
Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

**Einfluss des Kofaktors NAD^+/NADH
auf die cAMP-Bindung an der
S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Julia Nina Kirschler
aus Villingen-Schwenningen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Kloor

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Kömpf

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	IV
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
2.1.2 Messung der Enzymaktivität.....	15
2.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	16
2.1.4 Herstellung des Apoenzyms und Rekonstitution der SAH-Hydrolase .	16
2.2 Der Radioligand ³ H-cAMP	18
2.3 Untersuchte Kompetitoren	19
2.3.1 Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin	20
2.3.2 Adenosin-Analoga mit Modifikationen an der Ribose.....	22
2.3.3 Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin und an der Ribose .	24
2.4 Theoretische Grundlagen	26
2.4.1 Prinzip der spezifischen Bindung	26
2.4.2 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten.....	28
2.4.3 Transformation der Daten nach Scatchard.....	29
2.4.4 Hemmungsexperimente mit Kompetitoren	30
2.4.5 Rezeptorbindungsstudien mittels Radioliganden.....	31
2.5 Versuchsansätze	31
2.5.1 Allgemeines.....	31
2.5.2 Zeitabhängige Assoziation	32
2.5.3 Zeitabhängige Dissoziation	33
2.5.4 Konzentrationsabhängige Sättigung.....	33
2.5.5 Hemmungsexperimente mit Kompetitoren	39

2.6	Filtration	41
2.6.1	Filtrationsapparatur	41
2.6.2	Filter	42
2.6.3	Filtrationsvorgang.....	43
2.7	Messung der Radioaktivität	43
2.8	Bestimmung der cAMP-Bindungsstellen mittels 8-Azido- ³ H-cAMP	44
2.8.1	Markierung der SAH-Hydrolase mit 8-Azido- ³ H-cAMP	44
2.8.2	Sequenzierung der mit 8-Azido- ³ H-cAMP markierten Peptide.....	45
2.9	Berechnung der Daten.....	45
2.10	Herkunft der Materialien	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Zeitabhängige Bindungskinetik.....	47
3.1.1	Zeitabhängige Assoziation und Dissoziation	47
3.1.2	Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten und des kinetischen K _D -Wertes	52
3.2	Konzentrationsabhängige Sättigung.....	53
3.2.1	Sättigung mit ³ H-cAMP bis 250 nM	53
3.2.2	Sättigung mit ³ H-cAMP bis 500 nM	54
3.2.3	Sättigung mit ³ H-cAMP bis 5000 nM	57
3.3	Hemmungsexperimente mit Adenosin-Analoga	60
3.3.1	Adenosin und cAMP	60
3.3.2	Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin	63
3.3.3	Adenosin-Analoga mit Modifikationen an der Ribose.....	66
3.3.4	Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin und an der Ribose .	70
3.4	Bestimmung der cAMP-Bindungsstellen mittels 8-Azido- ³ H-cAMP	71
4	Diskussion	73
4.1	Zeitabhängige Assoziation und Dissoziation	73
4.2	Konzentrationsabhängige Sättigung.....	75

4.3	Hemmungsexperimente mit Kompetitoren	80
4.3.1	Adenosin und cAMP	80
4.3.2	Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin	83
4.3.3	Adenosin-Analoga mit Modifikationen an der Ribose	84
4.3.1	Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin und an der Ribose ..	88
4.4	Bestimmung der cAMP-Bindungsstelle mittels 8-Azido- ³ H- cAMP	89
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	92

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosindesaminase
Ade	Adenin
Ado	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ARA-A	Adenin-9- β -D-Arabinofuranosid
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
B _{max}	Bindungsmaximum
Bq	Becquerel
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAP	Catabolite activated protein
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CGS	2-(p-(2-Carboxyethyl)-(Phenethylamino)-5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin-Hydrochlorid
CHA	N6-Cyclohexyladenosin
CH ₃ H ₄ F	Methylentetrahydrofolat
Ci/mmol	Curie pro Millimol
CNG	Cyclic nucleotide gated
CPCA	5'-(N-Cyclopropyl)-carboxamidoadenosin
D	Dalton
dd H ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethyl-Cellulose
DEAE-Sepharose	Diethylaminoethyl-Sepharose
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Verzeichnis der Abkürzungen

dpm	Decays per minute, Zerfälle/Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EC ₅₀ -Wert	Inhibitorkonzentration, bei der die Hälfte des an den Rezeptor gebundenen Liganden verdrängt wurde
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Epac	Exchange protein directly activated by cAMP
ESI	Elektrospray-Ionisation
FH ₄	Tetrahydrofolat
GBq	Gigabecquerel
GF-B	Glasfaserfilterpapier vom Typ B
Gln	Glutaminsäure
h	Stunde(n)
HAC	hyperpolarization activated cation channel
³ H-Adenosin	Tritium-markiertes [2,8- ³ H]-Adenosin
³ H-cAMP	Tritium-markiertes cyclisches [2,8- ³ H]-Adenosin-3',5'-monophosphat
HCl	Salzsäure
Hcy	L-Homocystein
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethan]sulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochdruckchromatographie
I	Isoleucin
ICF-Syndrom	Immunodeficiency, Centromere instability, Facial anomalies-Syndrom
K	Lysin
k ₊₁	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k ₋₁	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
k _{ob}	beobachtete Assoziationskonstante
KCl	Kaliumchlorid

Verzeichnis der Abkürzungen

K_D	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante
K_i	Inhibitor-konstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
L	Leucin
[L]	Ligand
M	Mol/Liter
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation
MeCP	Methyl-CpG-binding protein
MeV	Megaelektronenvolt
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
Mg^{2+}	Magnesium
μg	Microgramm
μM	Micromol/Liter
min	Minute(n)
mM	Millimol/Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Asparagin
NAD/NAD ⁺ /NADH	Nikotinamiddinukleotid
NECA	5'-N-Ethylcarboxaminoadenosin
$[NH_4]_2SO_4$	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
nM	Nanomol/Liter
NP	Nukleosid-Phosphorylase
P	Prolin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEI	Polythylenimin
Pi, PPi	Phosphatreste
PK	Proteinkinase

pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Glutamin
[R]	Rezeptor
[R _t]	eingesetzte Menge an Rezeptor
rap	repression and activation protein
[RL]	Rezeptor-Ligand-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
R-PIA	R(-)-N ⁶ -(2-Phenylisopropyl)-Adenosin
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg (Sedimentationskonstante)
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAH-Hydrolase	S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Stammlsg.	Stammlösung
Tab.	Tabelle
TBq	Terabecquerel
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Trp	Tryptophan
V	Valin
W	Tryptophan
XOD	Xanthinoxidase

1 Einleitung

1.1 Bisheriger Kenntnisstand

Das Enzym S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (SAH-Hydrolase) (E.C. 3.3.1.1.) katalysiert die reversible Hydrolyse von S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) zu Adenosin und L-Homocystein.

Das thermodynamische Gleichgewicht der von der SAH-Hydrolase katalysierten Reaktion liegt mit einer Gleichgewichtskonstanten $K_{eq} = 1 \mu\text{M}$ weit auf Seiten der Synthese von SAH (De La Haba und Cantoni, 1958; Walker und Duerre, 1975). Unter physiologischen Bedingungen werden Adenosin und Homocystein jedoch durch enzymatischen Abbau aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt, die Hauptaufgabe der SAH-Hydrolase im Stoffwechsel besteht in der Hydrolyse des SAH (De La Haba und Cantoni, 1958), für das in Eukaryonten kein anderer Abbauweg bekannt ist. So führt die experimentell induzierte Deletion des für die SAH-Hydrolase kodierenden Gens in Mäuseembryonen zu deren Absterben im frühen Implantationsstadium (Miller et al., 1994).

Die SAH-Hydrolase wurde erstmals 1958 von De la Haba und Cantoni aus Rattenleber isoliert. Das Enzym ist ein zytosolisches Protein (Ueland et al., 1979) und kommt in Mäuseleberzellen in einer intrazellulären Konzentration von $10 \mu\text{M}$ vor (Ueland und Helland, 1980).

Später wurden unterschiedlichste eukaryote Spezies untersucht, in denen die SAH-Hydrolase ubiquitär verbreitet ist, von der Hefe (Duerre und Schlenk, 1962) über Amöben (Hohmann et al., 1984) und Pflanzen (Guranowski und Pawelkiewicz, 1977) bis hin zu Säugetieren (Fujioka und Takata, 1981; Hershfield et al, 1985a; Kim et al., 1983; Kloor et al., 1996; Ueland und Helland 1980; Walker und Duerre, 1975). Bei Wirbeltieren konnte die SAH-Hydrolase in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Die höchsten

Konzentrationen fanden sich dabei in der Leber, im Pankreas und in der Niere (Walker und Duerre, 1975).

SAH-hydrolysierende Enzyme sind auch unter Prokaryonten weit verbreitet (Shimizu et al., 1984). In vielen prokaryoten Zellen erfolgt der Abbau von SAH jedoch durch die S-Adenosyl-Homocystein-Nukleosidase (E.C. 3.2.2.9) zu Adenin und S-Ribosyl-L-Homocystein (Duerre, 1962), welches im nächsten Schritt durch die Ribosylhomocysteinase (E.C. 3.2.1.148) zu L-Homocystein und D-Ribose aufgespalten wird (Miller und Duerre, 1968; Walker und Duerre, 1975).

Die Enzyme aus verschiedenen Spezies zeigen eine hohe Übereinstimmung in ihren Aminosäure-Sequenzen. So stimmt die Aminosäure-Sequenz der SAH-Hydrolase aus der Ratte zu 97%, aus der Amöbe *Dictyostelium discoideum* zu 75% (Coulter-Karis und Hershfield, 1989) und aus dem Bakterium *Rhodobacter capsulatus* zu 64% (Sganga et al., 1992) mit der Aminosäure-Sequenz der humanen SAH-Hydrolase überein.

Die physiko-chemischen Eigenschaften der SAH-Hydrolasen aus unterschiedlichen Säugetierspezies sind ebenfalls weitestgehend kongruent. Der isoelektrische Punkt für die SAH-Hydrolase liegt zwischen pH 5,5 (Kloor et al., 1996) und pH 5,7 (Fujioka und Takata, 1981; Hershfield et al., 1985a). Die SAH-Hydrolase aus Rinderleber sedimentiert bei einer Sedimentationskonstanten von 9S (Palmer und Abeles, 1979).

Die SAH-Hydrolase besteht aus 4 identischen Untereinheiten (Gomi et al., 1985) die zu einem Tetramer angeordnet sind und einen zentralen Kanal bilden. Jede Untereinheit setzt sich aus je 431 Aminosäuren (AS) zusammen (Hu et al., 1999). Das Molekulargewicht des nativen Tetramers beträgt 180.000 – 190.000 Dalton, dasjenige einer Untereinheit 45.000 – 48.000 Dalton (Fujioka und Takata, 1981; Gomi et al., 1985; Hershfield, 1978 und 1985a; Hohmann et al., 1984; Kim et al., 1983; Kloor et al., 1996). Kristallographische Untersuchungen der Enzymstruktur ergaben, dass eine Untereinheit aus drei Teilen besteht, aus der katalytischen Domäne (AS 1 - 181 und 352 - 402), der NAD⁺-bindenden Domäne (AS 182 - 351) und aus einer C-terminalen Domäne (AS 403 - 431) (Hu et al., 1999).

Das Enzym enthält als Kofaktor 1 Molekül NAD^+ pro Untereinheit fest gebunden (Palmer und Abeles, 1979; Abeles et al., 1982). Ein Anteil des Kofaktors von durchschnittlich 10 - 15% liegt dabei in der reduzierten Form NADH vor (Hershfield et al., 1985a, De La Haba et al., 1986, Kloor et al., 2002). Die NAD^+ -Bindungsstellen der 4 Untereinheiten liegen in der Nähe des Zentrums des Tetramers und sind untereinander durch polare und nicht-polare Wechselwirkungen verbunden. Das NAD^+ -Molekül wird durch hydrophobischen Wechselwirkungen und OH-Brücken fest an die Bindungsstelle gebunden (Hu et al., 1999).

Der Mechanismus der von der SAH-Hydrolase katalysierten Reaktion (Palmer und Abeles, 1979) ist in Abbildung 1 veranschaulicht.

Die reversible Hydrolyse beginnt mit einer Oxidierung der 3'-Hydroxyl-Gruppe des SAH zu einer 3'-Keto-Gruppe (1), wodurch das enzymgebundene NAD^+ zu NADH reduziert wird. Dieser Zwischenzustand erleichtert die Elimination des Protons an C-4' durch eine Base des katalytischen Zentrums (2). Aus dem entstandenen α -Ketocarbanion wird L-Homocystein freigesetzt und 3'-Keto-4',5'-Dehydroadenosin gebildet (3). Aus diesem Zwischenprodukt wird durch stufenweise Addition von H_2O (4) 3'-Ketoadenosin gebildet (5), welches in einem letzten Schritt durch das enzymgebundene NADH zu Adenosin reduziert wird (6). Der Kofaktor des Enzyms wird hierbei wieder zu NAD^+ oxidiert. Der Anfangszustand ist wiederhergestellt, der katalytische Zyklus kann erneut durchlaufen werden. Die reversible Synthese durchläuft den beschriebenen Stoffwechselweg in der anderen Richtung.

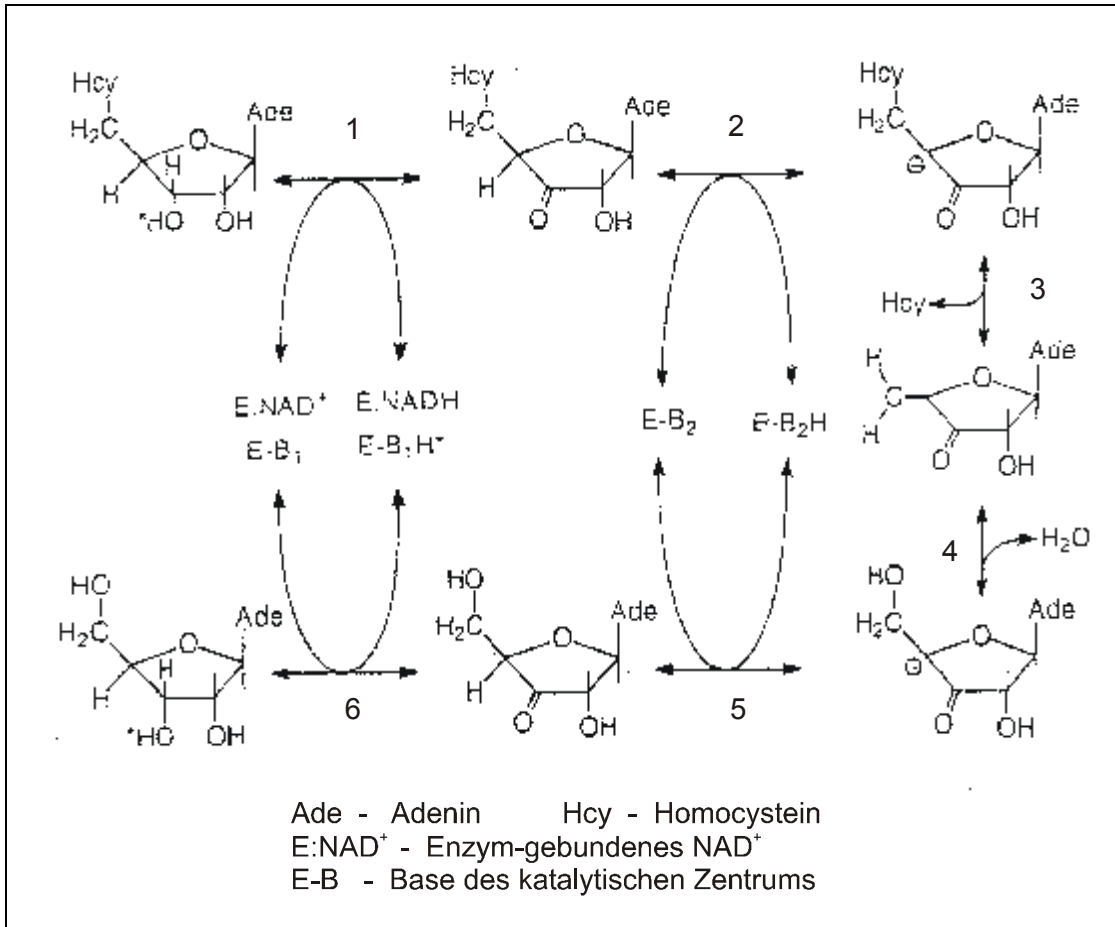


Abb. 1: Reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und Homocystein durch die SAH-Hydrolase (Hu et al., 1999).

Das Substrat SAH der SAH-Hydrolase entsteht durch Demethylierung des S-Adenosylmethionin (SAM) (Cantoni und Scarano, 1954) bei Methylierungsreaktionen (s. Abb. 2), die durch Methyltransferasen katalysiert werden (Clarke und Banfield, 2001). SAM ist das Produkt aus Methionin und ATP, das von der Methionin-Adenosyl-Transferase (E.C. 2.5.1.6) in Gegenwart von Mg²⁺ synthetisiert wird (Cantoni, 1952).

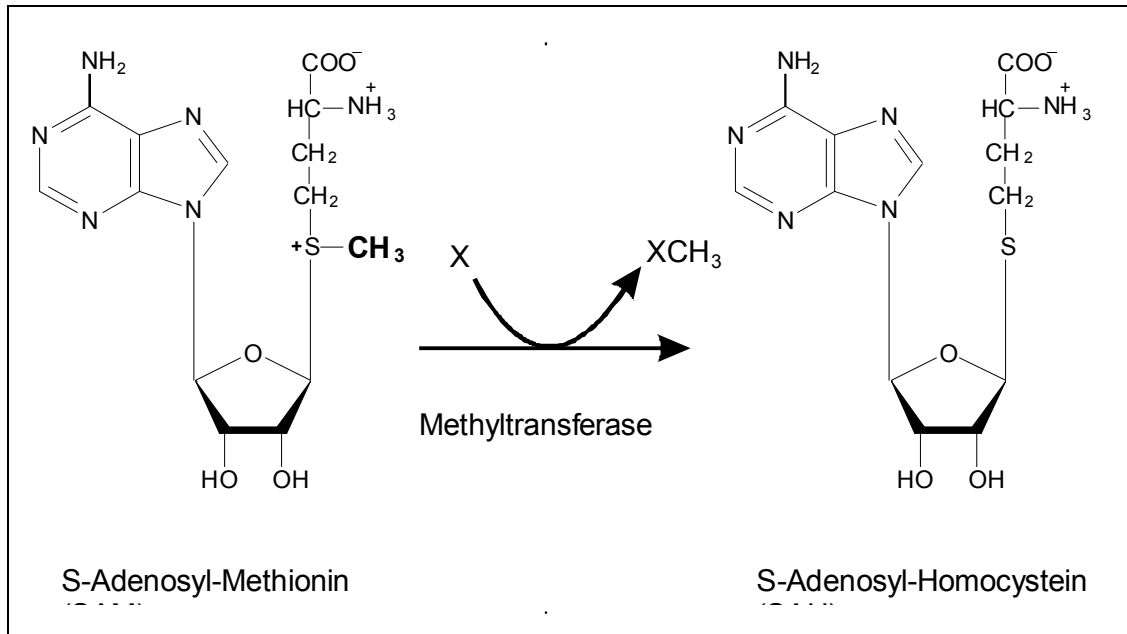


Abb. 2: Reaktionsschema der Transmethylierungsreaktionen

SAM ist der wichtigste Methylgruppendonator bei Säugetieren (Cantoni, 1975). Das Spektrum der Substrate, die durch Methylgruppen chemisch modifiziert werden, ist außerordentlich groß (Cantoni, 1975; Chiang, 1996; Clarke und Banfield, 2001).

Eine derartige Modifikation ist beispielsweise die Methylierung von eukaryoter DNA, die in engem Zusammenhang steht mit Transkriptionsregulation (Boyes und Bird, 1991), Karzinogenese (Laird und Jaenisch, 1996; Chen et al., 1998), X-Chromosom-Inaktivierung (Bestor, 2000) und genetischer Prägung (Li et al., 1993; Constanca et al., 1998). Im Genom der Säugetiere sind etwa 3×10^7 5-Methylcytosin-Reste nachweisbar (Bestor, 2000), deren essentielle Bedeutung durch die Letalität einer experimentell induzierten Mutation des DNA-Methyltransferase-Gens bei Mäuseembryonen aufgezeigt wird (Li et al., 1992). Bei bestimmten Störungen der DNA-Methylierung entstehen zwei seltene angeborene Erkrankungen. Dem Rett-Syndrom (einer entwicklungsneurologischen Störung mit Hirnatrophie) und einem Immunschwäche-Syndrom (*Immunodeficiency, Centromere Instability, Facial anomalies*; ICF-Syndrom) liegen Mutationen der Gene für das an methylierte

DNA bindende Protein MeCP2 (Hoffbuhr et al., 2001) bzw. für die DNA-Methyltransferase 3B (Xu et al., 1999) zu Grunde.

Weitere Modifikationen sind die Methylierung der mRNA, rRNA und tRNA, wodurch die strukturelle Stabilität der RNA-Moleküle erhöht und die Proteinsynthese auf ribosomaler Ebene reguliert wird (Chiang et al., 1996). Für die Reifung der ribosomalen RNA (rRNA) und für deren Interaktion mit zellulären Faktoren sind methylierte Anteile von essentieller Bedeutung (Chiang et al., 1996). Die Methylierung der 5'-terminalen Cap-Struktur der mRNA ist entscheidend für deren Transport aus dem Nukleus und für den korrekten Ablauf der Translation und Transkription (Chiang et al., 1996, Banerjee, 1980).

Methyliert werden ebenso Membranphospholipide (Hirata und Axelrod, 1980) und Proteine, die u. a. an der Regulation des Zellzyklus oder an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind, beispielsweise ras-Onkogene, G-Proteine und die retinale cGMP-Phosphodiesterase (Clarke, 1992).

Darüber hinaus wird ein breites Spektrum verschiedenster Metabolite transmethylert. Als Beispiele seien die Synthese von Katecholaminen (Axelrod und Tomchick, 1958), Histamin (Brown et al., 1959), Serotonin und Kreatin (Du Vigneaud et al., 1941) erwähnt.

SAH ist ein potenter Produkt-Inhibitor SAM-abhängiger Methyltransferasen (Ueland, 1982; Hoffmann et al., 1979), die eine höhere Affinität für SAH als für SAM aufweisen (Clarke und Banfield, 2001). Der von Cantoni et al. (1979) formulierte Quotient aus SAM und SAH gilt als sensibler Indikator für die Methylierungsaktivität innerhalb eines Gewebes. Je kleiner der Quotient ist, desto stärker werden Methylgruppenübertragungen gehemmt (Hoffman et al., 1979; Hershfield et al., 1985b).

Die hemmende Wirkung des SAH auf die Methyltransferasen begründet das pharmakologische Interesse an der SAH-Hydrolase, da

Methylierungsreaktionen sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten Teil der biologischen Kontrollmechanismen der Zelle sind (Razin und Szyf, 1984). Chiang et al. (1977) untersuchten erstmals Inhibitoren der SAH-Hydrolase. Seitdem hat sich die Bandbreite der hemmenden Stoffe, über die intensiv geforscht wird, stets vergrößert. Die essentielle Bedeutung bestimmter Methyltransferasen bei der Replikation von Viren (Banerjee, 1980) führte zur Entwicklung von Substanzen, deren antivirale Eigenschaften auf eine Hemmung der SAH-Hydrolase zurückzuführen sind (De Clercq, 1987; Chiang, 1998). Die Erniedrigung der Virentiter korreliert mit der Erhöhung der intrazellulären Konzentration an SAH und mit der daraus folgenden Erniedrigung des SAM/SAH-Quotienten (Cools und DeClercq, 1990). Das antivirale Spektrum der SAH-Hydrolase-Inhibitoren umfasst eine Vielzahl RNA-Viren wie Paramyxoviren (Parainfluenza, Masern), Rhabdoviren (Rabies), Reoviren (Rotavirus) und wenige DNA-Viren wie das Pocken-Virus und Herpetoviren (Herpes Simplex, Varizellen) (DeClercq, 1987).

Um die Hydrolyse des SAH thermodynamisch zu ermöglichen, müssen Adenosin und Homocystein, die potente Inhibitoren der SAH-Hydrolase im Sinne eines Feed-back-Mechanismus sind, aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden (De La Haba und Cantoni, 1958; Walker und Duerre, 1975). Eine Übersicht über die Stoffwechselwege von SAH, Adenosin und Homocystein findet sich in Abbildung 3.

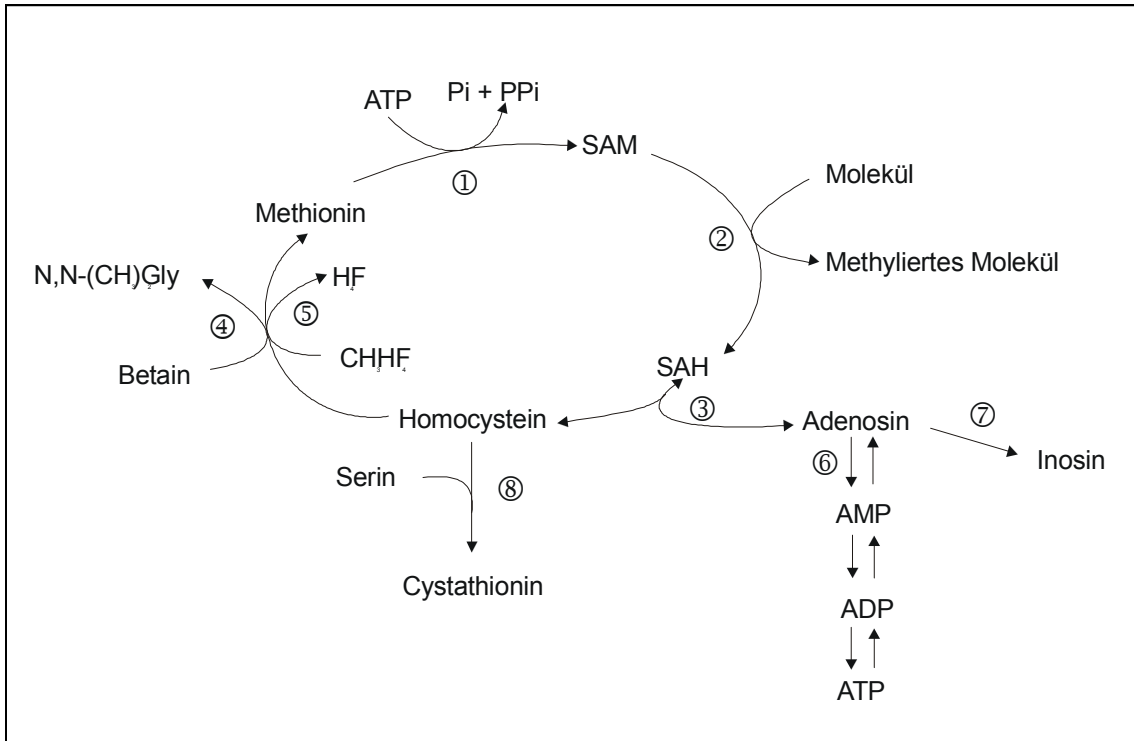


Abb. 3: Übersicht über die Stellung der SAH-Hydrolase im Stoffwechsel

- | | |
|---|---|
| ① Methionin-Adenosyl-
Transferase | ⑤ 5-Methyltetrahydrofolat-
Homocystein-S-
Methyltransferase |
| ② Methyltransferasen | ⑥ Adenosinkinase |
| ③ SAH-Hydrolase | ⑦ Adenosin-Desaminase |
| ④ Betain-Homocystein-S-Methyl-
Transferase | ⑧ Cystathionin- β -Synthase |

Das bei der Hydrolyse gebildete Homocystein kann auf zwei möglichen Wegen wieder in Methionin umgewandelt werden, entweder durch die Betain-Homocystein-S-Methyltransferase (EC 2.1.1.5) (Skiba et al., 1982) oder durch die 5-Methyl-Tetrahydrofolat-Homocystein-S-Methyltransferase (EC 2.1.1.13) (Utley et al., 1985). Letztere Reaktion benötigt als Koenzym Cobalamin und synthetisiert eine Methylgruppe *de-novo*.

Aus Homocystein und Serin kann auch die irreversible Synthese von Cystathionin durch die Cystathionin- β -Synthase (E.C. 4.2.1.22) erfolgen,

dieser Stoffwechselweg ist ein wichtiges Stellglied in der Regulation des Methionin-Spiegels (Kraus et al., 1978).

Ein Mangel dieses Enzyms ist die Ursache der Homocystinurie Typ I, die mit erhöhten Homocystein-Plasmaspiegeln ($> 100 \mu\text{mol/l}$), schwerer geistiger und psychomotorischer Retardierung, Augenerkrankungen (Myopie, Linsenluxation) und Störung der Thrombozytenaggregation (Thromboseneigung) einhergeht (Mudd et al, 1985).

Ein erhöhter Plasmaspiegel an Homocystein wird seit einigen Jahren als Risikofaktor für die Entwicklung vaskulärer Erkrankungen (koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Schlaganfälle und venöse Thrombosen) angesehen (Nygard et al, 1997).

Das bei der Hydrolyse gebildete Adenosin kann zum einen durch die Adenosindesaminase (ADA) (EC 3.5.4.4) zu Inosin abgebaut und zum anderen durch die Adenosinkinase (EC 2.7.1.20) zu AMP phosphoryliert werden (Fox und Kelley, 1978). Wird die intrazelluläre Funktion der ADA primär oder sekundär durch pharmakologische Hemmung gestört, steigt die intrazelluläre Konzentration an Adenosin an. Der autosomal rezessiv vererbte ADA-Mangel verursacht einen schweren Immundefekt (Giblett et al., 1972), da der ungestörte Purinabbau für die normale Reifung und Funktion des Immunsystems von großer Wichtigkeit ist (Hirschhorn, 1990). Die Zytotoxizität des Adenosins wird nur zum Teil durch eine adenosinmonophosphat-vermittelte Hemmung der Pyrimidin-Synthese erklärt (Aranow, 1961; Hershfield und Kredich, 1978). In Lymphoblasten konnte nachgewiesen werden, dass Adenosin durch eine Hemmung der SAH-Hydrolyse und eine dadurch verminderte DNA- und RNA-Methylierung zytotoxisch wirkt (Kredich und Martin, 1977, Kredich und Hershfield, 1979).

Die Existenz adenosinbindender Proteine im Cytosol wurde von Osswald et al. (1977; 1980) postuliert, da der Gewebsgehalt von Adenosin in der Niere unter physiologischen Bedingungen bei etwa 5 nmol/g Feuchtgewicht liegt. Bei extrazellulärer Kompartimentalisierung dieser Menge würde die

hämodynamisch wirksame Konzentration des Adenosins (Haas und Osswald, 1981) weit überschritten. Freies Adenosin wird jedoch in der Zelle mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden durch die ADA abgebaut (Fox und Kelley, 1978), was aber durch Bindung an intrazelluläre Proteine verhindert werden kann.

Chambaut et al. (1971) beschrieben erstmals ein Protein aus Rattenleber, das cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) binden konnte, bei 9 S sedimentierte und nicht mit bisher bekannten cAMP-bindenden Proteinkinasen übereinstimmte. Ähnliche Proteine, die neben cAMP auch Adenosin banden, wurden später aus Kaninchenerythrozyten (Yuh und Tao, 1974), Mäuseleber (Døskeland und Ueland 1975), Rinderleber (Sugden und Corbin, 1976), Rinder-Nebennierenrinde (Døskeland und Ueland 1977) und *Dictyostelium discoideum* (De Gunzburg und Veron, 1981) isoliert.

Die Funktion dieser adenosinbindenden Proteine blieb unklar, bis Hershfield und Kredich (1978) derartige Proteine aus menschlicher Plazenta und Lymphoblasten als SAH-Hydrolase identifizierten. In den folgenden Jahren gelangen weitere Enzymaktivitätsnachweise (Saebø und Ueland, 1978; De Gunzburg et al., 1983).

Die Bindung des Adenosins an die SAH-Hydrolase bewirkt eine Reduktion des enzymgebundenen NAD^+ und überführt das Enzym in eine „geschlossene“ Form (Abeles et al. 1982, Hu et al., 1999). Diese Enzymform ist enzymatisch inaktiv, behält aber dennoch die Fähigkeit, Adenosin mit hoher Affinität zu binden (Porter und Boyd, 1992; Kloor et al., 2000).

Durch Markierung mittels 8-Azido- ^3H -Adenosin untersuchten Kloor et al. (2003a) die Adenosin-Bindungsstellen sowohl der nativen SAH-Hydrolase als auch rekonstituierter Enzymformen mit definierten NAD^+/NADH -Verhältnissen. Die native SAH-Hydrolase wies zwei Adenosin-Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten auf, wohingegen die reine NADH-Form und die reine NAD^+ -Form nur eine einzige Bindungsstelle besaßen. Die hochaffine Bindungsstelle der NADH-Form ($K_D = 48 \text{ nM}$) wurde in der NAD^+ -bindenden

Domäne des Enzyms lokalisiert und die niedrigaffine Bindungsstelle der NAD^+ -Form ($K_D = 5 \mu\text{M}$) im Bereich des katalytischen Zentrums.

Die intrazelluläre Bindung des Adenosins an die SAH-Hydrolase, die Adenosin-Sequestration, bietet Schutz vor Desaminierung zu Inosin (Saebø und Ueland, 1979) und erklärt den hohen Adenosin-Gewebsgehalt der Nieren (Kloor et al., 1996). Möglicherweise könnte auch die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Bindung an die SAH-Hydrolase moduliert werden (Døskeland und Øgreid, 1981).

Pro Mol Enzym werden 2 Mol Adenosin (Kloor et al., 2000) und 0,025 Mol cAMP (Kloor et al., 2002) gebunden. In früheren Studien wurden Belege für zwei unterschiedliche Bindungsstellen für cAMP und Adenosin an der SAH-Hydrolase gefunden (Yuh und Tao, 1974; Sudgen und Corbin, 1976; Ueland und Døskeland, 1977 und 1978). Andere Studien vermuteten eine gemeinsame Bindungsstelle (Hershfield und Kredich, 1978; Aiyar und Hershfield, 1985; Kloor et al., 2002).

Cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) war der erste identifizierte *second messenger* (Rall et al., 1957; Sutherland und Rall, 1958; Lipkin et al., 1959). Seine Bildung aus ATP durch die Adenylat-Cyclase (E.C. 4.6.1.1) (Rall und Sutherland, 1962) steht unter der stimulierenden oder hemmenden Kontrolle von G-Proteinen (Walsh et al., 1968). Eine Vielzahl extrazellulärer Signale von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern entfalten über cAMP ihre intrazelluläre Wirkung (Sutherland, 1972), die durch den Abbau des cAMP durch die Phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.17) beendet wird (Butcher und Sutherland, 1962). Dieser Abbau wird durch methylierte Xanthine wie Coffein oder Theophyllin gehemmt (Butcher und Sutherland, 1962).

Im Jahre 1968 beschrieben Walsh et al. erstmals eine cAMP-abhängige Proteinkinase (PK), auf die cAMP als allosterischer Aktivator wirkt. Die Proteinkinase besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, die als Komplex mit zwei regulatorischen Untereinheiten inaktiv sind. Bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten, werden die katalytischen Untereinheiten in ihrer aktiven Form freigesetzt (Døskeland und Øgreid, 1981). Sie können nun

intrazellulär oder im Nukleus Prozesse durch Phosphorylierung von Proteinen beeinflussen (Kopperud et al., 2003).

Lange Zeit schien der Weg der Signaltransduktion über die PK alle cAMP-vermittelten Effekte bei Säugetierzellen erklären zu können. Es gibt jedoch Forschungsergebnisse, welche die Existenz weiterer, PK-unabhängiger Wege nahe legen.

Der *second messenger* cAMP bindet auch an die Proteine Epac 1 und Epac 2, wodurch die G-Proteine Rap1 und Rap 2 aktiviert werden (Altschuler et al., 1995; De Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). Diese G-Proteine sind unter anderem an Zellproliferation (Altschuler und Ribeiro-Neto, 1998) und Zelldifferenzierung (York, 1998) beteiligt.

Neueste Erkenntnisse über die embryonale Entwicklung retinaler Neuronen könnte auf die Existenz eines weiteren cAMP-abhängigen Mechanismus hinweisen. Unabhängig von PK und Epac/Rap führt eine erhöhte cAMP-Konzentration in diesen Neuronen zu Alpha-6-beta-Integrin-abhängiger Neuritenaussprossung (Ivins et al., 2004).

Außerdem verfügt eine heterogene Gruppe von Ionenkanälen in der COOH-terminalen Region über eine cAMP-Bindungsstelle. Zu diesen Ionenkanälen zählen *cyclic nucleotide-gated (CNG) channels* und *hyperpolarization-activated cation (HAC) channels*.

Die CNG-Kanäle öffnen sich nach der Bindung von cAMP oder cyclischem 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) und sind unselektiv für Kationen durchlässig. Sie sind unter anderem an der Signaltransduktion in sensorischen Zellen beteiligt, wurden jedoch später auch in zahlreichen anderen Organen nachgewiesen (Kaupp und Seifert, 2002).

Die HAC-Kanäle tragen zur spontanen rhythmischen Aktivität in Schrittmacherzellen des Herzens und des Zentralen Nervensystems bei. Die Bindung des cAMP führt zu einer schnelleren und vollständigeren Öffnung der HAC-Kanäle nach der Repolarisationsphase des Aktionspotentials und beschleunigt auf diese Weise die Rhythmogenese (Ludwig et al., 1998; Wainger et al., 2001).

Bei Amöben und Prokaryonten sind weitere cAMP-vermittelte Effekte bekannt.

Die Amöbe *Dictyostelium discoideum* exprimiert auf ihrer Oberfläche einen cAMP-Rezeptor, der an der Regulation ihrer Entwicklung beteiligt ist (Klein et al. 1988).

Bei Prokaryonten wie *Escherichia coli* ist cAMP an der Transkriptionskontrolle katabolit-sensitiver Operons beteiligt, die durch ein cAMP-bindendes Protein (Catabolite-Activator-Protein (CAP)) vermittelt wird (Emmer et al., 1970).

CAP bindet in Anwesenheit von cAMP an bestimmte DNA-Abschnitte und steigert deren Transkription.

Die cAMP-Bindungsstellen verschiedener cAMP-bindender Proteine vom CAP aus *Escherichia coli* bis zu Epac und HAC weisen strukturelle Homologien und übereinstimmende Aminosäuresequenzen auf (Dremier et al. 2003).

Mittels Bioinformatik können so die bekannten Sequenzen anderer Proteine auf potentielle cAMP-Bindungsstellen durchsucht werden, deren Bedeutung danach jedoch noch weiter geklärt werden muss.

1.2 Eigene Fragestellung

Wenn die Adenosin-Bindungsstellen der SAH-Hydrolase vom Verhältnis des Kofaktors NAD^+/NADH abhängig sind, stellt sich nun die Frage, inwieweit der Kofaktor NAD^+/NADH auch die cAMP-Bindungsstelle der SAH-Hydrolase beeinflusst.

Zur Klärung dieser Frage wurden folgende Untersuchungen durchgeführt, die Gegenstand dieser Arbeit sind:

1. Herstellung von Enzymformen mit definierten NAD^+/NADH -Verhältnissen.
2. Bestimmung des zeitabhängigen Bindungsverhaltens von ^3H -cAMP an die verschiedenen Enzymformen.
3. Bestimmung der Dissoziationskonstanten und der maximalen Bindungskapazitäten der verschiedenen Enzymformen.
4. Untersuchung der Interferenz der ^3H -cAMP-Bindung mit Adenosin-Analoga.
5. Bestimmung der cAMP-Bindungsstellen an der SAH-Hydrolase mittels 8-Azido- ^3H -cAMP.

2 Untersuchungsgut und Methoden

2.1 Das Enzym SAH-Hydrolase

Als Untersuchungsgut diente hochgereinigte SAH-Hydrolase aus Rindernieren. Das Enzym wurde von Renate Riehle aus der Arbeitsgruppe PD Dr. D. Kloor gereinigt.

Für die Durchführung der hier vorgestellten Versuche wurde Enzym aus insgesamt drei Reinigungen verwendet. Bei einer der Reinigungen hatte ich Gelegenheit zu assistieren und konnte auf diese Weise mein Verständnis für die Isolierung von Proteinen mit klassischen chromatographischen Methoden vertiefen.

2.1.1 Reinigung des Enzyms

Eine ausführliche Darstellung des Reinigungsvorganges ist in der Publikation von Kloor et al. (1996) beschrieben.

Die Rindernieren von frisch geschlachteten Tieren wurden im Schlachthaus erworben und auf Eis gelagert ins Labor transportiert. Dort wurden alle Reinigungsschritte bei 4°C durchgeführt.

Nach den einzelnen Schritten wurde die Enzymaktivität gemessen. Diejenigen Fraktionen, in denen Enzymaktivität nachweisbar war, wurden dem nächsten Reinigungsschritt unterzogen.

Im folgenden werden die einzelnen Reinigungsschritte kurz zusammengefasst:

Die Nieren wurden in einem Gerätemixer (*Waring-Blendor*) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) mit 1 mM DTT, 1 mM EDTA und 10 µM PMSF im Verhältnis 1:2 homogenisiert und anschließend 45 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen zytosolischen Proteine wurden mit 50%igem Ammoniumsulfat (29,1g $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4/100\text{ml}$) gefällt und 60 min bei

26.000g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5), 1 mM DTT und 1 mM EDTA gelöst und gegen denselben Puffer dialysiert.

Durch die Weiterverarbeitung mittels Säulenchromatographie wurde aus dem Proteingemisch ein nahezu hochgereinigtes Enzym isoliert. Dazu wurden vier verschiedene Säulen verwendet: DEAE-Cellulose, DEAE-Sepharose® Fast Flow, Hydroxylapatit Sepharose und Aminoethyl-Sepharose.

Nach jedem Durchlauf über eine Säule wurden die Fraktionen, in denen Enzymaktivität nachweisbar war, vor dem nächsten Schritt dialysiert. Nach einer Aufkonzentration im *AMICON*-Proteinkonzentrator erfolgte die Endreinigung durch Gelfiltration mittels *HiLoad Superdex™ 200*.

Fraktionen, die Enzymaktivität enthielten, wurden nach der Bestimmung der Proteinkonzentration aliquotiert und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.1.2 Überprüfung der Reinheit des Enzyms

Nach dem letzten Reinigungsschritt wurde der Reinheitsgrad der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) gemäß der von Laemmli (1970) beschriebenen Methode überprüft.

Als Standards wurden Referenzproteine mit einem Molekulargewicht von 6,5 kD bis 200 kD verwendet.

2.1.2 Messung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität der SAH-Hydrolase wurde in hydrolytischer Richtung mit Hilfe des Harnsäuretests gemessen. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4 dargestellt. Während 3 Minuten wurde bei 292 nm photometrisch die Extinktionszunahme der Harnsäurekonzentration in der Küvette gemessen.

Der Reaktionsnachweis erfolgte in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) und enthielt: 1 mM S-Adenosylhomocystein (SAH), 1 U Adenosindesaminase (ADA),

0,1 U Nukleosid-Phosphorylase (NP) und 0,1 U Xanthinoxidase (XOD). Die Messung erfolgte in einem Volumen von 1 ml bei 20°C.

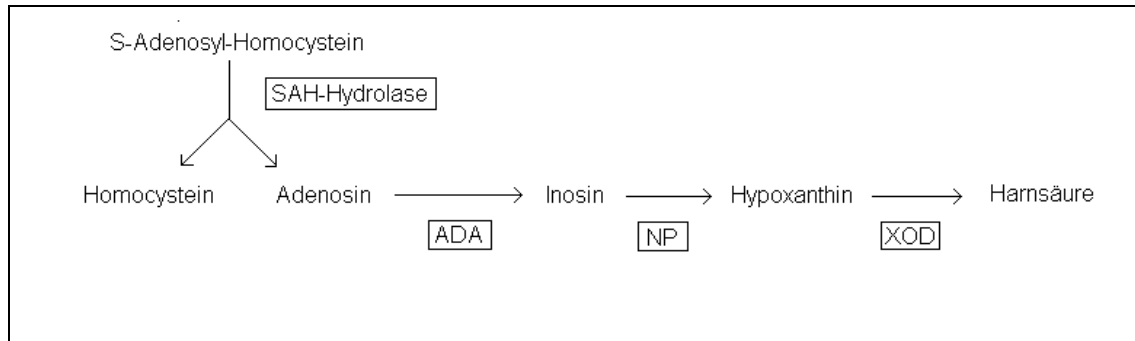


Abb. 4: Reaktionsschema des Harnsäuretestes zum Nachweis der Enzymaktivität der SAH-Hydrolase in hydrolytischer Richtung.

2.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt, wobei Rinderalbumin als Standard verwendet wurde.

2.1.4 Herstellung des Apoenzyms und Rekonstitution der SAH-Hydrolase

Natives Enzym enthält als Kofaktor gebundenes Nikotinamiddinukleotid, das hauptsächlich in oxidierte Form NAD^+ , aber auch zu einem geringen Teil in reduzierter Form NADH vorliegt. Die Angaben über den gebundenen NADH-Anteil der SAH-Hydrolase reichen von ca. 10 - 15% NADH (Abeles et al., 1982, De La Haba et al., 1986) und 21% NADH (Hershfield et al., 1985a) bis hin zu Werten von 43% NADH (Narayanan und Borchardt, 1988).

Um den Einfluss des Kofaktors auf die cAMP-Bindung zu untersuchen, wurden Enzymformen hergestellt, die entweder nur NAD^+ oder nur NADH gebunden

hatten. Diese Enzymformen werden im folgenden als NAD⁺-Form und als NADH-Form bezeichnet.

Um diese Formen herzustellen, musste zunächst der an das native Enzym gebundene Kofaktor entfernt werden. De La Haba et al. (1986) beschrieben eine Methode, die SAH-Hydrolase durch Inkubation mit hochmolaren Konzentrationen von ATP, Mg²⁺ und KCl in ein enzymatisch inaktives Apoenzym zu überführen. Diese Methode wurde leicht modifiziert angewendet.

Das in PBS gelagerte Enzym wurde mit 15 mM Tris/25 mM Hepes-Puffer (pH 7,4) umgepuffert. Für diesen Arbeitsschritt wurde der *AMICON*-Protein-Konzentrator mit einem YM 30-Filter verwendet. Dieser Filter hält Moleküle mit einem Molekulargewicht > 30.000 D zurück.

Die Reduktionslösung zur Entfernung des Kofaktors bestand aus 1,5 M KCl, 80 mM MgCl₂ x 6H₂O, 80 mM ATP in 15 mM Tris/25 mM Hepes-Puffer (pH 7,4).

Nach Messung der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität wurde das Enzym mit 100 µl Reduktionslösung/mg Protein während 90 min bei 37°C inkubiert.

Nach 90 min wurde die Enzymaktivität gemessen und gegebenenfalls bei noch vorhandener Aktivität die Inkubationszeit auf 150 min verlängert oder eine geringe Menge an Reduktionslösung (50 - 100 µl) zugegeben, bis keine Enzymaktivität mehr nachweisbar war.

Um den gelösten Kofaktor und die reduzierenden Agenzien zu entfernen, wurde das Inkubationsgemisch mit 15 mM Tris/25 mM Hepes (pH 7,4) dialysiert.

Je Milliliter aufkonzentrierter Lösung wurde nun 100 µl 10 mM NADH-Lösung bzw. 100 µl 10 mM NAD⁺ zugegeben. Während der folgenden 90 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur rekonstituiert sich das Apoenzym durch Bindung von NAD⁺ bzw. NADH zu einem Tetramer.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Enzymaktivität gemessen. Die NAD⁺-Form des Enzyms zeigt eine sehr hohe Enzymaktivität (Hershfield, 1985a; Kloor et al., 2003a), im Gegensatz zur fehlenden Enzymaktivität der NADH-Form (Kloor et al., 2000). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Enzymlösungen aliquotiert und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.2 Der Radioligand ^3H -cAMP

Die Messung der Quantität eines Stoffes wird durch die Verwendung seines radioaktiv markierten Isotops ermöglicht.

In den dargestellten Versuchen wurde ^3H -cAMP (cyclisches [2,8- ^3H]-Adenosin-3',5'-monophosphat) mit einer spezifischen Konzentration von 32,1 Ci/mmol (1188 GBq/mmol) verwendet. Es verhält sich biologisch identisch zu unmarkiertem cAMP. Der verwendete Radioligand befand sich in einer Konzentration von 31,15 μM ^3H -cAMP in einer Alkohol-Wasser-Lösung (1:1). Diese Lösung wird im Folgenden als Urtracer bezeichnet.

Die Tritiumatome sitzen an den Positionen C2 und C8 des Adenosin-Anteils. Die Strukturformel des ^3H -cAMP ist in Abbildung 5 dargestellt.

Tritium ist ein reiner β -Strahler. Seine Halbwertszeit beträgt 12,26 Jahre. Die Ausgangsaktivität des Urtracers nimmt also während der Versuchsdauer nicht wesentlich ab. Die Strahlung hat eine maximale Energie von 0,018 MeV. In der Luft beträgt ihre Reichweite nur wenige Millimeter.

In Hinsicht auf den Strahlenschutz ist der gefahrlose Umgang mit dem radioaktiven Material relativ einfach zu bewerkstelligen. Bei sorgfältigem Arbeiten wird ein ausreichender Arbeitsschutz bereits durch Latex-Handschuhe und Laborkittel ermöglicht. Eine Abschirmung oder spezielle Schutzkleidung sind nicht notwendig. Um eine mögliche Kontamination von Geräten und Arbeitsflächen zu überprüfen werden Wischtests durchgeführt.

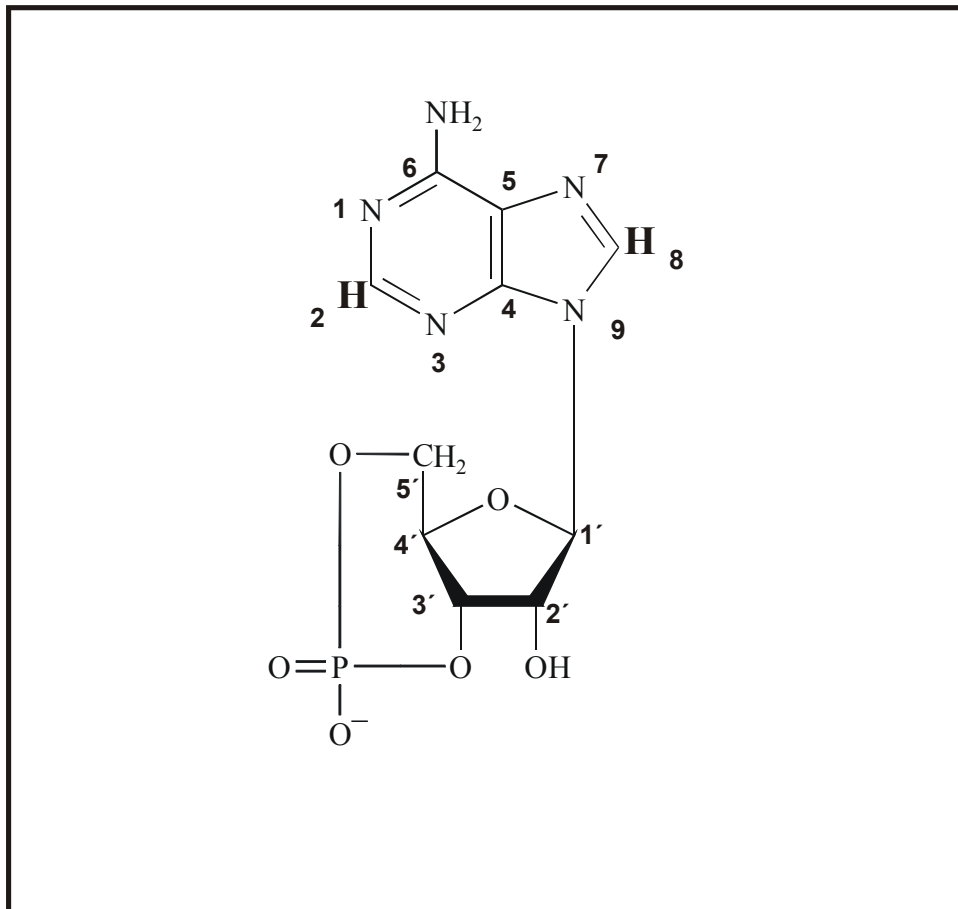


Abb. 5: Strukturformel des [2,8 - ^3H]-cAMP. Die Tritiumatome an Position C2 und C8 sind fett hervorgehoben.

2.3 Untersuchte Kompetitoren

Die untersuchten Substanzen sind strukturelle Modifikationen des Adenosins. Adenosin ist ein Nukleosid, das aus einer Purinbase, dem Adenin, und aus einem Zucker, der Ribose, besteht. Adenin und Ribose sind N-glykosidisch miteinander verknüpft. Abbildung 6 zeigt die Strukturformel des Adenosins.

Zur Unterscheidung von der Bezifferung der Kohlenstoffatome der Base mit einfachen Ziffern 1 - 9 werden die C-Atome des Zuckers mit 1'-5' bezeichnet.

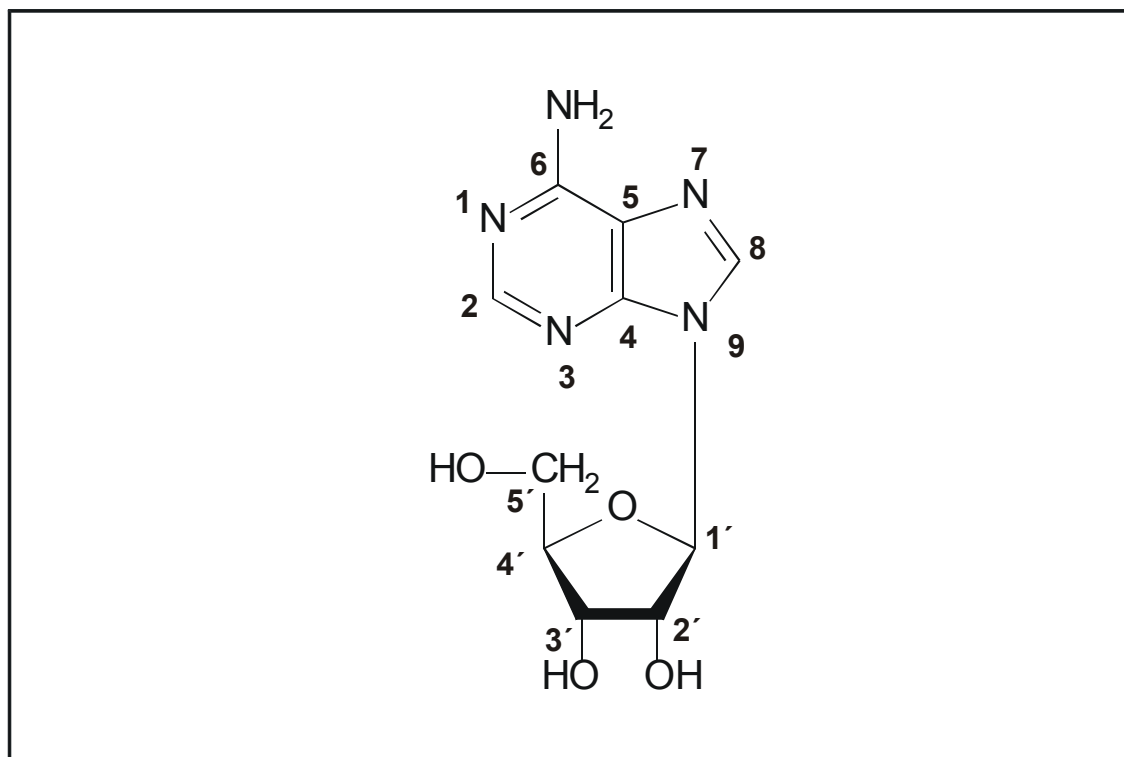


Abb. 6: Strukturformel des Adenosins.

Vergleicht man die Struktur der Adenosin-Analoga mit der Struktur des Adenosins, so lassen sich die Substanzen in folgende Kategorien einteilen:

2.3.1 Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin

Tab.1: Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin

Substanz	Abkürzung	Eigenschaft
2-Chloroadenosin		A ₁ -Rezeptor-Agonist
N6-Cyclohexyladenosin	CHA	A ₁ -Rezeptor-Agonist
R(-)-N6-(2-Phenylisopropyl)-Adenosin	R-PIA	A ₁ -Rezeptor-Agonist
N6-Methyladenosin		

2-Chloroadenosin (Abb. 7B) besitzt ein zusätzliches Chloratom an Position C2. Alle anderen Analoga sind an Position N6 modifiziert. N6-Methyladenosin (Abb. 7A) ist ein kompetitiver Inhibitor der SAH-Hydrolase mit einem K_i -Wert von $190 \mu\text{M}$ (Guranowski et al., 1981). Es dient der SAH-Hydrolase auch als Substrat zur Synthese von N6-Methyl-Adenosyl-Homocystein (Hoffman, 1979).

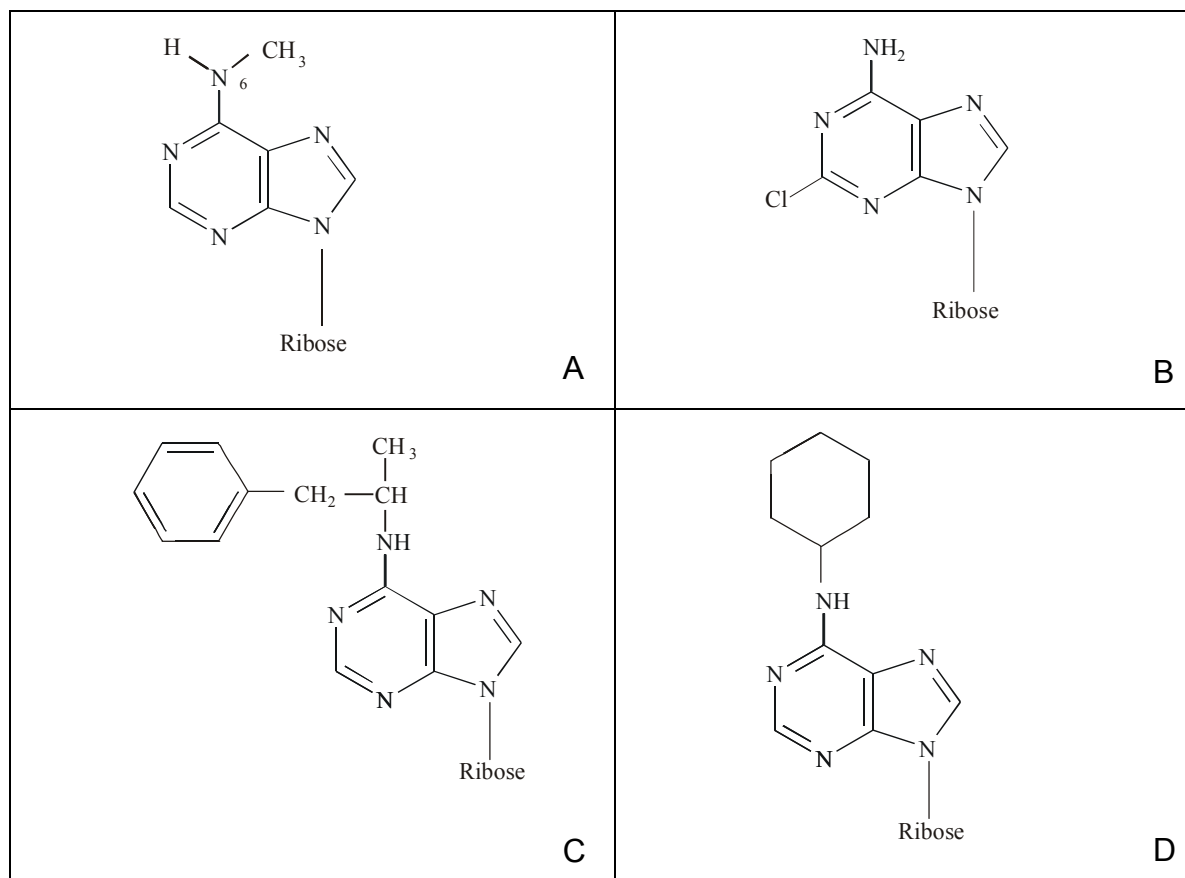


Abb. 7: Strukturformeln von N6-Methyladenosin (A), 2-Chloroadenosin (B), R-PIA (C) und N6-Cyclohexyladenosin (D).

2.3.2 Adenosin-Analoga mit Modifikationen an der Ribose

Tab. 2: Adenosin-Analoga mit Modifikationen an der Ribose

Substanz	Abkürzung	Eigenschaft
5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin	NECA	A ₂ -Rezeptor-Agonist
5'-(N-Cyclopropyl)- Carboxamidoadenosin	CPCA	A ₂ -Rezeptor-Agonist
5'-Amino-5'-Desoxyadenosin		
2'-Desoxyadenosin		Natürl. vorkommendes Analogon
Adenin-9-β-D-Arabinofuranosid =Vidarabin	ARA-A	
Adenosin-2',3'-Dialdehyd		
Adenin	Ade	Base

Die beiden A₂-Rezeptor-Agonisten NECA (Abb. 8B) und CPCA (Abb. 8A) sind an Position C5' modifiziert. Ebenso 5'-Amino-5'-Desoxyadenosin (Abb. 8C), bei dem die C5'-OH-Gruppe durch eine Aminogruppe ersetzt wurde.

2'-Desoxyadenosin (Abb. 9A) und ARA-A (Abb. 9B) sind Analoga mit Modifikationen an C2'.

Als physiologisches Abbauprodukt im DNA-Stoffwechsel findet sich 2'-Desoxyadenosin in allen Zellen. Es inaktiviert die SAH-Hydrolase in einem irreversiblen zeitabhängigen Prozess. Der inaktivierende Mechanismus zeigt Parallelen zum normalen katalytischen Mechanismus. 2'-Desoxyadenosin wird durch enzymgebundenes NAD⁺ zu 3'-Keto-2'-Desoxyadenosin oxidiert, welches Adenin freisetzt. Dabei wird NAD⁺ irreversibel zu NADH reduziert und das Enzym inaktiviert (Abeles et al., 1982, De La Haba et al., 1986).

Bei ARA-A wurde der Ribose-Anteil durch einen anderen Zucker, die Arabinose ersetzt. Die Hydroxylgruppen an C2' und C3' dieses Zuckers stehen in der Haworth-Formel in *trans*, das heißt abwechselnd oben und unten (Abb. 9B).

ARA-A hat onkostatistische und virostatische Eigenschaften und ist ein irreversibler Hemmstoff der SAH-Hydrolase (Helland und Ueland, 1982).

An den Positionen C2' und C3' der Ribose des Adenosin-2',3'-Dialdehyds (Abb. 9C) befinden sich Aldehyd-Gruppen. Dadurch ist der Ribose-Ring geöffnet. Es ist ein potenter kompetitiver Inhibitor und irreversibler Inaktivator der SAH-Hydrolase mit einem K_i -Wert von 3 nM (Chiang, 1998).

Adenin ist als Purinbase Baustein zahlreicher wichtiger Verbindungen. Es ist ein kompetitiver Hemmstoff der SAH-Hydrolase, die in der Literatur angegebenen K_i -Werte variieren von 3 μ M (Chiang, 1998) über 9 μ M (Kim et al 1983) bis hin zu 15 μ M (Kloor et al., 1996). In höheren Konzentrationen wirkt Adenin wie Adenosin zytotoxisch (Aranow, 1961).

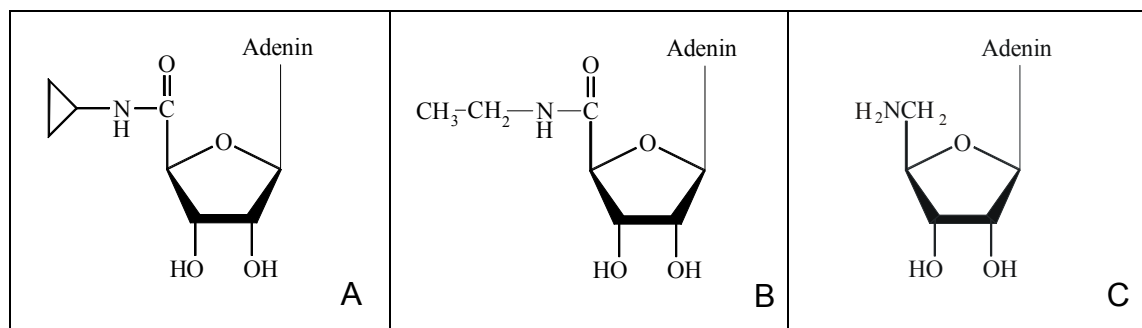


Abb. 8: Strukturformeln von CPCA (A), NECA (B) und 5'-Amino-5'-Desoxyadenosin (C).

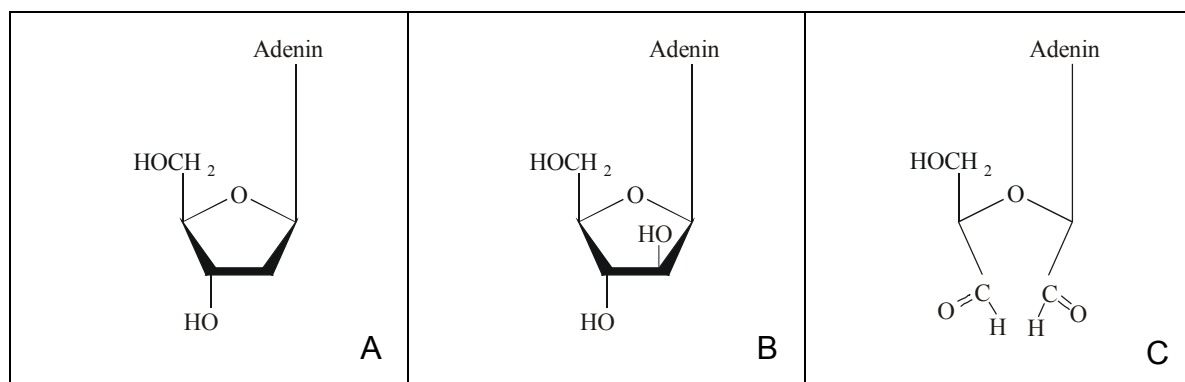


Abb. 9: Strukturformeln von 2'-Desoxyadenosin (A), ARA-A (B) und Adenosin-2',3'-Dialdehyd (C).

2.3.3 Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin und an der Ribose

Tab. 3: Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin und an der Ribose

Substanz	Abkürzung	Eigenschaft
Theophyllin =1,3-Dimethylxanthin	Theophyllin	A ₁ -Rezeptor-Antagonist
8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin	DPCPX	A ₁ -Rezeptor-Antagonist
2-(p-(2-Carboxyethyl) Phenethylamino)-5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin-Hydrochlorid =CGS-21680	CGS	A ₂ -Rezeptor-Agonist

CGS (Abb. 11) wurde aus NECA weiterentwickelt, um die Spezifität der agonistischen Wirkung auf Purinrezeptoren zu erhöhen. Die Substanz ist an den Positionen C2 und C5' modifiziert. Theophyllin (Abb. 10A) und DPCPX (Abb. 10B) sind Xanthin-Derivate. Xanthin ist ein Abbauprodukt der Purinbasen. Sie besitzen

keinen Ribose-Anteil und sind 2,6-Dihydroxypurin-Verbindungen, die am Purinring modifiziert sind.

Die pharmakologische Wirkung des Theophyllins ist hauptsächlich auf die Blockade von Adenosin-Rezeptoren zurückzuführen. Es erhöht außerdem die intrazellulären cAMP-Spiegel durch Hemmung der Phosphodiesterase. Therapeutischen Einsatz findet es als Bronchospasmolytikum bei mittelschwerem und schwerem Asthma. Weitere Wirkungen durch die A₁-Blockade sind Psychostimulation, positiv inotrope und chronotrope Wirkung am Herzen, sowie Steigerung der Diurese und der Magensäuresekretion (Starke, 2001).

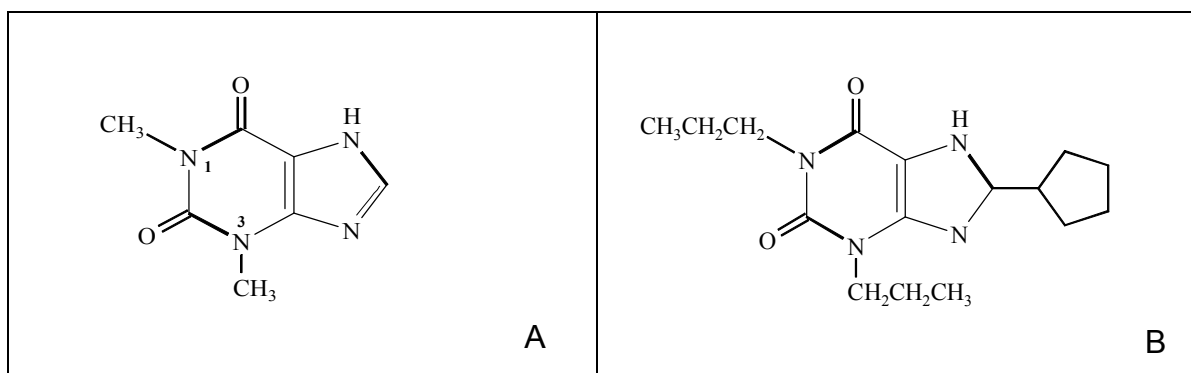


Abb. 10: Strukturformeln von Theophyllin (A) und DPCPX (B).

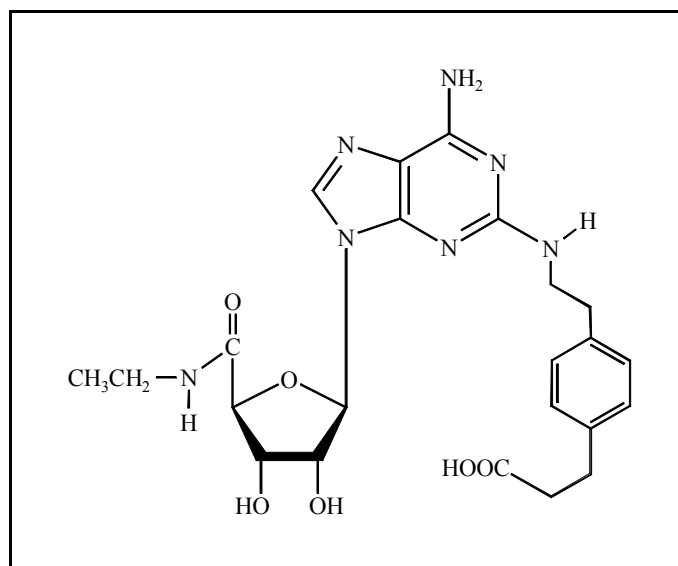


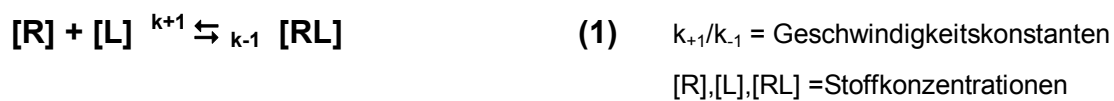
Abb. 11: Strukturformel von CGS

2.4 Theoretische Grundlagen

2.4.1 Prinzip der spezifischen Bindung

Ein Rezeptor und sein an ihn bindender Ligand bilden einen Komplex: den Rezeptor-Liganden-Komplex. Das gilt in gleicher Weise für Enzym und Substrat bei einer durch ein Enzym katalysierten Reaktion.

Für diese Wechselwirkung gilt das Massenwirkungsgesetz. Es kann mit folgender Gleichung (1) dargestellt werden:



Dabei verläuft die Assoziation mit der Geschwindigkeit:

$$v = k_{+1} [R] [L] \quad (2) \quad \begin{array}{l} k_{+1} = \text{Geschwindigkeitskonstante für die} \\ \text{Assoziation} \end{array}$$

Für die Dissoziation gilt gleichermaßen:

$$v = k_{-1} [RL] \quad (3) \quad \begin{array}{l} k_{-1} = \text{Geschwindigkeitskonstante für die} \\ \text{Dissoziation} \end{array}$$

Da die Bildung des Komplexes reversibel erfolgt, stellt sich ein Gleichgewichtszustand zwischen Assoziation und Dissoziation ein. Man kann die Gleichgewichtskonstante bzw. Dissoziationskonstante K_D folgendermaßen berechnen:

$$k_{+1} [R] [L] = k_{-1} [RL] = K_D$$

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] [L]}{[RL]} \quad (4)$$

Der K_D -Wert beschreibt also das Verhältnis von Rezeptor und Ligand im Reaktionsgleichgewicht.

Die insgesamt eingesetzte Menge an Rezeptoren $[R_t]$ setzt sich zusammen aus unbesetzten Rezeptoren $[R]$ und besetzten Rezeptor-Liganden-Komplexen $[RL]$.

Die maximale Bindungskapazität B_{\max} ist dann erreicht, wenn alle Bindungsstellen besetzt sind und alle Rezeptoren $[R_t]$ als Komplex gebunden vorliegen, also sind $[R_t]$ und B_{\max} gleichzusetzen:

$$B_{\max} = [R_t] = [R] + [RL]$$

oder umgeformt:

$$[R] = B_{\max} - [RL] \quad (5)$$

Ist die maximale Bindungskapazität zur Hälfte erreicht, so liegen gleiche Konzentrationen an freien und gebundenen Rezeptoren vor:

Bei $\frac{1}{2} B_{\max}$ gilt: $[R] = [RL]$.

Aus Gleichung (4) ergibt sich damit: $K_D = [L]$.

Daraus lässt sich zum einen ableiten, dass der K_D -Wert derjenigen Ligandenkonzentration entspricht, bei der die Hälfte der Rezeptorbindungsstellen besetzt ist. Er besitzt demnach die Dimension einer Stoffkonzentration und wird in Mol angegeben. Zum anderen wird deutlich, dass die Dissoziationskonstante ein Maß für die Affinität des Liganden zu seinem Rezeptor ist. Ein hoher K_D -Wert bedeutet, dass hohe Ligandenkonzentrationen benötigt werden, um die Hälfte der Rezeptoren zu sättigen. Der Ligand weist also eine niedrige Affinität zu seinem Rezeptor auf. Bei einem geringen Wert liegt analog dazu eine hohe Affinität vor. Bei K_D -Werten kleiner 10 nM spricht man schließlich von einer hochaffinen Bindung.

Die schrittweise Erhöhung der Ligandenkonzentration führt dazu, dass immer mehr Bindungsstellen am Rezeptor besetzt werden, und sich $[RL]$ immer näher an B_{\max} annähert, bis schließlich alle Rezeptoren als Komplex vorliegen und die Sättigung erreicht ist. Diese Sättigbarkeit ist eine charakteristische Eigenschaft der spezifischen Bindung zwischen einem Rezeptor und seinem Liganden.

Die Sättigungskurve beschreibt eine Hyperbel, die sich aus $[RL]$ auf der Ordinatenachse als Funktion der Ligandenkonzentration auf der Abszissenachse bildet und die sich asymptotisch an B_{\max} annähert.

Die Gleichung (7), die durch die Sättigungskurve graphisch dargestellt wird, ergibt sich nach mehreren Schritten:

Zunächst wird Gleichung (5) eingesetzt in Gleichung (4):

$$K_D = \frac{(B_{\max} - [RL]) [L]}{[RL]} \quad (6)$$

aus Gleichung (6) ergibt sich dann durch Umformung:

$$[RL] = \frac{B_{\max} [L]}{K_D + [L]} \quad (7)$$

Der K_D -Wert ist eine charakteristische Konstante für einen gegebenen Rezeptor, also von der eingesetzten Rezeptorkonzentration unabhängig.

Der K_D -Wert lässt sich nach Gleichung (7) bestimmen, aus der Sättigungskurve graphisch ermitteln oder mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} berechnen (Gleichung (4)).

2.4.2 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten

Die Geschwindigkeitskonstante k_{+1} stellt, wie der K_D -Wert, ein Maß für die Affinität des Liganden dar und charakterisiert die zeitabhängige Assoziation zwischen Rezeptor und Ligand, die einer hyperbolen Kinetik (ON-Kinetik) folgt.

Die zeitabhängige Dissoziation durch Zugabe von unmarkiertem Liganden im Überschuss erfolgt klassischerweise in Form einer absteigenden e-Funktion (OFF-Kinetik). Deren Geschwindigkeitskonstante k_{-1} ist ein Maß für die Reversibilität der Bindung.

Um die beiden Geschwindigkeitskonstanten zu bestimmen, werden die spezifische Bindung des Liganden im Gleichgewicht ($B_{(eq)}$) und die spezifische Bindung zum Messzeitpunkt (t) ($B_{(t)}$) zueinander in Beziehung gesetzt und logarithmisiert.

Für die Assoziationsversuche wird dafür Gleichung (8) und für die Dissoziationsversuche Gleichung (9) angewandt.

$$x = \ln \frac{B_{(eq)}}{B_{(eq)} - B_{(t)}} \quad (8)$$

$$x = - \ln \frac{B_{(t)}}{B_{(eq)}} \quad (9)$$

Werden diese x-Werte in ein Diagramm in Abhängigkeit von der Zeit (t) aufgetragen, ergeben sich Geraden, deren Steigungen den Konstanten k_{ob} (aus Gleichung (8)) und k_{-1} (aus Gleichung (9)) entsprechen.

Aus k_{ob} , der *beobachteten* Assoziationskonstante kann nun mit Hilfe der Gleichung (10) k_{+1} berechnet werden.

$$k_{+1} = \frac{k_{ob} - k_{-1}}{[L]} \quad (10)$$

2.4.3 Transformation der Daten nach Scatchard

Die Transformation der Daten nach Scatchard (1949) ermöglicht die Bestimmung der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen. Dabei werden auf der x-Achse die Menge an gebundenem Liganden und auf der y-Achse der Quotient von gebundenem und freiem Liganden aufgetragen. Ergeben die Daten eine Gerade, geht man von einer einzigen Bindungsstelle aus, lassen sich die Daten nur durch eine Kurve verbinden, weist der Rezeptor mehrere Bindungsstellen mit unterschiedlichen K_D -Werten auf.

2.4.4 Hemmungsexperimente mit Kompetitoren

Kompetitive reversible Hemmstoffe sind meist in ihrer Struktur dem Liganden nahe verwandt und können ebenfalls an die Bindungsstelle des Liganden am Rezeptor binden. Alle reversiblen Inhibitoren werden durch die Dissoziationskonstante K_i charakterisiert, die auch als Inhibitorkonstante bezeichnet wird und derjenigen Konzentration eines Inhibitors entspricht, bei der in Abwesenheit des Liganden die Hälfte der Bindungsstellen besetzt sind.

In Hemmungsexperimenten wird der EC_{50} -Wert bestimmt, der derjenigen Konzentration des Inhibitors entspricht, bei der die Hälfte des an den Rezeptor gebundenen Liganden verdrängt wurde. Der EC_{50} -Wert wird von der eingesetzten Konzentration des Liganden beeinflusst. Mit Hilfe der Gleichung nach Cheng und Prusoff (1973) kann die Inhibitorkonstante K_i aus dem EC_{50} -Wert, dem K_D -Wert des Liganden und der eingesetzten Ligandenkonzentration $[L]$ berechnet werden:

$$K_i = \frac{EC_{50}}{\left(1 + \frac{[L]}{K_D}\right)}$$

Die graphische Darstellung der Daten aus den Hemmungsexperimenten erfolgt durch Auftragung des Logarithmus der eingesetzten Kompetitor-Konzentration gegen die spezifische Bindung von $^3\text{H-cAMP}$ an die SAH-Hydrolase in Prozent. Dadurch erhält man eine klassische sigmoidale „Konzentrations-Wirkungs-Kurve“. Konkurrieren die Substanzen um eine einzige Bindungsstelle und erfolgt eine Verdrängung des $^3\text{H-cAMP}$ von 90%- auf 10%-Bindung innerhalb von 3 Zehnerpotenzen der Kompetitor-Konzentrationen, so wird ein solcher Kurvenverlauf als monophasisch bezeichnet.

2.4.5 Rezeptorbindungsstudien mittels Radioliganden

Rezeptoren lassen sich auf einfache und aussagekräftige Weise untersuchen, indem man Versuche mit radioaktiv markiertem Liganden durchführt (Bylund und Toews, 1993). Rezeptor und radioaktiver Ligand werden miteinander inkubiert und der an den Rezeptor gebundene Ligand wird gemessen. Zur Trennung des gebundenen vom ungebundenen Liganden wird ein Filter verwendet.

Bei dieser Methode ist zu beachten, dass zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung unterschieden werden muss. Gemessen wird die Summe aus beiden, die Gesamtbindung.

Die spezifische Bindung ist definiert als Bindung an den Rezeptor, der untersucht werden soll. Die unspezifische Bindung umfasst jegliche andere Bindung, sei es an andere Stellen des Proteins, an den Glasfaserfilter oder an das Polyethylenimin.

Um den Anteil der unspezifischen Bindung zu bestimmen, wird ein Parallelversuch mit Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem Liganden durchgeführt. Durch die sehr viel höhere Konzentration bindet hauptsächlich unmarkierter Ligand an die spezifischen Bindungsstellen.

Daher ist davon auszugehen, dass die in diesen Parallelversuchen gemessene Radioaktivität dem Anteil der unspezifisch gebundenen Liganden entspricht. Die spezifische Bindung ergibt sich dann aus der Differenz zwischen der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung.

2.5 Versuchsansätze

2.5.1 Allgemeines

Alle Versuche wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen und bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Pufferlösung diente stets 50 mM Tris/ HCl-Puffer (pH 7,5).

Die verschiedenen Formen der SAH-Hydrolase wurden je nach Proteingehalt der verwendeten Fraktion mit Puffer verdünnt, um einen Proteingehalt von 3 µg

Protein/100 µl Lösung herzustellen. Jeder Probe wurden 100 µl dieser Proteinlösung zugegeben.

Die ^3H -cAMP-Lösungen wurden entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung angesetzt. Die Verdünnungsfaktoren wurden ausgehend von der bekannten Konzentration des Urtracers von 31,15 µM ^3H -cAMP berechnet.

Das Lösungsmittelgemisch des Urtracers wurde bei 44°C im Trockenschrank verdampft und das nunmehr reine ^3H -cAMP mit Puffer verdünnt.

Um Doppelwerte bestimmen zu können, wurde jede Probe doppelt hergestellt.

Das Volumen jeder Probe betrug stets 300 µl. Aus jeder Probe wurden 250 µl abfiltriert und die auf dem Filter zurückgebliebene Radioaktivität wurde in einem β -Szintillationszähler in dpm gemessen.

Die Versuche wurden mit allen drei Enzymformen (native SAH-Hydrolase, NADH-Form, NAD^+ -Form) durchgeführt.

2.5.2 Zeitabhängige Assoziation

Bei der Durchführung der Assoziationsversuche wurde eine konstante Menge des Enzyms (10 µg/ml) über einen Zeitraum von 240 min mit einer gleichbleibenden Konzentration (20 nM) an ^3H -cAMP inkubiert. Die erreichte Bindung des ^3H -cAMP an das Enzym wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten während 0 - 240 min gemessen. Auf diese Weise lässt sich der zeitliche Verlauf der Gleichgewichtseinstellung zwischen Enzym und Ligand untersuchen.

Für diesen Versuchsansatz wurde der Urtracer (^3H -cAMP) 1:10 verdünnt, um eine 300 nM ^3H -cAMP-Lösung herzustellen. Daraus wurden pro Probe 20 µl entnommen, was einer Endkonzentration von 20 nM ^3H -cAMP entspricht.

Pipettiert wurden zunächst 180 µl Puffer und 20 µl ^3H -cAMP-Lösung (300 nM), dann wurden 100 µl Proteinlösung (3 µg Protein) zugegeben.

Die Inkubationszeit begann mit der Zugabe der Proteinlösung. Die ersten Proben (0 min) wurden sofort nach der Zugabe filtriert. Die weiteren folgten nach 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240 min.

2.5.3 Zeitabhängige Dissoziation

Bei der Durchführung der Dissoziationsversuche wurde zunächst eine konstante Menge des Enzyms (10 µg/ml) während eines Zeitraumes von 60 min bzw. 120 min mit einer gleichbleibenden Konzentration (20 nM) an ^3H -cAMP inkubiert. Durch Zugabe einer konstanten Menge (150 µM) an nicht radioaktiv markiertem cAMP im Überschuss wurde das gebundene ^3H -cAMP zur Abdissoziation aus der Bindung gebracht. Das verbliebene gebundene ^3H -cAMP wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten während 0 - 240 min nach Zugabe des kalten cAMP gemessen.

Für diesen Versuchsansatz wurde der Urtracer (^3H -cAMP) 1:10 verdünnt, um eine 300 nM ^3H -cAMP-Lösung herzustellen. Daraus wurden pro Probe 20 µl entnommen, was einer Endkonzentration von 20 nM ^3H -cAMP entspricht.

Zunächst wurden 130 µl Puffer, 20 µl ^3H -cAMP-Lösung und 100 µl Proteinlösung für die jeweilige Inkubationszeit der Enzymform inkubiert.

Für die native SAH-Hydrolase und die NADH-Form betrug die Inkubationszeit 2 Stunden, für die NAD^+ -Form nur 1 Stunde.

Der Nullwert (0 min) enthielt 180 µl Puffer und wurde ohne Zugabe von kaltem cAMP sofort nach Ende der Inkubationszeit filtriert. Alle weiteren Proben wurden 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240 min nach Zugabe von 50 µl 1 mM cAMP filtriert.

2.5.4 Konzentrationsabhängige Sättigung

Bei der Durchführung der Sättigungsversuche wurde eine konstante Menge (10 µg/ml) des Enzyms während eines Zeitraumes von 60 bzw. 120 min mit steigenden Konzentrationen (1 nM – 5 µM) von ^3H -cAMP inkubiert.

Um die unspezifische Bindung zu bestimmen, wurden in einem zweiten analogen Ansatz 40 µl Puffer durch 40 µl nicht markiertes cAMP ersetzt.

Durch Zugabe von 40 µl 2 mM cAMP wurde eine Verdünnung des ^3H -cAMP um den Faktor 1.000 – 200.000 erreicht. Bei der Zugabe von 40 µl 1 mM cAMP ergab

sich je nach Konzentrationsbereich eine Verdünnung um den Faktor 20 – 100.000.

Um die verschiedenen Formen der SAH-Hydrolase (nativ, NADH und NAD⁺) mit cAMP zu sättigen, wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten unterschiedlichen Versuchsansätze durchgeführt:

Tab. 4: Versuchsansätze für Sättigungsversuche

Enzymform	Konzentrationsbereich	Bestimmung der unspezifischen Bindung mittels:
SAH-Hydrolase nativ	1 nM-250 nM	40 µl 2 mM cAMP
SAH-Hydrolase nativ	1 nM-500 nM	40 µl 1 mM cAMP
SAH-Hydrolase/NADH	1 nM-250 nM	40 µl 2 mM cAMP
SAH-Hydrolase/NADH	1 nM-500 nM	40 µl 1 mM cAMP
SAH-Hydrolase/NADH	1 nM-5000 nM	40 µl 1 mM cAMP
SAH-Hydrolase/NAD ⁺	1 nM-500 nM	40 µl 1 mM cAMP
SAH-Hydrolase/NAD ⁺	1 nM-5000 nM	40 µl 1 mM cAMP

Die variablen ³H-cAMP-Konzentrationen für die Sättigungsversuche wurden durch Verdünnung von Stammlösungen hergestellt.

Für die Konzentrationsbereiche 1 nM – 250 nM bzw. 1 nM – 500 nM wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

Lösung 4: 1500 nM ³H-cAMP

Lösung 3: 750 nM ³H-cAMP

Lösung 2: 187 nM ³H-cAMP

Lösung 1: 18 nM ³H-cAMP

Je Milliliter Lösung 4 (1500 nM) wurden aus dem Urtracer 48,2 µl ³H-cAMP entnommen. Durch Zugabe von 1 ml 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 7,5) erfolgte die erforderliche Verdünnung (1:21).

Die Herstellung eines Milliliters der Lösung 3 (750 nM) erfolgte gleichermaßen mit 24,1 μl ^3H -cAMP Urtracer und 1 ml Pufferlösung (Verdünnung 1:42).

Lösung 2 (187 nM) entstand aus Lösung 3 durch 1:4-Verdünnung mit Puffer.

Durch eine weitere Verdünnung der Lösung 2 (Faktor 1:10) erhielt man Lösung 1 (18 nM).

Für den Konzentrationsbereich 1 nM - 5000 nM wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

Lsg.5: 15 μM ^3H -cAMP

Lsg.4: 1500 nM ^3H -cAMP

Lsg.3: 750 nM ^3H -cAMP

Lsg.2: 180 nM ^3H -cAMP

Lsg.1: 18 nM ^3H -cAMP

Der Urtracer für die Stammlösungen 3 - 5 des Konzentrationsbereiches von 1 nM - 5000 nM wurde im Verhältnis 1:10 mit kalter 31 μM cAMP-Lösung verdünnt.

Dazu wurde nach dem Verdampfungsprozess das nunmehr reine ^3H -cAMP in einer äquivalenten Menge an Puffer gelöst, die dem ursprünglich entnommenen Volumen an Urtracer entsprach. Diese Lösung wurde dann im Verhältnis 1:10 mit kalter 31 μM cAMP-Lösung verdünnt. Anschließend wurde mit Puffer bis zur gewünschten cAMP-Konzentration der Stammlösung verdünnt.

Je Milliliter Lösung 5 wurden 50 μl Urtracer verdampft und in 50 μl Puffer gelöst. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:10 mit 450 μl 31 μM cAMP-Lösung verdünnt. Anschließend wurde mit 500 μl Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt, um eine 15 μM cAMP-Lösung zu erhalten.

Je Milliliter Lösung 4 wurden analog dazu 4,8 μl Urtracer verdampft, in 4,8 μl Puffer gelöst, im Verhältnis 1:10 mit 43,2 μl 31 μM cAMP-Lösung verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:21 mit 960 μl Puffer verdünnt, um eine 1500 nM cAMP-Lösung zu erhalten.

Je Milliliter Lösung 3 wurden 2,4 μl Urtracer verdampft, in 2,4 μl Puffer gelöst, im Verhältnis 1:10 mit 21,6 μl 31 μM cAMP-Lösung verdünnt und anschließend im

Verhältnis 1:42 mit 984 μ l Puffer verdünnt, um eine 750 nM cAMP-Lösung zu erhalten.

Wie bei den anderen Konzentrationsbereichen entstand Lösung 2 durch 1:4-Verdünnung mit Puffer aus Lösung 3. Durch eine weitere 1:10 Verdünnung der Lösung 2 erhielt man Lösung 1.

Die Zusammensetzung der einzelnen Proben lässt sich aus den Pipettierschemata in Tab. 5 (1 - 250 nM), Tab. 6 (1 - 500 nM) und Tab. 7 (1 - 5000 nM) entnehmen. Die Menge der eingesetzten Stammlösung wurde nach der gewünschten ^3H -cAMP-Endkonzentration berechnet.

Die Zugabe der Proteinlösung bildete bei allen Proben den letzten Arbeitsschritt. Die anschließende Inkubationszeit richtete sich nach den für die jeweilige Enzymform in Assoziationsversuchen bestimmten optimalen Zeiten: Die native Enzymform und die NADH-Form wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, die NAD^+ -Form nur 1 Stunde.

Zusätzlich wurde eine Reihe von Versuchen über Nacht (durchschnittlich 18h) bei 4°C inkubiert.

Um die Konzentration des eingesetzten radioaktiven Liganden in jeder Probe zu bestimmen zu können, wurden nach der Inkubation aus jeder Probe 20 μ l entnommen und in ein Zählfläschchen pipettiert. Aus der hierbei gemessenen Radioaktivität ließ sich die Gesamtaktivität an ^3H -cAMP rückrechnen.

Tab. 5: Pipettierschema Sättigungsversuche / Gesamtbindung (1 nM - 250 nM)

Probe Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
³ HcAMP-Endkonz. (nM)	1	2	5	10	15	25	37	50	75	100	125	150	190	250
Stamm-Lösung	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4
³ H-cAMP-Lösung (µl)	10	20	10	20	30	10	15	20	30	40	25	30	40	50
Puffer (µl)	190	180	190	180	170	190	185	180	170	160	175	170	160	150
Protein-lsg.(µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tab. 6: Pipettierschema Sättigungsversuche/Gesamtbindung (1 nM - 500 nM)

Probe Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
³ H-cAMP-Endkonz. (nM)	1	10	25	50	100	150	250	500
Stamm-lösung	1	2	3	3	3	4	4	4
³ H-cAMP-Lsg.(µl)	10	20	10	20	40	30	50	100
Puffer (µl)	190	180	190	180	160	170	150	100
Protein-lösung (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100

Tab. 7: Pipettierschema Sättigungsversuche/Gesamtbindung (1 nM - 5000 nM)

Probe Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
³H-cAMP- Endkonz. (nM)	1	10	25	50	100	150	250	500	1000	2500	5000
Stamm- lösung	1	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5
³H-cAMP- Lsg.(µl)	10	20	10	20	40	30	50	100	20	50	100
Puffer(µl)	190	180	190	180	160	170	150	100	180	150	100
Protein- Lösung(µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

2.5.5 Hemmungsexperimente mit Kompetitoren

Bei der Durchführung der Verdrängungsexperimente wurde die eingesetzte Konzentration (3×10^{-5} M bis 10^{-9} M) der konkurrierenden Substanz variiert bei konstanten Mengen an Enzym (10 µg/ml) und $^3\text{H-cAMP}$ (20 nM), sowie bei gleichbleibendem Zeitraum (60 min bzw. 120 min). Durch den Vergleich der Messwerte mit einem Leerwert konnte ermittelt werden, ob und in welchem Ausmaß die Substanz mit cAMP um seine Bindungsstelle konkurriert.

Zunächst wurden 1 mM Stammlösungen der zu untersuchenden Substanz hergestellt. Bei Löslichkeit der Substanz in H_2O /Puffer wurde sie in 10 ml 50 mM Tris/Hepes-Puffer (pH 7,5) gelöst. Um die Konzentration der anderen Lösungsmittel (s. Tabelle 8) so niedrig wie möglich zu halten, wurde die Substanz zunächst in 200 µl des Lösungsmittels in Lösung gebracht und dann mit 9,8 ml Puffer verdünnt. DPCPX musste jedoch in 5 ml DMSO + 5 ml Puffer gelöst werden. Ein Einfluss der Lösungsmittel DMSO und Ethanol wurde ausgeschlossen, indem Proben mit 50 µl 3×10^{-5} M DMSO oder 50 µl 3×10^{-5} M Ethanol anstelle des kalten Liganden gemessen und mit den Leerwerten verglichen wurden. In den Fällen, in denen die Substanz in 200 µl 0,1 N HCl gelöst worden war, wurde der pH-Wert der 3×10^{-5} M-Probe kontrolliert.

Ausgehend von der 1 mM Stammlösung wurden durch Verdünnung mit Puffer die Lösungen 1 -10 mit Konzentrationen von 3×10^{-5} M bis 10^{-9} M hergestellt. Das Verdünnungsschema findet sich in Tabelle 9.

Analog zu den Versuchen zur zeitabhängigen Assoziation und Dissoziation wurde für diesen Versuchsansatz der Urtracer ($^3\text{H-cAMP}$) 1:10 verdünnt, um eine 300 nM $^3\text{H-cAMP}$ -Lösung herzustellen. Daraus wurden pro Probe 20 µl entnommen, was einer Endkonzentration von 20 nM $^3\text{H-cAMP}$ entspricht.

Tab. 8: Übersicht über die Lösungsmittel der untersuchten Adenosin-Analoga

Substanz	Lösungsmittel
2-Chloradenosin	H ₂ O/Puffer
CHA	Ethanol
R-PIA	DMSO
N ⁶ -Methyladenosin	H ₂ O/Puffer
NECA	0,1 N HCl
CPCA	0,1 N HCl
5'-Amino-5'-Desoxyadenosin	H ₂ O/Puffer

Substanz	Lösungsmittel
Adenosin-2',3'-Dialdehyd	H ₂ O/Puffer
2'-Desoxyadenosin	H ₂ O/Puffer
ARA-A	DMSO
Adenin	H ₂ O/Puffer
Theophyllin	H ₂ O/Puffer
DPCPX	DMSO
CGS	DMSO

Tab. 9: Pipettierschema zur Herstellung der Verdünnungsreihen
von 3×10^{-5} M bis 10^{-9} M

Lsg.	Konzentration (M)	(μ l)	Aus Lösung	Puffer (μ l)	Verdünnungsfaktor
1	3×10^{-5}	300	Aus 1 mM Stammlsg.	700	1:3
2	10^{-5}	200	1	400	1:3
3	3×10^{-6}	100	1	900	1:10
4	10^{-6}	100	2	900	1:10
5	3×10^{-7}	100	3	900	1:10
6	10^{-7}	100	4	900	1:10
7	3×10^{-8}	100	5	900	1:10
8	10^{-8}	100	6	900	1:10
9	3×10^{-9}	100	7	900	1:10
10	10^{-9}	100	8	900	1:10

Die Messwerte der Proben wurden prozentual auf einen Leerwert bezogen, durch den die Bindung des ^3H -cAMP an die SAH-Hydrolase ohne Zugabe eines Kompetitors ermittelt wurde. Leerwert und Proben setzten sich folgendermaßen zusammen:

Leerwert: 20 μl ^3H -cAMP-Lsg. + 100 μl Proteinlösung + 180 μl Puffer

Proben: 20 μl ^3H -cAMP-Lsg. + 100 μl Proteinlsg. + 130 μl Puffer + 50 μl Lsg.1-10.

Die anschließende Inkubationszeit richtete sich nach den für die jeweilige Enzymform in Assoziationsversuchen bestimmten optimalen Zeiten:

Die native Enzymform und die NADH-Form wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, die NAD^+ -Form nur 1 Stunde.

2.6 Filtration

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben filtriert. Nur der Protein-Ligand-Komplex bleibt auf den Filtern liegen und wird auf diese Art von ungebundenem Liganden getrennt.

2.6.1 Filtrationsapparatur

Die Absaugvorrichtung (nach Osswald und Breidbach; s. Abbildung 12) besteht aus einem Absaugblock (2), der mit einem Kunststoffschlauch über zwei Auffangflaschen (3) mit einer Membran-Vakuumpumpe (4) verbunden ist, und aus einer elektronischen Steuereinheit (1), an der die Filtrationsbedingungen modifiziert werden können. In das Kunststoffgehäuse des Absaugblocks ist ein vertikal beweglicher Kolben eingelassen. Die obere Öffnung des Kolbens besteht aus einem Stahlsieb in einer runden Aussparung, in die der Filter eingelegt wird. Seine Fußplatte befindet sich in einer Druckluftkammer. Über einen Fußschalter der Steuereinheit kann der Absaugvorgang in Gang gesetzt werden. Der Kolben wird pneumatisch nach oben bewegt und gegen einen fixierten Einfüllstutzen gepresst. Das Innere des Kolbens wird mit dem Sog der Vakuumpumpe

verbunden. Die Probe und die Spülflüssigkeit werden in den Einfüllstutzen pipettiert und über den Filter und den abführenden Kunststoffschlauch in die Auffangflaschen abgesaugt. Jeder Filtrationsvorgang findet durch das konstant erzeugte Vakuum unter gleichen Bedingungen statt, wodurch also eine genaue Doppelwertbestimmung ermöglicht wird.

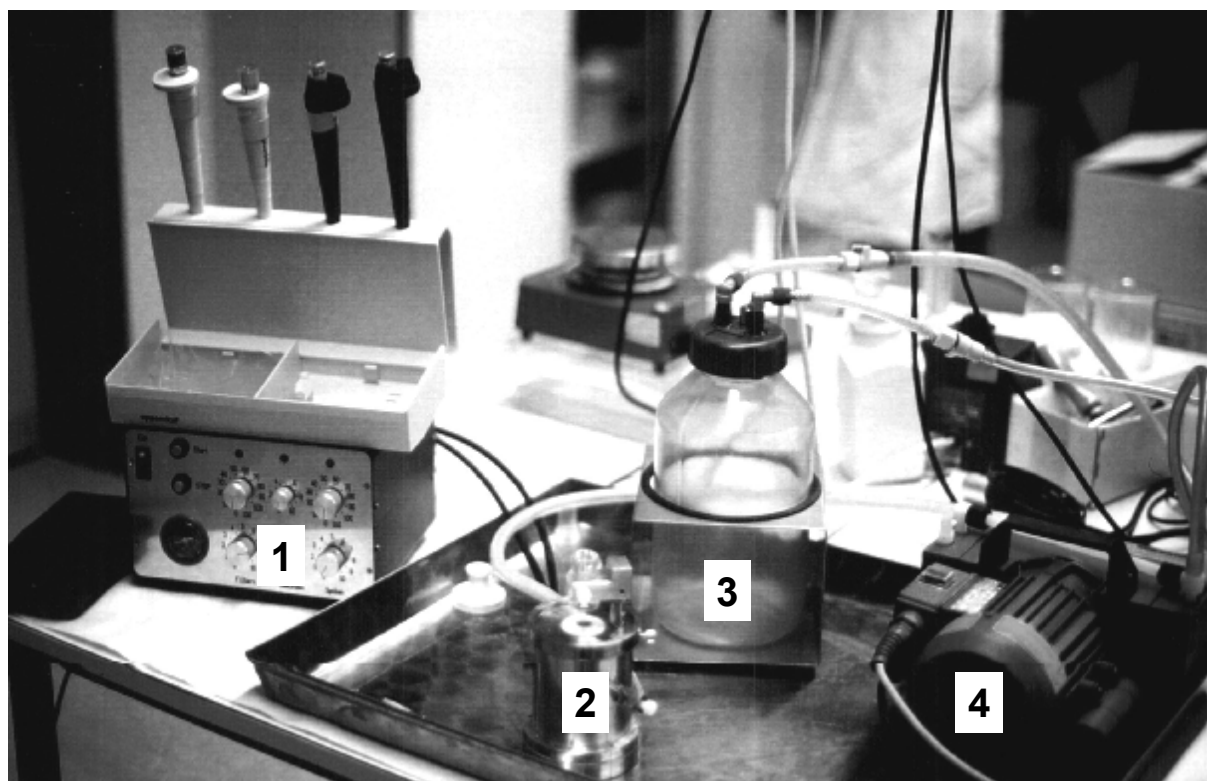


Abb. 12: Absaugvorrichtung nach Osswald und Breidbach

2.6.2 Filter

Es wurden kreisrunde Glasfaserfilter vom Typ B (GF-B-Filter) mit einem Durchmesser von 16 mm verwendet. Sie wurden von Frau Renate Riehle von Hand mittels einer Metallstanze und eines Gummihammers aus großen Filterpapierbögen herausgestanzt. Vor der Filtration wurden die Filter für 1 - 24

Stunden bei 4°C in 0,3%iges Polyethylenimin (PEI) eingeweicht, für das vorbereitete 5%ige PEI-Lösung mit dd H₂O im Verhältnis 1:17 verdünnt wurde. Das PEI bildet durch seinen polykationischen Charakter mit den polyanionischen Strukturen der GF-B-Filter über Coulombsche Kräfte eine Art Makromolekülnetz, in dem lösliche Proteine ab einer Größe von ca. 30.000 D abgefangen werden.

2.6.3 Filtrationsvorgang

Mit einer Pinzette wurde ein eingeweichter Filter in den Absaugblock eingelegt. Durch Druck auf das Fußpedal wurde der Absaugvorgang gestartet. Aus jeder zuvor frisch mittels eines *Vortex*-Mixers durchmischten Probe wurden 250 µl in den Einfüllstutzen auf den Filter pipettiert und sofort mit 2 x 4 ml 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) nachgespült. Die Dauer des Absaugvorganges wurde an der elektronischen Steuereinheit auf 20 Sekunden eingestellt. Nach Beendigung des Vorganges wurde der Filter mit einer zweiten Pinzette in ein Zählröhrchen gegeben, in das zuvor 5 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt worden waren. Das verschlossene Röhrchen wurde gut geschüttelt.

2.7 Messung der Radioaktivität

Die β-Strahlung des radioaktiven ³H-cAMP regt in der Szintillationsflüssigkeit die Erzeugung von Lichtblitzen an. Diese können wiederum von dem β-Szintillationszähler (2550 TR, Packard) gemessen werden. Im Messgerät ist eine optimierte Quenchkorrektur gespeichert.

Die gemessene Aktivität wird vom Computer als Zerfallsaktivität in dpm ausgedruckt.

Ein *decay per minute* (dpm) entspricht ca. 2,2 Zerfällen pro Minute. Ein Becquerel entspricht ca. 60 dpm.

2.8 Bestimmung der cAMP-Bindungsstellen mittels 8-Azido-³H-cAMP

2.8.1 Markierung der SAH-Hydrolase mit 8-Azido-³H-cAMP

Das Derivat 8-Azido-³H-cAMP enthält an Position C8 eine durch Licht aktivierbare Arylazidogruppe. Diese Gruppe verhält sich in Abwesenheit von Licht identisch zu ³H-cAMP und bindet an die ³H-cAMP-Bindungsstelle der SAH-Hydrolase, von der es in nicht aktiviertem Zustand durch unmarkiertes cAMP verdrängt werden kann (Ayar und Hershfield, 1985). Bei Bestrahlung durch UV-Licht entstehen aus den Arylazidogruppen reaktive Nitrene, die bevorzugt NH- und OH-Bindungen oder andere Nukleophile angreifen und dadurch kovalent an die ³H-cAMP-Bindungsstelle binden. Die Aminosäuresequenz der ³H-cAMP-Bindungsstelle kann auf diese Weise markiert und identifiziert werden.

SAH-Hydrolase in der nativen, der NAD⁺-Form und der NADH-Form wurde mit 8-Azido-³H-cAMP über Nacht bei 4°C inkubiert. Das 8-Azido-³H-cAMP wurde im Verhältnis 1:300 mit nicht radioaktiv markiertem 8-Azido-cAMP verdünnt. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch 5 Minuten bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt. Dabei betrug der Abstand der Lichtquelle zur Probe 8 cm. Das nicht gebundene 8-Azido-³H-cAMP wurde durch Dialyse entfernt. Dann wurde die native SAH-Hydrolase mit Endoproteinase Asp-N (1 µg Asp-N / 100 µg Protein) bzw. die NAD⁺-Form und die NADH-Form mit Trypsin (5 µg/100 µg Protein) während 18 Stunden bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Peptide mittels HPLC aufgetrennt. Dabei wurde eine Grom (3)-Sil ODS (250 x 4,0 mm, 5 µm) Säule eingesetzt und eine Gradientenmethode mit einer Flussrate 0,8 ml/min bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Lösungsmittel A enthielt 0,1% Trifluoressigsäure. Das Lösungsmittel B enthielt zusätzlich 80% Acetonitril. Die Peptide wurden bei einer Wellenlänge von 214 nm nachgewiesen und in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen.

Um die mittels 8-Azido-³H-cAMP markierten Peptidfraktionen zu identifizieren, wurden 10 µl der einzelnen Fraktionen im Szintillationszähler gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Radioaktivität wurden ausgewählt und sequenziert.

2.8.2 Sequenzierung der mit 8-Azido-3H-cAMP markierten Peptide

Die Sequenzierung der radioaktiv markierten Fraktionen wurde im Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Prof. Dr. Stevanovic von Frau Dipl.-Biol. M. Müller durchgeführt. Dabei wurde eine Kombination von Massenspektrometrie (MALDI) und Elektrospray-Ionisation (ESI) eingesetzt.

2.9 Berechnung der Daten

Die Daten der Ausdrücke des β -Szintillationszählers wurden mit Hilfe des Computerprogramms EXCEL (Microsoft) ausgewertet. Da die spezifische Aktivität des verwendeten ^3H -cAMP von 71262 dpm/pmol und die Proteinmenge von 2,5 $\mu\text{g}/250 \mu\text{l}$ Probe bekannt waren, konnte die gebundene Menge an ^3H -cAMP in pmol/mg Protein berechnet werden. Die Mittelwerte aus den Ergebnissen einer Versuchsreihe und der mittlere Standardfehler wurden mit dem Programm INSTAT berechnet. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe des Zeichenprogramms FIGURE P ausgewertet und graphisch dargestellt. Dabei wurden die Abweichungen in den Datensätzen und die Gültigkeit der Anpassungen der Kurven mittels statistischer Tests (t-Test, F-Test) auf ihre Signifikanz hin überprüft ($p < 0,05$).

2.10 Herkunft der Materialien

Die eingesetzten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- ^3H -cAMP – Perkin Elmer Life Sciences Inc.
- Adenosin, Adenin und ATP – Boehringer Mannheim GmbH.
- cAMP, CGS-21680, 2-Chloroadenosin, N6-Methyladenosin, 5'-Amino-5'-Desoxyadenosin, Adenosin-2',3'-Dialdehyd, ARA-A, 2'-Desoxyadenosin, Theophyllin und Nukleosid-Phosphorylase – Sigma Aldrich Chemie GmbH
- NECA, CPCA, R-PIA, DPCPX und N6-Cyclohexyladenosin – Research Biochemicals Inc.
- PEI – Serva Electrophoresis GmbH
- GF-B-Filter – Whatman
- Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold – Perkin Elmer
- Zählfläschchen: 20 ml vials – Packard Bioscience Company .
- alle weiteren Chemikalien in analytischer Qualität – Merck

3 Ergebnisse

3.1 Zeitabhängige Bindungskinetik

3.1.1 Zeitabhängige Assoziation und Dissoziation

Um die optimale Inkubationszeit für die Sättigungs- und Verdrängungsversuche herauszufinden, wurde die Assoziationszeit, also die minimale Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes zwischen Ligand und Enzym ermittelt. In einer anderen Versuchsreihe wurde das Dissoziationsverhalten des Enzym-Liganden-Komplexes nach einer für die Enzymform optimalen Vorinkubationszeit bestimmt. Beide Versuchsreihen wurden mit einer ^3H -cAMP-Konzentration von 20 nM durchgeführt. Die Versuche wurden jeweils 2 - 4 Mal wiederholt.

Bei der graphischen Darstellung wurde das an das Protein gebundene ^3H -cAMP in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

Die native SAH-Hydrolase (Abb. 12) und die NADH-Form (Abb. 14) zeigten Assoziationskurven, die in der Steilheit ihrer Verläufe und in den Maximalbindungswerten im Bereich von 250 – 300 pmol/mg Protein vergleichbar waren. In beiden Fällen war der Gleichgewichtszustand nach ca. 2 Stunden erreicht. Bei der nativen SAH-Hydrolase wurde allerdings auch nach 2 Stunden noch ein minimaler Anstieg des gebundenen ^3H -cAMP gemessen.

Die Inkubationszeit für die folgenden Experimente mit den beiden Enzymformen wurde auf 2 Stunden festgelegt.

Die Assoziationskurve der NAD^+ -Form (Abb. 16) verlief im Vergleich dazu weitaus steiler und erreichte Maximalbindungswerte, die mit ca. 120 pmol/mg Protein um ein Vielfaches niedriger lagen. Der Gleichgewichtszustand wurde bereits nach 1 Stunde erreicht. Nach 2 Stunden fiel der Anteil an gebundenem ^3H -cAMP schon deutlich ab. Die Inkubationszeit für die folgenden Experimente wurde also auf 1 Stunde festgelegt.

Ein vergleichbares Ergebnis fand sich bei den Dissoziationsversuchen.

Die native SAH-Hydrolase (Abb. 13) und die NADH-Form (Abb. 15) zeigten Dissoziationskurven, die in ihrem Verlauf und ihren Ausgangswerten zwischen 100 und 150 pmol/mg Protein nach einer Vorinkubation von 2 Stunden vergleichbar waren. Nach 4 Stunden Dissoziationszeit war bei beiden Enzymformen noch ca. 13 - 15 pmol ^3H -cAMP/mg Protein gebunden, was einer Restbindung von ca. 10% entspricht.

Die Dissoziationskurve der NAD^+ -Form (Abb. 17) verlief im Vergleich dazu weitaus steiler und ging von niedrigeren Ausgangswerten von ca. 60 pmol/mg Protein nach 1 Stunde Vorinkubation aus. Nach 4 Stunden Dissoziationszeit war das gesamte gebundene ^3H -cAMP abdissoziiert.

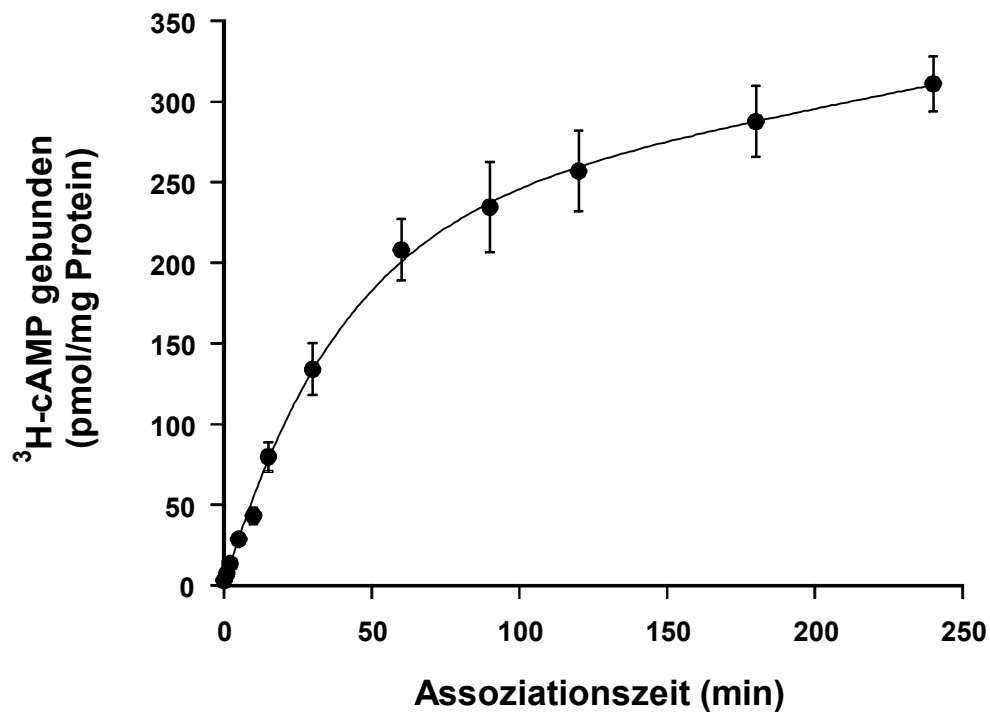


Abb. 12: Assoziationskurve der nativen SAH-Hydrolase

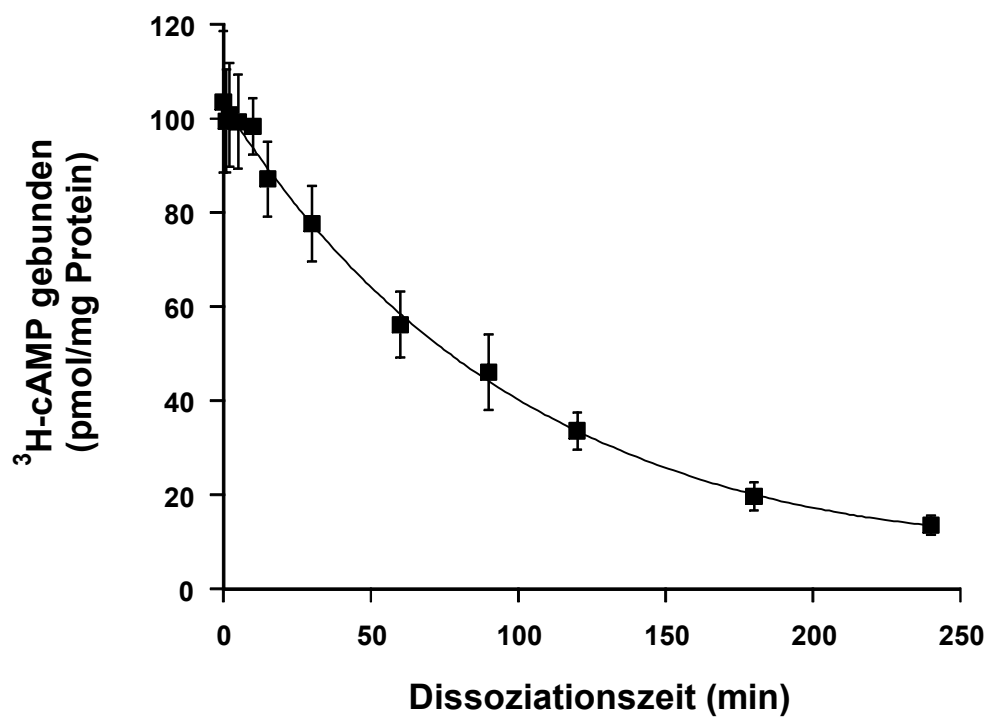


Abb. 13: Dissoziationskurve der nativen SAH-Hydrolase

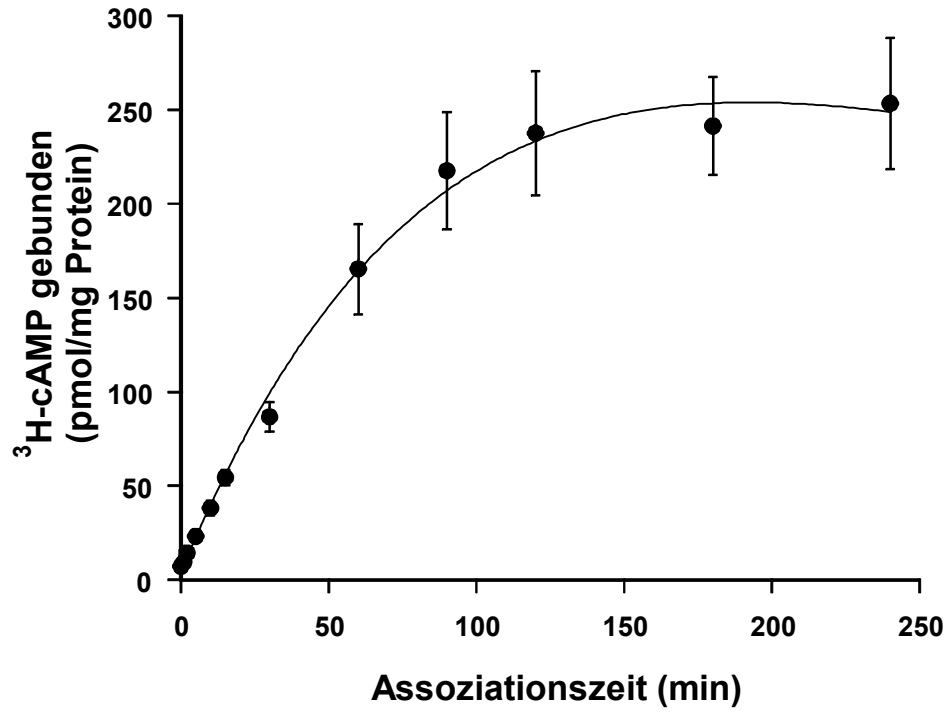


Abb. 14: Assoziationskurve der NADH-Form

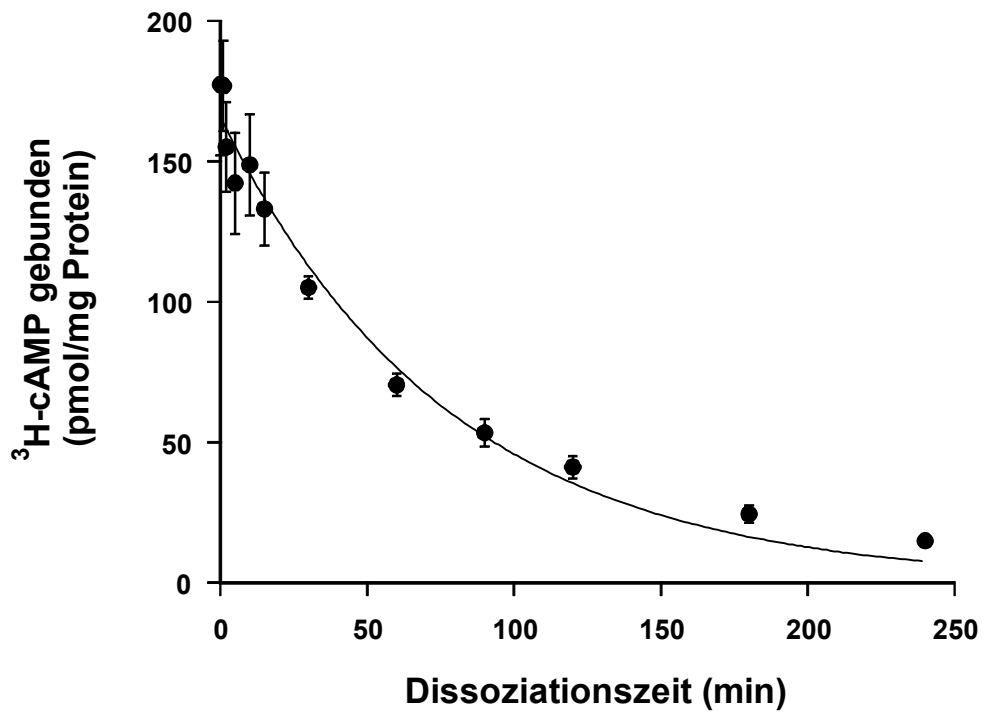


Abb. 15: Dissoziationskurve der NADH-Form

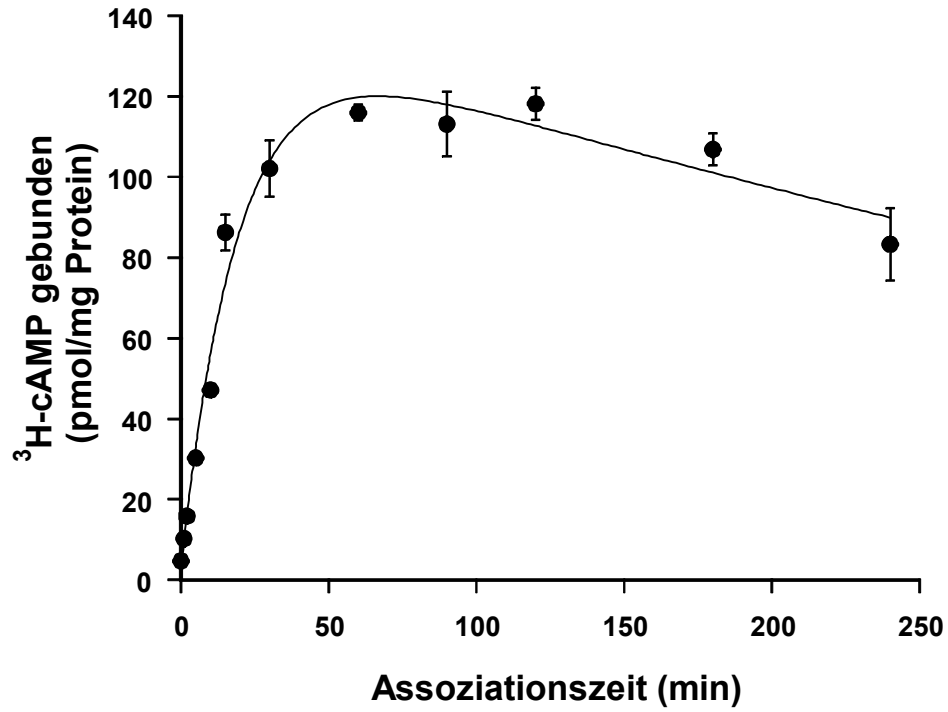


Abb. 16: Assoziationskurve der NAD⁺-Form

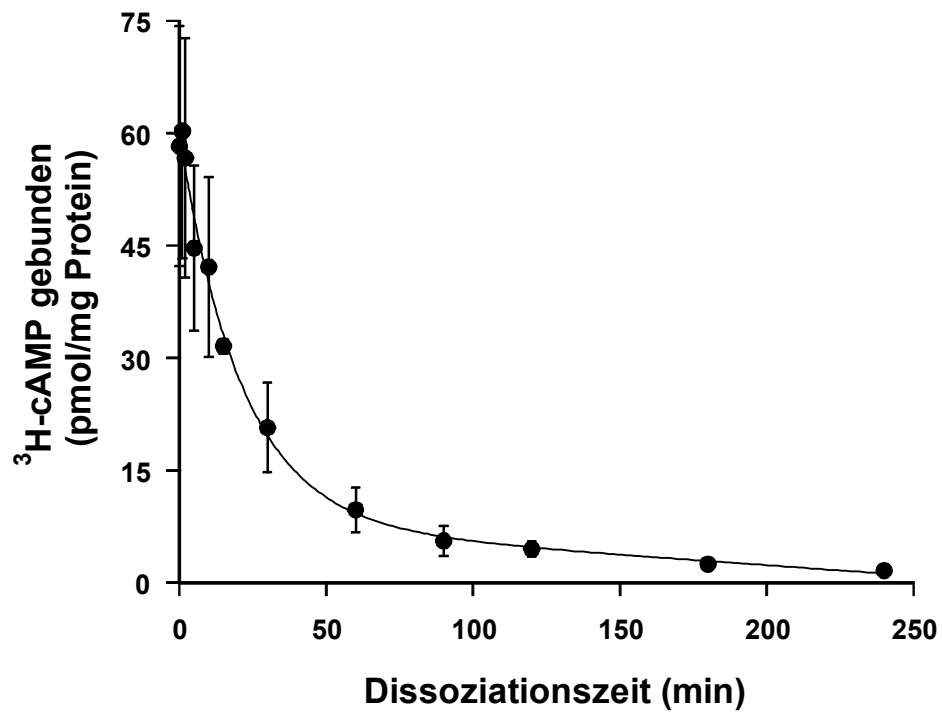


Abb. 17: Dissoziationskurve der NAD⁺-Form

3.1.2 Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten und des kinetischen K_D -Wertes

Die Assoziationskonstante k_{+1} und die Dissoziationskonstante k_{-1} wurden nach der unter 2.5.2. beschriebenen Vorgehensweise bestimmt. Mit Hilfe von FIGURE P wurden die berechneten x-Werte in Abhängigkeit von der Zeit in Diagrammen aufgetragen und die Steigung der resultierenden Geraden ermittelt, die k_{ob} bzw. k_{-1} entspricht. Der Quotient k_{-1}/k_{+1} der beiden Konstanten ergibt die Gleichgewichtskonstante.

Tab. 10: Die Geschwindigkeitskonstanten k_{ob} , k_{+1} und k_{-1} und die daraus ermittelten K_D -Werte

Enzymform	k_{ob} (s^{-1})	K_{+1} ($s^{-1} \times M^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	K_D -Wert (nM)
Native SAH-H	0,000457	$2,211 \times 10^4$	0,000145	9,3
NADH-Form	0,000314	$1,266 \times 10^4$	0,00017	23,5
NAD ⁺ -Form	0,00121	$4,782 \times 10^4$	0,00025	5,3

3.2 Konzentrationsabhängige Sättigung

Anhand der Assoziationsversuche wurden für die unterschiedlichen Enzymformen die optimalen Inkubationszeiten ermittelt, die Voraussetzung für die Durchführung der Sättigungsversuche waren. Nun wurden die Sättigbarkeit der Bindung, die maximale Bindungskapazität (B_{max}) und der K_D -Wert als Maß für die Affinität des cAMP an die jeweilige Enzymform bestimmt. Die Versuche wurden mit allen drei Enzymformen durchgeführt. Aus dem Vergleich der Ergebnisse lassen sich Rückschlüsse auf den Einfluss des Kofaktors auf die cAMP-Bindungsstelle ziehen.

3.2.1 Sättigung mit ^3H -cAMP bis 250 nM

Aufgrund vorausgehender Untersuchungen (Kloor et al., 2002) wurden sowohl die native SAH-Hydrolase als auch die NADH-Form zuerst in einem ^3H -cAMP-Konzentrationsbereich von 1 nM bis 250 nM untersucht. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte durch Zugabe von 40 μl 2 mM cAMP, wodurch das ^3H -cAMP um den Faktor 1.000 – 200.000 verdünnt wurde.

Bei keiner Enzymform wurde eine Sättigung erreicht. Die unspezifische Bindung betrug im Durchschnitt nur 2 - 6% der Gesamtbindung. Vermutlich verdrängte der sehr hohe Überschuss an nicht radioaktiv markiertem cAMP auch die unspezifisch gebundenen ^3H -cAMP-Moleküle. In diesem Konzentrationsbereich konnten also weder ein B_{max} - noch ein K_D -Wert bestimmt werden.

Um eine Sättigung der Enzymformen zu erreichen, wurde die ^3H -cAMP-Konzentration bis 500 nM erhöht und die unspezifische Bindung durch 40 μl 1 mM cAMP bestimmt. Das ^3H -cAMP wurde dadurch nur noch auf das 20 – 100.000-fache verdünnt.

3.2.2 Sättigung mit $^3\text{H-cAMP}$ bis 500 nM

Alle drei Enzymformen wurden in einem $^3\text{H-cAMP}$ -Konzentrationsbereich von 1 nM bis 500 nM untersucht.

Bei der nativen SAH-Hydrolase konnte bei 2 von 6 Versuchen, die bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, eine Sättigung erreicht werden (Abb. 17). Das Enzym war auch bei Inkubation über Nacht (18 h) bei 4°C sättigbar (Abb. 19). Die K_D -Werte lagen bei 40 nmol/l für die Inkubation bei Raumtemperatur bzw. 48 nmol/l für die Inkubation des Enzyms bei 4°C .

Die maximale Bindungskapazität betrug bei der Inkubation des Enzyms für 2 Stunden bei Raumtemperatur 337 pmol/mg Protein. Bei der Inkubation über Nacht (18 h) bei 4°C verdoppelte sich die maximale $^3\text{H-cAMP}$ -Bindungskapazität auf 773 pmol/mg Protein. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Die unspezifische Bindung hatte in beiden Fällen einen Anteil von 2 - 14% der Gesamtbindung.

Die Transformation der Daten nach Scatchard lässt die Bildung einer Geraden zu (Abb. 19 und Abb. 21), deren Steigung Auskunft über den K_D -Wert der Bindungsstelle gibt. Das bedeutet, dass die native SAH-Hydrolase lediglich eine einzige Bindungsstelle für cAMP besitzt.

Tab. 11: B_{\max} - und K_D -Werte der nativen SAH-Hydrolase bei $^3\text{H-cAMP}$ -Konzentrationen von 1 nM bis 500 nM

Versuchsbedingungen	K_D (nmol/l)	B_{\max} (pmol/mg Protein)
Inkubation 2 h bei 20°C	$40,1 \pm 4,5$	$336,7 \pm 16,9$
Inkubation 18 h bei 4°C	$47,6 \pm 1,5$	$772,4 \pm 20,8$

Die rekonstituierten Enzymformen der SAH-Hydrolase (NAD^+ -Form und NADH-Form) konnten im $^3\text{H-cAMP}$ -Konzentrationsbereich von 1 nM bis 500 nM nicht gesättigt werden.

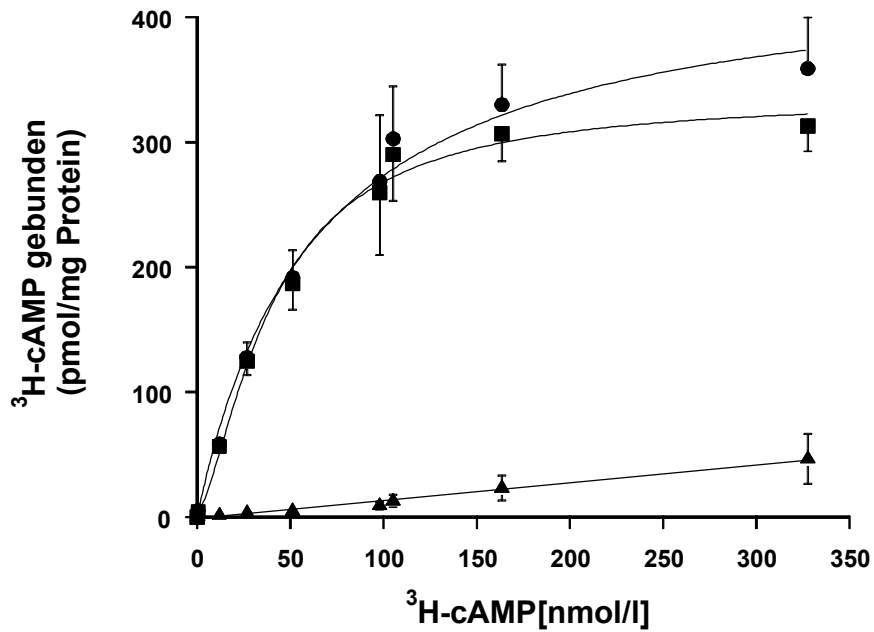


Abb.18: Sättigungsversuche der nativen SAH-Hydrolase mit $^3\text{H-cAMP}$ -Konzentrationen von 1 nM bis 500 nM. Dargestellt sind die Gesamtbindung (●), die spezifische (■) und die unspezifische (▲) Bindung. Inkubation 2 Stunden bei Raumtemperatur (n=2).

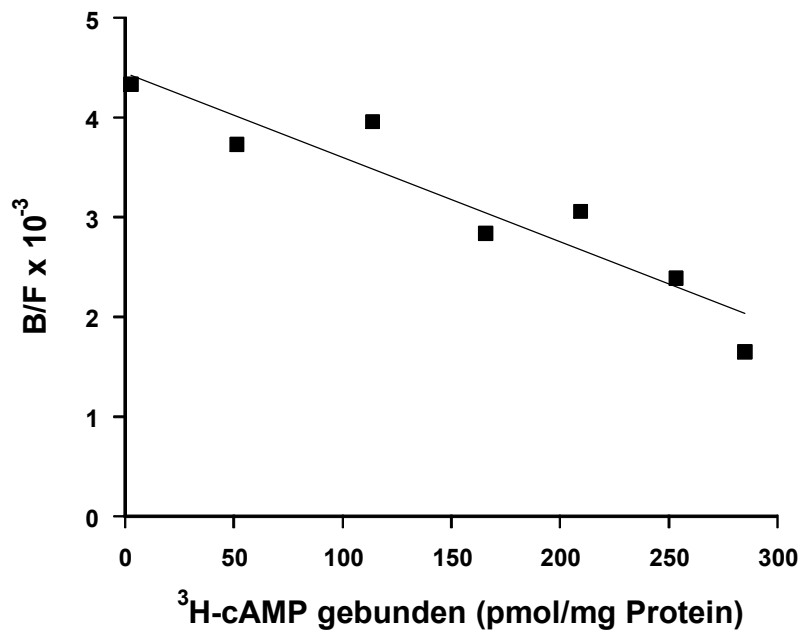


Abb. 19: Transformation der Daten aus Abb. 18 nach Scatchard.

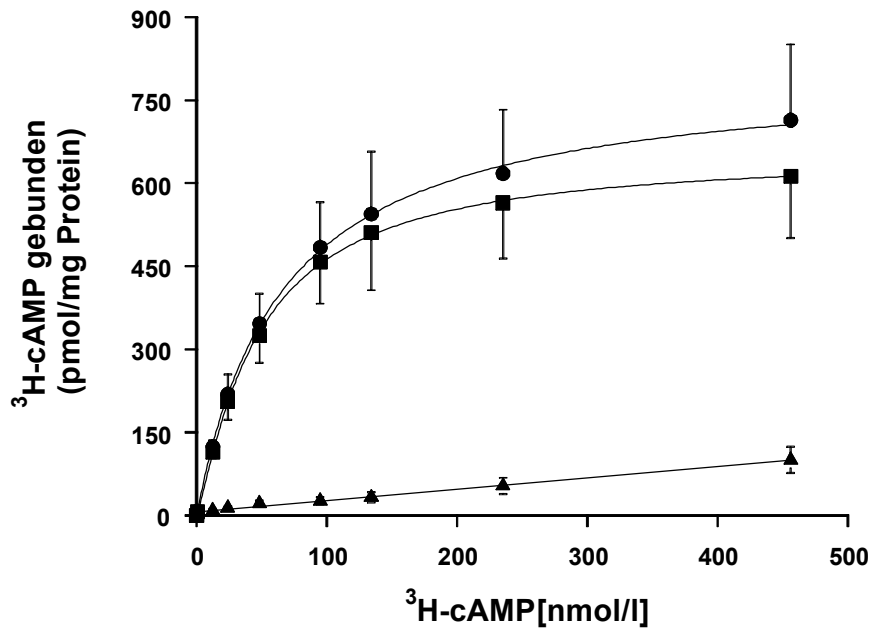


Abb. 20: Sättigungsversuche der nativen SAH-Hydrolase mit $^3\text{H-cAMP}$ -Konzentrationen von 1 nM bis 500 nM. Dargestellt sind die Gesamtbindung (●), die spezifische (■) und die unspezifische (▲) Bindung. Inkubation 18 Stunden bei 4°C (n=3).

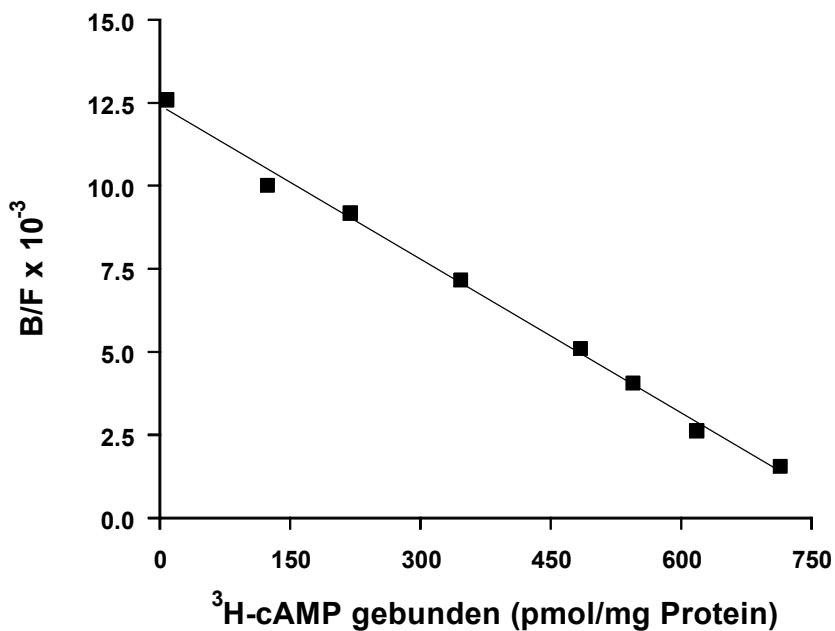


Abb. 21: Transformation der Daten aus Abb. 20 nach Scatchard.

3.2.3 Sättigung mit ^3H -cAMP bis 5000 nM

Um eine Sättigung der NAD^+ -Form und der NADH-Form zu erreichen, wurde die ^3H -cAMP-Konzentration bis 5000 nM erhöht. Um diese Versuche durchführen zu können, wurde der Radioligand um den Faktor 10 mit nicht markiertem cAMP verdünnt.

Der Anteil der unspezifischen Bindung an der Gesamtbindung betrug in diesen Versuchen 10 - 53% und lag damit höher als bei den Versuchen in einem ^3H -cAMP-Konzentrationsbereich von 1 nM bis 500 nM.

Aufgetragen gegen die ^3H -cAMP-Konzentration zeigen die Messergebnisse beider Enzymformen einen hyperbolischen Verlauf der Gesamtbindung und einen linearen Verlauf der unspezifischen Bindung (NADH-Form: Abb. 22; NAD^+ -Form: Abb. 24). Mit der nichtlinearen Regressionsanalyse ließen sich ein K_D -Wert von 100 nM für die NADH-Form und ein K_D -Wert von 364 nM für die NAD^+ -Form berechnen. Die Bindungsstelle der NAD^+ -Form hat also eine weitaus niedrigere Affinität für cAMP.

Beide Enzymformen binden ^3H -cAMP mit der gleichen Kapazität von ca. 1300 pmol/mg Protein (Tab. 12). Die maximale Bindungskapazität ist deutlich höher als bei der nativen SAH-Hydrolase. Die Transformation der Daten nach Scatchard lässt sowohl für die NADH-Form (Abb. 23) als auch für die NAD^+ -Form (Abb. 25) die Bildung einer Geraden zu. Das bedeutet, dass auch diese Enzymformen lediglich eine Bindungsstelle für cAMP besitzen. Eine Änderung des Oxidations- bzw. Reduktionszustandes des Kofaktors verändert die Anzahl der cAMP-Bindungsstellen nicht.

Tab. 12: B_{\max} - und K_D -Werte der NAD^+ -Form und der NADH-Form der SAH-Hydrolase bei ^3H -cAMP-Konzentrationen bis 5000 nM

Enzymform	Versuchsbedingungen	K_D (nmol/l)	B_{\max} (pmol/mg Protein)
NADH	Inkubation 2 h bei 20°C	100,1 ± 12,6	1296,3 ± 37,7
NAD^+	Inkubation 2 h bei 20°C	364,5 ± 42,7	1306,5 ± 51,1

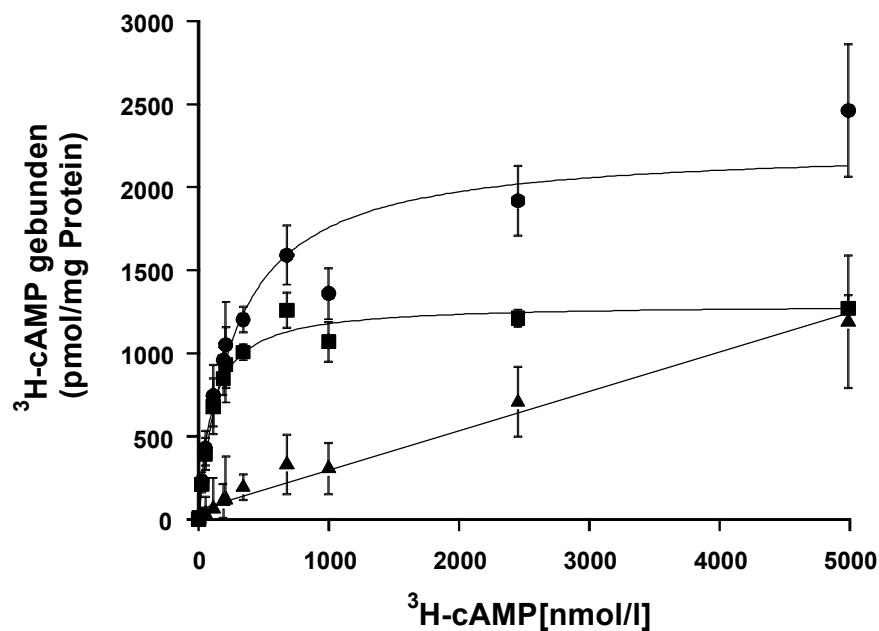


Abb. 22: Sättigungsversuche der NADH-Form der SAH-Hydrolase mit ^3H -cAMP-Konzentrationen von 1 nM bis 5000 nM. Dargestellt sind die Gesamtbindung (●), die spezifische (■) und die unspezifische (▲) Bindung; Inkubation 2 Stunden bei Raumtemperatur (n=4).

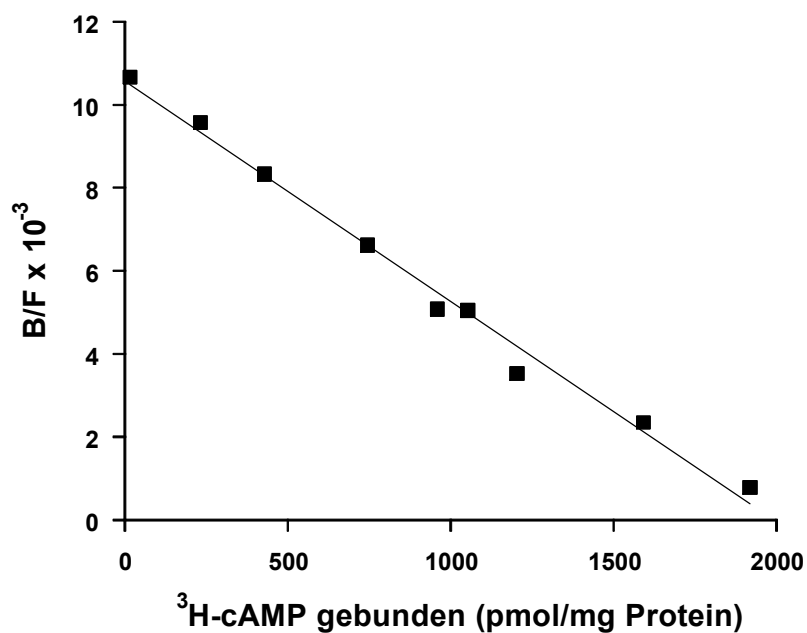


Abb. 23: Transformation der Daten aus Abb. 22 nach Scatchard.

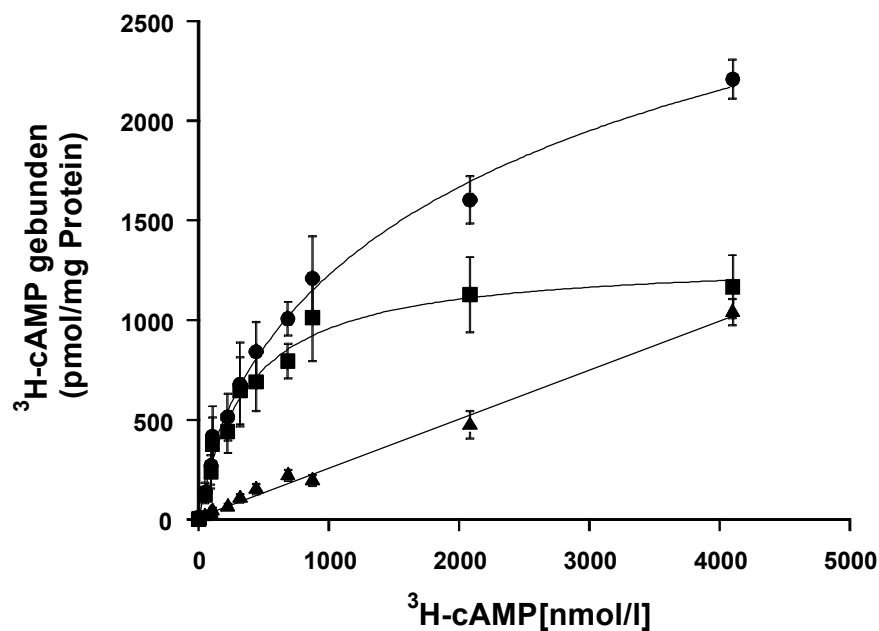


Abb. 24: Sättigungsversuche der NAD⁺-Form der SAH-Hydrolase mit $^3\text{H-cAMP}$ -Konzentrationen von 1 nM bis 5000 nM. Dargestellt sind die Gesamtbindung (●), die spezifische (■) und die unspezifische (▲) Bindung. Inkubation 1 Stunde bei Raumtemperatur (n=4).

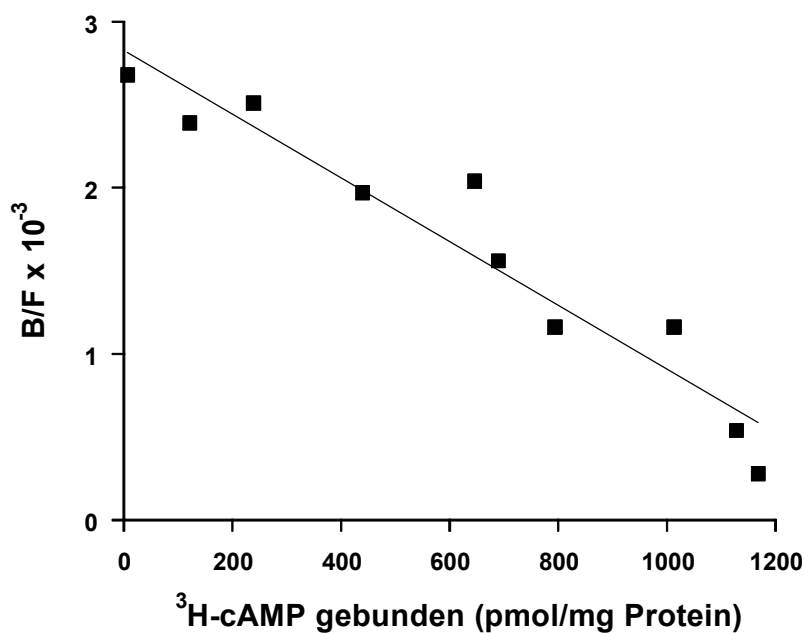


Abb. 25: Transformation der Daten aus Abb. 24 nach Scatchard.

3.3 Hemmungsexperimente mit Adenosin-Analoga

Adenosin-Analoga konkurrieren aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Struktur mit cAMP um dessen Bindungsstelle am Enzym.

Der Effekt dieser Substanzen auf die cAMP-Bindungsstelle aller drei Enzymformen (natives Enzym, NADH-Form und NAD⁺-Form) wurde untersucht. Zur Quantifizierung der Verdrängungsfähigkeit wurde der EC₅₀-Wert bestimmt, welcher derjenigen Konzentration des Kompetitors entspricht, bei der 50% des an das Enzym gebundenen ³H-cAMP verdrängt wurden.

Aus den Übereinstimmungen und Unterschieden der EC₅₀-Werte lassen sich Rückschlüsse auf den Einfluss des Kofaktors NAD⁺/NADH auf die cAMP-Bindungsstelle ziehen.

Die Kompetitoren wurden je nach Strukturmodifikation in Kategorien eingeteilt und die Ergebnisse der Enzymformen miteinander verglichen.

3.3.1 Adenosin und cAMP

Die untersuchten Analoga gehen in ihren Modifikationen von der Struktur des Adenosins aus. Bei cAMP ist der Phosphatrest über eine Esterbindung an C3' und C5' der Ribose gebunden. Es diente bei den vorgestellten Versuchen jeweils als parallel durchgeführte Vergleichskontrolle.

Wie in Abbildung 26 dargestellt, konkurrieren Adenosin und ³H-cAMP bei der nativen SAH-Hydrolase mit gleicher Affinität und gleichen EC₅₀-Werten von 0,05 µM um die cAMP-Bindungsstelle (Tab. 13). Auch bei der NADH-Form konkurrierten Adenosin und ³H-cAMP mit der gleichen Affinität um die cAMP-Bindungsstelle, allerdings mit EC₅₀-Werten von 0,12 µM und 0,11 µM. Bei der NAD⁺-Form war die Affinität des Adenosins an die cAMP-Bindungsstelle geringer als die des cAMP. Der EC₅₀-Wert für Adenosin lag bei 0,75 µM im Vergleich zu 0,18 µM für cAMP

Die Restbindung an nicht verdrängtem ³H-cAMP betrug durchschnittlich 4 - 6%.

Abweichend davon ergab sich ein Wert von 12% für Adenosin und das native Enzym.

In allen Fällen wurde beobachtet, dass cAMP in niedrigen Konzentrationen (von 10^{-9} M bis 10^{-8} M) die ^3H -cAMP-Bindung auf 107 - 130% erhöhte. Bei der NAD^+ -Form fiel dieser Effekt mit einem Anstieg auf 130% am deutlichsten aus, bei der NADH-Form mit einem Anstieg auf 107% am geringsten.

Tab. 13: EC_{50} -Werte (μM) von Adenosin und cAMP

Substanz	Native SAH-Hydrolase	NADH-Form	NAD^+ -Form
cAMP	$0,05 \pm 0,002$	$0,11 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,03$
Adenosin	$0,05 \pm 0,002$	$0,12 \pm 0,006$	$0,74 \pm 0,08$

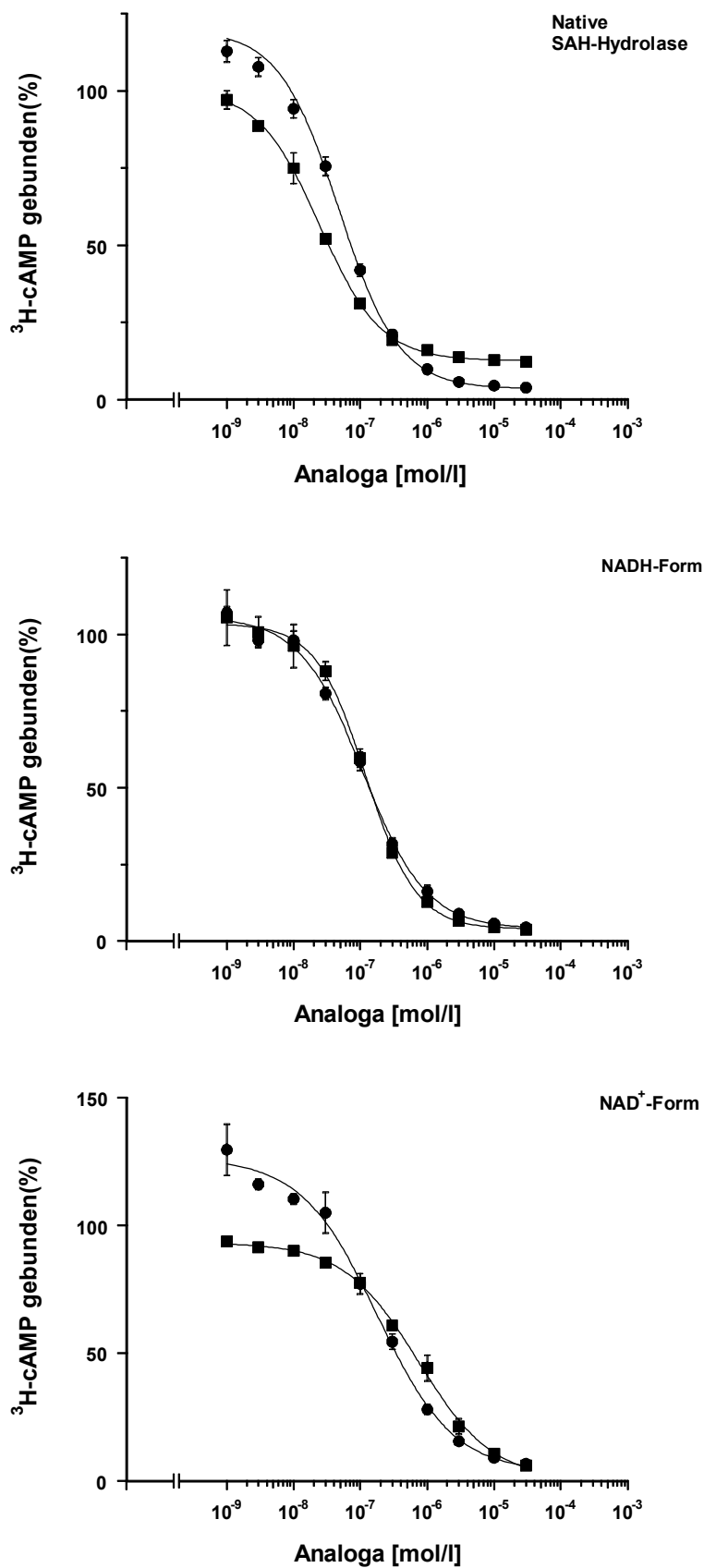


Abb. 26: Verdrängungskurven von cAMP (●; n=9 - 10), Adenosin (■; n=2 - 4).

3.3.2 Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin

Wie aus Abb. 27 hervorgeht, war N6-Methyladenosin der potenteste Kompetitor aus dieser Gruppe.

Bei der nativen SAH-Hydrolase und bei der NADH-Form lagen die EC_{50} -Werte mit 0,09 μM und 0,15 μM in der gleichen Größenordnung wie die Werte von cAMP und Adenosin (Tab. 14). Bei der NAD^+ -Form zeigte sich im Unterschied dazu eine niedrigere Affinität des N6-Methyladenosins an die ^3H -cAMP-Bindungsstelle mit einem EC_{50} -Wert von 0,9 μM . Die Restbindung an nicht verdrängtem ^3H -cAMP fiel bei der nativen Enzymform mit 18% am höchsten aus, bei den beiden anderen Formen lag sie lediglich zwischen 6% (NADH-Form) und 11% (NAD^+ -Form).

Für 2-Chloroadenosin wurden unterschiedliche Ergebnisse bei den drei Enzymformen erzielt. Bei der nativen SAH-Hydrolase und bei der NADH-Form zeigte sich eine eingeschränkte Fähigkeit, cAMP aus seiner Bindungsstelle zu verdrängen mit hohen EC_{50} -Werten von 2,9 μM und 10 μM (Tab. 14). Die Restbindung an nicht verdrängtem ^3H -cAMP betrug 17% bzw. 19%. Bei der NAD^+ -Form konnte erst bei einer Konzentration von 3×10^{-5} M ein Anteil von 45% des gebundenen ^3H -cAMP verdrängt werden. Der EC_{50} -Wert wurde auf $>10^{-4}$ M geschätzt.

Für N^6 -Cyclohexyladenosin (CHA) und das ebenfalls an Position N6 modifizierte R-PIA fanden sich ähnliche Ergebnisse.

Im höchsten Konzentrationsbereich vermochte CHA bei der nativen SAH-Hydrolase bis zu 40% und R-PIA bis zu 28% des gebundenen ^3H -cAMP zu verdrängen (Abb. 27). Auch bei diesen beiden Substanzen wurden die EC_{50} -Werte auf $> 10^{-4}$ M geschätzt. Sowohl bei der NADH-Form als auch bei der NAD^+ -Form fand sich im Gegensatz dazu keinerlei Verdrängung im untersuchten Konzentrationsbereich.

Tab. 14: EC₅₀-Werte (μM) von Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin

Substanz	Native SAH-Hydrolase	NADH-Form	NAD⁺-Form
N6-Methyladenosin	0,09 ± 0,009	0,15 ± 0,01	0,99 ± 0,27
2-Chloroadenosin	2,9 ± 0,46	10 ± 4,5	>100
CHA	> 100	————	————
R-PIA	> 100	————	————

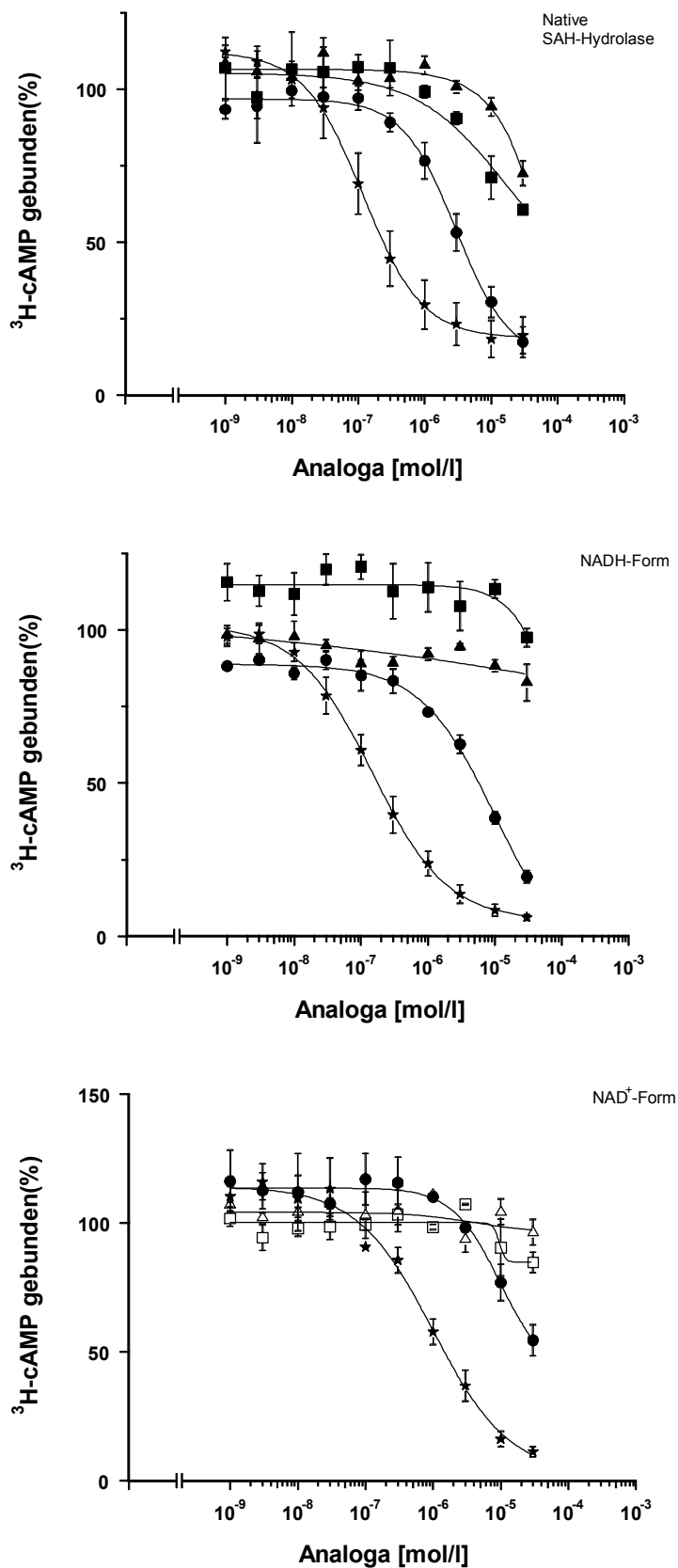


Abb. 27: Verdrängungskurven von N6-Methyladenosin (★; n = 2 - 4), 2-Chloradenosin (●; n=2 - 3), CHA (■/□; n=2), und PIA (▲/△; n=2 -3).

3.3.3 Adenosin-Analoga mit Modifikationen an der Ribose

Die an Position C5' modifizierten Adenosin-Analoga (NECA, CPCA, 5'- Amino-5'- Desoxyadenosin) konkurrierten mit ähnlichen Affinitäten um die ³H-cAMP-Bindungsstelle (Abb. 28). 5'- Amino-5'- Desoxyadenosin erwies sich dabei als der am wenigsten effektive Kompetitor.

Die Verdrängungskurven von NECA und CPCA verliefen nahezu deckungsgleich, ihre EC₅₀-Werte stimmten mit 0,05 µM (natives Enzym), 0,07 µM (NADH-Form) und ca. 0,15 µM (NAD⁺-Form) überein. Sie lagen im selben Größenbereich wie die Werte von cAMP. Der Wert der NAD⁺-Form liegt dabei doppelt so hoch wie bei den beiden anderen Formen.

Die EC₅₀-Werte für 5'- Amino-5'- Desoxyadenosin lagen bei 0,4 µM (natives Enzym), 0,25 µM (NADH-Form) und 0,6 µM (NAD⁺-Form). Auch hier ist der Wert der NAD⁺-Form höher als bei den anderen beiden Formen.

Im Durchschnitt verblieben bei allen drei Substanzen ca. 6% an nicht verdrängter Restbindung. Auffällige Abweichungen davon finden sich für das native Enzym. Für CPCA betrug der Wert 21% ³H-cAMP, bei 5'- Amino-5'- Desoxyadenosin verblieben 16% ³H-cAMP.

2'-Desoxyadenosin und ARA-A sind an Position C2' modifizierte Analoga.

2'-Desoxyadenosin zeigte bei den untersuchten Enzymformen unterschiedliche EC₅₀-Werte von 0,63 µM (natives Enzym), 2,1 µM (NADH-Form) bis 5,8 µM (NAD⁺-Form) (Tab. 15).

Bei der NAD⁺-Form verblieb eine hohe Restbindung an nicht verdrängtem ³H-cAMP von 24% im Vergleich zu 14% (natives Enzym) und 9% (NADH-Form) bei den beiden anderen Enzymformen.

Für ARA-A konnten nur die EC₅₀-Werte für die native Enzymform (7,3 µM) und für die NADH-Form (8,5 µM) bestimmt werden. Bei der höchsten Konzentration von 3×10^{-5} M verblieb in beiden Fällen eine Restbindung an nicht verdrängtem ³H-cAMP von 30%.

Bei der NAD⁺-Form zeigte ARA-A im Gegensatz dazu keinerlei Verdrängung im untersuchten Konzentrationsbereich.

Adenosin-2',3'-Dialdehyd (geöffneter Ribose-Ring) und Adenin (ohne Ribose-Anteil) weichen strukturell am weitesten vom Adenosin ab.

Sie konkurrierten kaum oder nur im hohen Konzentrationsbereich mit $^3\text{H-cAMP}$ um seine Bindungsstelle (Abb. 29).

Adenosin-2',3'-Dialdehyd zeigte bei der nativen Form des Enzyms die beste Verdrängungsfähigkeit. Bis zu 47% des $^3\text{H-cAMP}$ wurden verdrängt. Bei der NADH-Form wurden bis zu 43% des $^3\text{H-cAMP}$ verdrängt. In beiden Fällen konnte der EC_{50} -Wert nur auf $> 10^{-4} \text{ M}$ geschätzt werden.

Bei der NAD^+ -Form zeigte Adenosin-2',3'-Dialdehyd im Gegensatz dazu keinerlei Verdrängung im untersuchten Konzentrationsbereich.

Adenin vermochte im hohen Konzentrationsbereich bei der nativen SAH-Hydrolase und bei der NADH-Form bis zu 40% bzw. 30% zu verdrängen.

Bei der NAD^+ -Form zeigte Adenin keinerlei Verdrängung im untersuchten Konzentrationsbereich. Die EC_{50} -Werte sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Bei der graphischen Darstellung wurden die an Position C5' modifizierten Analoga zusammengefasst (Abb. 28) und die an Position C2' modifizierten Analoga gemeinsam mit Adenin abgebildet (Abb. 29).

Tab. 15: EC_{50} -Werte (μM) der Adenosin-Analoga mit Modifikationen an der Ribose

Substanz	Natives Enzym	NADH-Form	NAD^+ -Form
NECA	$0,05 \pm 0,006$	$0,07 \pm 0,003$	$0,14 \pm 0,01$
CPCA	$0,13 \pm 0,006$	$0,07 \pm 0,006$	$0,16 \pm 0,009$
5'-Amino-5'- Desoxyadenosin	$0,39 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,08$
2'-Desoxyadenosin	$0,63 \pm 0,05$	$2,1 \pm 0,44$	$5,8 \pm 4,3$
ARA-A	$7,3 \pm 4,2$	$8,5 \pm 3,7$	————
Adenosin-2',3'- Dialdehyd	> 100	> 100	————
Adenin	> 100	> 100	————

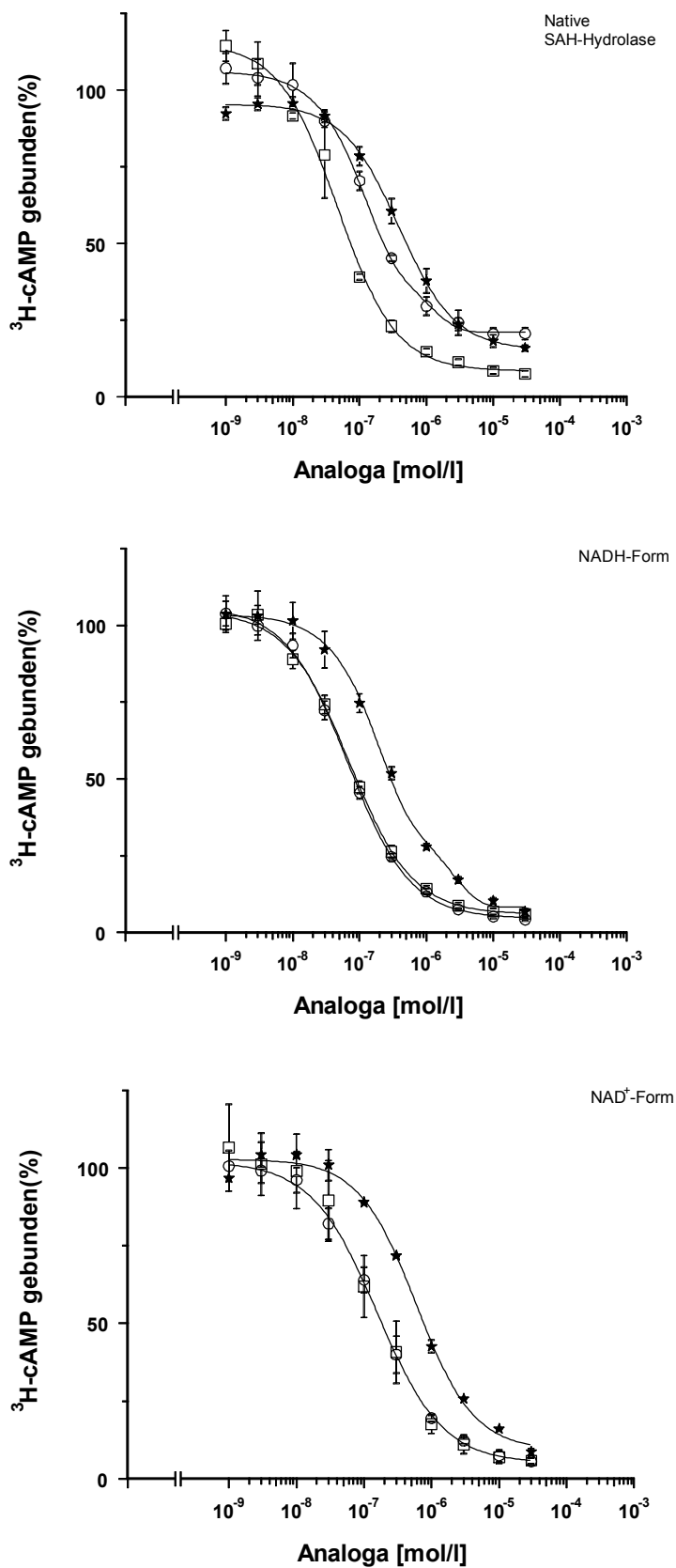


Abb. 28: Verdrängungskurven von NECA (\square ; $n=2$), CPCA (\circ ; $n=2$), und 5'-Amino-5'-Desoxyadenosin (\star ; $n=2$).

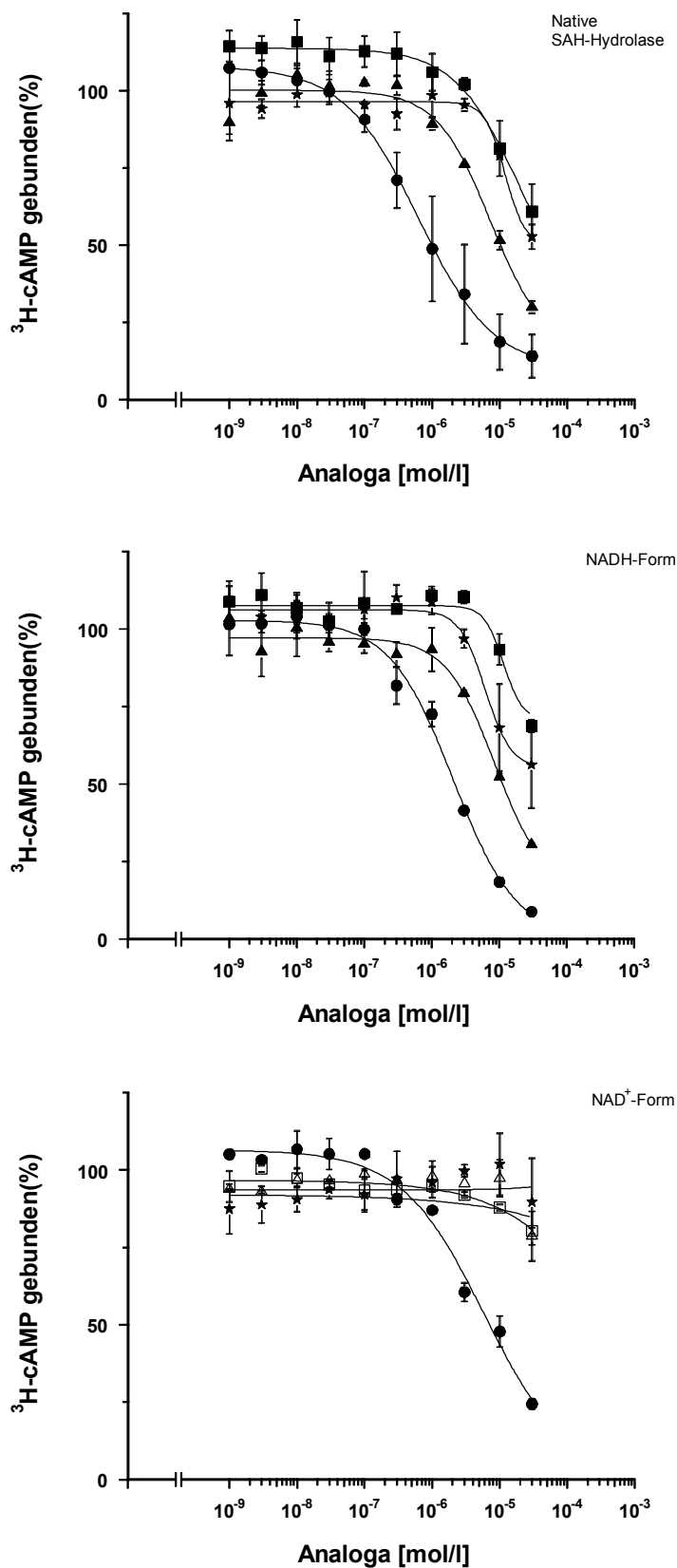


Abb. 29: Verdrängungskurven von 2'-Desoxyadenosin (●/○; n=2), ARA-A (▲; n=2), Adenosin-2',3'-Dialdehyd (★; n=2) und Adenin (■/□; n=2).

3.3.4 Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin und an der Ribose

CGS und die Xanthin-Derivate Theophyllin und DPCPX sind Adenosin-Analoga mit weitgehenden Strukturänderungen.

Keine der Substanzen aus dieser Kategorie zeigte eine Verdrängung von ^3H -cAMP aus seiner Bindungsstelle (Abb. 29). Es konnten somit keine EC_{50} -Werte bestimmt werden.

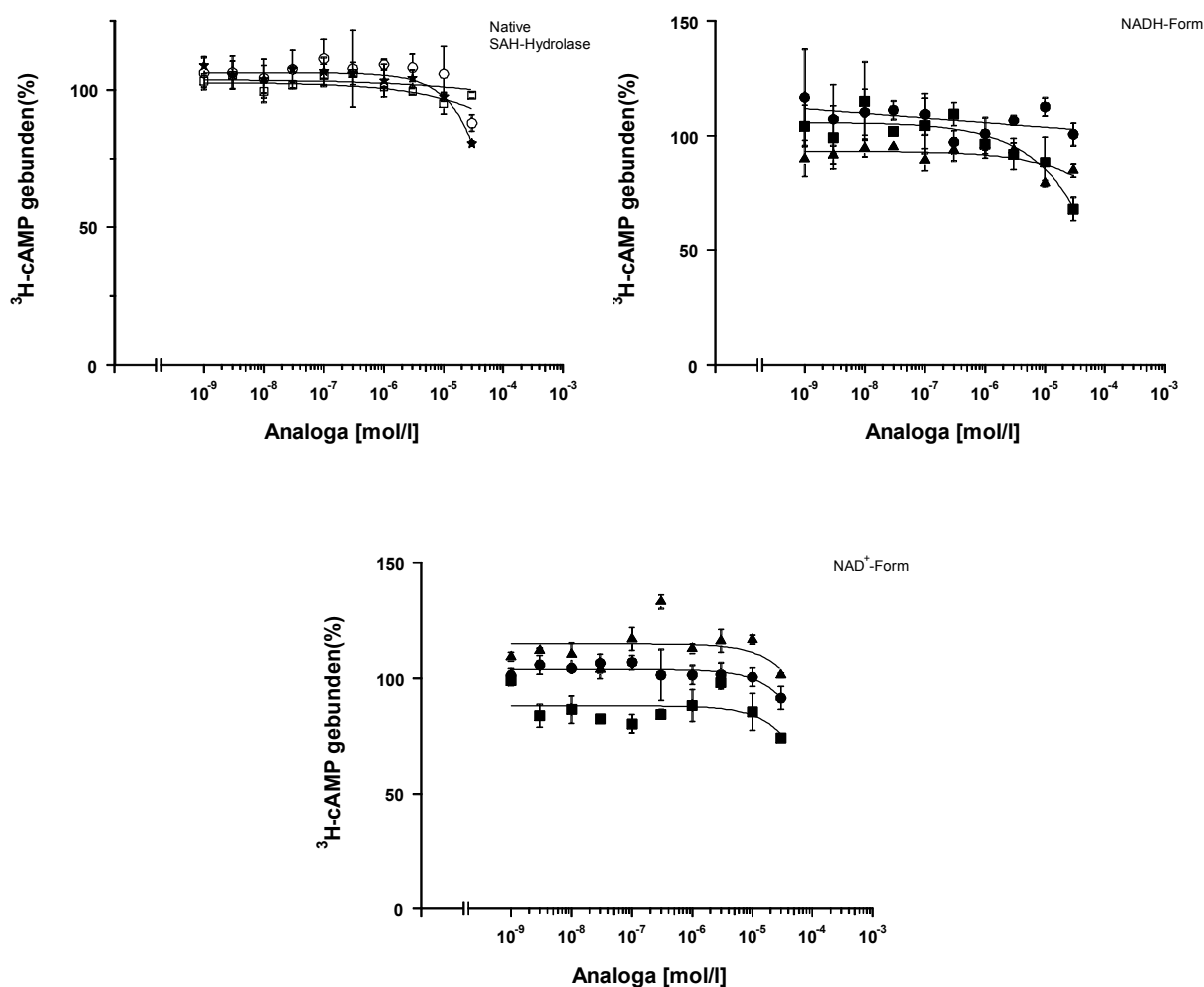


Abb. 30: Verdrängungskurven von Theophyllin (■/□; n=2), DPCPX (●/○; n=2) und CGS (★; n=2).

3.4 Bestimmung der cAMP-Bindungsstellen mittels 8-Azido-³H-cAMP

Um die cAMP-Bindungsstellen der verschiedenen Enzymformen identifizieren zu können, wurden die native SAH-Hydrolase, die NADH- Form und die NAD⁺-Form mit Azido-³H-cAMP markiert. Die Azido-Markierung ist eine durch Licht aktivierbare Gruppe, die durch die Affinität des cAMP an die Bindungsstelle der SAH-Hydrolase bindet. Durch die Photoaktivierung lassen sich sowohl Zeitpunkt als auch der Ort der Reaktion bestimmen. Die so markierten Peptide wurden durch die Kombination von Massenspektrometrie (MALDI) und Elektrospray-Ionisation (ESI) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt. Hierbei wurde der gängige Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren gewählt.

Tab. 16: Aminosäuresequenzen der mittels Azido-³H-cAMP markierten cAMP-Bindungsstellen der verschiedenen Formen der SAH-Hydrolase

Enzymform	Aminosäuresequenz	Markierte Region
Native SAH-Hydrolase	WLNENAVEKVNICKPQV	Trp ³¹⁰ – Val ³²⁵
NAD ⁺ -Form	NAVEKVNICKPQ	Asn ³¹⁴ – Gln ³²⁴
NADH-Form	NAVEKVNICKPQ	Asn ³¹⁴ – Gln ³²⁴

Es wurde nur jeweils nur ein einziges Peptid markiert, das der cAMP-Bindungsstelle entspricht. Alle drei SAH-Hydrolase Formen weisen eine identische cAMP-Bindungsstelle auf. Die unterschiedliche Länge der Peptide ist auf den proteolytischen Verdau zurückzuführen. Die native SAH-Hydrolase wurde mit Endoproteinase Asp-N verdaut, die NAD⁺-Form und die NADH-Form jedoch mit Trypsin. Die Spaltung mit Trypsin führt zu kleineren Peptiden, während die Spaltung mit Endoproteinase Asp-N, Peptide mit einer Länge bis zu 30 Aminosäuren erzeugt. Nur bei der nativen SAH-Hydrolase konnte die

Aminosäure identifiziert werden an die cAMP gebunden hat. Es ist die Aminosäure Tryptophan³¹⁰. Die Instabilität des durch die Photoreaktion erzeugten Cross-link könnte eine Ursache dafür sein, dass die Azido-³H-cAMP markierte Aminosäure bei den anderen beiden Peptiden nicht identifiziert werden konnte. Eine andere Ursache könnte sich auch aus der Spaltung der Peptide ergeben haben.

4 Diskussion

Die SAH-Hydrolase, ein zytoplasmatisches Enzym, ist ein Tetramer und enthält als Kofaktor 1 Molekül NAD pro Untereinheit fest gebunden (Palmer und Abeles, 1979; Abeles et al., 1982). Dieses NAD wird während des Reaktionsmechanismus reduziert und liegt am Ende des Reaktionszyklus wieder in oxidierter Form vor.

Das Enzym bindet sowohl Adenosin als auch cAMP (Hershfield und Kredich, 1978; Saebo und Ueland, 1978; De Gunzburg et al., 1983; Aiyar und Hershfield, 1985; Kloor et al., 2002). Es weist zwei Adenosin-Bindungsstellen mit verschiedenen Affinitäten auf, die abhängig sind vom Verhältnis des Kofaktors NAD^+/NADH (Kloor et al., 2003a).

Das Ziel dieser Arbeit war, die cAMP-Bindungsstelle der SAH-Hydrolase in Abhängigkeit vom Kofaktor NAD^+/NADH zu charakterisieren.

Dazu wurde der Kofaktor nach der von De la Haba et al. (1986) etablierten und in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Methode mit hochmolaren Konzentrationen an ATP, Mg^{2+} und KCl entfernt. Anschließend wurde das Enzym mit reinem NAD^+ bzw. reinem NADH rekonstituiert. Die Charakterisierung der cAMP-Bindungsstellen der drei Enzymformen (native SAH-Hydrolase, NAD^+ -Form, NADH-Form) wurde mittels Bindungsstudien mit dem Radioliganden ^3H -cAMP durchgeführt.

4.1 Zeitabhängige Assoziation und Dissoziation

Das Bindungsverhalten des ^3H -cAMP an die verschiedenen Enzymformen wurde zunächst mit Assoziations- und Dissoziationsversuchen untersucht. Die native SAH-Hydrolase und die NADH-Form zeigten ein ähnliches Assoziations- und Dissoziationsverhalten (s. S. 42/43, Abb. 12 - 15). Beide Enzymformen erreichten bei den Assoziationsversuchen das Reaktionsgleichgewicht nach 120 Minuten. Die cAMP-Bindung folgte einer monophasischen Reaktion.

Die Dissoziationskurven der beiden Enzymformen zeigen einen ähnlichen flachen Verlauf. Bei beiden Formen, der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form, bleibt jedoch nach 240 Minuten Dissoziation eine ^3H -cAMP-Restbindung von 20% der Ausgangsbindung, was auf eine nicht dissoziierbare Bindung des cAMP hinweist.

Bei Untersuchungen der Assoziation und die Dissoziation von cAMP an die native SAH-Hydrolase wurden von Kloor et al. (2002) vergleichbare Ergebnisse beschrieben.

Die Assoziation des ^3H -cAMP an die NAD^+ -Form erfolgte sehr viel schneller (s. S. 44, Abb. 16). Bereits nach 60 Minuten wurde das Reaktionsgleichgewicht erreicht. Dann allerdings sank die Menge des gebundenen ^3H -cAMP wieder ab, was auf eine Instabilität der cAMP-Bindung oder eine Degradation des Enzyms bei Raumtemperatur zurückzuführen ist. Dieselbe Schlussfolgerung wurde in der Doktorarbeit von Lüdtker (2003) gezogen, die bei der Untersuchung der Adenosin-Bindung an die NAD^+ -Form ein vergleichbares Ergebnis erzielte. Die Instabilität der SAH-Hydrolase führten Narayanan und Borchardt (1988) ebenfalls auf das enzymgebundene NAD^+ zurück.

Bereits nach 60 min sind 90% des gebundenen ^3H -cAMP von der NAD^+ -Form dissoziiert und nach 240 min geht die Bindung auf Null zurück. Zum einen kann hierfür auch die Instabilität des Enzyms nach 60 Minuten Vorinkubation verantwortlich gemacht werden. Zum anderen kann es aber auch bedeuten, dass das cAMP mit dieser Enzymform keinen festen Komplex bildet.

Für die Assoziation von Adenosin an die Enzymformen mit definierten NAD^+/NADH -Verhältnissen wies Lüdtker (2003) ebenfalls eine schnellere Gleichgewichtseinstellung bei einem NAD^+ -Gehalt von 90% bzw. 100% nach. Allerdings zeigten in ihren Untersuchungen die Enzymformen mit hohen NADH-Gehalten ein weitaus langsames Assoziations- und Dissoziationsverhalten für Adenosin. Die vollständig reduzierte NADH-Form erreichte das Reaktionsgleichgewicht erst nach 480 Minuten.

Die Ergebnisse der Assoziations- und Dissoziationskinetiken lassen den Schluss zu, dass der an das Enzym gebundene Kofaktor NAD^+/NADH die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit von cAMP an die SAH-Hydrolase beeinflusst. Im Vergleich zur nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form erfolgte die Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes am schnellsten bei 100% NAD^+ -Gehalt des Enzyms.

4.2 Konzentrationsabhängige Sättigung

In einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 500 nM ^3H -cAMP konnte lediglich die native SAH-Hydrolase gesättigt werden. Die Sättigung war sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Inkubation über 18 h bei 4°C zu erreichen. Die NAD^+ -Form und die NADH-Form waren mit diese Konzentrationen nicht sättigbar. Der K_D -Wert für die native SAH-Hydrolase lag bei $40,1 \pm 4,5$ nM (2h/ 20°C) bzw. $47,6 \pm 1,5$ nM (18 h/ 4°C). Die maximale Bindungskapazität wurde mit $337,6 \pm 16,9$ pmol/mg Protein (2 h/ 20°C) bzw. $772,4 \pm 20,8$ pmol/mg Protein (18 h/ 4°C) bestimmt.

Davon abweichende Daten geben Kloor et al. (2002) sowohl für den K_D -Wert als auch die maximale Bindungskapazität der nativen SAH-Hydrolase an. In Sättigungsversuchen bestimmten Kloor et al. (2002) eine hochaffine Bindungsstelle für cAMP mit einem K_D -Wert von $23,1 \pm 1,1$ nM, der gut mit dem berechneten K_D -Wert von 26,5 nM aus den Assoziations- und Dissoziationskonstanten übereinstimmte. Die maximale Bindungskapazität wurde mit $116,6 \pm 3,8$ pmol/mg Protein angegeben. Das Enzym war bereits bei einer ^3H -cAMP-Konzentration von 300 nM gesättigt.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei gleicher Methodik könnte daran liegen, dass mit Proteinen aus unterschiedlichen Reinigungen gearbeitet wurde, die cAMP im unterschiedlichem Ausmaß unspezifisch binden. Kloor et al. (2002) beschrieben eine mit wachsender ^3H -cAMP-Konzentration linear ansteigende unspezifischer Bindung. Die Werte der unspezifischen Bindung erreichten bis zu 20 - 25% der Gesamtbindung.

Dagegen betrug die linear ansteigende unspezifische Bindung in den jetzt durchgeführten Versuchen maximal 2 – 14% der Gesamtbindung. Da die spezifische Bindung aus Gesamtbindung abzüglich der unspezifischen Bindung berechnet wird, könnten höhere Werte der unspezifischen Bindung eine scheinbare Sättigung vortäuschen. Außerdem ließe sich damit auch die höhere spezifische cAMP-Bindung erklären.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in einem unterschiedlichen NAD^+/NADH -Verhältnis der jeweiligen verwendeten nativen SAH-Hydrolase liegen. Die größere maximale Bindungskapazität im Vergleich zu dem von Kloor et al. (2002) ermittelten Wert könnte sich durch einen höheren Anteil an NADH der verwendeten nativen SAH-Hydrolase erklären lassen, da eine längere Inkubationszeit (18 h bei 4°C) und ein dadurch ansteigender NADH-Gehalt des nativen Enzyms (Lüdtke, 2003) zu einer Verdoppelung des maximal gebundenen ^3H -cAMP führte.

Die Angaben über den gebundenen NADH-Anteil der SAH-Hydrolase divergieren in großem Maße. De La Haba et al. (1986) berichteten, dass durchschnittlich 10 – 15% des Kofaktors in der reduzierten Form NADH vorliegen. Andere Quellen geben höhere Werte an mit einem NADH-Anteil von durchschnittlich 21% (Hershfield et al., 1985) oder 43% NADH (Narayanan und Borchardt, 1988). Diese Schwankungen lassen sich dadurch erklären, dass sowohl die Versuchsdurchführung bei Raumtemperatur als auch die Lagerung des Enzyms bei -20°C zu einer Zunahme des NADH-Anteils führen (Lüdtke, 2003).

Kloor et al. (2002) geben für das von ihnen verwendete Protein ein NAD^+/NADH -Verhältnis von 92 – 94% NAD^+ und 6 – 8% NADH an.

Bei den hier vorgestellten Versuchen wurde das NAD^+/NADH -Verhältnis der nativen SAH-Hydrolase nicht bestimmt. Da frisch gereinigte SAH-Hydrolase aus drei verschiedenen Reinigungen eingesetzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der an das verwendete Enzym gebundene NADH-Anteil 8 – 20% ausmachte. Das tatsächliche NAD^+/NADH -Verhältnis der hergestellten NAD^+ -Form und der NADH-Form wurde ebenfalls nicht überprüft, da Kloor et al.

(2003) zeigen konnten, dass das bei der Rekonstitution erzielte Ergebnis mit dem gewünschten NAD^+/NADH -Verhältnis übereinstimmte.

Die Verschiebung des gebundenen Kofaktors NAD^+/NADH hin zu einem höheren NADH-Anteil ist ein zeit- und temperaturabhängiger Prozess (Lüdtke, 2003). Um eine derartige Beeinflussung zu vermeiden, wurden die NAD^+ -Form und die NADH-Form möglichst frisch nach ihrer Herstellung verwendet.

Im Unterschied zur nativen SAH-Hydrolase waren die NAD^+ -Form und die NADH-Form in einem ^3H -cAMP-Konzentrationsbereich bis 500 nM nicht sättigbar. Deshalb wurde die ^3H -cAMP-Konzentration bis 5 μM gesteigert.

Um die Sättigungsversuche durchführen zu können, wurden alle ^3H -cAMP-Lösungen 1:10 mit unmarkiertem cAMP verdünnt.

Sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C waren beide Enzymformen unter diesen Bedingungen sättigbar (s. S. 51/52, Abb. 21 - 24). Die unspezifische Bindung betrug 10 – 53% der Gesamtbindung.

Der K_D -Wert für die NADH-Form lag bei $100,1 \pm 12,6$ nM und für die NAD^+ -Form bei $364,5 \pm 42,7$ nM.

Beide experimentell hergestellten Enzymformen (NAD^+ -Form und NADH-Form) banden ^3H -cAMP mit höheren maximalen Bindungskapazitäten als die native SAH-Hydrolase ($B_{\text{max}} = 336,7 \pm 16,9$ pmol/mg Protein bei 20°C). An die NADH-Form banden maximal $1296,3 \pm 37,7$ pmol ^3H -cAMP/mg Protein. Eine ähnlich hohe Bindungskapazität zeigte die NAD^+ -Form bei Raumtemperatur mit $1306,5 \pm 51,1$ pmol ^3H -cAMP/mg Protein.

Die Transformation der Daten nach Scatchard weist auf eine einzelne Bindungsstelle für cAMP an allen drei untersuchten Enzymformen (native SAH-Hydrolase, NADH-Form, NAD^+ -Form) hin (s. S. 48 - 52, Abb. 19/21/23/25).

Die K_D -Werte für die unterschiedlichen Enzymformen wurden auch als Quotient aus den bei den Assoziations- und Dissoziationsversuchen bestimmten Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} und k_{+1} ermittelt. Der so berechnete K_D -Wert betrug 9,3 nM für die native SAH-Hydrolase, 23,5 nM für die NADH-Form und

5,3 nM für die NAD^+ -Form. Aufgrund vorausgehender Untersuchungen (Kloor et al., 2002) betrug die bei den Assoziations- und Dissoziationsversuchen eingesetzte ^3H -cAMP-Konzentration 20 nM und lag somit für keine der Enzymformen im optimalen Bereich des K_D -Wertes. Der K_D -Wert der nativen SAH-Hydrolase liegt um den Faktor 2, der K_D -Wert der NADH-Form um den Faktor 5 und der K_D -Werte der NAD^+ -Form um den Faktor 18 höher als die eingesetzte ^3H -cAMP-Konzentration von 20 nM. Dieser methodische Fehler könnte die große Abweichung von den mittels nichtlinearer Regressionsanalyse in den Sättigungsversuchen ermittelten K_D -Werten erklären.

In der Literatur findet sich keine Untersuchung der cAMP-Bindungsstellen der SAH-Hydrolase mit definierten NAD^+/NADH -Verhältnissen, aber es gibt unterschiedliche Angaben über den K_D -Wert des Enzyms für cAMP.

Yuh und Tao (1974) geben für das „Adenosin-cAMP-bindende Protein“ aus Kaninchenerythrozyten, das erst später in Bezug zur SAH-Hydrolase gesetzt wurde, einen K_D -Wert von 300 nM für cAMP an. Olsson (1978) bestimmte für dasselbe Protein einen K_D -Wert von 9 nM, der mit dem K_D -Wert der SAH-Hydrolase aus *Dictyostelium discoideum* übereinstimmt (Hohmann et al., 1984; De Gunzburg, 1985). Für ein cAMP-bindendes Protein aus Rindernebennieren, das später als SAH-Hydrolase identifiziert wurde (Døskeland und Ueland, 1982), geben Døskeland und Ueland (1977) einen K_D -Wert von 100 nM an. Untersuchungen der SAH-Hydrolase aus Mäuseleber ergaben einen K_D -Wert von 150 nM (Ueland und Døskeland, 1977) und des Enzyms aus Rindernieren, wie bereits erwähnt, einen K_D -Wert von 23 nM (Kloor et al., 2002).

Der Grund für die beschriebenen unterschiedlichen Affinitäten von cAMP an die SAH-Hydrolase könnte zum einen in der Spezies-Spezifität der SAH-Hydrolase liegen. Zum anderen könnten auch verschiedene NAD^+/NADH -Verhältnisse der untersuchten Enzyme zu unterschiedlichen K_D -Werten führen.

Auch für den K_D -Wert von Adenosin finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben (Yuh und Tao, 1974; Olsson, 1978; Ueland und Døskeland, 1977;

Fujioka und Takata, 1981; Hershfield und Kredich, 1978; Kloor et al., 1996, 2000, 2003a).

Lüdtke (2003) versuchte diese Unterschiede durch verschiedene NAD^+/NADH -Verhältnisse der untersuchten Enzyme zu erklären. Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte erstmals, dass die SAH-Hydrolase zwei Adenosin-Bindungsstellen in Abhängigkeit vom NAD^+/NADH -Verhältnis aufweist (Kloor et al., 2003a). Die native SAH-Hydrolase und die Enzymform, die 50% NAD^+ und 50% NADH gebunden hält, besitzen zwei Bindungsstellen für Adenosin mit K_D -Werten von $9,2 \pm 0,6$ nM und $1,4 \pm 0,1$ μM . Für die hochaffine Adenosin-Bindungsstelle der NADH-Form wurde ein K_D -Wert von $48,3 \pm 2,7$ nM und für die niedrigaffine Adenosin-Bindungsstelle der NAD^+ -Form ein K_D -Wert von $4,9 \pm 0,3$ μM bestimmt.

Dabei fällt auf, dass der K_D -Wert (5 μM) der niedrigaffinen Adenosin-Bindungsstelle der NAD^+ -Form 500 Mal höher liegt als der K_D -Wert (9 nM) der hochaffinen Adenosin-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase.

Der K_D -Wert (360 nM) der cAMP-Bindungsstelle der NAD^+ -Form liegt jedoch im nanomolaren Bereich und unterscheidet sich vom K_D -Wert (40 nM) der nativen SAH-Hydrolase nur um den Faktor 9.

Dieser geringe Unterschied könnte dafür sprechen, dass die verschiedenen Enzymformen der SAH-Hydrolase über eine identische cAMP-Bindungsstelle verfügen. Die Affinität dieser Bindungsstelle für cAMP könnte sich jedoch in Abhängigkeit vom Verhältnis des Kofaktors NAD^+/NADH verändern, da die Reduktion des enzymgebundenen NAD^+ zu NADH einer Konformationsänderung des Enzyms in eine „geschlossene“ Form führt (Palmer und Abeles, 1982; Hu et al. 1999; Kloor et al. 2000).

4.3 Hemmungsexperimente mit Kompetitoren

Hemmungsexperimente mit Adenosin-Analoga, die aufgrund ihrer chemischen Strukturähnlichkeiten mit cAMP und Adenosin um die Bindungsstelle am Enzym konkurrieren, erlauben weitere Rückschlüsse auf den Einfluss des Kofaktors NAD⁺/NADH auf die cAMP-Bindung.

Im folgenden wird näher auf einzelne untersuchten Substanzen eingegangen.

4.3.1 Adenosin und cAMP

Bisher konnte die Frage, ob cAMP und Adenosin an eine identische Bindungsstelle oder an unterschiedliche Bindungsstellen binden, noch nicht eindeutig geklärt werden.

In der Literatur lassen sich sowohl Theorien über eine einzige identische (Aiyar und Hershfield, 1985; Kloor et al., 2002) als auch über mehrere unterschiedliche Bindungsstellen für cAMP und Adenosin finden (Yuh und Tao, 1974; Sudgen und Corbin, 1976; Ueland und Døskeland, 1977 und 1978, Olsson, 1978).

Die von Richter (2000) durchgeführten Hemmungsversuche mit ³H-Adenosin ergaben, dass cAMP mit hoher Affinität und einem EC₅₀-Wert von 120 nM um die hochaffine Adenosin-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase konkurrierte. Bei der NADH-Form verdrängte cAMP das ³H-Adenosin jedoch nicht aus seiner Bindungsstelle.

Die Untersuchungen von Yuh und Tao (1974) hatten gleichfalls ergeben, dass Adenosin mit hoher Affinität um die cAMP-Bindungsstelle konkurrierte, cAMP jedoch ohne Einfluss auf die Adenosin-Bindung blieb. Daraus zogen sie die Schlussfolgerung, dass Adenosin und cAMP an unterschiedliche Bindungsstellen binden, wobei sie für möglich hielten, dass eine der Bindungsstellen nur Adenosin, die andere jedoch beide Moleküle binden könne. Neben dieser Erklärungsmöglichkeit muss aber auch bedacht werden, dass die Inkubationszeit bei ihren Versuchen lediglich 3 Minuten bei 37°C betrug.

Sowohl die cAMP-Bindung als auch die Adenosin-Bindung sind zeit- und temperaturabhängige Prozesse (Kloor et al., 2002 und 2003a). Das Reaktionsgleichgewicht der Adenosin-Bindung bei Raumtemperatur wird sowohl bei der NAD⁺-Form (30 min) als auch bei der nativen SAH-Hydrolase (90 min) (Lüdtke, 2003) schneller erreicht als das Reaktionsgleichgewicht der cAMP-Bindung mit 60 Minuten bzw. 120 Minuten. Die fehlende Verdrängung des Adenosins durch cAMP ließe sich durch eine zu kurze Inkubationszeit erklären. Des weiteren muss bedacht werden, dass bei der nativen SAH-Hydrolase das an beide Bindungsstellen gebundene ³H-Adenosin gemessen wird, cAMP aber nur um eine der beiden Adenosin-Bindungsstellen (Kloor et al., 2003a) konkurriert. Dadurch wird das Ausmaß der Adenosin-Verdrängung durch cAMP unterschätzt.

Bei der Markierung der Bindungsstellen mittels 8-Azido-Derivaten von Adenosin und cAMP schlossen Aiyar und Hershfield (1985) auf eine gemeinsame Bindungsstelle.

Bei der Durchführung von Hemmungsversuchen fanden Kloor et al. (2002) ebenfalls Hinweise auf eine identische Bindungsstelle im nanomolaren Bereich, da Adenosin und cAMP mit der gleichen Affinität und EC₅₀-Werten von 57 nM und 65 nM um die Bindungsstelle an der nativen SAH-Hydrolase konkurrierten. Dieses Ergebnis konnte mit den hier vorgestellten Versuchen bestätigt werden. Sowohl bei der nativen SAH-Hydrolase als auch bei der NADH-Form konkurrierten Adenosin und cAMP mit der gleichen Affinität um die cAMP-Bindungsstelle. Der EC₅₀-Wert beider Substanzen betrug für das native Enzym 50 nM, was gut mit den von Kloor et al. (2002) bestimmten Werten übereinstimmt. Auch bei der NADH-Form verdrängten sich Adenosin und cAMP mit ähnlichen Affinitäten von 120 nM und 110 nM.

Diese Ergebnis könnte ein Hinweis für eine identische cAMP- und Adenosin-Bindungsstelle bei der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form sein.

Die hochaffine Adenosin-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form wurde von Kloor et al. (2003a) mittels Markierung durch 8-Azido-³H-Adenosin im Bereich der NAD⁺-bindenden Domäne des Enzyms lokalisiert.

Bei der NAD^+ -Form war die Affinität des Adenosins an die ^3H -cAMP-Bindungsstelle geringer als die des unmarkierten cAMP. Der EC_{50} -Wert für Adenosin lag bei 750 nM im Vergleich zu 180 nM für cAMP.

Die niedrigaffine Adenosin-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase und der NAD^+ -Form wurde von Kloor et al. (2002) im Bereich des katalytischen Zentrums lokalisiert. Hohmann et al., (1984) beschrieben für die SAH-Hydrolase aus *Dictyostelium discoideum* eine Hemmung der hydrolytischen Reaktion durch cAMP, die jedoch durch Zugabe von NAD^+ reversibel war. Danielyan et al. (1997) fanden heraus, dass cAMP die Aktivität der SAH-Hydrolase aus Rindernieren in der hydrolytischen Richtung um 30% erhöht. Bei der photometrischen Titration konnte jedoch gezeigt werden, dass cAMP die durch Adenosin bedingte Umwandlung von NAD^+ zu NADH konzentrationsabhängig hemmt (Kloor et al., 2003b). Die Bindung des cAMP führt aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe nicht zu einer Reduktion des enzymgebundenen NAD^+ (Hershfield et al., 1985) und bewirkt keine Konformationsänderung der SAH-Hydrolase in eine „geschlossene“ Form. Da cAMP außerdem leicht von der Bindungsstelle der NAD^+ -Form dissoziiert, kann Adenosin auch bei niedrigerer Affinität mit cAMP um die Bindungsstelle konkurrieren. Die Bindung des Adenosins führt zu einer Reduktion des enzymgebundenen NAD^+ zu NADH in einem zeit- und konzentrationsabhängigen Prozess (Palmer und Abeles, 1979; Hershfield et al., 1985; Kloor et al., 2000). Sowohl die eingesetzten Konzentrationen an Adenosin (bis zu 3×10^{-5} M) als auch die Inkubationszeit von 60 Minuten sind ausreichend, um einen großen Anteil des enzymgebundenen NAD^+ zu NADH zu reduzieren. Wie bereits dargelegt, konkurrierte Adenosin bei der NADH-Form aber mit gleicher Affinität mit ^3H -cAMP um die Bindungsstelle.

Vor diesem Hintergrund ist das Ergebnis für die NAD^+ -Form mit Vorbehalt zu interpretieren.

Da der EC_{50} -Wert des cAMP abhängig von der eingesetzten ^3H -cAMP-Konzentration ist, wurde mit Hilfe der Gleichung nach Cheng und Prusoff (1973) die unabhängige Inhibitorkonstante K_i berechnet. Für die native SAH-Hydrolase stimmen der so ermittelte K_i -Wert für cAMP von 33 nM und der in den

Sättigungsversuchen ermittelte K_D -Wert von 40 nM gut überein. Gleiches gilt für den K_i -Wert für cAMP von 92 nM und den K_D -Wert von 100 nM der NADH-Form.

Für die NAD^+ -Form divergieren der K_i -Wert für cAMP von 170 nM und der K_D -Wert von 360 nM. Die Ursache hierfür könnte in der methodischen Vorgehensweise zu finden sein, da die Hemmungsversuche mit einer ^3H -cAMP-Konzentration von 20 nM durchgeführt wurden, die weit unter der optimalen Radioliganden-Konzentration im Bereich des K_D -Wertes lag. Dies muss bei der Interpretation der Daten für die NAD^+ -Form bedacht werden.

4.3.2 Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin

Von den am Adenin modifizierten Substanzen hatte nur das N6-Methyladenosin eine hohe Affinität an die cAMP-Bindungsstelle der drei untersuchten Enzymformen. Der EC_{50} -Werte für die native SAH-Hydrolase betrug 90 nM und bestätigte den von Kloor et al. (2002) bestimmten Wert. Der EC_{50} -Wert der NADH-Form betrug 150 nM, der EC_{50} -Wert der NAD^+ -Form ca. 1 μM .

Analog zu Adenosin induziert das N6-Methyladenosin die Reduktion des enzymgebundenen NAD^+ zu NADH, da es der SAH-Hydrolase als Substrat für die Synthese von S-N6-Methyladenosylhomocystein dient (Hoffman, 1978). Deshalb erlaubt der ermittelte EC_{50} -Wert für die NAD^+ -Form nur begrenzte Rückschlüsse auf die Bindungsstelle.

2-Chloroadenosin konkurrierte bei der nativen SAH-Hydrolase und bei der NADH-Form mit hohen EC_{50} -Werten von 2,9 μM und 10 μM um die ^3H -cAMP-Bindungsstelle. Für die native SAH-Hydrolase bestimmten Kloor et al. (2002) ebenfalls einen hohen EC_{50} -Wert von 7 μM . Bei der NAD^+ -Form konnte erst bei einer Konzentration von 3×10^{-5} M ein Anteil von 45% des gebundenen ^3H -cAMP verdrängt werden. Der EC_{50} -Wert wurde auf $> 10^{-4}$ M geschätzt.

In Konzentrationen von über 100 μM vermochten CHA bei der nativen SAH-Hydrolase bis zu 40% und R-PIA bis zu 28% des gebundenen ^3H -cAMP zu verdrängen. Sowohl bei der NADH-Form als auch bei der NAD^+ -Form fand sich

im Gegensatz dazu keinerlei Verdrängung im untersuchten Konzentrationsbereich.

Richter (2000) untersuchte dieselben Substanzen in ihrer Wirkung auf die native SAH-Hydrolase und die NADH-Form in Hemmungsversuchen mit ^3H -Adenosin, wobei sich das N6-Methyladenosin ebenfalls als einzige Substanz mit hoher Affinität an die Adenosin-Bindungsstelle erwies (EC_{50} -Werte: 90 nM für das native Enzym und 730 nM für die NADH-Form). Für 2-Chloroadenosin konnte nur für die native SAH-Hydrolase ein EC_{50} -Wert von 340 μM bestimmt werden, bei der NADH-Form konkurrierte es nur schwach mit Adenosin. R-PIA konkurrierte mit sehr geringer Affinität und EC_{50} -Werten um 400 μM um die Adenosin-Bindungsstellen der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form. Die Ergebnisse der Hemmungsversuche mit am Adenin modifizierten Adenosin-Analoga stimmen für die cAMP-Bindungsstelle und die Adenosin-Bindungsstelle gut überein und könnten die Annahme einer identischen Bindungsstelle für cAMP und Adenosin an der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form unterstützen.

4.3.3 Adenosin-Analoga mit Modifikationen an der Ribose

Die A_2 -Rezeptor-Agonisten CPCA und NECA wiesen die höchste Affinität an die ^3H -cAMP-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase (0,05 μM) und der NADH-Form (0,07 μM) auf. Für NECA bestimmten Kloor et al. (2002) ebenfalls eine hohe Affinität an die cAMP-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase mit einem EC_{50} -Wert von 0,08 μM .

CPCA und NECA sind keine Substrate der SAH-Hydrolase, sie beeinflussen das enzymgebundene NAD^+ nicht. Für die NAD^+ -Form wurden für diese beiden Substanzen EC_{50} -Werte von 0,16 μM (CPCA) und 0,14 μM (NECA) ermittelt. Diese EC_{50} -Werte stimmen nahezu mit dem EC_{50} -Wert für cAMP (0,18 μM) überein. Das bedeutet, dass die Modifikation in Position 5' durch eine Carboxamido- oder Carboxylgruppe die Affinität an die cAMP-Bindungsstelle der SAH-Hydrolase nicht beeinflusst.

Diese Modifikation vermindert auch die Affinität an die Adenosin-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form nur gering (Richter, 2000).

Diese Übereinstimmung könnte als weiteres Indiz für eine identische Bindungsstelle für cAMP und Adenosin der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form gewertet werden.

Das ebenfalls an Position C5' modifizierte Adenosin-Analogon 5'-Amino-5'-Desoxyadenosin konkurrierte mit niedrigerer Affinität um die cAMP-Bindungsstelle aller drei untersuchter Enzymformen. Die EC_{50} -Werte lagen aber immer noch im nanomolaren Bereich mit 0,4 μM (natives Enzym), 0,25 μM (NADH-Form) und 0,6 μM (NAD⁺-Form). Die Verdrängungskurven verliefen monophasisch, was auf eine einzelne Bindungsstelle hinweist. In Hemmungsversuchen mit ³H-Adenosin zeigte die Verdrängungskurve dieser Substanz bei der nativen SAH-Hydrolase einen biphasischen Verlauf, die EC_{50} -Werte der beiden Bindungsstellen wurden mit 0,1 μM und 100 μM bestimmt (Richter, 2000). Die Bindung von ³H-Adenosin an die NADH-Form vermochte 5'-Amino-5'-Desoxyadenosin bei monophasischem Kurvenverlauf ganz zu unterdrücken, der EC_{50} -Wert lag jedoch bei 3,8 μM (Richter, 2000)

2'-Desoxyadenosin ist ein endogen vorkommendes physiologisches Abbauprodukt im DNA-Stoffwechsel. Es konkurrierte mit niedriger Affinität und einem EC_{50} -Wert von 0,63 μM um die cAMP-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase. Im Vergleich zu Adenosin bewirkt das Fehlen der OH-Gruppe an Position C2' eine Affinitätsverminderung an die cAMP-Bindungsstelle um eine Zehnerpotenz. Für die Adenosin-Bindungsstelle wird die Affinität sogar um zwei Zehnerpotenzen verringert (Richter, 2000). Bei der NADH-Form verblieb bei einem hohen EC_{50} -Wert von 2,1 μM eine niedrige ³H-cAMP-Restbindung von lediglich 9%, die bei der NAD⁺-Form mit 24% weitaus höher lag.

2'-Desoxyadenosin inaktiviert die SAH-Hydrolase in einem irreversiblen zeitabhängigen Prozess. Der inaktivierende Mechanismus beinhaltet die irreversible Reduktion des enzymgebundenen NAD⁺ zu NADH (Abeles et al., 1982). Vor diesem Hintergrund ist der für die NAD⁺-Form ermittelte EC_{50} -Wert von 5,8 μM mit Vorbehalt zu interpretieren.

ARA-A, ein irreversibler Inaktivator der SAH-Hydrolase (Helland und Ueland, 1982), unterscheidet sich von Adenosin nur durch die nach oben weisende Hydroxylgruppe an der Position C2' des Zucker-Anteils. Diese Modifikation bewirkt im Vergleich zu Adenosin einen Affinitätsverlust an die ^3H -cAMP-Bindungsstelle um mehr als 2 Zehnerpotenzen. Die Auswirkung auf die cAMP-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase (EC_{50} -Wert $7,3 \mu\text{M}$) und der NADH-Form (EC_{50} -Wert $8,5 \mu\text{M}$) ist dabei nahezu identisch. Bei der höchsten Konzentration von $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ verblieb in beiden Fällen eine Restbindung an nicht verdrängtem ^3H -cAMP von 30%. Dies könnte einen weiteren Beleg für eine identische cAMP-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form darstellen. Bei Hemmungsversuchen mit ^3H -Adenosin band ARA-A mit einer im Vergleich zu Adenosin um den Faktor 10^3 verminderten Affinität an die native SAH-Hydrolase und die NADH-Form (Richter, 2000). Der Austausch der Ribose durch Arabinose hat folglich dieselbe Auswirkung auf die cAMP- und Adenosin-Bindungsstellen der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form. Dies könnte als ein Indiz für eine identische Bindungsstelle für cAMP und Adenosin an diesen beiden Enzymformen gewertet werden.

Bei der NAD^+ -Form zeigte ARA-A im Gegensatz dazu keinerlei Verdrängung im untersuchten Konzentrationsbereich.

Adenosin-2',3'-Dialdehyd (geöffneter Ribose-Ring) und Adenin (ohne Ribose-Anteil) weichen strukturell am weitesten vom Adenosin ab. Beide Substanzen konkurrierten nur im hohen Konzentrationsbereich ($> 100 \mu\text{M}$) mit ^3H -cAMP um seine Bindungsstelle an der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form. Adenosin-2',3'-Dialdehyd verdrängte bis zu 47% des ^3H -cAMP bei der nativen SAH-Hydrolase und bis zu 43% bei der NADH-Form, die EC_{50} -Werte für beide Enzymformen konnten jedoch nur auf $> 100 \mu\text{M}$ geschätzt werden. Im Gegensatz dazu bestimmte Kloor et al. (2002) für die cAMP-Bindungsstelle der native SAH-Hydrolase einen EC_{50} -Wert von $9,3 \mu\text{M}$. Adenosin-2',3'-Dialdehyd ist ein potenter, irreversibler Hemmstoff der SAH-Hydrolase (Chiang, 1998). Richter (2000) beobachtete eine Steigerung der Adenosin-Bindung an die hochaffinen Adenosin-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase um 400% bei einer Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentration von $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ und versuchte

dieses Phänomen durch eine Reduktion des enzymgebundenen NAD^+ und eine damit einhergehende Erhöhung der Adenosin-Bindungskapazität zu erklären. Bei höheren Konzentrationen von $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ bis 10^{-3} M erfolgte bei der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form eine gleichartige Verdrängung des Adenosins bis auf 1% (Richter, 2000). In den hier vorgestellten Versuchen wurde keine vergleichbare Erhöhung der cAMP-Bindung beobachtet. Dies könnte als Hinweis für unterschiedliche cAMP- und Adenosin-Bindungsstellen der nativen SAH-Hydrolase gewertet werden, weil die NADH-Form bei den Sättigungsversuchen ebenfalls mit höherer maximaler Bindungskapazität band. Es wäre aber auch möglich, dass sich die cAMP-Bindungskapazitäten dieser beiden Enzymformen bei niedrigen $^3\text{H-cAMP}$ -Konzentrationen nicht unterscheiden, da die native SAH-Hydrolase und die NADH-Form bei den Assoziations- und Dissoziationsversuchen, die wie die Hemmungsversuche mit einer $^3\text{H-cAMP}$ -Konzentration von 20 nM durchgeführt wurden, gleich hohe Ausgangswerte aufwiesen.

Möglicherweise ist die Reduktion des enzymgebundenen NAD^+ zu NADH durch Adenosin-2',3'-Dialdehyd auch ein zeitabhängiger Prozess. Auf die cAMP-Bindungsstelle der NAD^+ -Form, die 1 Stunde inkubiert wurde, hatte Adenosin-2',3'-Dialdehyd keinerlei Wirkung. Da bei der NADH-Form zumindest ein Anteil des gebundenen $^3\text{H-cAMP}$ verdrängt wurde, könnte man bei einer Reduktion des NAD^+ ein vergleichbares Ergebnis für die NAD^+ -Form erwarten.

Adenin ist ein kompetitiver Hemmstoff der SAH-Hydrolase, die in der Literatur angegebenen K_i -Werte variieren von $3 \mu\text{M}$ (Chiang, 1998) über $9 \mu\text{M}$ (Kim et al 1983) bis hin zu $15 \mu\text{M}$ (Kloor et al., 1996).

Adenin vermochte im hohen Konzentrationsbereich bei der nativen SAH-Hydrolase und bei der NADH-Form bis zu 40% bzw. 30% zu verdrängen. Die EC_{50} -Werte der beiden Enzymformen konnten jedoch lediglich auf $> 100 \mu\text{M}$ geschätzt werden. Im Gegensatz dazu ermittelte Kloor et al. (2002) einen EC_{50} -Wert von $11 \mu\text{M}$ für die native SAH-Hydrolase. An die Adenosin-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase (EC_{50} -Wert $20 \mu\text{M}$) und der NADH-Form (EC_{50} -Wert $> 100 \mu\text{M}$) hatte Adenin eine geringe Affinität (Richter, 2000). Adenin bindet

also sowohl an die cAMP- als auch an die Adenosin-Bindungsstelle mit sehr niedriger Affinität, was auf eine identische Bindungsstelle an der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form hinweisen könnte. Auf die cAMP-Bindungsstelle der NAD⁺-Form hatte Adenin keinerlei Wirkung.

4.3.1 Adenosin-Analoga mit Modifikationen am Adenin und an der Ribose

CGS ist ein A₂-Rezeptor-Agonist mit sehr hoher Affinität an A_{2A}-Rezeptoren (Müller und Scior, 1993). Die beiden potenten A₁-Rezeptor-Antagonisten Theophyllin und DPCPX sind Xanthin-Derivate, die keinen Ribose-Anteil besitzen und am Purinring modifiziert sind. Diese Substanzen waren bei allen untersuchten Enzymformen nicht in der Lage, ³H-cAMP aus seiner Bindungsstelle zu verdrängen. Auf die Adenosin-Bindungsstelle der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form hatten sie ebenfalls keinen Einfluss (Richter, 2000).

Die übereinstimmenden Ergebnisse der Hemmungsversuche könnten auf die Gleichheit der Bindungsstellen der nativen SAH-Hydrolase und der NADH-Form hinweisen, eine eindeutige Aussage kann aus diesen Untersuchungen jedoch nicht gemacht werden. Im Vergleich der drei Enzymformen ergaben sich bei allen Substanzen die niedrigsten Affinitäten für die NAD⁺-Form in Übereinstimmung mit der niedrigen Affinität, die bei den Sättigungsexperimenten ermittelt worden war.

Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass die NAD⁺-Form der SAH-Hydrolase eine andere cAMP-Bindungsstelle aufweist als die beiden anderen Enzymformen.

4.4 Bestimmung der cAMP-Bindungsstelle mittels 8-Azido-³H-cAMP

Die Bestimmung der cAMP-Bindungsstelle der SAH-Hydrolase mittels 8-Azido-³H-cAMP bestätigte die Ergebnisse der Bindungsstudien, die auf eine singuläre Bindungsstelle der SAH-Hydrolase für cAMP hindeuteten. Alle drei untersuchten Enzymformen weisen die gleiche Bindungsstelle auf, die in der Region Trp³¹⁰ – Val³²⁵ bzw. Asn³¹⁴ – Gln³²⁴ liegt.

Die SAH-Hydrolase ist ein Tetramer, jede Untereinheit besteht aus drei Teilen, der katalytischen Domäne (AS 1 - 181 und 352 - 402), der NAD⁺-bindenden Domäne (AS 182 - 351) und der C-terminalen Domäne (AS 403 - 431) (Hu et al., 1999). Demnach ist das markierte Peptid in der NAD⁺-bindenden Domäne lokalisiert.

Frühere enzymkinetische Untersuchungen mit cAMP haben gezeigt, dass die Aktivität der SAH-Hydrolase in Richtung der Hydrolyse in Anwesenheit von cAMP konzentrationsabhängig, gesteigert werden konnte (Danielyan et al., 1997). Durch die Lokalisation der cAMP-Bindungsstelle in der NAD⁺-bindenden Domäne lässt sich erklären warum die Bindung von cAMP an die SAH-Hydrolase die Aktivität des Enzyms beeinflusst. Die Bindung von cAMP an die SAH-Hydrolase verändert das Enzym in seiner Konformation dahingehend, dass es das Substrat SAH schneller umsetzt.

Bei der Bestimmung der Adenosin-Bindungsstelle mittels 8-Azido-³H-Adenosin wurden die native SAH-Hydrolase und die NADH-Form in der Region Asp³⁰⁷ – Val³²⁵ markiert (Kloor et al., 2003a), die mit der jetzt ermittelten 8-Azido-³H-cAMP-Bindungsstelle gut übereinstimmt. An diese Stelle der SAH-Hydrolase bindet Adenosin mit hoher Affinität ($K_D=6,5 \pm 0,3$ nM bzw. $K_D=48,3 \pm 2,7$ nM). Das bedeutet, dass die hochaffine Bindungsstelle sowohl für Adenosin als auch für cAMP nur dann vorhanden ist, wenn der Kofaktor NAD im reduzierten Zustand vorliegt. Dieses Ergebnis erklärt auch, warum die NAD⁺-Form der SAH-Hydrolase cAMP mit niedrigerer Affinität bindet ($K_D= 300$ nM).

Die Bindungsstelle der SAH-Hydrolase hat dabei eine unterschiedliche Bedeutung für die beiden Metabolite. Während die Bindung von Adenosin an

die hochaffine Stelle der nativen SAH-Hydrolase als Adenosin-Speicher betrachtet werden kann, beeinflusst die Bindung von cAMP das Enzym in seiner Aktivität.

Bereits 1985 schlossen Aiyar und Hershfield aus ihren Versuchen mit Azido-Adenosin und Azido-cAMP auf eine gemeinsame Bindungsstelle für Adenosin und cAMP, während durch die Eigenschaft der SAH-Hydrolase, einen Teil des Adenosins fest zu binden, lediglich eine separate cAMP-Bindungsstelle vorgetäuscht wird. Yaun und Borchardt (1995) wiesen nach Markierung der humanen SAH-Hydrolase aus Plazenta mit 8-Azido-³H-Adenosin zwei Peptide Val¹⁷⁵ – Lys¹⁸⁶ und Val³¹⁹ – Arg³²⁷ nach. Während das eine Peptid (Val¹⁷⁵ – Lys¹⁸⁶) der von Hu et al. (1999) beschriebenen katalytischen Domäne zuzuordnen ist, befindet sich das andere Peptid (Val³¹⁹ – Arg³²⁷) in der NAD⁺-bindenden Domäne der SAH-Hydrolase. Das bedeutet, dass unabhängig von der Herkunft des untersuchten Enzyms, Adenosin, aber auch cAMP an dieselbe Stelle am Enzym binden. Die Bedeutung dieser Adenosin bzw. cAMP markierten Sequenzen für die Funktion des Enzyms bedarf weiterer Untersuchungen. Darüber hinaus muss die physiologische Bedeutung dieser cAMP-Bindungsstelle in Hinblick auf die Regulation der SAH-Hydrolase weiter geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Das zytoplasmatische Enzym SAH-Hydrolase ist ein Tetramer und katalysiert die reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und Homocystein. Jede Untereinheit der SAH-Hydrolase enthält fest gebundenes NAD^+ , das als Kofaktor an der Reaktion beteiligt ist. Das Enzym bindet sowohl cAMP als auch Adenosin, für das es zwei Bindungsstellen mit verschiedenen Affinitäten aufweist, die abhängig sind vom Verhältnis des Kofaktors. In der vorliegenden Arbeit wurde das Bindungsverhalten von cAMP an die SAH-Hydrolase in Abhängigkeit vom Kofaktor NAD^+/NADH mit Hilfe von Bindungsstudien untersucht. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Der an das Enzym gebundene Kofaktor NAD^+/NADH beeinflusst die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit von cAMP an die SAH-Hydrolase. Die NAD^+ -Form erreichte nach 60 min das Gleichgewicht, während die native SAH-Hydrolase und die NADH-Form 120 min bis zur Einstellung des Gleichgewichts benötigten.
2. Bei den Sättigungsversuchen wurde für die native SAH-Hydrolase ein K_D -Wert von 40 nM und eine maximale ^3H -cAMP-Bindungskapazität von 337 pmol/mg Protein bestimmt. Die K_D -Werte der NADH-Form und der NAD^+ -Form betragen 100 nM und 364 nM, die ermittelte maximale ^3H -cAMP-Bindungskapazität lag bei 1300 pmol/mg Protein für beide Enzymformen. Die Transformation der Daten nach Scatchard weist auf eine einzige cAMP-Bindungsstelle an allen untersuchten Enzymformen hin.
3. Die untersuchten Adenosin-Analoga zeigten in den Hemmungsversuchen die gleiche Affinität an die native SAH-Hydrolase und an die NADH-Form. Bei der NAD^+ -Form wiesen alle Substanzen deutlich niedrigere Affinitäten auf.
4. Bei der Markierung mittels 8-Azido- ^3H -cAMP wiesen die native SAH-Hydrolase, die NAD^+ -Form und die NADH-Form eine identische cAMP-Bindungsstelle auf, die im Bereich der NAD-bindenden Domäne lokalisiert wurde.

6 Literaturverzeichnis

Abeles, R. H., Fish, S., Lapinskas, B.:
S-adenosylhomocysteinase: Mechanism of inactivation by 2'-deoxyadenosine and interaction with other nucleosides.
Biochemistry 21: 5557 - 5562 (1982).

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).

Altschuler, D. L., Peterson, S. N., Ostrowski, M. C., Lapetina, E. G.:
Cyclic AMP-dependent activation of Rap 1b.
J. Biol. Chem. 270: 10373 - 10376 (1995).

Altschuler, D.L., Ribeiro-Neto, F.:
Mitogenic and oncogenic properties of small G Protein Rap 1b.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7475 - 7479 (1998).

Aranow, L.:
Reversal of adenine toxicity by pyrimidine nucleosides.
Biochim. Biophys. Acta 47: 184 - 185 (1961).

Axelrod, J., Tomchick, R.:
Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols.
J. Biol. Chem. 233: 702 - 705 (1958).

Banerjee, A. K.:
5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids.
Microbiol. Rev. 44: 175 - 205 (1980).

Bestor, T. H.:
The DNA methyltransferases of mammals.
Hum. Mol. Gen. 9: 2395 - 2402 (2000).

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).

Brown, D. D., Tomchick, R., Axelrod, J.:
The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme.
J. Biol. Chem. 234: 2948 - 2950 (1959).

Boyes, J., Bird, A.:
DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methylated CpG binding protein.
Cell 64: 1123 - 1134 (1991).

Butcher, R. W., Sutherland, E. W.:
Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials: purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine.
J. Biol. Chem. 237: 1244 - 1250 (1962).

Bylund, D. B., Toews, M. L.:
Radioligand binding methods: practical guide and tips.
Am. J. Physiol. 265: 421 - 429 (1993).

Cantoni, G. L.:
The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate.
J. Am. Chem. Soc. 74: 2942 - 2943 (1952).

Cantoni, G. L., Scarano, E.:
The formation of S-adenosylhomocysteine in enzymatic transmethylation reactions.
J. Am. Chem. Soc. 76: 4744 (1954).

Cantoni, G. L.:
Biological methylation: selected aspects.
Annu. Rev. Biochem. 44: 435 - 451 (1975).

Cantoni, G.L., Richards, H.H., Chiang, P.K.:
Inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase and their role in the regulation of biological methylation.
In: Transmethylation ed. by Usdin, E., Borchardt, R. T., Creveling, C. R.
Elsevier North Holland, New York: 155 - 164 (1979).

Chambaut A. M., Leray, F., Hanoune J.:
Relationship between cyclic AMP dependent protein kinase(s) and cyclic AMP binding protein(s) in rat liver.
FEBS Letters 15: 328 - 334 (1971).

Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., Jaenisch, R.:
DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates.
Nature 395: 89 - 93 (1998).

Cheng, Y., Prusoff, W. H.:
Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction.
Biochem. Pharmacol. 22: 3099 - 3108 (1973).

Chiang, P. K., Richards, H. H., Cantoni, G. L.:
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase: analogues of S-adenosyl-L-homocysteine as potential inhibitors.
Mol. Pharmacol. 13: 939 - 947 (1977).

Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., McCann, P. P.:
S-Adenosylmethionine and methylation.
FASEB J. 10: 471 - 480 (1996).

Chiang, P. K.:
Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase.
Pharmacol. Ther. 77: 115 - 134 (1998).

Clarke, S.:
Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues.
Annu. Rev. Biochem. 61: 355 - 386 (1992).

Clarke, S., Banfield, K.:
S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases
In: Homocysteine in health and disease, ed. by Carmel, R., Jacobsen, D.W.,
Cambridge University Press (2001).

Constancia, M., Pickard, B., Kelsey, G., Reik, W.:
Imprinting mechanisms.
Genet. Res. 8: 881 - 900 (1998).

Cools, M., De Clercq, E.:
Influence of S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors on S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine pool levels in L929 cells.
Biochem. Pharmacol. 40: 2259 - 2264 (1990).

Coulter-Karis, D. E., Hershfield, M. S.:
Sequence of full length cDNA for human S-adenosylhomocysteine hydrolase.
Ann. Hum. Genet. 53: 169 - 175 (1989).

Danielyan, L., Kloor, D., Fuchs, S., Osswald, H.:
Binding of cAMP to a preparation of S-adenosylhomocysteine hydrolase from bovine kidney and influence of cAMP on enzyme activity.
Biol. Chem. 378: 174 (1997).

De Clercq, E.:
S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as broad-spectrum antiviral agents.
Biochem. Pharmacol. 36: 2667 - 2575 (1987).

De Gunzburg, J., Veron, M.:
Intracellular adenosine 3',5'-phosphate binding proteins in *Dictyostelium discoideum*: Partial purification and characterization in aggregation competent cells.

Biochemistry 20: 4547 - 4554 (1981).

De Gunzburg, J., Hohman, R., Part, D., Veron, M.:
Evidence that a cAMP binding protein from *Dictyostelium discoideum* carries S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase activity.

Biochimie 65: 33 - 41 (1983).

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 (1958).

De La Haba, G., Agostini, S., Bozzi, A., Merta, A., Unson, C., Cantoni, G. L.:
S-adenosylhomocysteinase: Mechanism of reversible and irreversible inactivation by ATP, cAMP and 2'-desoxyadenosine.

Biochemistry 25, 8337 - 8342 (1986).

De Rooij, J., Zwartkruis, F. J. T., Verheijen, M. H. G., Cool, R. H., Nijman, S. M. B., Wittinghofer, A., Bos, J. L.:

Epac is a Rap 1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP.:

Nature 396: 474 - 477 (1998).

Døskeland, S. O., Ueland, P. M.:

A cAMP receptor from mouse liver whose binding capacity is enhanced by Mg⁺⁺-ATP.

Biochim. Biophys. Res. Com. 66: 606 - 613 (1975).

Døskeland, S. O., Ueland, P. M.:

Binding proteins for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in bovine adrenal cortex.

Biochem. J. 165: 561 - 573 (1977).

Døskeland, S. O., Øgreid, D.:

Binding proteins for cyclic AMP in mammalian tissues.

Int. J. Biochem. 13: 1 - 19 (1981).

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.

Biochim. Biophys. Acta 708: 185 - 193 (1982).

Dremier, S., Kopperud, R., Døskeland, S. O., Dumont, J. E., Maenhaut, C.:
Search for new cyclic AMP-binding proteins.
FEBS Letters 546: 103 - 107 (2003).

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.:
A hydrolytic nucleosidase acting on S-adenosylhomocysteine and on 5'-methylthioadenosine.
J. Biol. Chem. 237: 3737 - 3741 (1962).

Du Vigneaud, V., Cohn, M., Chandler, J. P., Schenck, J. R., Simmonds, S.:
The utilization of the methyl group of methionine in the biological synthesis of choline and creatine.
J. Biol. Chem. 140: 625 - 641 (1941).

Emmer, M. De Combrugghe, B., Pastan, I., Perlman, R.:
Cyclic AMP receptor protein of E. coli: Its role in the synthesis of inducible enzymes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66: 480 - 487 (1970).

Fox, I. H., Kelley, W. N.:
The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells.
Ann. Rev. Biochem. 46: 655 - 686 (1978).

Fujioka, M., Takata, Y.:
S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver.
J. Biol. Chem. 256: 1631 - 1635 (1981).

Giblett, E. R., Anderson, J. E., Cohen, F., Pollara, B., Meuwissen, H. J.:
Adenosine deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity.
Lancet 2: 1067 - 1069 (1972).

Gomi, T., Ishiguro, Y., Fujioka, M.:
S-adenosylhomocysteinease from rat liver: Evidence for structurally identical and catalytically equivalent subunits.
J. Biol. Chem. 260: 2798 - 2793 (1985).

Guranowski, A., Pawelkiewicz, J.:
Adenosylhomocysteinease from yellow lupin seeds.
Eur. J. Biochem. 80: 517 - 523 (1977).

Guranowski, A., Montgomery, J. A., Cantoni, G. L., Chiang, P. K.:
Adenosine analogues as substrates and inhibitors of S-adenosylhomocysteine
hydrolase.
Biochemistry 20: 110 - 115 (1981).

Haas, J. A., Osswald, H.:
Adenosine induced fall in glomerular capillary pressure; effect of uretral
obstruction and aortic constriction in the munich-wistar rat kidney.
Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 317: 36 - 89 (1981).

Helland, S., Ueland, P. M.:
Inactivation of S-adenosyl-homocysteine hydrolase by 9- β -D-
Arabinofuranosyladenine in intact cells.
Cancer Res. 42: 1130 - 1136 (1982).

Hershfield, M. S., Kredich, N. M.:
S-adenosylhomocysteine hydrolase is an adenosine-binding protein: A target
for adenosine toxicity.
Science 202:151 - 160 (1978).

Hershfield, M. S., Francke, U.:
The human genes for S-adenosylhomocysteine hydrolase and adenosine
desaminase are sythetic 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. Affinity, purification
and characterization.
Biochem. J. 230: 43 - 52, (1985a).

Hershfield, M. S., Kurtzberg, J., Aiyar, V. N., Suh, E. J., Schiff, R.:
Abnormalities in S-adenosylhomocysteine hydrolysis, ATP catabolism and
lymphoid differentiation in adenosine desaminase deficiency.
In Adenosine desaminase in disorders of purine metabolism and in immune
deficiency, ed. by G. L. Tritesch, The New York Academy of Sciences 451: 78 -
86 (1985b).

Hirata, F., Axelrod, J.:
Phospholipid methylation and biological signal transmission.
Science 209, 1082 - 1090 (1980).

Hirschhorn, R.:
Adenosine desaminase deficiency.
Immunodeficiency Rev. 2: 175 - 198 (1990).

Hoffbuhr, K., Devaney, J. M., La Fleur, B., Sirianni, N., Scacheri, C., Giron, J., Schuette, J., Innis, J., Marino, M., Philippart, M., Narayanan, V., Umansky, R., Kronn, D., Hoffman, E. P., Naidu, S.:
MeCP2 mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome.
Neurology 56: 1486 - 1495 (2001).

Hoffman, J. L.:
Biosynthesis of S-N6-methyladenosylhomocysteine, an inhibitor of RNA methyltransferases.
J. Biol. Chem. 253: 2905 - 2907 (1978).

Hoffman, D. R., Cornatzer, W. E., Duerre, J. A.:
Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and transmethylations reactions.
Can. J. Biochem. 57: 57 - 65 (1979).

Hohmann, R. J., Guitton, M. C., Véron, M.:
Purification of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum*: Reversible inactivation by cAMP and 2'-deoxyadenosine.
Arch. Biochem. Biophys. 233: 785 - 795 (1984).

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).

Ivins, J. K., Parry, M. K., Long, D. A.:
A novel cAMP-dependent pathway activates neuronal integrin function in retinal neurons.
J. Neurosci. 24: 1212 - 1216 (2004).

Kaupp, U. B., Seifert, R.:
Cyclic nucleotide-gated ion channels.
Physiol. Rev. 82: 769 - 824 (2002).

Kawasaki, H., Springett, G. M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D. E., Graybiel, A. M.:
A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap 1.
Science 282: 2257 - 2279 (1998).

Kim, I.-K., Zhang, C.-Y., Chiang, P. K., Cantoni, G. L.:
S-adenosylhomocysteine hydrolase from hamster liver: Purification and kinetic properties.
Arch. Biochem. Biophys. 226: 65 - 72 (1983).

Klein, P. S., Sun, T. J., Saxe, C. L., Kimmel, A. R., Johnson, R. L., Devreotes, P. N.:
A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*.
Science 241: 1467 - 1472 (1988).

Kloor, D., Kurz, J., Fuchs, S., Faust, B., Osswald, H.:
S-adenosylhomocysteine-hydrolase from bovine kidney: Enzymatic and binding properties.
Kidney and Blood Press. Res. 19: 100 - 108 (1996).

Kloor, D., Yao, K., Delabar, U., Osswald, H.:
Simple and sensitive binding assay for measurement of adenosine using reduced S-adenosylhomocysteine hydrolase.
Clin. Chem. 46: 537 - 542 (2000).

Kloor, D., Danielyan, L., Osswald, H.:
Characterization of the cAMP binding site of purified S-adenosyl-homocysteine hydrolase from bovine kidney.
Biochem. Pharmacol. 64: 1201 - 1206 (2002).

Kloor, D., Lüdtkke, A., Stoeva, S., Osswald, H.:
Adenosine binding sites at S-adenosylhomocysteine hydrolase are controlled by the NAD⁺/NADH ratio of the enzyme.
Biochem. Pharmacol. 66: 2117 - 2123 (2003a).

Kloor, D., Riehle, R., Osswald, H.:
Interaction between cAMP and adenosine at the S-adenosylhomocysteine hydrolase.
Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 367: R57 (2003b).

Kopperud R., Krakstad, C., Selheim, F., Døskeland, S. O.:
cAMP effector mechanism. Novel twist for an "old" signaling system.
FEBS Letters 546: 121 - 126 (2003).

Kraus, J., Packman, S., Fowler, B., Rosenberg, L. E.:
Purification and properties of cystathionine β -synthase from human liver.
J. Biol. Chem. 253: 6523 - 6528 (1978).

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

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

- Laemmli, U. K.:
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680 - 685 (1970).
- Laird, P. W., Jaenisch, R.:
The role of DNA-methylation in cancer genetics and epigenetics.
Annu. Rev. Genet. 30: 441 - 464 (1996).
- Li, E., Bestor, T. H., Jaenisch, R.:
Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.
Cell 69: 915 - 926 (1992).
- Li, E., Beard, C., Jaenisch, R.:
Role for DNA methylation in genomic imprinting.
Nature 366: 362 - 365 (1993).
- Lipkin, D., Cook, W. H., Markham, R.:
Adenosine-3':5'-phosphoric acid: a proof of structure.
J. Am. Chem. Soc. 81: 6198 - 6203 (1959).
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., Biel, M.:
A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels.
Nature 393: 587 - 591 (1998).
- Lüdtke, A.:
Einfluss des Kofaktors NAD⁺/NADH der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase auf die Adenosinbindung.
Med. Dissertation, Universität Tübingen (2003).
- Miller, C. H., Duerre, J. A.:
S-ribosylhomocysteine cleavage enzyme from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 243: 92 - 97 (1968).
- Miller, M. W., Duhl, D. M., Winkes, B. M., Arredondo-Vega, F., Saxon, P. J., Wolff, G. L., Epstein, C. J., Hershfield, M. S., Barsh, G. S.:
The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (Ancy) gene.
EMBO J. 13: 1806 - 1816 (1994).
- Mudd, S. H., Skovby, F., Levy, H. L., Pettigrew, K.D., Wilcken, B., Pyeritz, R.E., Andria, G., Boers, G.H.:
The natural history of homocysteinuria due to cystathionine β -synthase deficiency.
Am. J. Hum. Genet. 37: 1 - 31 (1985).

Müller, C. E., Scior, T.:

Adenosine receptors and their modulators.
Pharmaceutica Acta Helveticae 68: 77 - 111 (1993).

Narayanan, P. J., Borchardt, R. T.:

Purification of bovine liver S-adenosylhomocysteine hydrolase by affinity chromatography on blue dextran-agarose.
Biochim. Biophys. Acta 965:22 - 28 (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.
New Engl. J. Med. 337: 230 - 236 (1997).

Olsson, R. A.:

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

Osswald, H., Schmitz, H.-J., Kemper, R.:

Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation.
Pflug. Arch. 371: 45 - 49 (1977).

Osswald, H., Nabakowski, G., Hermes, H.:

Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate.
Int. J. Biochem. 12: 263 - 267 (1980).

Palmer, J. L., Abeles, R. H. :

The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase.
J. Biol. Chem. 245: 1217 - 1226 (1979).

Porter, D. J. T., Boyd, F. L.:

Reduced S-adenosylhomocysteine hydrolase: Kinetics and thermodynamics for binding of 3'-ketoadenosine, adenosine and adenine.
J. Biol. Chem. 267: 3205 - 3213 (1992).

Rall, T. W., Sutherland, E. W., Berthet, J.:

The relationship of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates.
J. Biol. Chem. 224: 463 - 475 (1957).

Rall, T. W., Sutherland, E. W.:

Adenyl cyclase: The enzymatically catalyzed formation of adenosine-3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate.
J. Biol. Chem. 237: 1228 - 1232 (1962).

- Razin, A., Szyf, M.:
DNA methylation patterns. Formation and function.
Biochim. Biophys. Acta 782: 331 - 342 (1984).
- Richter, S.:
Strukturerfordernisse von Adenosin-Analoga für die Bindung an hochgereinigte S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase.
Med. Dissertation, Universität Tübingen (2000).
- Saebø, J., Ueland, P. M.:
An adenosine-3',4'-monophosphate binding protein from mouse liver. Association with S-adenosylhomocysteinase activity.
FEBS Letters 96: 125 - 128 (1978).
- Saebø, 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.
Biochem. Biophys. Acta 587: 330 - 340 (1979).
- Scatchard, G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. NY Acad. Sci. 51: 660 - 672 (1949).
- Sganga, M. W., Aksamit, R. R., Cantoni, G. L., Bauer, C. E.:
Mutational and nucleotide sequence analysis of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Rhodobacter capsulatus*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6328 - 6332 (1992).
- Shimizu, S., Shiozaki, S., Oshiro, T., Yamada, H.:
Occurrence of S-adenosylhomocysteine hydrolase in prokaryote cells.
Eur. J. Biochem. 141: 385 - 392 (1984).
- Skiba, W. E., Taylor, M. P., Wells, M. S., Mangum, J. H., Awad, W. M. Jr.:
Human hepatic methionine biosynthesis: Purification and characterization of betaine:homocysteine S-methyltransferase.
J. Biol. Chem. 257: 14944 - 14948 (1982).
- Sugden, P. H., Corbin, J. D.:
Adenosine-3',5'-binding proteins in bovine and rat tissues.
Biochem. J. 159: 423 - 437 (1976).
- Sutherland, E. W., Rall, T. W.:
Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.
J. Biol. Chem. 232: 1077 - 1091 (1958).

- Sutherland, E. W.:
Studies on the mechanism of hormone action.
Science 177: 401 - 408 (1972).
- Starke, K.:
Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme.
In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Hsg. von Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K.
Urban und Fischer Verlag München, Jena (2001).
- Ueland, P. M.:
Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase.
Pharmacol. Rev. 34: 223 - 253 (1982).
- Ueland, P. M., Berge, R. K., Saebø, J., Farstad, M.:
S-adenosylhomocysteine hydrolase in human and rat liver is localized in the cytosol fraction of the tissue homogenate.
FEBS Letters 101: 184 - 186 (1979).
- Ueland, P. M., Helland, S.:
S-adenosylhomocysteinase from mouse liver: Catalytic properties at cellular enzyme level.
J. Biol. Chem. 255: 7722 - 7727 (1980).
- 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).
- Uttley, C. S., Marcell, P. D., Allen, R. H., Antony, A. C., Kolhouse, J. F.:
Isolation and characterization of methionine synthetase from human placenta.
J. Biol. Chem. 260: 13656 - 13665 (1985).
- Wainger, B. J., Degennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S. A., Tibbs, G.R.:
Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels.
Nature, 411: 805 - 810 (2001).
- Walker, R. D., Duerre, J. A.:
S-adenosylhomocysteine metabolism in various species.
Can. J. Biochem. 53: 312 - 319 (1975).

Walsh, D. A., Perkins, J. P., Krebs, E. G.:
An adenosine-3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle.
J. Biol. Chem. 243: 3763 - 3765 (1968).

Xu, G.-L., Bestor, T. H., Burchis, D., Hsieh, C.-L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J. J., Viegas-Péquignot E.:
Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene.
Nature 402, 187 - 191 (1999).

York, R. D., Yao, H., Dillon, T., Elig, C. L., Eckert, S. P., McCleskey, E. W., Sto P. J.:
Rap 1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor.
Nature 392: 622 - 626 (1998).

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

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

Frau PD Dr. Doris Kloor danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Einführung in die Thematik und in die Arbeitstechniken. Mein ganz besonderer Dank gilt darüber hinaus ihrer optimalen Betreuung, ihrer uneingeschränkten Unterstützung und Hilfe, sowie der ständigen Bereitschaft zur Beratung und Diskussion. Die freundschaftliche Atmosphäre in ihrer Arbeitsgruppe hat mir bei meiner Arbeit sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald und den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Frau Renate Riehle und Frau Marina Hermes bedanke ich mich herzlich für ihre Mithilfe, ihre unentwegte Bereitschaft zur Problemlösung und Diskussion, sowie für die großartige Unterstützung durch ihre Freundschaft. Außerdem danke ich Frau Renate Riehle für die Reinigung des Enzyms und für die Einweisung in die Arbeitstechniken.

Bei Frau Dipl.-Biol. M. Müller aus dem Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Prof. Dr. Stevanovic möchte ich mich für die Durchführung der Sequenzierung bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern und meinem Mann für ihre Unterstützung und ihre Hilfe danken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Kirschler
Vorname	Julia Nina
Geburtsdatum	03.08.1978
Geburtsort	Villingen-Schwenningen
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1985-1988	Nachbarschaftsgrundschule Schura
1989-1997	Gymnasium Trossingen
	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

04/1998 – 09/2004	Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/2004 – 09/2005	Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg/ Praktisches Jahr am Klinikum der Stadt Villingen- Schwenningen
03/2000	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
03/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
03/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
19/05/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Villingen- Schwenningen