

Isoform-spezifische Regulation der Säuger-Adenylylcyclasen ACI und ACII durch Calcium/Calmodulin und G β γ

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susanne Diel
aus Berlin

November 2006

1. Gutachter

**Prof. Dr. Walter Rosenthal
Institut für Pharmakologie
Campus Benjamin Franklin
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Thielallee 67-73, 14195 Berlin**

2. Gutachter

**Prof. Dr. Volker Haucke
Institut für Chemie - Biochemie
Freie Universität Berlin
Takustraße 6, 14195 Berlin**

Disputation am

1. Februar 2007

Abstract

The universal *second messenger* cAMP plays a key role in the mammalian intracellular signal transduction. It controls a variety of pivotal cell functions ranging from cell growth and differentiation to transcriptional regulation and apoptosis. The key step in the regulation of cAMP is the exact cell/tissue-specific modulation of those enzymes that synthesize cAMP: the adenylyl cyclases (ACs). Particular mammalian ACs are represented by at least nine different isoforms (ACI-ACIX). All isoforms are susceptible to the stimulatory α -subunit of heterotrimeric G proteins ($G\alpha_s$), besides that each AC is uniquely regulated by multiple signals from G proteins, calcium and kinases. Due to their competency as detectors and integrators of coincident regulatory signals they form intersection points for the cross-talk of different signaling pathways. Thereby, the regulatory hot spots on the AC molecules represent ideal targets to selectively modulate branches of bifurcated cascades without affecting the complete receptor-triggered signaling network. Up to now little is known about the detailed mechanisms underlying the isoform-specific regulation of ACs. In the present study molecular insights in the isoform-specific stimulation of ACII by $G\beta\gamma$ and ACI by calcium/calmodulin (Ca/CaM) were yielded.

For the first time we have identified motifs on an AC enzyme that could be proven to be necessary for the $G\beta\gamma$ -regulatory effect:

the PFAHL-motif localized on the variable C1b-domain of ACII,

the KF-loop localized on the catalytic C2a-domain of ACII.

Apart from the data regarding isoform ACII, a new $G\beta\gamma$ -regulatory pathway was discovered for isoform ACIII: The ACIII is directly inhibited by $G\beta\gamma$ *in vitro*.

In terms of the stimulation of isoform ACI by Ca/CaM there was already one regulatory motif known: the AC28-region localized on the variable C1b-domain of ACI. In the present work we have figured out that:

the C1b-domain is not sufficient for the ACI-stimulation by Ca/CaM,

the catalytic C2a-domain of ACI is also crucial for the ACI-stimulation by Ca/CaM. We have identified the VLG-motif on this domain and provided evidence for a direct interaction between Ca/CaM and this sequence.

The data presented here reveal that the regulatory signal transfer is based on more than one molecular interface between regulator and effector. Different roles of the regulatory motifs as signal transfer regions or general binding domains are discussed.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Adenylylcyclasen (AC)	3
1.1.1	Klassen der Adenylylcyclase-Familie	3
1.1.2	Topologie der partikulären Säuger-ACs	3
1.1.3	Das katalytischen Zentrum der partikulären Säuger-ACs	4
1.1.4	Isoform-spezifische Expression und Regulation der partikulären Säuger-ACs	7
1.1.5	Physiologische Bedeutung der ACII- und ACI-Regulationen	9
1.1.5.1	ACII-spezifische Regulationen	9
1.1.5.2	ACI-spezifische Regulationen	9
1.2	Die isoform-spezifischen AC-Regulatoren G$\beta$$\gamma$ und Ca/CaM	11
1.2.1	Aufbau und Funktion von G β γ	11
1.2.1.1	Heterotrimere G-Proteine	11
1.2.1.2	Zusammensetzung und Struktur von G β γ	11
1.2.1.3	Effektoren von G β γ	15
1.2.1.4	Molekulare Mechanismen der G β γ -Interaktionen	15
1.2.2	Aufbau und Funktion von Ca/CaM	17
1.2.2.1	Calcium-bindende Proteine	17
1.2.2.2	Struktur und Calcium-Bindung des Calmodulins	17
1.2.2.3	Effektoren von Ca/CaM	21
1.2.2.4	Molekulare Mechanismen der Ca/CaM-Interaktionen	21
1.3	Die isoform-spezifischen Stimulationen der ACII durch G$\beta$$\gamma$ und der ACI durch Ca/CaM	24
1.3.1	Sind G β γ -Regulationsmotive auf der ACII bekannt?	24
1.3.2	Sind Ca/CaM-Regulationsmotive auf der ACI bekannt?	24
2	Zielsetzung	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Material	27
3.1.1	Hersteller und Lieferanten	27
3.1.2	Chemikalien	27
3.1.3	Enzyme, Proteine und Kitsysteme	28
3.1.4	Peptide	29
3.1.5	Antikörper	29
3.1.6	Vektoren und Konstrukte	29
3.1.7	Oligonukleotide	29
3.1.8	Nukleotide	31
3.1.9	Radionukleotide	32
3.1.10	Molekulargewichtstandards	32
3.1.11	Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze	32
3.1.12	Puffer und Lösungen	32
3.1.13	Reinigungs- und Trennmaterialien	33
3.1.14	Filtermembranen und Filmmaterial	33
3.1.15	Software	33

3.2	Methoden	34
3.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	34
3.2.1.1	Präparation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	34
3.2.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.2.1.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.2.1.3.1	Plasmid-Minipräparation	34
3.2.1.3.2	Plasmid-Maxipräparation	35
3.2.1.4	Sequenzspezifisches Schneiden doppelsträngiger DNA durch Restriktionsendonukleasen	35
3.2.1.5	Phenolextraktion von DNA	35
3.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	35
3.2.1.7	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
3.2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.2.1.9	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	36
3.2.1.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.2.1.11	Gerichtete Mutagenese von DNA	36
3.2.1.12	Sequenzierung von DNA	37
3.2.2	Proteinbiochemische Standardmethoden	37
3.2.2.1	Protein-Konzentrationsbestimmung	37
3.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.2.2.3	Coomassie-Blau-Färbung	37
3.2.2.4	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen (Western-Blot)	37
3.2.2.5	Immunodetektion	38
3.2.3	Protein-Expression	38
3.2.3.1	Kultivierung von Sf9-Zellen	38
3.2.3.2	Konstruktion rekombinanter Baculoviren	38
3.2.3.3	Amplifikation rekombinanter Baculoviren	39
3.2.3.4	Virusinfektion von Sf9-Zellen	39
3.2.3.5	Membranpräparation von virusinfizierten Sf9-Zellen	39
3.2.4	Präparation heterotrimerer G-Protein-Untereinheiten	39
3.2.4.1	Reinigung von G $\beta_1\gamma_2$	39
3.2.4.2	GTP γ S-Aktivierung von G α_s	40
3.2.5	Bindungsstudien mit Dansyl-Calmodulin	40
3.2.6	Enzym-Funktionsstudien	41
3.2.6.1	Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivität	41
3.2.6.1.1	AC-Regulierbarkeit durch G $\beta\gamma$	41
3.2.6.1.2	AC-Regulierbarkeit durch Ca/CaM	41
3.2.6.2	Bestimmung der Aktivität der Ca/CaM-abhängigen KinaseII	42
3.2.7	Generierung von Adenylylcyclase-Konstrukten	42
3.2.7.1	AC-Wildtyp-Konstrukte mit MYC- und HA-Epitop	42
3.2.7.1.1	ACII mit MYC- und HA-Epitop	42
3.2.7.1.2	ACI mit MYC- und HA-Epitop	44
3.2.7.2	AC-Chimären: Domänen austausch verschiedener AC-Isoformen	44
3.2.7.2.1	ACII.IC1b	44
3.2.7.2.2	ACIII.IIC1b	44
3.2.7.2.3	ACII.IC2	44
3.2.7.2.4	ACI.IIC2	44
3.2.7.3	ACI-C2b-Deletionsmutanten	45
3.2.7.4	NAAIRS- und AA-Substitutionsmutanten	45
3.2.7.4.1	NAAIRS-Mutanten der C1b-Domäne der ACII	45
3.2.7.4.2	NAAIRS-Mutanten der C2a-Domäne der ACII	45
3.2.7.4.3	AA-Mutanten der C2a-Domäne der ACII	45
3.2.7.4.4	AA-Mutante der C2a-Domäne der ACI	45

4	Ergebnisse	46
4.1	G$\beta$$\gamma$-Regulationsmotive auf der ACII	46
4.1.1	Einfluss der C1b-Domäne der ACII	46
4.1.1.1	Bedeutung der C1b-Domäne für die G β γ -Regulation	46
4.1.1.2	Das PFAHL-Motiv auf der C1b-Domäne	50
4.1.1.3	Hinlänglichkeit des PFAHL-Motivs für die G β γ -Regulation	55
4.1.2	Einfluss der C2-Domäne der ACII	59
4.1.2.1	Bedeutung der C2-Domäne für die G β γ -Regulation	59
4.1.2.2	Feinkartierung der C2-Domäne	65
4.1.2.3	Die KF-Schleife auf der C2-Domäne	68
4.2	Ca/CaM-Regulationsmotive auf der ACI	72
4.2.1	Einfluss der C1b-Domäne der ACI	72
4.2.1.1	Hinlänglichkeit der C1b-Domäne für die Ca/CaM-Regulation	72
4.2.2	Einfluss der C2-Domäne der ACI	74
4.2.2.1	Bedeutung der C2-Domäne für die Ca/CaM-Regulation	74
4.2.2.2	Bedeutung der C2b-Domäne für die Ca/CaM-Regulation	76
4.2.2.3	Das VLG-Motiv auf der C2a-Domäne	80
4.2.2.3.1	VLG-Peptid-Bindung an Ca/CaM	84
4.2.2.3.2	VLG-Peptid-Kompetition mit der ACI um Ca/CaM	86
4.2.2.3.3	VLG-Peptid-Kompetition mit der CaMKinaseII um Ca/CaM	88
5	Diskussion	90
5.1	G$\beta$$\gamma$-Regulationsmotive auf der ACII	90
5.1.1	Die C1b-Domäne	90
5.1.2	Die C2a-Domäne	91
5.1.3	G β γ -Interaktion mit der ACII: Bindungs- und Signaltransferregionen	93
5.2	Die Isoform ACIII ist G$\beta$$\gamma$-sensitiv	96
5.3	Ca/CaM-Regulationsmotive auf der ACI	97
5.3.1	Die C1b-Domäne	97
5.3.2	Die C2-Domäne	97
5.3.3	Das VLG-Motiv	98
5.3.4	Ca/CaM-Bindungsmotive der ACI: AC28 und VLG	99
5.3.5	Mechanismen der AC-Stimulation durch Ca/CaM	100
5.4	Isoform-spezifische AC-Regulationen	102
6	Zusammenfassung	105
7	Summary	106
8	Literaturverzeichnis	107
9	Abkürzungen	115

Anhang

Eigene Veröffentlichungen

Lebenslauf

Erklärung

Danksagung