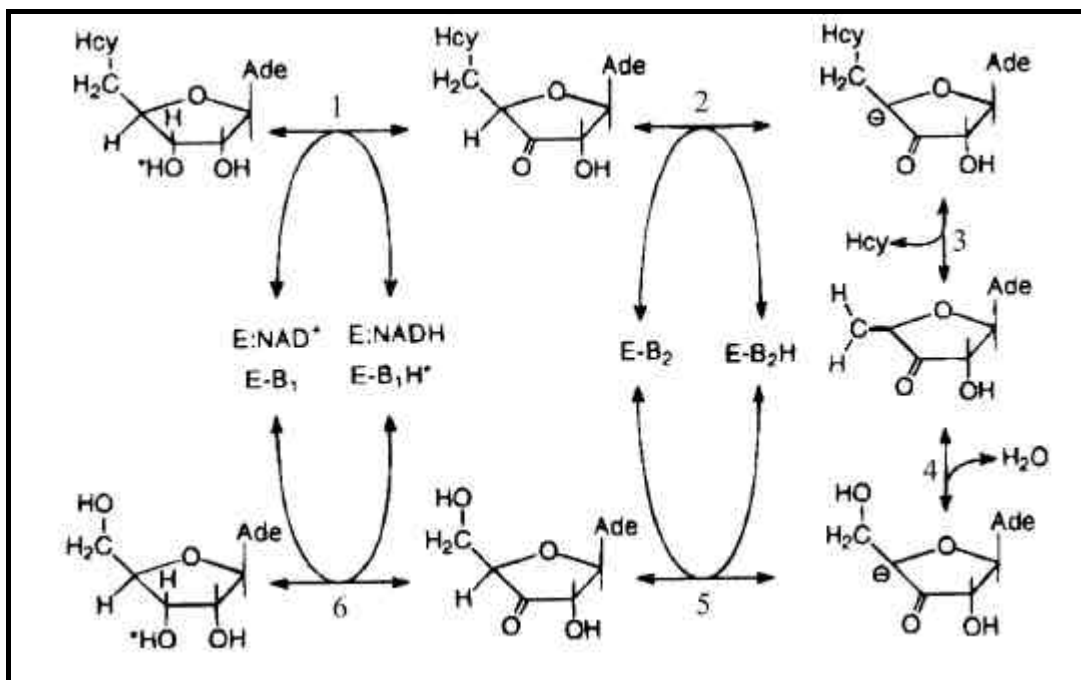


Abb.3: Reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und Homocystein durch die SAH-Hydrolase (E). (Hu et al., 1999)

SAH wird zunächst durch enzymgebundenes NAD^+ zu einem 3'-Ketoderivat oxidiert (1), wodurch das NAD^+ zu NADH reduziert wird. Dieser Vorgang ermöglicht die Entfernung des 4'-Protons durch eine Enzybase (2).

Das dabei entstehende Karbanion wird durch die Entfernung der 5'-Komponente Homocystein zu einem 3'-Keto-4'5'-Dehydroadenosin umgewandelt (3). Es folgt nun eine Aufnahme von H_2O an das 5'-Atom (4). Über ein Zwischenprodukt (5) entsteht schließlich durch die Reduktion des 3'-Kohlenstoffatoms (6) - ausgehend vom NADH - das Endprodukt Adenosin (Palmer & Abeles, 1976; Palmer & Abeles, 1979).

Beim Übergang von der offenen zur geschlossenen Form scheint die Aminosäure Aspartat an Position 244, die Teil der Bindungsstelle für das NAD^+ -Molekül ist, eine entscheidende Rolle zu spielen (Komoto et al., 2000).

Die Kristallstruktur der SAH-Hydrolase zeigt, dass die Carboxylgruppe des Asp^{244} zwar in der Nähe des NAD^+ -Moleküls positioniert ist, jedoch in die entgegengesetzte Richtung zeigt und nicht an den Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit dem NAD^+ -Molekül beteiligt ist (Turner et al., 1998; Hu et al., 1999).

Durch eine einzige Mutation an dieser Aminosäure entsteht eine Enzymform – D244E, die nur in der geschlossenen Form vorliegt und NADH sowie oxidiertes Substrat bindet. Dagegen weist das Wildtyp-Enzym eine offene Konformation auf und bindet NAD^+ , jedoch kein Substrat.

Eine Inaktivierung des Enzyms erreichten De la Haba et al. (1986), indem sie die NAD^+ -Moleküle durch Inkubation mit 150 mM KCl, 8 mM ATP und 1 mM MgCl_2 entfernten und anschließend durch Zugabe von 1 mM NADH das Enzym in reduzierter Form wiederherstellten.

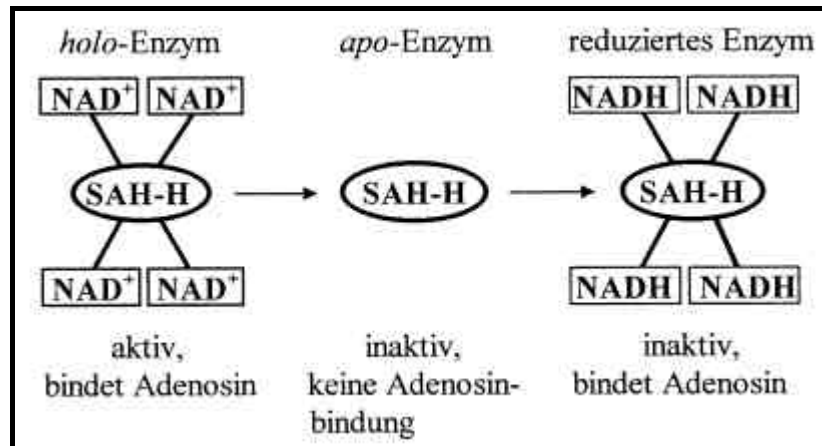


Abb.4: Schema der Reduktion der SAH-Hydrolase
(Kloor et al., 1998).

Kloor et al. (1998) konnten zeigen, dass das Enzym in seiner reduzierten Form zwar enzymatisch inaktiv ist, also weder Hydrolyse noch Synthese möglich ist, die ³H-Adenosin-Bindung jedoch erhalten bleibt. Die Bindungskapazität von ³H-Adenosin in Konzentrationen bis 150 nM erhöht sich sogar um ein Dreifaches, verglichen mit der nativen SAH-Hydrolase (Kloor et al., 2000).

So beträgt die Affinität (K_d -Wert) der nativen SAH-Hydrolase für Adenosin $12,4 \pm 0,8$ nmol, und der K_d -Wert der NADH-SA-Hydrolase liegt bei 32 ± 2 nmol. Für das Bindungsmaximum (B_{max}) der NADH-SA-Hydrolase bis 150 nM ³H-Adenosin wurden 848 ± 19 pmol / mg Protein gemessen, verglichen mit $238 \pm 3,2$ pmol / mg Protein für das native Enzym (Kloor et al., 2000).

Diese Beobachtung führte zur Fragestellung dieser Arbeit.

1.2 Eigene Fragestellung

Die SAH-Hydrolase besitzt als Kofaktor vier NAD^+ -Moleküle pro Molekül Enzym. Dieser Kofaktor ist direkt am katalytischen Mechanismus des Enzyms beteiligt. Als intrazelluläres Adenosin-bindendes Enzym kann die SAH-Hydrolase Adenosin mit einer hohen und einer niedrigen Affinität binden. Die Bindung von Adenosin an das Enzym führt zur Reduktion des NAD^+ zu NADH und dadurch zur enzymatischen Inaktivierung des Enzyms.

Die Tatsache, dass die NADH-Form der SAH-Hydrolase noch in der Lage ist, Adenosin zu binden, führte zu folgender Fragestellung:

Bindung von Adenosin an die SAH-Hydrolase in Abhängigkeit vom Verhältnis des Kofaktors NAD^+/NADH am Enzym.

Gegenstände dieser Arbeit sind:

1. Bestimmung der NAD^+/NADH -Verhältnisse an der SAH-Hydrolase mittels HPLC und radioaktiv markiertem $^3\text{H-NAD}^+$.
2. Bestimmung des zeitabhängigen Bindungsverhaltens von $^3\text{H-Adenosin}$ an die verschiedenen Enzymformen.
3. Bestimmung der Dissoziationskonstanten und der maximalen Bindungskapazitäten der verschiedenen Enzymformen.
4. Bestimmung der Adenosin-Bindungsstellen an der SAH-Hydrolase mittels Azido- $^3\text{H-Adenosin}$.

2 Untersuchungsgut und Methoden

2.1 Das Enzym SAH-Hydrolase

Als Untersuchungsgut diente bei den vorliegenden Bindungsstudien hochgereinigte SAH-Hydrolase aus Rindernieren.

Die Reinigung der verwendeten SAH-Hydrolase wurde von Frau Dr. Doris Kloor und Frau Renate Riehle mittels chromatographischer Methoden durchgeführt. Insgesamt wurde mit Enzym aus drei Reinigungen gearbeitet.

2.1.1 Reinigung des Enzyms

Nachdem die Rindernieren den frisch geschlachteten Tieren auf dem Schlachthof entnommen worden waren, wurden sie auf Eis gelagert ins Labor transportiert und dort bei 4°C den Reinigungsvorgängen unterzogen.

Das Nierengewebe wurde in einem Waring-Blendor mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0), 1 mM DTT (Dithiothreitol), 1 mM EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure) und 10 µM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid = 8% Saccharose) homogenisiert und anschließend bei 20000x g für 45 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand, der die zytosolischen Proteine enthält, wurde mit Ammoniumsulfat (50%) gefällt und bei 4°C und 26000x g für eine Stunde zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5), 1 mM DTT und 1 mM EDTA gelöst und über Nacht gegen denselben Puffer dialysiert, anschließend eine Stunde bei 50000x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde mittels Säulenchromatographie zu einem nahezu hochgereinigten Enzym weiterverarbeitet. Dazu wurden vier verschiedene Säulen verwendet: DEAE-Cellulose (Sigma D-8257), DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmazia 17-0709-01), Hydroxylapatit Bio-Gel http (BIO-RAD) und Aminohexyl-Sepharose.

Die Endreinigung erfolgte durch eine Gelfiltration mit HiLoad Superdex 200 (Pharmazia 71-6038-00-01) (Kloor et al., 1996)

Die Messung der Enzymaktivität der SAH-Hydrolase wurde in Richtung der Hydrolyse mittels des Harnsäure-Testes durchgeführt.

2.1.2 Überprüfung der Reinheit des Enzyms

Der Reinheitsgrad des Proteins nach der Reinigung wird mit der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) (Laemmli, 1970) überprüft. Dieses Gel dient auch zur Bestimmung des Molekulargewichts des Monomers.

Im SDS-Gel liegt die SAH-Hydrolase als einzelne Bande mit einem Molekulargewicht (MG) der Untereinheit von 47,4 kDa vor (Kloor et al., 1996).

2.1.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt, wobei Rinderserumalbumin als Standard verwendet wurde.

2.1.4 Reduktion der SAH-Hydrolase

Um die Adenosin-Bindungsfähigkeit der SAH-Hydrolase mit definierten NAD^+/NADH -Verhältnissen untersuchen zu können, musste zuerst das enzymeigene NAD entfernt werden.

Dazu wurde als erstes das in PBS gelagerte Enzym gegen 15 mM Tris/25 mM HEPES Puffer (pH 7,0) dialysiert, um die Phosphationen zu beseitigen. Das Enzym wurde anschließend mit einer Lösung, bestehend aus 1,5 M KCl, 80 mM MgCl_2 und 80 mM ATP, im Verhältnis von 100 μl Reduktionslösung pro 1 mg Enzym für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit löst sich das NAD aus der Enzymbindung, und es entsteht ein Apo-Enzym ohne Enzymaktivität und Adenosin-Bindungsfähigkeit.

Die Enzymaktivität wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 292 nm mit dem Harnsäuretest gemessen. Wenn keine messbare Enzymaktivität mehr vorhanden war, wurde das Enzym gegen den gleichen Tris/HEPES Puffer (pH 7,0) dialysiert, um das NAD^+/NADH -Gemisch und die Ionen der Reduktionslösung zu entfernen.

Um nun die verschiedenen Verhältnisse an NAD^+ und NADH herstellen zu können, wurde 10 mM NAD^+ -Lösung mit 10 mM NADH -Lösung in den Verhältnissen 1/0, 1/9, 1/1, 9/1 und 1/0 gemischt und zum Apo-Enzym SAH-Hydrolase im Verhältnis von 100 μl NAD^+/NADH pro 1 ml Apo-Enzym gegeben. Nach 90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss wurde erneut die Enzymaktivität am Photometer gemessen, um zu überprüfen, ob die Aktivität der SAH-Hydrolase den NAD^+/NADH -Verhältnissen entsprach. Danach wurde das Enzym zum letzten Mal gegen den gleichen Tris/Hepes Puffer (pH 7,0) dialysiert, um das nicht gebundene NAD^+ und NADH zu entfernen und abzentrifugiert, um nicht rekonstituiertes Protein zu entfernen. Abschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) gemessen. Die Lagerung der so hergestellten SAH-Hydrolase erfolgte bei -20°C .

2.1.5 Bestimmung der NAD^+/NADH -Verhältnisse der SAH-Hydrolase

2.1.5.1 HPLC

Das Verhältnis NAD^+/NADH an der nativen SAH-Hydrolase wurde bestimmt, indem 1 ml Enzym (1,5 mg/ml) mit 2 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung, 1 mM EDTA und 5 mM DTT für 90 min bei 4°C inkubiert wurde. Anschließend wurde dieses Inkubationsgemisch für 15 Min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Kofaktor NAD^+/NADH wurde aus dem Überstand mit Hilfe der HPLC bestimmt.

Die Untersuchung an der HPLC erfolgte mit einer Grom-Sil 120 ODS-3 CP (5 μm , 125x4 mm I.D.) Säule. NAD^+/NADH wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Durchgeführt wurde der Lauf mit einer Gradientenmethode bei 30°C und einer Flussrate von 1 ml/min.

Lösungsmittel A enthielt 65 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 4,6) und 5 mM Tetrabutylammoniumsulfat als Ionenpaarreagens. Lösungsmittel B enthielt Lösung A und zusätzlich noch 40% Azetonitril. NAD^+ und NADH wurden nach ihren Retentionszeiten identifiziert, und die Fläche unten der Peaks wurde mit einem externen Standard quantitativ ausgewertet.

2.1.5.2 $^3\text{H-NAD}^+$

Da die oben beschriebene Methode für die reduzierten SAH-Hydrolase-Formen wegen zu geringer Proteinmengen nicht anwendbar war, wurde der NAD^+ -Gehalt am Enzym mittels $^3\text{H-NAD}^+$ bestimmt. Das $^3\text{H-NAD}^+$ (von NEN, Deutschland) hatte eine spezifische Aktivität von 1480 GBq / mmol und eine Konzentration von 2,5 μM .

In einem ersten Schritt wurde das Enzym, wie unter 2.1.4 beschrieben, reduziert. Nach der Dialyse wurde das $^3\text{H-NAD}^+$ mit 10 mM kaltem NAD^+ 1:20000 verdünnt und in den Verhältnissen 0,5 $^3\text{H-NAD}^+$ /0,5 NADH, 0,9 $^3\text{H-NAD}^+$ /0,1 NADH und 0,1 $^3\text{H-NAD}^+$ /0,9 NADH dem Apo-Enzym zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei Raumtemperatur wurden 500 μl (enthielten 115 μg SAH-Hydrolase) des Reaktionsgemisches über einen GF/B-Filter, getränkt in 0,3 %igem PEI, filtriert. Um die Filterbindung zu ermitteln, wurde $^3\text{H-NAD}^+$ /NADH in den oben angegebenen Verhältnissen ohne Enzym filtriert.

Die Filter wurden in Röhrchen mit Szintillationsflüssigkeit gegeben, und die auf dem Filter hängengebliebene Radioaktivität im Szintillationscounter gezählt.

Die ermittelten dpm-Werte wurden auf die eingesetzte Proteinmenge umgerechnet.

2.2 Der Radioligand $^3\text{H-Adenosin}$

Um das Bindungsverhalten von Adenosin an die SAH-Hydrolase in den verschiedenen NAD^+ /NADH-Verhältnissen genau bestimmen zu können, war es wichtig, sowohl die eingesetzte Menge als auch die an das Enzym gebundene Menge Adenosin quantitativ messen zu können. Dazu wird radioaktiv markiertes Adenosin ($[2,8,5\text{'-}^3\text{H}]$ -Adenosin) verwendet, das Tritium-Atome an den Kohlenstoffatomen C2 und C8 des Adenins sowie an C5' der Ribose bindet (Abb.5).

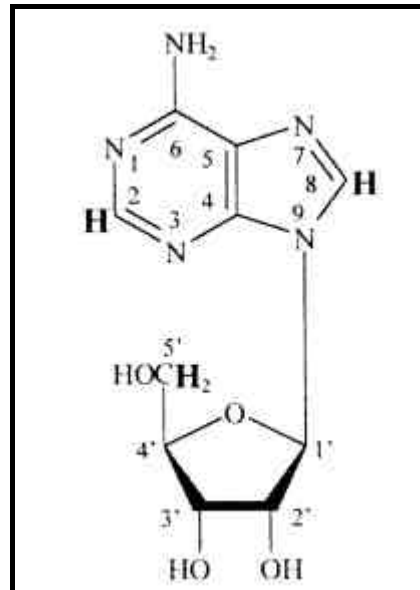


Abb.5: 2,8,5'-³H-Adenosin

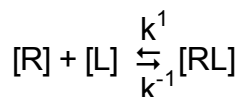
Das ³H-Adenosin verhält sich biologisch identisch zu unmarkiertem Adenosin. Das Tritium-Isotop weist eine Halbwertszeit von 12,26 Jahren auf, weshalb man davon ausgehen kann, dass die Ausgangsaktivität der Stammlösung bei mehrmonatiger Versuchsdauer nur geringfügig abnimmt. Der Radioligand (von NEN, Deutschland) befindet sich in einer Alkohol-Wasser- Lösung im Verhältnis 1:1 und besitzt bei einer Konzentration von 15,2 µM in der Stammlösung eine spezifische Aktivität von 65,8 Ci/mmol (2,4 TBq/mmol). Damit sind Messungen bis in den Femtomol-Bereich möglich.

Beim Tritium handelt sich um reine β-Strahlung mit einer Reichweite von nur wenigen Millimetern in der Luft und einer maximalen Energie von 0,018 MeV, wodurch die Handhabung des Radioliganden in Hinsicht auf den Strahlenschutz relativ einfach ist. So ist keine Abschirmung notwendig, ein Arbeitsschutz durch Handschuhe und Schutzkleidung ausreichend und die Überprüfung der Kontamination von Geräten (Pipetten etc.) und Arbeitsflächen mit Wischtests leicht durchführbar.

2.3 Theoretische Grundlagen

2.3.1 Prinzip der spezifischen Bindung

Bei einer durch ein Enzym katalysierten Reaktion erfolgt die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Dies kann folgendermaßen als eine Beziehung zwischen einem Rezeptor [R] und einem Ligand [L] im Sinne des Massenwirkungsgesetzes dargestellt werden:



Dabei bildet k^1 die Assoziations- und k^{-1} die Dissoziationskonstante.

Besteht ein Gleichgewicht zwischen Hin- und Rückreaktion, so lässt sich die Dissoziationskonstante (K_d -Wert) berechnen:

$$K_d = \frac{k^{-1}}{k^1}$$

Der K_d -Wert ist ein quantitatives Maß für die Affinität zwischen Ligand und Bindungsstelle. Ist der Wert der Dissoziationskonstanten klein, so liegt eine hohe Affinität vor, ist der Wert groß, zeigt das eine niedrige Affinität. Beträgt der K_d -Wert weniger als 10 nM, spricht man von einer hochaffinen Bindung.

Anders dargestellt beschreibt der K_d -Wert das Verhältnis von Rezeptor und Ligand im Reaktionsgleichgewicht:

$$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit, die durch die Rezeptor-Ligandkomplex-Konzentration [RL] darstellbar ist, lässt sich mit der Michaelis-Menten-Gleichung ausrechnen:

$$[RL] = \frac{B_{\max} [L]}{K_m + [L]}$$

Hierbei ist B_{\max} die maximale Bindungskapazität, die aus besetzten und unbesetzten Rezeptorstellen angegeben wird, und der K_m -Wert ist die Michaelis-Konstante.

Wenn man davon ausgeht, dass sich die Reaktion im Gleichgewicht befindet, kann die Michaelis-Konstante K_m durch die Dissoziationskonstante K_d ersetzt werden:

$$[RL] = \frac{B_{\max} [L]}{K_d + [L]}$$

Der K_d -Wert entspricht der Ligandenkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Bindungskapazität erreicht ist und wird in mol angegeben. Er ist für einen gegebenen Rezeptor charakteristisch, jedoch unabhängig von der Rezeptorkonzentration. Da dieser Wert eine Berechnung der Ligandenkonzentration durch die Sättigung der Bindung ermöglicht, ist er für *in-vitro*-Untersuchungen äußerst wichtig.

Um diese Informationen in einer Kurve darstellen zu können, wurde hier das Programm Sigma-Plot verwendet, wobei bei den Sättigungen auf der x-Achse die Konzentration des eingesetzten Adenosins und auf der y-Achse das an das Enzym gebundene Adenosin in pmol/mg Protein angegeben wurde. Bei den Assoziationen bzw. Dissoziationen wurde auf der y-Achse ebenfalls die gebundene Adenosinmenge aufgetragen, auf der x-Achse jedoch die Zeit in Minuten.

Die Transformation der Daten nach Scatchard ermöglicht die Bestimmung der vorhandenen Bindungsstellen: Ergeben die Daten eine Gerade, geht man von *einer* Bindungsstelle aus, wobei die Steigung der Geraden dem K_d -Wert und der Schnittpunkt mit der x-Achse dem B_{\max} entspricht.

Wenn die Daten eine Gerade nicht zulassen, weist der Rezeptor *mehrere* Bindungsstellen mit unterschiedlichen K_d -Werten auf. Durch Anlegen von

Tangenten an die Kurve kann die Steigung der verschiedenen Teilstücke berechnet werden.

Beim Scatchard-Plot wird auf der x-Achse die Menge an gebundenem ^3H -Adenosin, und auf der y-Achse der Quotient von gebundenem und freiem ^3H -Adenosin aufgetragen.

Zur Erstellung des Scatchard-Plots wurde ebenfalls das Programm Sigma-Plot und teilweise das Programm LIGAND (Munson & Rodbard, 1980) verwendet.

2.3.2 Rezeptorbindungsstudien

Bei der Rezeptorbindungsstudie unterscheidet man zwischen der Gesamt- und der unspezifischen Bindung. Die Gesamtbindung gibt den Anteil an Radioaktivität wieder, der an das Protein und eventuell an den Filter gebunden hat. Die unspezifische Bindung wird in einem Parallelversuch bestimmt, der mit einem 1000fachen Überschuss an unmarkiertem Liganden durchgeführt wird. Dadurch wird eine Isotopenverdünnung herbeigeführt, so dass eine Bindung des radioaktiven Liganden an das Protein vermindert wird. Die in diesen Ansätzen gemessene Radioaktivität stellt die unspezifische Bindung dar. Die Differenz zwischen der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung wird als spezifische Bindung bezeichnet.

2.3.2.1 Zeitabhängige Assoziation

Um das Assoziationsverhalten von Adenosin an das Enzym zu bestimmen, wurde die erreichte Bindung zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen.

Folgende Vorbereitungen waren notwendig:

In alle Eppendorf-Gefäße wurde die gleiche Menge Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) (150 μl) und ^3H -Adenosin (50 μl , 10 nM) pipettiert. Die Inkubation, die bei Raumtemperatur sowie bei 4°C erfolgte, begann mit der Zugabe von 100 μl Protein in jedes Eppendorf-Gefäß. Nach einer Minute wurde die erste Probe filtriert, die weiteren folgten nach 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten.

2.3.2.2 Zeitabhängige Dissoziation

Bei der Dissoziation wurden ebenfalls in jedes Eppendorf-Gefäß 50 µl ^3H -Adenosin (10 nM) gegeben. Anders als bei den Assoziationsversuchen wurden hier jedoch nur 100 µl Puffer dazupipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl Protein, und alle Proben wurden für 120 Minuten bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Abdissoziation des gebundenen ^3H -Adenosins erfolgte durch Zugabe von 50 µl kaltem Adenosin (1 mM). Danach wurden die Proben nach 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240, aber auch nach 300 und 360 Minuten abfiltriert.

2.3.2.3 Konzentrationsabhängige Sättigung

Bei den Sättigungsversuchen wurden die unterschiedlichen Formen der SAH-Hydrolase mit steigenden Konzentrationen von ^3H -Adenosin inkubiert, wobei ^3H -Adenosin in 2 Konzentrationsbereichen vorlag:

Der erste Konzentrationsbereich lag zwischen 1 nM und 250 nM ^3H -Ado. Dazu wurden 3 Stammlösungen hergestellt: Für Lösung 1 wurden aus dem Urtracer 36,4 µl ^3H -Adenosin entnommen und die Flüssigkeit verdampft. Anschließend wurden zur Radioaktivität 800 µl Tris-HCl-Puffer (20 nM, pH 7,4) gegeben. Aus dieser Lösung 1 wurde durch eine 1:5 Verdünnung Lösung 2 hergestellt, welche wiederum im Verhältnis 1:5 zu Lösung 3 verdünnt wurde.

Die Zusammensetzung der einzelnen Proben ist im Pipettierschema in Tabelle 1 aufgezeigt.

Lösung 1: 36,4 µl aus dem Urtracer + 800 µl Tris-HCl-Puffer → 750 nM ^3H -Ado

Lösung 2: 100 µl aus Lsg. 1 + 400 µl Tris-HCl-Puffer → 150 nM ^3H -Ado

Lösung 3: 50 µl aus Lsg. 2 + 250 µl Tris-HCl-Puffer → 30 nM ^3H -Ado

Tab.1: Pipettierschema der Sättigungsversuche mit ^3H -Adenosin-Konzentrationen bis 250 nM

^3H -Ado-Konz. (nM)	1	5	10	25	50	75	100	125	250
Stammlsg.	3	2	2	1	1	1	1	1	1
$\mu\text{l } ^3\text{H-Ado}$	10	10	20	10	20	30	40	50	100
$\mu\text{l Puffer}$	190	190	180	190	180	170	160	150	100
$\mu\text{l Protein}$	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Abhängig vom NAD^+/NADH -Verhältnis des eingesetzten Proteins variierte die Inkubationszeit bei Raumtemperatur zwischen ein und vier Stunden.

Bei 4°C wurden alle Proben über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen abgesaugt.

Um die unspezifische Bindung bestimmen zu können, wurden $50 \mu\text{l}$ des Puffers durch $50 \mu\text{l}$ kaltes Adenosin (1 mM) ersetzt. Durch diesen Überschuss an kaltem Adenosin wurden gleich einer Dissoziation die radioaktiv markierten Adenosinmoleküle von den Bindungsstellen verdrängt.

Der zweite Konzentrationsbereich lag zwischen $0,01 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ ^3H -Adenosin. Um diese Konzentrationen zu erreichen, mussten vier Stammlösungen hergestellt werden. Für Lösung 1 wurden $30,6 \mu\text{l}$ ^3H -Adenosin aus dem Urtracer verdampft und die Radioaktivität mit $1,5 \text{ ml}$ kaltem Adenosin ($150 \mu\text{M}$) verdünnt. Die Konzentration des heißen Adenosins betrug $15 \mu\text{M}$ und wurde durch das kalte Adenosin 1:10 verdünnt.

Um Lösung 2 zu erhalten, musste Lösung 1 1:10 verdünnt werden. Lösung 2 wurde ebenfalls 1:10 verdünnt um Lösung 3 herzustellen, die wiederum 1:10 verdünnt wurde, um Lösung 4 zu erhalten.

Lösung 1: 30,6 µl aus dem Urtracer + 1,5 ml kaltes Ado → 150 µM Ado

Lösung 2: 100 µl aus Lsg. 1 + 900 µl Tris-HCl-Puffer → 15 µM Ado

Lösung 3: 100 µl aus Lsg. 2 + 900 µl Tris-HCl-Puffer → 1,5 µM Ado

Lösung 4: 100 µl aus Lsg. 3 + 900 µl Tris-HCl-Puffer → 0,15 µM Ado

Tab.2: Pipettierschema der Sättigungsversuche mit ³H-Adenosin-Konzentrationen bis 50 µM

³ H-Ado-Konz. (µM)	0,01	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0	2,5	5,0	12,5	25,0	50,0
Stammlsg.	4	4	3	3	3	2	2	3	1	1	1	1
µl ³ H-Ado	20	50	10	20	50	10	20	50	10	25	50	100
µl Puffer	180	150	190	180	150	190	180	150	190	175	150	100
µl Protein	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

2.4 Filtration

Um den gebundenen Radioliganden von den nichtgebundenen Liganden zu trennen, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde eine Filtrationsapparatur (nach Osswald & Breidbach) eingesetzt, die es ermöglicht, für jede Probe konstante Bedingungen einzuhalten. Beim Filtrieren bleiben die Enzym-Ligand-Komplexe aufgrund ihrer Größe in dem Filter hängen, wohingegen nicht gebundenes Adenosin entfernt wird. Die Filter mit dem radioaktiv markierten Adenosin-SAH-H-Komplex werden danach in einem Szintillationszähler (s. 2.4.4) gemessen. Daraus kann die pro mg Protein gebundene Menge an Adenosin berechnet werden.

2.4.1 Die Filtrationsapparatur

Die Absaugvorrichtung (Abb.6) (nach Osswald und Breidbach) besteht aus einer elektronischen Steuereinheit (1) und einer Membran-Vakuumpumpe (4), die über einen Kunststoffschlauch und zwei Auffangflaschen (3) für die abgesaugte radioaktive Flüssigkeit mit einem Absaugblock (2) verbunden ist.

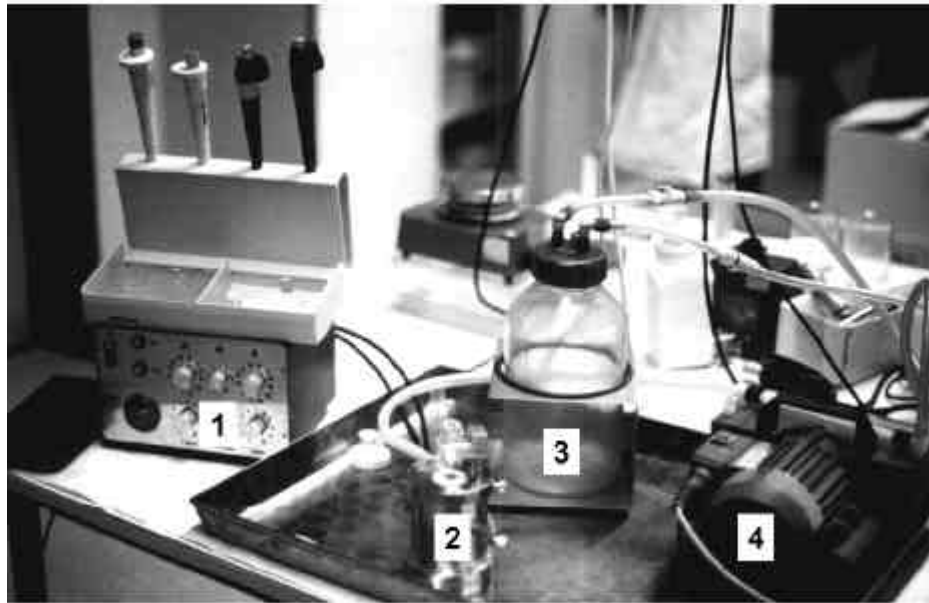


Abb.6: Absaugvorrichtung (nach Osswald und Breidbach)

Der Absaugblock besteht aus einem Metall- oder Kunststoffgehäuse, in das ein vertikal beweglicher Filterkolben eingelassen ist. Die obere Öffnung besitzt ein Stahlsieb, auf das die runden Filter gelegt werden. Über dem Filterkolben ist ein Einfüllstutzen fest angebracht, in den beim Absaugvorgang das Reaktionsgemisch und die Spülflüssigkeit gegeben werden.

Über einen Fußschalter wird die elektronische Steuereinheit aktiviert, die den Filterkolben - dessen Fußplatte sich in einer Druckluftkammer befindet - pneumatisch nach oben bewegt und ihn dort an den Einfüllstutzen presst.

Mit der Aufwärtsbewegung des Filterkolbens wird gleichzeitig eine Verbindung zwischen dem Sog der Vakuumpumpe und dem Inneren des Kolbens hergestellt, so dass im Stutzen befindliche Luft oder Flüssigkeit durch den Filter in die Auffangflaschen gesaugt wird.

Da das von der Pumpe erzeugte Vakuum konstant ist, findet jeder Filtrationsvorgang unter gleichen Bedingungen statt, was eine genaue Doppelwertbestimmung ermöglicht.

2.4.2 Die Filter

Es handelte sich hier um Glasfaserfilter, die von Hand mit Hilfe einer Metallstanze und eines Gummihammers aus großen Bögen von Glasfaser-Filterpapier vom Typ B gefertigt wurden. Die Filter waren kreisrund und wiesen einen Durchmesser von 16 mm auf.

Die ausgestanzten Filter mussten vor der Filtration eine bis 24 Stunden in 0,3%igem Polyethylenimin (PEI) eingelegt werden (Bruns et al., 1983). Durch seinen polykationischen Charakter bildet das PEI mit den polyanionischen Strukturen des Glasfaserfilters über Coulombsche Kräfte eine Art Makromolekülnetz aus, das auch lösliche Proteine ab einer Größe von 30 kDa zurückhält.

Die Zählzelle betrug ohne PEI-Behandlung nur 5-10% der Zählzelle, die man nach Einlegen der Filter in PEI erreicht hat.

Bruns et al. (1983) konnten anhand zytosolischer Estradiolrezeptoren zeigen, dass die Filtrationsmethode der aufwendigen Gelfiltration überlegen ist.

2.4.3 Filtrationsvorgang

Ein in PEI eingelegter Filter wurde mit einer Pinzette auf das Sieb des Filterkolbens gelegt, der Filterkolben über das Fußschaltersignal nach oben bewegt, und so der Filterkolben an den Einfüllstutzen gepresst. Nun wurden 250 von 300 µl des inkubierten Reaktionsgemisches mit einer Pipette aus dem Eppendorf-Gefäß entnommen und auf den Filter gegeben. Durch den Sog der Vakuumpumpe wurde die Flüssigkeit sofort in die erste Auffangflasche abgesaugt.

Jede Probe wurde sofort mit 4 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) nachgespült, der ebenfalls in die erste Auffangflasche gelangte. Der Filterkolben bewegt sich nach einer bestimmten Zeit, die an der elektronischen Steuereinheit eingestellt werden kann, automatisch wieder nach unten.

Der Filter wurde nun mit einer anderen Pinzette vom Stahlsieb genommen und in ein Szintillationsgefäß gegeben.

2.4.4 Messung der Radioaktivität

Jedes Szintillationsgefäß wird mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, High-Flashpoint Liquid Scintillation Cocktail, Fa. Packard) gefüllt, verschlossen, beschriftet und gut geschüttelt.

Bei jeder Messreihe wird auch die gesamt eingesetzte Radioaktivität bestimmt. Dazu werden 10 µl der angesetzten ³H-Adenosin-Lösung direkt in ein Szintillationsgefäß pipettiert, Szintillationsflüssigkeit dazugegeben und mit den anderen Proben gemessen.

Zur Messung im β-Szintillationszähler (Fa. Packard) werden die Vials in dafür bestimmte Halterungen gestellt, aus denen das Gerät die Gefäße nacheinander entnimmt und in einer Zählkammer für maximal fünf Minuten den Zerfall der Radioaktivität und die daraus resultierenden Lichtblitze zählt.

Diese Lichtblitze werden von der Szintillationsflüssigkeit erzeugt, die durch die β-Strahlen des ³H-Adenosins angeregt wird, und von einem Computer als Zerfallsaktivität (dpm = decays per minute) ausgedruckt. Dabei entspricht 1 Bq ca. 60 dpm und 1 dpm ungefähr 2,2 zpm (Zerfälle pro Minute).

Im Szintillationszähler ist eine optimierte Quenchkorrektur gespeichert.

2.5 Bestimmung der Adenosin-Bindungsstellen mittels

Azido-³H-Adenosin

2.5.1 Markierung der SAH-Hydrolase mit Azido-³H-Adenosin

Bei dieser Methode wird die SAH-Hydrolase mit Azido-³H-Adenosin in der Weise derivatisiert, dass das Enzym eine durch Licht aktivierbare Gruppe enthält. Durch die Photoaktivierung lässt sich die Adenosin-Bindungsstelle der SAH-Hydrolase markieren und dadurch ist es möglich, die Aminosäuresequenz dieser Markierung zu identifizieren.

SAH-Hydrolase in der nativen, der vollständig reduzierten und vollständig oxidierten Form wurde mit Azido-³H-Adenosin über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Azido-³H-Adenosin wurde im Verhältnis 1:300 mit kaltem Azido-Adenosin verdünnt. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch 5 Minuten bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt.

Das nichtgebundene Azido-Adenosin wurde durch Dialyse entfernt und die Proben mit Endoproteinase Asp-N (1µg Asp-N auf 100µg Protein) oder Trypsin 18 Stunden bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Peptide mittels HPLC mit einer Grom(3)-Sil ODS (250 x 4,0 mm, 5 µm) Säule aufgetrennt. Detektiert wurden die Peptide bei einer Wellenlänge von 214 nm. Durchgeführt wurde eine Gradientenmethode bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 0,8 ml/min. Lösungsmittel A enthielt 0,1% TFA (Trifluoressigsäure), und der Gradient enthielt zusätzlich noch 80% Azetonitril.

Die einzelnen Peptidfraktionen wurden aufgefangen, gesammelt und 10 µl davon im Szintillationscounter gemessen. Die Fraktionen, die die höchste Radioaktivität enthielten, wurden sequenziert.

2.5.2 Sequenzierung der Azido-³H-Adenosin-markierten Peptide

Die Sequenzierung der radioaktiv markierten Fraktionen wurde in der Physiologischen Biochemie, Abteilung Prof. Dr. Voelter, von Frau PD Dr. Stoeva durchgeführt.

Die Untersuchung der radioaktiv markierten Peptide erfolgte durch Kombination von Edman-Abbau und Massenspektrometrie (MALDI).

2.6 Berechnungen und Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Computerprogrammen Excel (Microsoft) und Sigmaplot (SPSS). Die Transformation der Daten nach Scatchard erfolgte mit den Programmen LIGAND (Munson und Rodbard, 1980; McPherson, 1985) und Sigmaplot (SPSS). Dabei wurden die Abweichungen in den Datensätzen und die Gültigkeit der Anpassungen der Kurven mittels statistischer Tests (t-Test, runs-Test, F-Test) auf ihre Signifikanz hin überprüft ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 NAD⁺/NADH-Verhältnisse an der SAH-Hydrolase

Die Bindungskinetiken sowie die Sättigungsexperimente wurden mit fünf verschiedenen „Formen“ der SAH-Hydrolase durchgeführt.

Das native Enzym stellte die gereinigte SAH-Hydrolase dar, die ohne weitere Veränderungen verwendet wurde. Um das NAD⁺/NADH-Verhältnis an der nativen SAH-Hydrolase zu bestimmen, wurde das Enzym mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung gefällt und der Überstand mittels HPLC gemessen. Die ermittelten NAD⁺- und NADH-Peaks wurden quantitativ ausgewertet. Die Messung ergab, dass die native SAH-Hydrolase NAD⁺/NADH in einem Verhältnis von 0,94 zu 0,06 enthielt.

Um zu überprüfen, ob die zugesetzten NAD⁺/NADH-Verhältnisse auch tatsächlich an den experimentell hergestellten Enzymformen existieren, wurde ³H-NAD⁺ eingesetzt. Der gebundene ³H-NAD⁺-Anteil an der SAH-Hydrolase wurde, wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben, gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab.3: Anteil an ³H-NAD⁺ an der SAH-Hydrolase (n=2)

NAD ⁺ /NADH	Anteil an ³ H-NAD ⁺ in %
0,9 / 0,1	90,05
0,5 / 0,5	52
0,1 / 0,9	11,4

3.2 Zeitabhängige Bindungskinetik

Um die optimale Inkubationszeit herauszufinden, ist es notwendig, die Assoziationsgeschwindigkeit, das heißt die minimale Inkubationszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes zwischen Enzym und Ligand zu ermitteln.

Gleichzeitig wird die Dissoziationsgeschwindigkeit des Enzym-Ligand-Komplexes bestimmt.

Die Versuche zur jeweiligen Kinetik wurden 2-10 Mal wiederholt. Von den Assoziations- und Dissoziationskinetiken ist repräsentativ jeweils ein Versuch bei Raumtemperatur in den Abbildungen 7.1 und 7.2 dargestellt.

Die Assoziationskurven zeigten hyperbole Verläufe mit zunehmender Steilheit bei verändertem NAD^+/NADH -Gehalt am Enzym. Das bedeutet eine Verkürzung der Dauer bis zur Einstellung des Gleichgewichts, bzw. bis zur halbmaximalen Bindung bei der eingesetzten ^3H -Adenosin-Konzentration von 10 nM.

Auffallend war auch, dass in Abhängigkeit vom NAD^+/NADH -Verhältnis am Enzym unterschiedliche Maximalbindungswerte gemessen wurden.

Der Einfluss des NAD^+/NADH -Verhältnisses an der SAH-Hydrolase zeigte sich auch bei den Dissoziationsexperimenten. Auch hier ergab sich mit Erhöhung des NAD^+ -Gehaltes ein steilerer Verlauf der Dissoziationskurve.

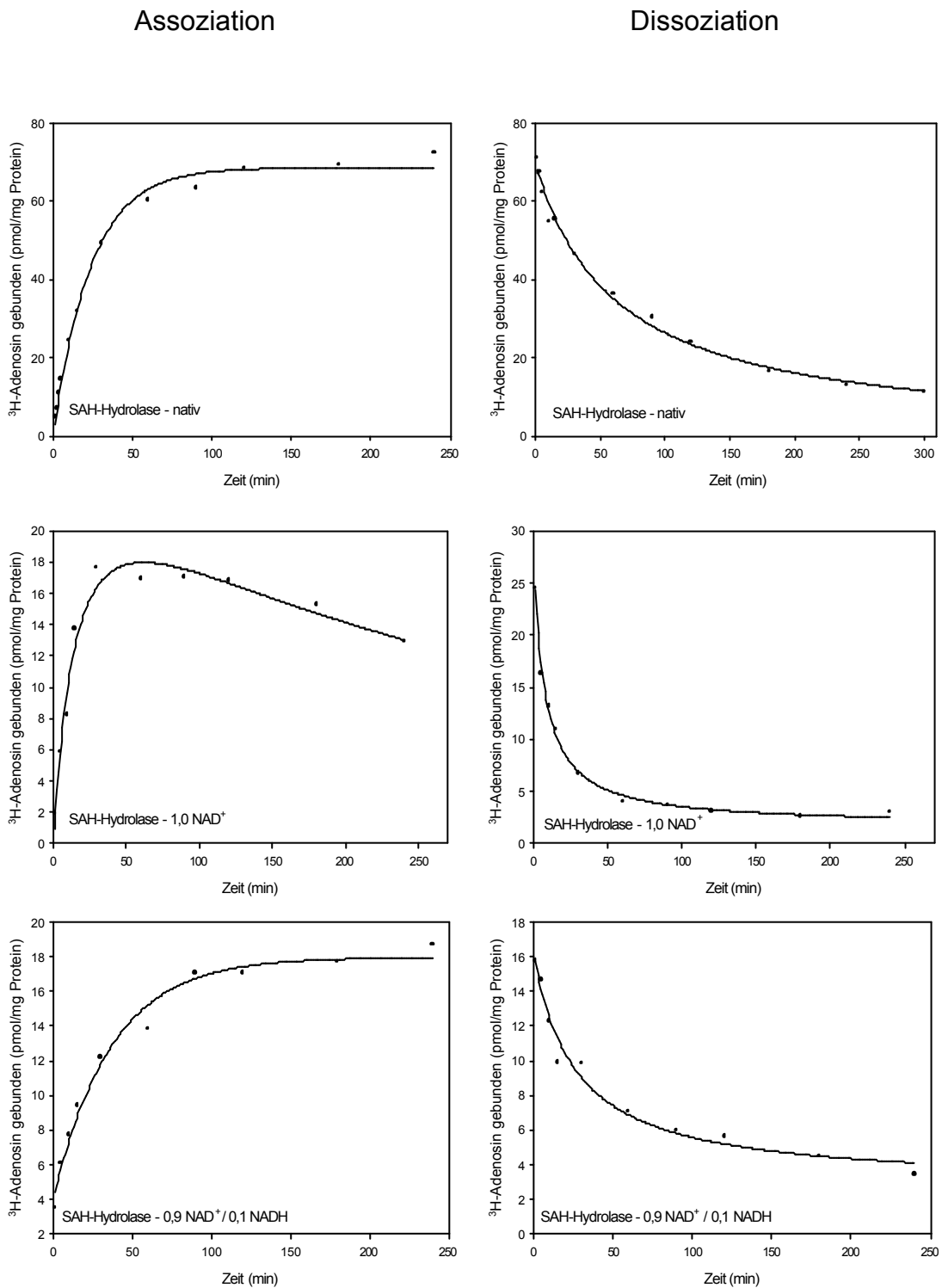


Abb.7.1: Assoziation und Dissoziation von $^3\text{H-Adenosin}$ an die SAH-Hydrolase bei Raumtemperatur. In den Grafiken angegeben ist das Verhältnis des Kofaktors NAD^+/NADH am Enzym (repräsentativer Versuch aus $n = 2-10$). Der Nullwert der Dissoziationskurve entspricht dem Zeitpunkt der Zugabe des unmarkierten Adenosins in einem 10^5 -fachen Überschuss.

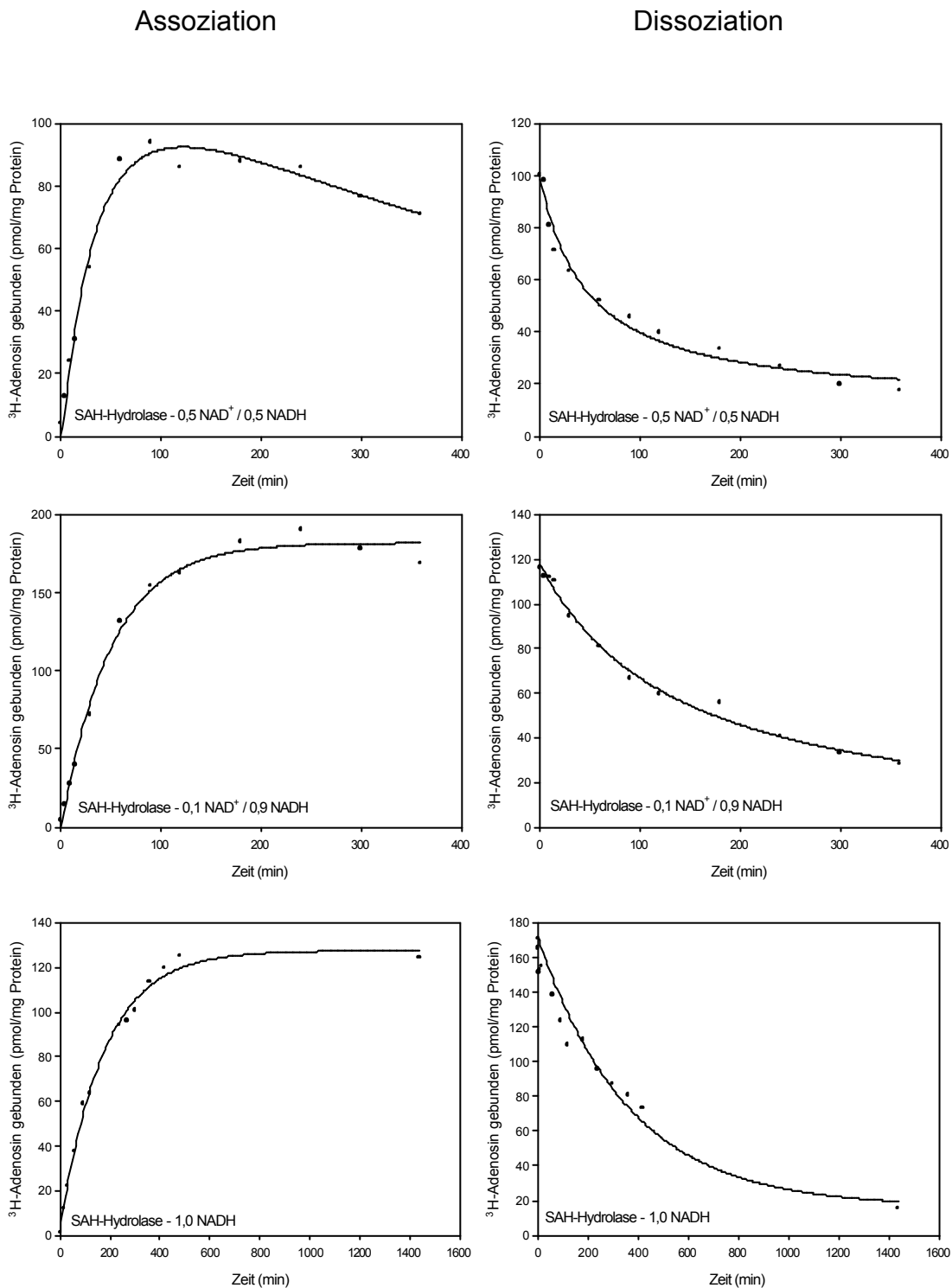


Abb.7.2: Assoziation und Dissoziation von ^3H -Adenosin an die SAH-Hydrolase bei Raumtemperatur. In den Grafiken angegeben ist das Verhältnis des Kofaktors NAD^+ / NADH am Enzym (repräsentativer Versuch aus $n = 2 - 10$). Der Nullwert der Dissoziationskurve entspricht dem Zeitpunkt der Zugabe des unmarkierten Adenosins in einem 10^5 -fachen Überschuss.

3.3 Konzentrationsabhängige Sättigung

Nachdem bei den Assoziationsversuchen die optimalen Inkubationszeiten für die verschiedenen Enzymformen herausgefunden wurden, wurden Sättigungsexperimente durchgeführt, um die Sättigbarkeit der Bindung, die maximale Bindungskapazität, sowie die Affinität des Liganden an die jeweilige Enzymform festzustellen.

3.3.1 ³H-Adenosin-Konzentration bis 250 nM

Im Konzentrationsbereich von 1-250 nM ³H-Adenosin variierten die Inkubationszeiten zwischen einer und vier Stunden bei Raumtemperatur, doch es konnte bei keiner Enzymform eine Sättigung erreicht werden. Demzufolge ist in diesem Konzentrationsbereich eine Bestimmung der maximalen Bindungskapazität nicht möglich. Die Analyse nach Scatchard ergibt bei der nativen SAH-Hydrolase und bei den Enzymformen mit NAD⁺/NADH in den Verhältnissen 0,9/0,1; 0,5/0,5; 0,1/0,9 und 0/1,0, eine Gerade, was auf eine Bindungsstelle hinweist. Aufgrund der fehlenden Sättigung kann jedoch kein K_d-Wert bestimmt werden. Die aus den Kurven geschätzten K_d- und B_{max}-Werte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab.4: geschätzte K_d- und B_{max}-Werte der unterschiedlichen Enzymformen bei ³H-Adenosin-Konzentrationen bis 250 nM

NAD ⁺ /NADH	K _d (nmol/l)	B _{max} (pmol/mg Protein)
nativ	40	540
1,0 / 0,0	---	---
0,9 / 0,1	55	158
0,5 / 0,5	65	510
0,1 / 0,9	45	1120
0,0 / 1,0	25	740

Die Sättigbarkeit der Enzymformen (= Steilheit der Kurven) und die Menge an gebundenem ^3H -Adenosin unterscheiden sich abhängig vom vorliegenden NAD^+/NADH -Verhältnis. Mit zunehmendem NADH -Anteil nehmen die Sättigbarkeit des Enzyms und die Menge an gebundenem Liganden zu.

Bei der Enzymform die nur NAD^+ enthält, gleicht die Kurve fast einer Geraden. Diese Enzymform ist in diesem Adenosin-Konzentrationsbereich nicht sättigbar, und außerdem ist die Adenosinbindungskapazität sehr gering. Auch nach vierstündiger Inkubationszeit wurden nicht mehr als $130 \text{ pmol } ^3\text{H}\text{-Adenosin/mg}$ Protein gebunden.

Die Enzymform, die NAD^+ und NADH in gleichen Verhältnissen enthält, zeigt eine Bindungs-Isotherme, die der der nativen SAH-Hydrolase gleicht. Auch die Adenosin-Bindungskapazität in diesem Adenosin-Konzentrationsbereich ist bei beiden Enzymformen gleich.

Sättigungsexperimente

Scatchard-Analysen

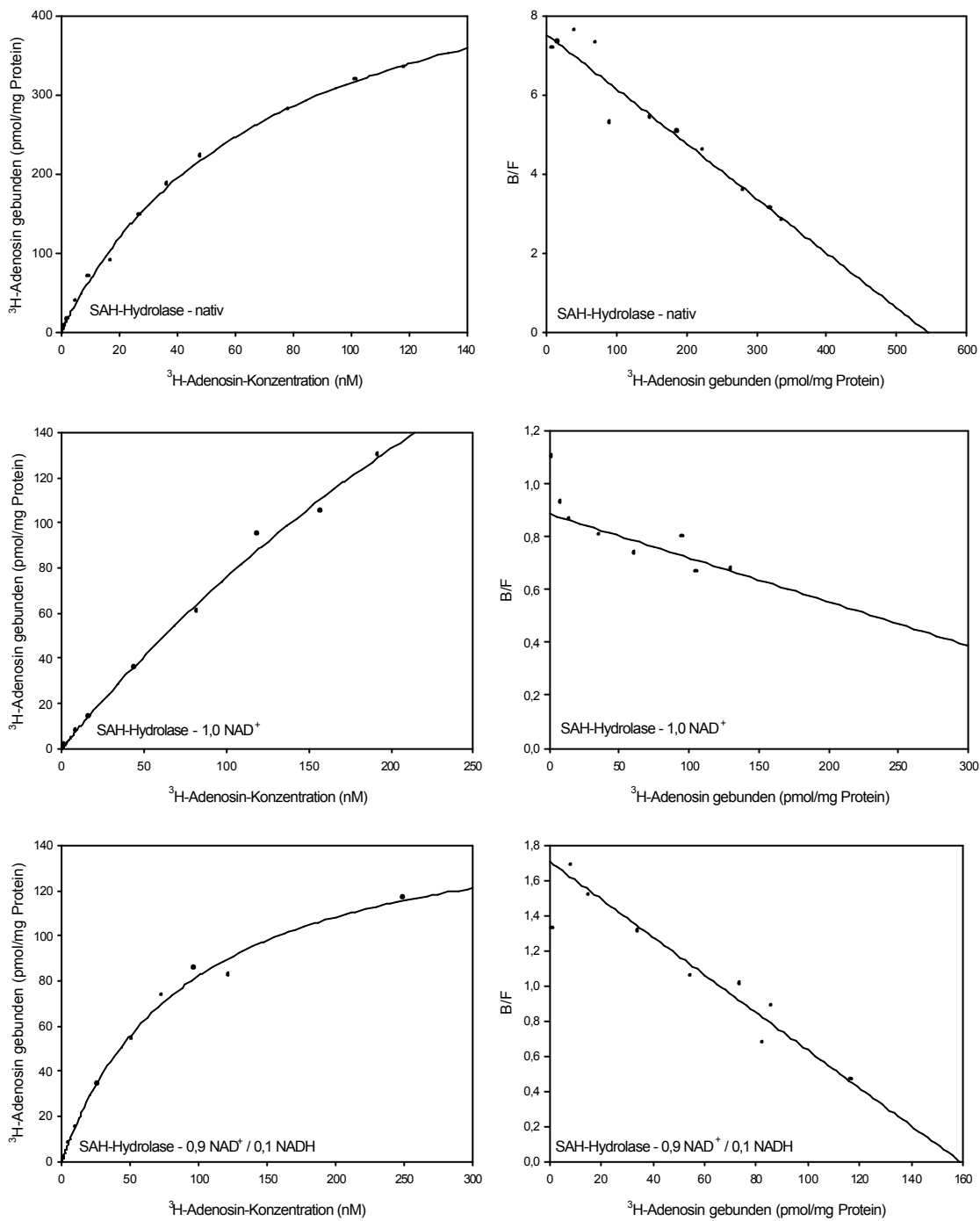


Abb.8.1: Sättigungsexperimente der SAH-Hydrolase-Formen mit ³H-Adenosin-Konzentrationen zwischen 1 nM und 250 nM. Repräsentative Versuche aus n = 3-10. Die verschiedenen NAD⁺/NADH-Verhältnisse sind in den jeweiligen Grafiken angegeben.

Sättigungsexperimente

Scatchard-Analysen

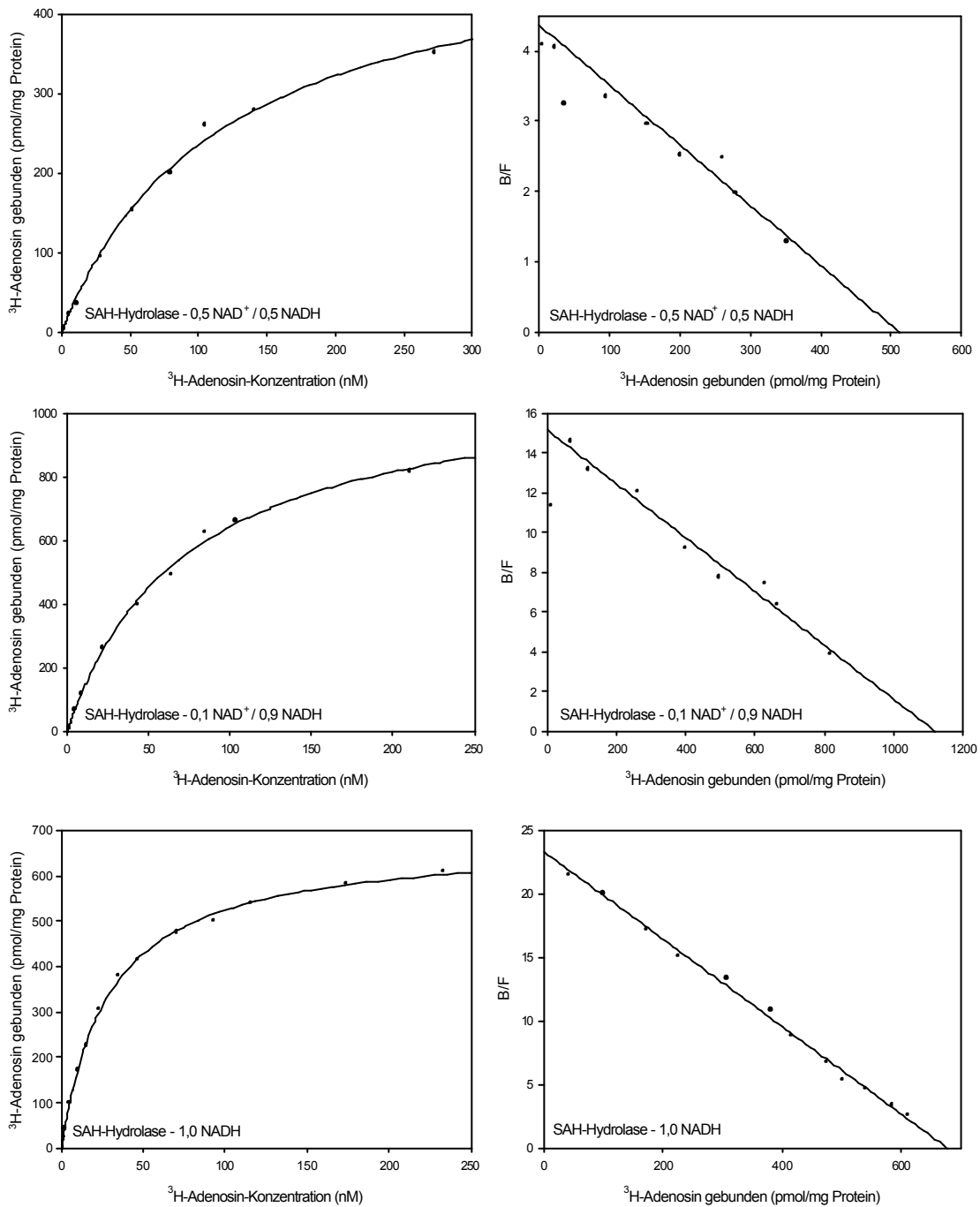


Abb.8.2: Sättigungsexperimente der SAH-Hydrolase-Formen mit ³H-Adenosin-Konzentrationen zwischen 1 nM und 250 nM. Repräsentative Versuche aus n = 3-10. Die verschiedenen NAD⁺/NADH-Verhältnisse sind in den jeweiligen Grafiken angegeben.

3.3.2 ^3H -Adenosin-Konzentration bis 60 μM

Da im niedrigeren ^3H -Adenosin-Konzentrationsbereich eine Sättigung der verschiedenen SAH-Hydrolase-Formen nicht erreicht werden konnte, wurde die ^3H -Adenosin-Konzentration auf 1-60 μM erhöht. Dazu wurde heißes Adenosin im Verhältnis 1:50 mit kaltem Adenosin verdünnt.

Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Stunden bei Raumtemperatur war bei allen Enzymformen eine Sättigung erreicht.

Auch hier kann festgestellt werden, dass die Kurven mit abnehmendem NAD^+/NADH Quotienten steiler verlaufen und früher in die Sättigungsphase eintreten.

Die Scatchard-Analysen ergeben bei dem nativen Enzym und demjenigen mit 0,5 $\text{NAD}^+ / 0,5 \text{NADH}$ eine nichtlineare Kurve, sodass man davon ausgehen kann, dass hier 2 Bindungsstellen vorliegen. Bei allen anderen Enzymformen weist der Scatchard-Plot eine Gerade auf, was auf nur eine Bindungsstelle hindeutet.

Daraus lassen sich eine bzw. zwei Bindungsstellen für Adenosin mit unterschiedlichen Affinitäten (K_d -Werte) an die SAH-Hydrolase ermitteln. Diese K_d -Werte und die Bindungsmaxima (B_{max}) sind in Tabelle 5 dargestellt.

Bei den Bindungsmaxima wird eine Grenze erreicht, die bei ca. 3,7 nmol ^3H -Adenosin/mg Protein liegt. Eine Ausnahme stellt die native Form des Enzyms dar, denn hier liegt das zweite Bindungsmaximum bei 8,6 nmol/mg Protein.

Tab.5: K_d - und B_{max} -Werte der unterschiedlichen Enzymformen bei 3H -Adenosin-Konzentrationen bis 60 μM

NAD ⁺ /NADH	K_d1 (nmol/l)	K_d2 (μ mol/l)	$B_{max}1$ (nmol/ mg Protein)	$B_{max}2$ (nmol/ mg Protein)
nativ	9,2 ± 0,6	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,05	8,6 ± 1,1
1,0 / 0,0	---	4,9 ± 0,3	---	2,3 ± 0,1
0,9 / 0,1	---	3,7 ± 0,1	---	7,1 ± 0,2
0,5 / 0,5	6,5 ± 0,3	0,6 ± 0,03	0,7 ± 0,01	3,5 ± 0,3
0,1 / 0,9	98,5 ± 7,7	---	---	3,9 ± 0,8
0,0 / 1,0	43,3 ± 2,7	---	---	3,5 ± 1,0

Sättigungsexperimente

Scatchard-Analysen

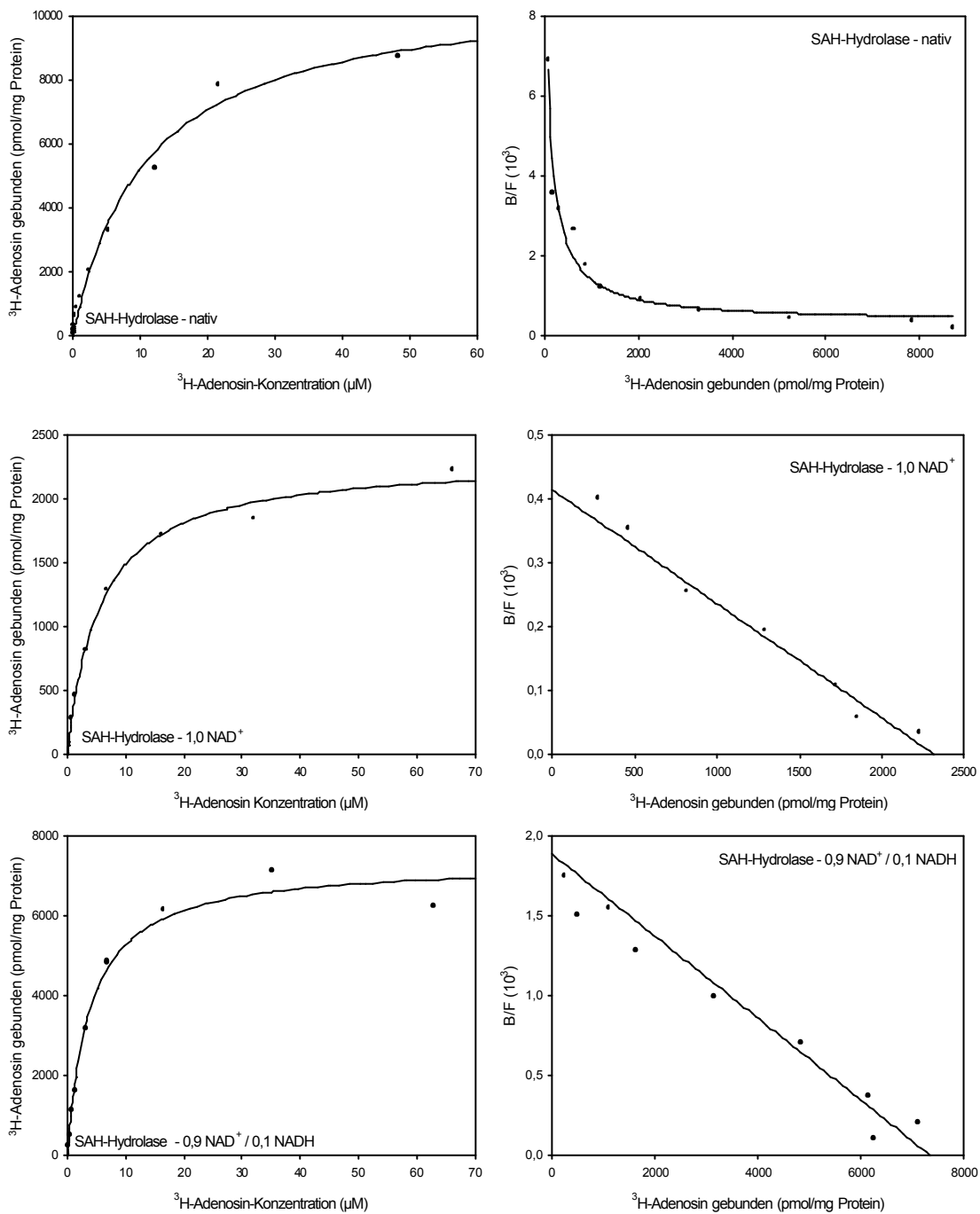


Abb.9.1: Sättigungsexperimente der SAH-Hydrolase-Formen mit ³H-Adenosin-Konzentrationen zwischen 0,01 μM und 50 μM. Repräsentative Versuche aus n = 26. Die verschiedenen NAD⁺/NADH-Verhältnisse sind in den jeweiligen Grafiken angegeben.

Sättigungsexperimente

Scatchard-Analysen

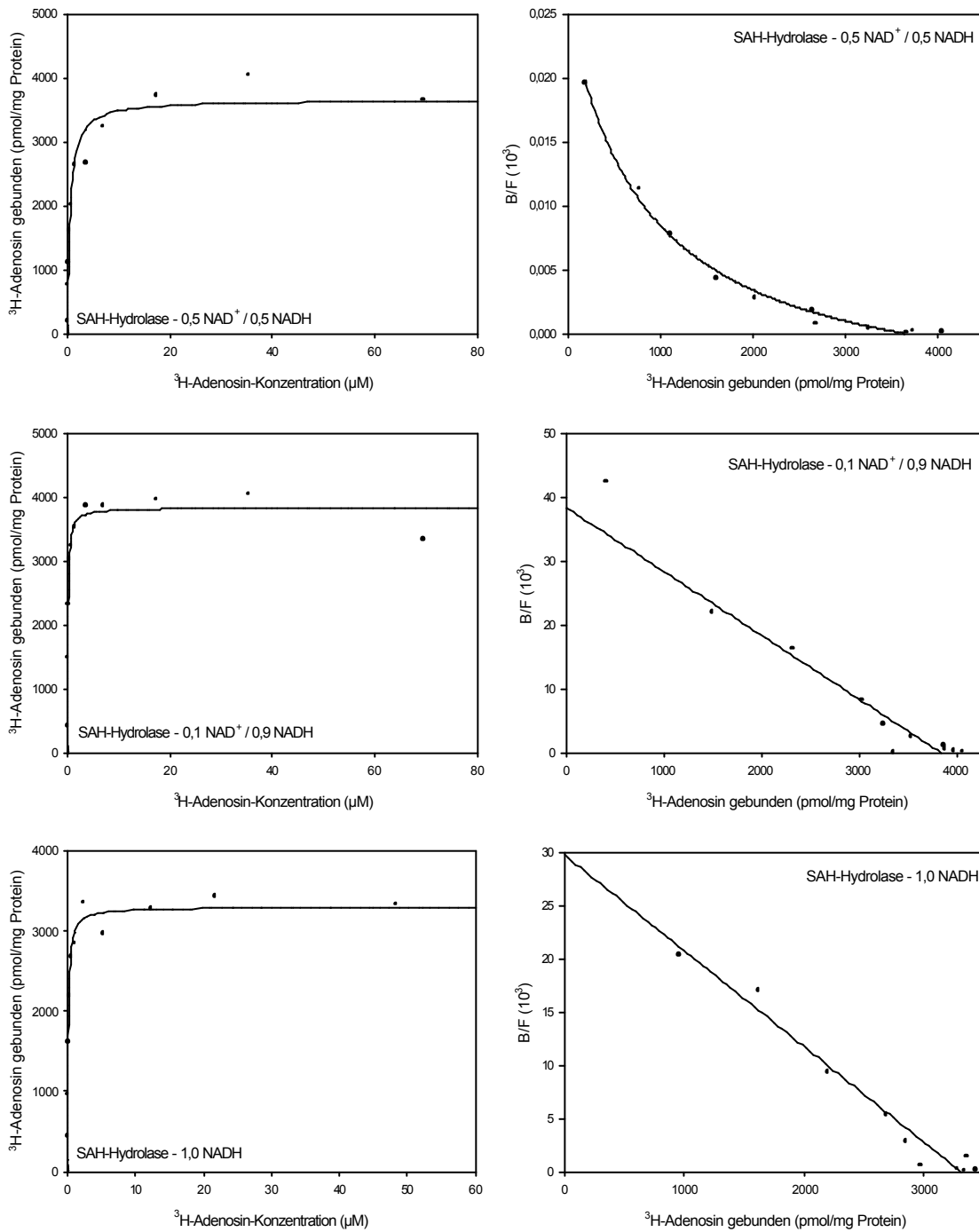


Abb.9.2: Sättigungsexperimente der SAH-Hydrolase-Formen mit ³H-Adenosin-Konzentrationen zwischen 0,01 μM und 50 μM. Repräsentative Versuche aus n = 26. Die verschiedenen NAD⁺/NADH-Verhältnisse sind in den jeweiligen Grafiken angegeben.

3.4 Bestimmung der Adenosin-Bindungsstellen an der SAH-Hydrolase

Um die Adenosin-Bindungsstellen ermitteln zu können, wurden die native, die vollständig reduzierte NADH- und die vollständig oxidierte NAD⁺-Form der SAH-Hydrolase mit Azido-³H-Adenosin markiert. Die Azido-Markierung ist eine durch Licht aktivierbare Gruppe, die durch die Affinität des Adenosins an die Bindungsstelle der SAH-Hydrolase bindet. Durch die Photoaktivierung lassen sich sowohl Zeitpunkt als auch Ort der Reaktion bestimmen. Die so markierten Peptide wurden durch Kombination von Edman-Abbau und Maldimassenspektrometrie untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab.6: Aminosäure-Sequenz der Azido-markierten Regionen der SAH-Hydrolase

NAD ⁺ / NADH	Azido-markierte Peptide
nativ	Asp ³⁰⁷ – Val ³²⁵ Tyr ³⁷⁹ – Thr ⁴¹⁰
1,0 / 0,0	Asp ³⁹¹ – Ala ³⁹⁶
0,0 / 1,0	Asn ³¹² – Lys ³¹⁸

Die Instabilität eines durch die Photoreaktion erzeugten Cross-links war die Ursache dafür, dass die Azido-³H-Adenosin-markierte Aminosäure nicht identifiziert werden konnte.

Entsprechend den zwei Adenosin-Bindungsstellen sind bei der nativen SAH-Hydrolase zwei Peptide markiert, dagegen bei der vollständig reduzierten bzw. vollständig oxidierten SAH-Hydrolaseform jeweils nur ein Peptid. Die native SAH-Hydrolase hat also sowohl mit der reduzierten als auch mit der oxidierten Form jeweils eine gemeinsame Adenosin-Bindungsstelle. Die unterschiedliche Länge der Peptide ist auf den proteolytischen Verdau zurückzuführen.

4 Diskussion

Die SAH-Hydrolase katalysiert die reversible Hydrolyse von SAH zu Homocystein und Adenosin (De la Haba & Cantoni, 1959), wobei *in vivo* das Gleichgewicht auf der Seite der Hydrolyse liegt, da Adenosin und Homocystein intrazellulär schnell metabolisiert werden (De la Haba & Cantoni, 1959; Cortese et al., 1974; Eloranta, 1977; Crooks et al., 1979).

Jedes Molekül SAH-Hydrolase enthält als Kofaktor NAD^+ , das am Reaktionsmechanismus direkt beteiligt ist (Palmer & Abeles, 1979). Die Bindung des Adenosins an das Enzym führt zur Oxidation der 3'-OH-Gruppe des Adenosins, bei gleichzeitiger Reduktion des an das Enzym gebundenen NAD^+ . Dadurch wird das Enzym inaktiviert und kann erst durch Zugabe des Reaktionspartners Homocystein reaktiviert werden.

Die Tatsache, dass die reduzierte, inaktive SAH-Hydrolase Adenosin mit hoher Affinität binden kann (Kloor et al., 2000), führte zur Fragestellung dieser Arbeit, inwieweit das Verhältnis des Kofaktors NAD^+/NADH an der SAH-Hydrolase die Adenosin-Bindungsstellen und die Affinität von Adenosin beeinflusst.

4.1 NAD^+/NADH -Quotient

Dazu wurde der Kofaktor NAD^+/NADH nach der von De la Haba et al. (1986) etablierten und in Kapitel 2.1.4 beschriebenen Methode vom Enzym entfernt und anschließend mit NAD^+/NADH in definierten Verhältnissen rekonstituiert. Außer der vollständig reduzierten NADH -SAH-Hydrolase, sowie der vollständig oxidierten NAD^+ -SAH-Hydrolase, wurden Enzymformen mit 0,9 $\text{NAD}^+/\text{0,1 NADH}$, 0,5 $\text{NAD}^+/\text{0,5 NADH}$ und 0,1 $\text{NAD}^+/\text{0,9 NADH}$ hergestellt.

Messungen des NAD^+/NADH -Gehaltes frisch gereinigter SAH-Hydrolase aus Rinderniere mittels HPLC zeigten, dass 94% des am Enzym gebundenen Kofaktors in der NAD^+ -Form vorlagen und nur 6% in der NADH -Form.

Hershfield et al. (1985) ermittelten bei 8 separat gereinigten SAH-Hydrolase-Formen einen NADH -Anteil zwischen 10-50% mit einem Durchschnitt von 21% NADH .

Einen höheren Anteil an NADH bestimmten Narayanan und Borchardt (1988) an der von ihnen gereinigten SAH-Hydrolase. Sie ermittelten ebenfalls mit Hilfe der HPLC ein NAD⁺/NADH-Verhältnis von 57% NAD⁺ zu 43% NADH.

Dieses Verhältnis erfährt bei Raumtemperatur eine weitere Verschiebung zum NADH. Aber auch die Lagerung der SAH-Hydrolase bei -20°C führt zu einer Reduktion des NAD⁺. So wies hochgereinigte SAH-Hydrolase-Fraktion aus Rinderniere nach einem Jahr nur noch 25% NAD⁺ und 75% NADH auf. Die Verschiebung des NAD⁺/NADH-Verhältnisses hin zum NADH hat zur Folge, dass sich die Affinität von ³H-Adenosin an die SAH-Hydrolase vermindert (Kloor et al., 1996).

Eine weitere Methode um den NAD⁺-Gehalt an der SAH-Hydrolase zu bestimmen, ist der Einsatz von radioaktiv markiertem NAD⁺. Damit wurde der NAD⁺-Gehalt der experimentell hergestellten SAH-Hydrolase-Formen bestimmt.

4.2 Zeitabhängige Assoziation und Dissoziation

Durch die hohe Reinheit der SAH-Hydrolase, insbesondere durch die Abwesenheit von ADA, sowie durch die Verwendung einer geeigneten Filtrationsapparatur mit PEI getränkten Glasfaserfiltern, wurden Bedingungen geschaffen, um Bindungsstudien an isoliertem Enzym mit Adenosin als Radioligand durchführen zu können.

Das Bindungsverhalten von ³H-Adenosin an die verschiedenen Enzymformen wurde primär mit Assoziations- und Dissoziationsversuchen geprüft (Abb.7.1 und 7.2).

Ein ähnliches Assoziations- und Dissoziationsverhalten zeigen die native SAH-Hydrolase und die SAH-Hydrolase-Form mit 0,9 NAD⁺/0,1 NADH. Beide Enzymformen erreichen bei den Assoziationsversuchen das Gleichgewicht der Reaktion nach 100 Minuten. Auch bei den Dissoziationskurven liegen die Verhältnisse ähnlich: Nach 240 Minuten Dissoziation bleibt bei beiden Enzymformen eine ³H-Adenosin-Restbindung von 20 bis 25% der Ausgangsbindung.

Eine sehr schnelle Assoziation zeigt die vollständig oxidierte Form der SAH-Hydrolase. Schon nach 30 Minuten ist die Reaktion im Gleichgewicht. Dann allerdings sinkt die Menge des gebundenen Adenosins wieder ab, was auf eine Instabilität oder Degradation des Enzyms bei Raumtemperatur zurückzuführen ist. Diese Schlussfolgerung wird durch Untersuchungen bei 4°C bestätigt (nicht gezeigt). Hier konnte dieser Abfall auch nach 240 Minuten nicht festgestellt werden. Die Instabilität der SAH-Hydrolase bei Prokaryonten führen Narayanan und Borchardt (1988) auf das enzymgebundene NAD^+ zurück.

Die Dissoziation des ^3H -Adenosins von der vollständig oxidierten Enzymform erreicht schon nach 60 Minuten 10% der Gesamtbindung. Das bedeutet, dass das Adenosin an diese SAH-Hydrolase-Form, verglichen mit den anderen SAH-Hydrolase-Formen, nicht in einem festgebundenen Adenosin-SAH-Hydrolase-Komplex vorliegt.

Einen ähnlich steilen Anstieg der Assoziationskurve wie bei der 100% NAD^+ -Form zeigt die SAH-Hydrolase mit 50% NAD^+ /50% NADH . Hier ist das Gleichgewicht der Bindung erst nach 90 Minuten erreicht. Danach sinkt allerdings auch hier die an das Enzym gebundene ^3H -Adenosin-Konzentration, was auch hier auf eine Degradation des Enzyms zurückzuführen ist. Der Verlauf der Dissoziationskurve ähnelt der der nativen SAH-Hydrolase.

Ein ganz anderes Assoziation- und Dissoziationsverhalten zeigen die Enzymformen mit einem hohen Anteil an NADH . Während die Reaktion bei der Enzymform mit 90% NADH nach 180 Minuten im Gleichgewicht ist, erreicht die vollständig reduzierte Form das Gleichgewicht erst nach 480 Minuten. Dementsprechend langsam verläuft auch die Dissoziation des Adenosin-Enzym-Komplexes.

Die Ergebnisse der Assoziations- und Dissoziationskinetiken zeigen eine eindeutige Korrelation zwischen dem NAD^+ / NADH -Quotienten am Enzym und der Assoziationszeit bis zum Einstellen des Gleichgewichtes der Reaktion. Je höher der NAD^+ -Gehalt am Enzym ist, desto schneller wird das Gleichgewicht erreicht, während die Assoziation bei den Enzymformen mit hohem NADH -Anteil nur sehr langsam erfolgt.

An den Assoziationsuntersuchungen wird außerdem deutlich, dass auch die Bindungskapazität der SAH-Hydrolase-Formen abhängig vom NAD^+/NADH -Quotienten ist. Bei einer ^3H -Adenosin-Konzentration von 10 nM bindet die vollständig oxidierte NAD^+ -Form der SAH-Hydrolase maximal 17 pmol/mg Protein, während die vollständig reduzierte NADH-Form 130 pmol ^3H -Adenosin/mg Protein bindet.

4.3 Konzentrationsabhängige Sättigung

Bei unverdünnter spezifischer Aktivität des ^3H -Adenosins und einer Konzentration bis 250 nM zeigt lediglich die vollständig reduzierte Enzymform eine scheinbare Sättigung. Dass es sich hierbei nur um eine scheinbare Sättigung handelt, bestätigen Versuche mit ^3H -Adenosin in höheren Konzentrationen.

Alle anderen Enzymformen, einschließlich der nativen SAH-Hydrolase sind in diesem Adenosin-Konzentrationsbereich nicht sättigbar. Kloor et al. (2000) konnten zwar für das native Protein in diesen niedrigen ^3H -Adenosin-Konzentrationen eine scheinbare Sättigung zeigen, was aber mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte. Auffällig war das Sättigungsverhalten der vollständig oxidierten SAH-Hydrolase-Form. In den ^3H -Adenosin-Konzentrationen bis 250 nM kam es nur zu einem linearen Anstieg der Bindung.

Da sich in diesen niedrigen ^3H -Adenosin-Konzentrationen keine Sättigung ergibt, können Bindungsmaxima und K_d -Werte nur anhand der Kurven geschätzt werden. Die durchgeführten Scatchard-Analysen (Abb.8.1 und 8.2) weisen – abgesehen von der vollständig oxidierten Enzymform - auf eine hochaffine Bindungsstelle für Adenosin hin (Tab.4).

Da in den ^3H -Adenosin-Konzentrationen bis 250 nM keine Sättigung erreicht werden konnte, wurden weitere Sättigungsversuche mit Adenosin-Konzentrationen bis 60 μM durchgeführt.

Dabei wurde das heiße Adenosin 1:50 mit kaltem Adenosin verdünnt, um diese hohen Adenosin-Konzentrationen zu erreichen. Mit dieser Aktivitätsverdünnung des ^3H -Adenosin mit kaltem Adenosin konnten alle Enzymformen gesättigt werden.

Die Transformation der Daten nach Scatchard und die Auswertung mit dem LIGAND-Programm lassen erkennen, dass die Enzymformen in Abhängigkeit vom NAD^+/NADH -Verhältnis eine oder zwei Bindungsstellen für Adenosin besitzen (Abb.9.1 und 9.2).

Einen linearen Verlauf und somit nur eine Bindungsstelle ergeben die Daten der vollständig oxidierten, der vollständig reduzierten und der SAH-Hydrolase-Formen mit 90% $\text{NAD}^+/\text{10\% NADH}$ und 10% $\text{NAD}^+/\text{90\% NADH}$. Die Affinität des Adenosins an die SAH-Hydrolase ist bei den SAH-Hydrolase-Formen, bei denen NADH überwiegt (90 oder 100% NADH), sehr hoch. Die K_d -Werte liegen für diese Enzymformen bei $98,5 \pm 7,7 \text{ nmol/l}$ und $43,3 \pm 2,7 \text{ nmol/l}$. Dagegen binden die SAH-Hydrolase-Formen, bei denen NAD^+ überwiegt (90 bzw. 100% NAD^+), Adenosin mit einer sehr viel niedrigeren Affinität. Die K_d -Werte liegen mit $4,9 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{mol/l}$ und $3,7 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$ im mikromolaren Bereich. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Affinität mit zunehmendem NADH-Gehalt steigt.

Zwei Bindungsstellen für Adenosin - eine mit niedriger und eine mit hoher Affinität für Adenosin - zeigen die native SAH-Hydrolase und die SAH-Hydrolase-Form mit einem NAD^+/NADH -Verhältnis von 0,5/0,5.

In der Literatur finden sich keine Untersuchungen der SAH-Hydrolase mit definierten NAD^+/NADH -Verhältnissen, wohl aber unterschiedliche Ergebnisse, sowohl im Bezug auf die Anzahl der Bindungsstellen, als auch auf die K_d -Werte. Daten für die K_d -Werte findet man jedoch lediglich für die vollständig reduzierte Form der SAH-Hydrolase.

Yuh und Tao (1974) fanden für das „Adenosin-cAMP bindende Protein“ aus Kaninchenerythrozyten, das erst später in Bezug zur SAH-Hydrolase gesetzt

wurde, eine Bindungsstelle für Adenosin und eine für cAMP mit den K_d -Werten 100 nM und 300 nM.

Olsson (1978) gibt für ein Protein („Adenin-Analogabindendes Protein“) aus Kaninchenerythrozyten die Werte 5 nM (Adenosin) und 9 nM (cAMP) an, ohne die Identität dieses Proteins mit der SAH-Hydrolase nachzuweisen.

Die Ergebnisse von Messungen der SAH-Hydrolase aus der Mäuseleber liegen bei 200 nM für Adenosin und 150 nM für cAMP (Ueland & Døskeland, 1977). Die gleichen Autoren beschreiben in weiteren Publikationen die Existenz einer Adenosin- und einer cAMP-Bindungsstelle, die keine Kooperation aufweisen (Ueland & Døskeland, 1978).

Beim Enzym der Rattenniere wurde ein K_d -Wert von 630 nM bestimmt (Fujioka & Takata, 1981).

Anhand menschlicher Gewebe (Lymphoblasten und Plazenta) fanden Hershfield und Kredich (1978) einen K_d -Wert von 500 nM und gaben die Existenz von nur einer Bindungsstelle an.

Kloor et al. (1996) konnten bei der nativen SAH-Hydrolase zum ersten Mal drei verschiedene Affinitäten feststellen. Die hohe Affinität mit $6,8 \pm 0,7$ nM deckt sich ungefähr mit der hier erhaltenen, die $9,2 \pm 0,6$ beträgt. Die niedrige Affinität jedoch war mit $7,05 \pm 0,9 \mu\text{M}$ niedriger als der K_d -Wert der vorliegenden Versuche, der bei $1,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ liegt (Tab.5).

Der von Kloor et al. (1996) beschriebene mittlere K_d -Wert war durch den experimentellen Ansatz bedingt, da Versuche mit niedrigen und hohen Konzentrationen unabhängig voneinander durchgeführt wurden.

Bei den hier vorliegenden Versuchen wurden auch bei ^3H -Adenosin-Konzentrationen bis $50 \mu\text{M}$ sowohl der hohe als auch der niedrige ^3H -Adenosin-Konzentrationsbereich umfasst, weshalb nur zwei Affinitäten festgestellt wurden. Deshalb kann – abhängig von der Enzymform – von zwei Adenosin-Bindungsstellen ausgegangen werden.

Von zwei Adenosin-Bindungsstellen berichten auch Jakubowski und Guranowski (1981), die das Enzym in Pflanzen untersucht haben. Sie gehen von einer negativen Kooperativität zwischen den Bindungsstellen aus, da das erste Molekül Adenosin schnell, das zweite hingegen langsam bindet. Diese

negative Kooperativität könnte eine Besonderheit pflanzlicher SAH-Hydrolase sein, da diese bei der SAH-Hydrolase tierischen bzw. humanen Ursprungs nicht festgestellt werden konnte. Der Hill-Koeffizient, den das Programm LIGAND berechnete, lag für die Adenosin-Bindungsstelle der SAH-Hydrolase aus Rinderniere zwischen 0,7 und 1,3.

Versuche mit kovalent bindendem 8-Azido-Adenosin und $-cAMP$ (Aiyar & Hershfield, 1985) weisen auf nur eine gemeinsame Bindungsstelle hin, während durch die Eigenschaft der SAH-Hydrolase, einen Teil des Adenosin fest zu binden, lediglich eine separate cAMP-Bindungsstelle vorgetauscht werde. Diese Bindungsstelle liege jedoch in zwei Zuständen vor, wie sich im biphasischen Verlauf von Adenosin-Bindung und Dissoziation zeige (Hershfield et al., 1985).

So konnten Kloor et al. (2000) zeigen, dass die NADH-Form der SAH-Hydrolase Adenosin mit einer Affinität von 32 ± 2 nM bindet. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit mit einer Affinität von $43,3 \pm 2,7$ nM bestätigt werden.

Einen sehr viel niedrigeren K_d -Wert von 5 nM berechneten Porter und Boyd (1991) für die reduzierte SAH-Hydrolase. Allerdings ermittelten sie diesen Wert mit einer Stop-Flow spektrofluorometrischen Methode.

Der Grund für die unterschiedlichen Affinitäten von 3H -Adenosin an die SAH-Hydrolase, die in der Literatur beschrieben werden, könnte sein, dass das Enzym mit verschiedenen $NAD^+/NADH$ -Verhältnissen untersucht wurde.

Die Bindung von Adenosin an die SAH-Hydrolase führt zur Reduktion des NAD^+ (Palmer & Abeles, 1979). Dabei tritt eine Konformationsänderung am Enzym ein, die dazu führt, dass die SAH-Hydrolase in eine geschlossene Form übergeht (Komoto et al., 2000). In dieser geschlossenen, inaktiven Form ist das Enzym in der Lage, Adenosin zu binden.

Der Verlust der enzymatischen Aktivität mit zunehmendem NADH-Gehalt wurde auch von Narayanan und Borchardt (1988) festgestellt, und die enzymatische Inaktivität der vollständig reduzierten SAH-Hydrolase wurde von Kloor et al. (2000) beschrieben.

So wie die Enzymaktivität der SAH-Hydrolase mit zunehmendem NADH-Anteil abnimmt, steigt in gleichem Maße die Affinität des Enzyms für Adenosin an.

Ist am Enzym von vorneherein schon hauptsächlich NADH gebunden, befindet sich das Enzym schon in der geschlossenen Form, sodass keine Konformationsänderung mehr stattfindet.

Aufgrund der niedrigen Affinität von Adenosin an die vollständig oxidierte SAH-Hydrolase werden sehr große Mengen Adenosin benötigt, um einen Übergang von der offenen in die geschlossene Form zu bewirken. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass nur eine Adenosin-Bindungsstelle vorliegt.

Die maximale Bindungskapazität der nativen SAH-Hydrolase bei den hier durchgeführten Versuchen liegt bei $8,6 \pm 1,1$ nmol/mg Protein. Für das hochgereinigte Protein ergibt sich somit ein Verhältnis zwischen gebundenem ^3H -Adenosin und SAH-Hydrolase von 2:1, das heißt, ein Enzymmolekül bindet zwei Moleküle ^3H -Adenosin. Die übrigen Enzymformen binden maximal 3,1–3,9 nmol Adenosin/mg Protein. Eine Ausnahme bildet die vollständig oxidierte Form der SAH-Hydrolase, die maximal nur 2,3 pmol Adenosin/mg Protein bindet. Damit bindet nur jedes zweite Enzymmolekül ein Molekül Adenosin. Eine plausible Erklärung für dieses Ergebnis lässt sich schwer finden, da Adenosin primär an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet und diese Enzymform in Richtung der Hydrolyse sehr aktiv ist.

Aufgrund der hier durchgeführten Bindungsstudien kann also darauf geschlossen werden, dass die Adenosin-Bindungsstellen und die Affinitäten von Adenosin an die SAH-Hydrolase vom NAD^+/NADH -Gehalt der SAH-Hydrolase abhängt. Damit lassen sich auch die in der Literatur angegebenen unterschiedlichen K_d -Werte erklären.

4.4 Adenosin-Bindungsstellen an der SAH-Hydrolase

Die Bestimmung der Adenosin-Bindungsstellen der SAH-Hydrolase mit 8-Azido- ^3H -Adenosin bestätigt die durch die Bindungsstudien gemachten Beobachtungen von zwei unterschiedlichen Adenosin-Bindungsstellen.

Entsprechend den Adenosin-Bindungsstellen ließen sich bei der nativen SAH-Hydrolase zwei markierte Peptide Asp³⁰⁷ – Val³²⁵ und Tyr³⁷⁹ – Thr⁴¹⁰ identifizieren.

Nach Einteilung der SAH-Hydrolase in katalytische Domänen und NAD-Bindungsdomänen (Hu et al., 1999) ist das Peptid Asp³⁰⁷ – Val³²⁵ in der NAD⁺-Domäne (Aminosäure 182-351) lokalisiert, während das Peptid Tyr³⁷⁹ – Thr⁴¹⁰ einen Teil der zweiten katalytischen Domäne (Aminosäure 352-402) markiert.

Die mit 100% NAD⁺ rekonstituierte SAH-Hydrolase-Form, die in den Bindungsstudien nur eine Bindungsstelle aufweist, zeigt auch nur ein markiertes Peptid Asp³⁹¹ – Ala³⁹⁶, das zur zweiten katalytischen Domäne gehört.

Die mit 100% NADH rekonstituierte Enzymform, die ebenfalls nur eine Bindungsstelle in den Sättigungsexperimenten aufweist, zeigt auch nur ein markiertes Peptid Asn³¹² – Lys³¹⁸, welches der NAD⁺-Bindungsdomäne zugeordnet werden kann.

Yuan und Borchardt (1995) fanden ebenfalls zwei Peptide nach (2-³H)8-Azido-Adenosin-Markierung der SAH-Hydrolase aus humaner Plazenta und schlossen, dass die Peptide Teile der Adenosin-Bindungsdomänen sind. Sie entsprachen Teilen der von Hu et al. (1999) erwähnten katalytischen Domäne. In diesen markierten Peptiden Val¹⁷⁵ – Lys¹⁸⁶ und Val³¹⁹ – Arg³²⁷ konnten Ala¹⁷⁷ und Ile³²¹ direkt mit der Radioaktivität assoziiert werden.

Eine gute Übereinstimmung mit diesen Daten zeigt das markierte Peptid Asp³⁰⁷ – Val³²⁵ der nativen SAH-Hydrolase aus Rinderniere. Die Markierung des zweiten Peptids Tyr³⁷⁹ – Thr⁴¹⁰ der SAH-Hydrolase aus Rinderniere könnte auf die unterschiedliche Herkunft der untersuchten Enzyme zurückzuführen sein, da bei der Sequenzierung der SAH-Hydrolase aus Rinderniere an mehreren Stellen ein Aminosäureaustausch festgestellt wurde.

Trotzdem zeigen weder die von Yuan und Borchardt (1995), noch die in dieser Arbeit identifizierten Peptide eine Übereinstimmung mit den aus der Kristallisation ermittelten Aminosäuren, die für die Bindung von Adenosin an die SAH-Hydrolase entscheidend sind. Aus den Kristallisationsdaten geht hervor, dass die Interaktion von Adenosin mit der SAH-Hydrolase mit den Aminosäuren

Thr⁵⁶, Glu⁵⁸ und His³⁵² stattfindet, während die Ribose mit den Aminosäuren His⁵⁵, Asp¹⁵¹, Glu¹⁵⁵, Thr¹⁵⁶, Asp¹⁹⁰ und His³⁰⁰ interagiert (Turner et al., 1998; Hu et al., 1999; Komoto et al., 2000; Hu et al., 2001; Huang et al., 2002).

Diese Unterschiede können daran liegen, dass die Untersuchungen mit SAH-Hydrolasen aus unterschiedlichen Spezies durchgeführt wurden. Trotz großer Homologie der SAH-Hydrolase aus Säugern (Coulter-Karis & Hershfield, 1989) können Aminosäure-Austausche stattfinden.

Eine andere Erklärung könnte die Herkunft des Enzyms sein, die für diese Untersuchungen eine entscheidende Rolle spielt. Für die Kristallisationsversuche wurde rekombinante SAH-Hydrolase humanen oder murinen Ursprungs verwendet, die in Bakterien vermehrt wurde. Nach dieser Vermehrung in Bakterien ist es möglich, dass Proteine eine „Fehl-Faltung“ aufweisen, die nicht der „nativen Faltung“ entspricht. Infolgedessen müssen diese Proteine nach einer „Entfaltung“ neu gefaltet werden, um die „native Faltung“ zu erhalten. Inwieweit dieser Vorgang einzelne Aminosäuren und deren prosthetische Gruppen beeinflusst, ist zur Zeit nicht bekannt.

Da in dieser Arbeit nur mit aus Rindernieren gereinigter SAH-Hydrolase gearbeitet wurde, könnte die Faltung der nativen SAH-Hydrolase-Form, im Vergleich zu den rekombinanten SAH-Hydrolase-Formen, ein Grund für die gefundenen Unterschiede sein.

Bemerkenswert ist, dass sowohl die Arbeitsgruppe um Yuan und Borchardt (1995), als auch Hu et al. (1999) zwei Adenosin-Bindungsstellen gefunden haben, wie dies auch für die native SAH-Hydrolase aus Rindernieren gezeigt werden konnte. Ist das Enzym jedoch vollständig oxidiert oder reduziert, ist nur noch eine Bindungsstelle vorhanden, wie die Sequenzierungsdaten der NAD⁺- und der NADH-Form des Enzyms zeigen.

5 Zusammenfassung

Das Enzym SAH-Hydrolase katalysiert die reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und Homocystein. Jedes Molekül SAH-Hydrolase enthält fest gebundenes NAD^+ , das als Kofaktor an der Reaktion beteiligt ist. Bindet Adenosin an die SAH-Hydrolase, wird das NAD^+ zu NADH reduziert, und das Enzym geht in eine geschlossene, inaktive Form über.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Kofaktor NAD^+ von der hochgereinigten SAH-Hydrolase aus Rindernieren entfernt und das Enzym mit definierten NAD^+/NADH -Verhältnissen rekonstituiert. Untersucht wurde das Bindungsverhalten von Adenosin an die einzelnen Enzymformen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die Assoziationsgeschwindigkeit nahm mit steigendem NADH -Gehalt deutlich ab. So erreichte die vollständig oxidierte Enzymform schon nach 30 Minuten das Gleichgewicht, während die vollständig reduzierte SAH-Hydrolase bis zur Einstellung des Gleichgewichts 8 Stunden benötigte.
2. Nur bei ^3H -Adenosin-Konzentration bis $60 \mu\text{M}$ kann eine Sättigung der Enzymformen erreicht werden. Die Analyse nach Scatchard ergibt, abhängig vom NAD^+/NADH -Gehalt der Enzymformen, eine bzw. zwei Bindungsstellen für Adenosin. Eine Bindungsstelle mit niedriger Affinität weisen die Enzymformen mit 90 bzw. 100% NAD^+ und eine Bindungsstelle mit hoher Affinität die Formen mit 90 bzw. 100% NADH auf. Zwei Bindungsstellen findet man beim nativen Enzym und bei der Enzymform mit 50% NADH . Die höchste Bindungskapazität weist die native SAH-Hydrolase mit einer Bindung von 2 mol Adenosin pro mol Enzym auf. Die anderen untersuchten Enzymformen binden maximal ein mol Adenosin pro mol Enzym.
3. Die Bestimmung der Adenosin-Bindungsstellen der SAH-Hydrolase mit Azido-Adenosin bestätigt die durch die Bindungsstudien gemachten Beobachtungen von 2 unterschiedlichen Bindungsstellen. Beim nativen Enzym wurden 2 markierte Peptide $\text{Asp}^{307} - \text{Val}^{325}$ und $\text{Tyr}^{379} - \text{Thr}^{410}$ identifiziert. Bei der vollständig oxidierten Enzymform sowie bei der vollständig reduzierten Form konnte jeweils nur ein Peptid identifiziert werden. Diese befinden sich für das oxidierte Enzym bei $\text{Asp}^{391} - \text{Ala}^{396}$ und für die reduzierte SAH-Hydrolase bei $\text{Asn}^{312} - \text{Lys}^{318}$. Diese entsprechen den jeweiligen Peptiden der nativen SAH-Hydrolase.

6 Literaturverzeichnis

Aiyar, V. N., Hershfield, M. S.:

Covalent labelling of ligand binding sites of human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase with 8-azido derivatives of adenosine and cyclic AMP.

Biochem. J. 232: 643-650 (1985).

Aranow, L.:

Reversal of adenosine toxicity by pyrimidine nucleosides.

Biochim. Biophys. Acta 47: 184-185 (1961).

Ault-Riche, D. B., Lee, Y., Yuan, C. S., Hasobe, M., Wolfe, M. S., Borcharding, D. R., Borchardt, R. T.:

Effects of 4'-modified analogs of aristeromycin on the metabolism of S-adenosyl-L-homocysteine in murine L929 cells.

Mol. Pharm. 43: 989-997 (1993).

Berne, R. M., Winn, H. R., Knabb, R. M., Ely, S. W., Rubio, R.:

Blood flow regulation by adenosine in heart, brain and skeletal muscle.

In Berne, R. M., Rall, T. W., Rubio, R. (eds.)

Regulatory function of adenosine, pp.293-317

Martinus Nijhoff Publishers, The Hague/Boston/London (1983).

Bitonti, A. J., Baumann, J., Jarvi, T., McCarthy, J. R., McCann, P. P.:

Antimalarial activity of a 4',5'-unsaturated 5'-fluoroadenosine mechanism-based inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase.

Biochem. Pharmacol. 40: 601-606 (1990).

Bissbort, S., Bender, K., Wienker, T. F., Grzeschik, K. H.:

Genetics of S-adenosylhomocysteine hydrolase. A new polymorphism in man.

Hum. Genet. 65: 68-71 (1983).

Bradford, M. M.:

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 (1976).

Bruns, R. F., Lawson-Wendling, K., Pugsley, T.A.:

A rapid filtration assay for soluble receptors using Polyethylenimine-treated filters.

Anal. Biochem. 132: 74-81 (1983).

Cantoni, G. L.:

Biological methylation: selected aspects.

Annu. Rev. Biochem. 44: 435-451 (1975).

Cantoni, G. L., Chiang, P. K.:

The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological ethylations.

In Natural Sulfur Compounds: Novel Biochemical and Structural Aspects, ed. by D. Cavallini, G. E. Gaull, V. Zappia, Plenum Press, New York, London, pp.67-80 (1980).

Cantoni, G. L.:

In Biological Methylation and Drug Design

(Borchardt, R. T., Creveling, C. R., Ueland, P. M., Eds.)

Humana Press, Clifton, NJ: 227-238 (1986).

Cortese, R., Perfetto, E., Arcari, P., Prota, G., Salvatore, F.:

Formation of uric acid from adenosylhomocysteine in rat liver.

Int. J. Biochem. 5: 535-545 (1974).

Coulter-Karis, D. E., Hershfield, M. S.:

Sequence of full length cDNA for human S-adenosylhomocysteine hydrolase.

Ann. Hum. Genet. 53: 169-175 (1989).

Creedon, K. A., Rathod, P. K., Wellems T. E.:

Plasmodium falciparum S-adenosylhomocysteine hydrolase. cDNA identification, predicted protein sequence, and expression in Escherichia coli.

J. Biol. Chem. 269: 16364-16370 (1994).

Crooks, P. A., Dreyer, R. N., Coward, J. K.:

Metabolism of S-adenosylhomocysteine and S-tubercidinylhomocysteine in neuroblastoma cells.

Biochemistry 18: 2601-2609 (1979).

De Clerq, E., Deschamps, J., De Somer, P., Holy, A.:

(S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenine: an aliphatic nucleoside analog with broadspectrum antiviral activity.

Science 200: 563 (1978).

De Clerq, E., Cools, M., Balzarini, J., Marquez, V. E., Borcharding, D. R., Borchardt, R. T., et al.:

Broad-spectrum antiviral activities of neplanocin a, 3-deazaneplanocin A, and their 5'-nor derivatives.

Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1291-1297 (1989).

Deguchi, T., Barchas, J.:

Inhibition of transmethylations of biogenic amines by S-adenosylhomocysteine.

Enhancement of transmethylation by adenosylhomocysteinase.

J. Biol. Chem. 246: 3175-3181 (1971).

De La Haba, G., Cantoni, G. L.:
The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine.
J. Biol. Chem. 234: 603-608 (1959).

De La Haba, G., Agostini, S., Bozzi, A., Merta, A., Unson, C., Cantoni, G. L.:
S-adenosylhomocysteine hydrolase: mechanism of reversible and irreversible inactivation by ATP, cAMP and 2'-deoxyadenosine.
Biochemistry 25: 8337-8342 (1986).

Døskeland, S. O., Ueland, P.M.:
Comparison of some physicochemical and kinetic properties of S-adenosylhomocysteine hydrolase from bovine liver, bovine adrenal cortex and mouse liver.
Biochem. Biophys. Acta, in press (1982).

Duerre, J. A., Schlenk F.:
Formation and metabolism of S-adenosyl-L-homocysteine in yeast.
Arch. Biochem. Biophys. 69: 575-579 (1962).

Duerre, J. A.:
In vivo and in vitro metabolism S-adenosyl-L-homocysteine by *Saccharomyces cerevisiae* .
Arch. Biochem. Biophys. 124: 422-430 (1968).

Eloranta, T. O.:
Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat. Effect of age, sex and methionine administration on the metabolism of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and polyamines.
Biochem. J. 166: 521-529 (1977).

Fox, I. H., Kelley, W. N.:
The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells.
Annu. Rev. Biochem. 47: 655-686 (1978).

Fredholm, B. B., Sollevi, A.:
The release of adenosine and inosine from canine subcutaneous adipose tissue by nerve stimulation and noradrenaline.
J. Physiol. (Lond.) 313: 351-367 (1981).

Füllgraf, G., Palm, D. (Hrsg.):
Pharmakotherapie. Klinische Pharmakologie.
Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, Lübeck, Ulm, S.321; ISBN: 3-437-21220-6 (1997).

Fujioka, M., Takata, Y.:

S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. Purification and some properties.

J. Biol. Chem. 256: 1631-1635 (1981).

Gomi, T., Fujioka, M.:

Spectrophotometric studies of the interaction of S-adenosylhomocysteinase with adenosine, adenine and cordycepin.

Biochim. Biophys. Acta 785: 177-180 (1984).

Gomi, T., Ishiguro, Y., Fujioka, M.:

S-Adenosylhomocysteinase from rat liver. Evidence for structurally identical and catalytically equivalent subunits.

J. Biol. Chem. 260: 2789-2793 (1985).

Gomi, T., Date, T., Ogawa, H., Fujioka, M., Aksamit, R. R., Backlund, P. S., Cantoni, G. L.:

Expression of rat liver S-adenosylhomocysteinase cDNA in Escherichia coli and mutagenesis at the putative NAD binding site.

J. Biol. Chem. 264: 16138-16142 (1989).

Green, H., Chan, T.-S.:

Pyridine starvation induced by adenosine in fibroblasts and lymphoid cells: role of adenosine deaminase.

Science 182: 836-837 (1973).

Guranowski, A., Pawelkiewicz, J.:

Adenosylhomocysteinase from yellow lupin seeds. Purification and properties.

Eur. J. Biochem. 80: 517-523 (1977).

Hasobe, M., McKee, J. G., Borcharding, D. R., Borchardt, R. T.:

9-(trans-2', trans-3'-dihydroxycyclopent-4'-enyl)-adenine and -3-deazaadenine: analogs of neplanocin A which retain potent antiviral activity but exhibit reduced cytotoxicity.

Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1849-1851 (1987).

Hasobe, M., McKee, J. G., Borcharding, D. R., Keller, B. T., Borchardt, R. T.:

Effects of 9-(trans-2', trans-3'-dihydroxycyclopent-4'-enyl)-adenine and -3-deazaadenine on the metabolism of S-adenosylhomocysteine in mouse L929 cells.

Mol. Pharmacol. 33: 713-720 (1988).

Hasobe, M., McKee, J. G., Borchardt, R. T.

Relationship between intracellular concentration of S-adenosylhomocysteine and inhibition of vaccinia virus replication and inhibition of murine L-929 cell growth.

Antimicrob. Agents Chemother. 33: 828-834 (1989).

Henderson, D. M., Hanson, S., Allen, T., Wilson, K., Coulter-Karis, D. E., Greenberg, M. L., Hershfield, M. S., Ullman, B.:
Cloning of the gene encoding *Leishmania donovani* S-adenosylhomocysteine hydrolase, a potential target for antiparasitic chemotherapy.
Mol. Biochem. Parasitol. 53: 169-183 (1992).

Hershfield, M. S.:
Human cytoplasmic adenosine binding proteine: Identification as S-adenosylhomocysteinase.
Fed. Proc. 37: 1466 (1978).

Hershfield, M. S., Kredich, N. M.:
S-adenosylhomocysteine hydrolase is an adenosine-binding protein: a target for adenosine toxicity.
Science 202: 757-760 (1978).

Hershfield, M. S., Kredich, N. M., Ownby, D. R., Ownby, H., Buckley, R.:
In vivo inactivation of erythrocyte S-adenosylhomocysteine hydrolase by 2'-deoxyadenosine in adenosine deaminase deficient patients.
J. Clin. Invest. 63: 807-811 (1979).

Hershfield, M. S., Francke, U.:
The human genes for S-adenosylhomocysteine hydrolase and adenosine deaminase are syntenic on chromosome 20.
Science 216: 739-742 (1982).

Hershfield, M. S., Aiyar, V. N., Premakumar, R., Small, W. C.:
S-Adenosylhomocysteine hydrolase from human placenta.
Biochem. J. 230: 43-52 (1985).

Hilz, H., Kaukel, E.:
Divergent action of cAMP and dibutyryl cAMP on cell proliferation and macromolecular synthesis.
Mol. Cell Biochem. 1: 229-239 (1973).

Hu, Y., Komoto, J., Huang, Y., Gomi, T., Ogawa, H., Takata, Y., Fujioka, M., Takusagawa, F.:
Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver.
Biochemistry 38: 8323-8333 (1999).

Hu, Y., Yang, X., Yin, D. H., Mahadevan, J., Kuczera, K., Schowen, R., Borchardt, R. T.:
Computational characterization of substrate binding and catalysis in S-adenosylhomocysteine hydrolase.
Biochemistry 40: 15143-15152 (2001).

Huang Y., Komoto, J., Takata, Y., Powell, D. R., Gomi, T., Ogawa, H., Fujioka, M., Takusagawa, F.:

Inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase by "acyclic sugar" adenosine analogue Deritadenine: Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase complexed with D-eritadenine.

J. Biol. Chem. 277: 7477-7482 (2002).

Jakubowski, H., Guranowski, A.:

S-Adenosylhomocysteinase from yellow lupin seeds. Stoichiometry and reactions of the enzyme-adenosine complex.

Biochemistry 20: 6877-6881 (1981).

Johnston, J. M., Kredich, N. M.:

Inhibition of methylation by adenosine in adenosine deaminase-inhibited, phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes.

J. Immunol. 123: 97-103 (1979).

Kaminska, J. E., Fox, I. H.:

Decreased S-adenosylhomocysteine hydrolase in inborn errors of purine metabolism.

J. Lab. Clin. Med. 96: 141-147 (1980).

Keller, B. T., Borchardt, R. T.:

In Antiviral Drug Development – A Multidisciplinary Approach

(De Clerq, E., Walker, R. T., eds.)

Plenum, New York, pp.123-138 (1988).

Kitakaze, M., Hori, M., Kamada, T.:

Role of Adenosine and its interaction with a adrenoceptor activity in ischaemic and reperfusion injury of the myocardium.

Cardiovascular Research 27: 18-27 (1993).

Kloor, D., Kurz, J., Fuchs, S., Faust, B., Osswald, H.:

S-adenosylhomocystein hydrolase from bovine kidney: Enzymatic and binding properties.

Kidney and Blood Press Res 19: 100-108 (1996).

Kloor, D., Fuchs, S., Petroktistis, F., Delabar, U., Muhlbauer, B., Quast, U., Osswald, H.:

Effects of ions on adenosine binding and enzyme activity of purified S-adenosylhomocysteine hydrolase from bovine kidney.

Biochem. Pharmacol. 56: 1493-1496 (1998).

Kloor, D., Yao, K., Delabar, U., Osswald, H.:

Simple and sensitive binding assay for measurement of adenosine using reduced S-adenosylhomocystein hydrolase.

Clin. Chem. 46: 537-542 (2000).

Kloor, D., Delabar, U., Mühlbauer, B., Luippold, G., Osswald, H.:
Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in rat kidney: effects of ischemia and homocysteine.
Biochem. Pharm. 63: 809-815 (2002).

Komoto, J., Huang, Y., Gomi, T., Ogawa, H., Takata, Y., Fujioka, M., Takusagawa, F.:
Effects of site-directed mutagenesis on structure and function of recombinant rat liver S-adenosylhomocysteine hydrolase.
J. Biol. Chem. 275: 32147-32156 (2000).

Kredich, N. M., Hershfield, M. S.:
S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 2450-2454 (1979).

Kredich, N. M., Martin, D. W., Jr.:
Role of S-adenosylhomocysteine in adenosine mediated toxicity in cultured mouse T lymphoma cells.
Cell 12: 931-938 (1977).

Laemmli, U. K.:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685 (1970).

Liu, S., Wolfe, M. S., Borchardt, R. T.:
Rational approaches to the design of antiviral agents based on S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase as a molecular target.
Antiviral Res. 19: 247-265 (1992).

Liu, S., Whuk, S. F., Yuan, C., Robins, M. J., Borchardt, R. T.:
Adenosine-5'-carboxaldehyde: a potent inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase.
J. Med. Chem. 36: 883-887 (1993).

Lloyd, H. G., Schrader, J.:
Adenosine metabolism in the guinea pig heart: the role of cytosolic S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, 5'-nucleotidase and adenosine kinase.
Eur. Heart J. 14: 27-33 (1993).

McPherson, G. A.:
Kinetic, EBDA, Ligand, Lowry: A collection of radioligand binding analysis programs.
Originalprogramm: Ligand, von P. J. Munson und D. Rodbard.
Elsevier – BIOSOFT®, Cambridge, GB (1985).

Mudd, S. H., Poole, J. R.:

Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens.
Metabolism 24: 721-735 (1975).

Munson, P. J., Rodbard, D.:

LIGAND: A versatile computerized approach for the characterization of ligand binding systems.
Anal. Biochem. 107: 220-239 (1980).

Narayanan, S. R., Bocharde, R. T.:

Purification of bovine liver S-adenosylhomocysteine hydrolase by affinity chromatography on blue dextran-agarose.
Biochim. Biophys. Acta 965: 22-28 (1988).

Narayanan, S. R., Keller, B. T., Borchering, D. R., Scholtz, S. A., Bocharde, R. T.:

9-(trans-2', trans-3'-dihydroxycyclopent-4'-enyl) derivatives of adenine and 3-deazaadenine: potent inhibitors of bovine liver S-adenosylhomocystein hydrolase.
J. Med. Chem. 31: 500-503 (1988).

Nygaard, O., Nordrehaug, J. E., Refsum, H., Ueland, P. M., Farstad, M., Vollset, S. E.:

Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease.
N. Engl. J. Med. 337: 230-236 (1997).

Olsson, R. A.:

Ligand binding to the adenine analogue binding protein of the rabbit erythrocyte.
Biochemistry 17: 367-375 (1978).

Osswald, H.:

The role of adenosine in the regulation of glomerular filtration rate and renin secretion.
TIPS 5: 94-97 (1984).

Osswald, H., Mühlbauer, B., Schenk, F.:

Adenosine mediates tubuloglomerular feedback response: An element of metabolic control of kidney function.
Kidney Int. 39: 128-131 (1991).

Osswald, H., Gleiter, C.:

Renale Wirkungen des Adenosins: mögliche Konsequenzen für die Nierentransplantation.
Zentralblatt für Chirurgie 118: 90-102 (1993).

Palmer, J. L., Abeles, R. H.:
Mechanism for enzymatic thioether formation. Mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase.
J. Biol. Chem. 251: 5817-5819 (1976).

Palmer, J. L., Abeles, R. H.:
The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase.
J. Biol. Chem. 254: 1217-1226 (1979).

Patil, S. D., Schneller, S. W., Hosoya, M., Snoeck, R., Andrei, G., Balzarini, J., De Clercq, E.:
Synthesis and antiviral properties of (+/-)-5'-noraristeromycin and related purine carbocyclic nucleosides. A new lead for anti-human cytomegalovirus agent design.
J. Med. Chem. 35: 3372-3377 (1992).

Porcelli, M., Cacciapuoti, G., Fusco, S., Iacomino, G., Gambacorta, A., De Rosa, M., Zappia, V.:
S-Adenosylhomocysteine-Hydrolase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: Purification, physico-chemical and immunological properties.
Biochim. Biophys. Acta 1164: 179-188 (1993).

Porter, D. J. T., Boyd, F. L.:
Mechanism of bovine liver S-Adenosylhomocysteine Hydrolase.
J. Biol. Chem. 266: 21616-21625 (1991).

Pugh, C. S., Borchardt, R. T., Stone, H. O.:
Inhibition of Newcastle disease virion messenger RNA (guanine-7-)-methyltransferase by analogues of S-adenosylhomocysteine.
Biochemistry 16: 3928-3932 (1977).

Richards, H., H., Chiang, P., K., Cantoni G., L.:
Adenosylhomocysteine hydrolase. Crystallization of the purified enzyme and its properties.
J. Biol. Chem. 253: 4476-4480 (1978).

Sæbø, J., Ueland, P. M.:
A study on the sequestration of adenosine and its conversion to adenine by the cyclic AMP-adenosine binding protein / S-adenosylhomocysteinase from mouse liver.
Biochim. Biophys. Acta 587: 333-340 (1979).

Schatz, R. A., Vunnam, C. R., Sellinger, O. Z.:
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from rat brain. Purification and some properties.
In Transmethylation, ed. by E. Usdin, R. T. Borchardt, C. R. Creveling, Elsevier / North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford: pp. 143-154 (1979).

Schrader, J., Schütz, W., Bardenheuer, H.:
Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine metabolism in mammalian heart.
Biochem. J. 196: 65-79 (1981).

Schütz, W., Schrader, J., Gerlach, E.:
Different sites of adenosine formation in the heart.
Am. J. Physiol. 240: H963-H970 (1981).

Shimizu, S., Shiozaki, S., Ohshiro, T., Yamada, H.:
Occurrence of S-adenosylhomocysteine hydrolase in prokaryote cells. Characterization of the enzyme from *Alcaligenes faecalis* and role of the enzyme in the activated methyl cycle.
Eur. J. Biochem. 141: 385-392 (1984).

Snyder, F. F., Seegmiller, J. E.:
The adenosine-like effect of exogenous cyclic AMP upon nucleotide and PP-ribose-P concentrations of cultured human lymphoblasts.
FEBS Lett. 66: 102-106 (1976).

Spielman, W. S., Osswald, H.:
Characterization of the postocclusive response of renal blood flow in the cat.
A. J. Physiol. 235: F386-F290 (1978).

Stockand, J. D., Al-Baldawi, N. F., Al-Khalili, O. K., Worrell, R. T., Eaton, D. C.:
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase regulates aldosterone-induced Na⁺ transport.
J. Biol. Chem. 274: 3842-3850 (1999).

Stockand, J. D., Zeltwanger, S., Bao, H.-F., Becchetti, A., Worrell, R. T., Eaton, D. C.:
S-Adenosylhomocystein-Hydrolase is necessary for aldosterone-induced activity of epithelial Na⁺ channels.
Am. J. Cell Physiol. 281: C773-C785 (2001).

Sugden, P. H., Corbin, J. D.:
Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-binding proteins in bovine and rat tissues.
Biochem. J. 159: 423-437 (1976).

Turner, M. A., Yuan, C. S., Borchardt, R. T., Hershfield, M. S., Smith, G. D., Howell, P. L.:
Structure determination of selenomethionyl S-adenosylhomocysteine hydrolase using data at a single wavelength.
Nat. Struct. Biol. 5: 369-376 (1998).

Ueland, P. M., Døskeland, S. O.:
An adenosine 3':5'-monophosphate-adenosine binding protein from mouse liver. Purification and partial characterization.
J. Biol. Chem. 252: 677-686 (1977).

Ueland, P. M., Døskeland, S. O.:
An adenosine 3':5'-monophosphate-adenosine binding protein from mouse liver. A study on its interaction with adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine.
J. Biol. Chem. 253: 1667-1676 (1978).

Ueland, P. M., Skotland, T., Døskeland, S. O., Flatmark, T.:
An adenosine 3':5'-monophosphate-adenosine binding protein from mouse liver. Some physicochemical properties.
Biochim. Biophys. Acta 533: 57-65 (1978).

Ueland, P. M., Berge R. K., Sæbø, J., Farstad, M.:
S-Adenosylhomocystein hydrolase in human and rat liver is localized to the cytosol fraction of the tissue homogenate.
FEBS (Fed. Eur. Biochem.Soc.) Letters 101: 184-186 (1979).

Ueland, P. M., Helland, S.:
Binding of adenosine to intracellular S-adenosylhomocysteine hydrolase in isolated rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. 258: 747-752 (1983).

Villalon, M. D., Gil-Fernandez, C., De Clercq, E.:
Activity of several S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors against African swine fever virus replication in Vero cells.
Antiviral Res. 20: 131-144 (1993).

Walker, R. D., Duerre, J. A.:
S-Adenosylhomocysteine metabolism in various species.
Can. J. Biochem. 53: 312-319 (1975).

Webster S., Olsson, R. A.:
Adenosine formation of canine cardiac adenylate cyclase.
Biochem. Pharmacol. 30: 369-373 (1981).

Wnuk, S. F., Yuan, C. S., Borchardt, R. T., Balzarini, J., De Clercq, E., Robins, M. J.:
Nucleic acid related compounds. 84. Synthesis of 6'-(E and Z)-halohomovinyl derivatives of adenosine, inactivation of Sadenosyl-L-homocysteine hydrolase, and correlation of anticancer and antiviral potencies with enzyme inhibition.
J. Med. Chem. 37: 3579-3587 (1994).

Wolfe, M. S., Borchardt, R. T.:
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase as a target for antiviral chemotherapy.
J. Med. Chem. 34: 1521-1530 (1991).

Wolos, J. A., Frondorf, K. A., Babcock, G. F., Stripp, S. A., Bowlin, T. L.:
Immunomodulation by an inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase:
inhibition of in vitro and in vivo allogeneic responses.
Cell. Immunol. 149: 402-408 (1993) a.

Wolos, J. A., Frondorf, K. A., Davis, G. F., Jarvi, E. T., McCarthy, J. R., Bowlin
T. L.:
Selective inhibition of T cell activation by an inhibitor of S-adenosyl-L-
homocysteine hydrolase.
J. Immunol. 150: 3264-3273 (1993) b.

Yongbo, H., Junichi, K., Yafei, H., Tomoharu, G., Hirofumi, O., Yoshimi, T.,
Motoji, F., Fusao, T.:
Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver.
Biochemistry 38: 8323-8333 (1999).

Yuan, C.-S., Borchardt, R. T.:
Photoaffinity labeling of human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase
with [2-³H]8-azido-adenosine.
J. Biol. Chem. 270: 16140-16146 (1995).

Yuan, C.-S., Liu, S., Wnuk, S. F., Robins, M. J., Borchardt, R. T.:
Design and synthesis of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as
broad-spectrum antiviral agents.
Adv. Antiviral Drug Design 2: 41-88 (1996).

Yuh, K. C., Tao, M.:
Purification and characterization of adenosine – adenosine cyclic 3',5'-
monophosphate binding protein factors from rabbit erythrocytes.
Biochemistry 13: 5220-5226 (1974).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken:

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Doris Kloor. Durch ihre optimale Betreuung, Einweisung in das Thema und die Arbeitstechniken und das sehr angenehme Klima im Labor, in dem ich mich sehr wohl gefühlt habe, hat sie mir bei meiner Arbeit sehr geholfen. Außerdem danke ich ihr für die uneingeschränkte Unterstützung und Hilfe, sowie für die unentwegte Bereitschaft zu Beratung und Gespräch.

Herrn Professor Hartmut Oßwald danke ich für die Bereitstellung des Themas, seine Diskussionsbereitschaft und seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Renate Riehle danke ich für die Reinigung des Enzyms, ihre Mithilfe und die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor.

Bei Frau PD Dr. Stanka Stoeva möchte ich mich für die Durchführung der Sequenzierung bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern Dr. Anneliese Lüdtker und Dr. Klaus-Werner Lüdtker sowie meinem Freund Karl Herold für ihre Unterstützung und Hilfe danken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Lüdtke
Vorname	Angelika
Geburtsdatum	25.04.1977
Geburtsort	Ulm
Familienstand	Ledig

Schulbildung

1983 - 1987	Grundschule Neu-Ulm
1987 - 1996	Bertha-von-Suttner-Gymnasium, Neu-Ulm Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/1996 - 04/1999	Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität zu Greifswald
04/1999 - 09/2002	Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
09/1998	Ärztliche Vorprüfung, Universität Greifswald
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Tübingen
09/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Tübingen
10/2002 - 11/2003	Praktisches Jahr an der Humboldt-Universität zu Berlin
11/11/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Humboldt-Universität zu Berlin, Erlangung der Teilapprobation

Praktische Tätigkeiten

1996 / 1997	Krankenpflegepraktika in Ulm, Stettin und Paris
03/1999	Famulatur Chirurgie am Dr.-von-Halem-Krankenhaus, Norderney
03/2000	Famulatur Urologie im Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
05/2001 - 06/2001	Famulatur Kinderchirurgie, Starship Children's Hospital, Auckland, Neuseeland

Zusatzaktivitäten

- 10/1997 - 07/1998 Tutor im Bereich Community Medicine, Institut für Medizinische Psychologie, Universität Greifswald
- 05/1999 - 08/2000 Nachtwachen und Krankenpflegearbeit in der Medizinischen Klinik, Universität Tübingen
- 11/1999 - 12/1999 „Preparation Course for Clerkships in Internal Medicine in the U.S.“, Universität Tübingen, in Kooperation mit der Northwestern University Medical School, Chicago, USA
- 03/2001 Kurs der Akupunktur und Traditionellen Chinesischen Medizin, Peking, China
- 09/2001 - 03/2002 Forschungsaufenthalt an den National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA

Promotion

- 05/2000 - 09/2002 Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Tübingen. Thema:
„Einfluss des Kofaktors NAD⁺/NADH der S-Adenosylhomocystein Hydrolase auf die Adenosinbindung“