1 Einleitung

Die Entwicklung vielzelliger Organismen war ein bedeutender Fortschritt der Evolution. Ein wichtiges Merkmal der Vielzeller sind ausgeklügelte Kommunikationsysteme, die es den Zellen erlauben, sich auf komplexen Wegen auszutauschen und so ihr Verhalten zum Wohl des gesamten Organismus aufeinander abzustimmen.

Häufig wird Information für eine Zelle über größere Entfernungen hinweg durch Signalmoleküle übertragen. Im Menschen gibt es mehrere hundert Arten solcher Signalmoleküle; darunter fallen Proteine, Peptide, Aminosäuren, Steroide, Nukleotide, Fettsäurederivate oder gelöstes Gas wie Stickstoffmonoxid. Die meisten Signalmoleküle werden von einer Zelle durch Exozytose freigesetzt und treten mit einem spezifischen Rezeptor der Zielzelle als Ligand in Wechselwirkung, um einen bestimmten Signaltransduktionsweg in Gang zu setzen. Viele Rezeptoren sind transmembranäre Proteine, die nach Aktivierung durch Bindung des Liganden das extrazelluläre Signal in ein intrazelluläres konvertieren, welches häufig die temporäre Bildung bzw. Freisetzung eines intrazellulären Botenstoffs (*second messenger*) wie cAMP, cGMP, Diacylglycerol, Inositolphosphate oder Calcium zur Folge hat, der wiederum die entsprechenden zellulären Reaktionen auslösen kann.

Generell kommen für den Prozess der Signalumwandlung über einen Rezeptor drei Funktionen zum Tragen: Die Liganden-Erkennung, Signalumsetzung und Effektoraktivität. Diese können je nach Rezeptor auf ein und demselben oder auf separaten Proteinen lokalisiert sein.

Die die intrazellulären Signalkaskaden triggernden Zelloberflächen-Rezeptorproteine werden in drei Klassen eingeteilt, die durch den Signalumwandlungsmechanismus definiert sind, den sie nutzen: Eine Rezeptorklasse stellen ligandengesteuerte Ionenkanäle dar, deren Aktivierung zur Änderung des Membranpotentials führt. Eine zweite Klasse bilden die Rezeptorproteinkinasen, Transmembrankomplexe aus einem extrazellulären Rezeptorteil und einer intrazellulären Proteinkinase. Die Proteinkinase kommt entweder als separates Protein vor oder ist als Effektordomäne mit den anderen Rezeptorkomponenten auf einem Protein lokalisiert. Die dritte und mit Abstand größte Klasse der Zelloberflächenrezeptoren stellt die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) dar. Sie repräsentieren die größte Genfamilie des menschlichen Genoms. Nahezu die Hälfte der heutigen Arzneimittelwirkstoffe arbeitet über einen Rezeptor der GPCR-Familie. Hunderte dieser Rezeptoren sind schon bei Säugetieren identifiziert worden. Sie vermitteln Antworten auf eine Vielfalt von Signalmolekülen; dazu gehören Hormone, Neurotransmitter und Zytokine. Eine ausführliche Übersicht dazu geben Seifert und Wieland (2005). Trotz der chemischen und strukturellen Vielfalt der an sie bindenden Signalmoleküle haben alle GPCRs einen ähnlichen molekularen Aufbau: Sie besitzen sieben transmembranäre α-Helices mit extrazellulärem N- und intrazellulärem C-Terminus, weshalb sie auch als heptahelicale Rezeptoren bezeichnet werden. Bei den GPCRs liegen nicht nur die Effektordomänen als eigenständige Moleküle vor, sondern auch die Signalumsetzungsdomänen werden von separaten Proteinen dargestellt, den heterotrimeren G-Proteinen. Agonist-Bindung an den ligand-spezifischen Rezeptor und die dadurch ausgelöste Aktivierung heterotrimerer G-Proteine führt zur Modulation verschiedener Effektoren. Diese liegen entweder cytosolisch vor und werden erst bei Aktivierung an die Membran transloziert, wie beispielsweise die PI3-Kinasen, oder sie sind permanent in der Plasmamembran verankert wie die Familie der Adenylylcyclasen.

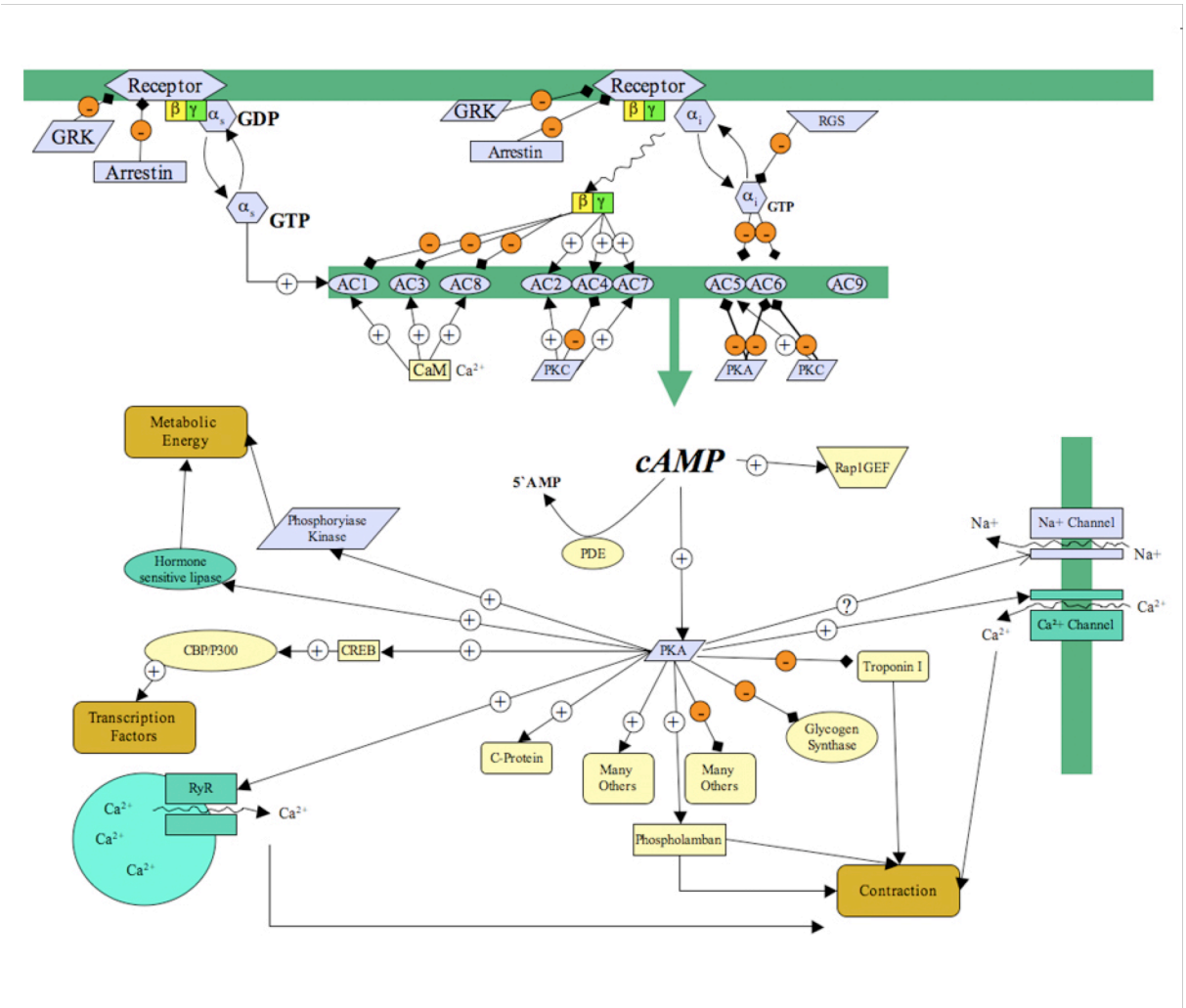

Abbildung 1.1: cAMP-Signaltransduktion
Schema der intrazellulären Signalkaskaden über den *second messenger* cAMP, modifiziert nach *Alliance for Cellular Signaling* (AfCS) 2005, [http://www.afcs.org/].
AC (*adenylyl cyclase*), CaM (*calmodulin*), CREB (*cAMP response element-binding protein*), CBP (*cAMP response element-binding protein-binding protein*), GRK (*G-protein receptor kinase*), PDE (*phoshodiesterase*), PKA (*protein kinase A*), PKC (*protein kinase C*), Rap1GEF (*G-Protein exchange factor* für Rap1), RGS (*regulator of G-protein signaling*), RyR (*ryanodine receptor*), +: Stimulation, -: Inhibition
Weitere isoform-spezifische Regulationswege der Adenylylcylcasen werden im Text (Abschnitt 1.1.4) angegeben.

1.1 Adenylylcyclasen (AC)

1.1.1 Klassen der Adenylylcylcase-Familie

Das 1957 von Sutherland zum ersten Mal beschriebene cyclische Adenosin-3`:5`-Monophosphat, cAMP, kontrolliert als intrazellulärer Signalstoff (*second messenger*) eine Vielzahl zellulärer Vorgänge wie Metabolismus, Genexpression, Zellproliferation und Differenzierung; cAMP-abhängige Signalwege sind involviert in die Proliferation verschiedener Tumore, in Fortpflanzungsprozesse und in Immunantworten; außerdem regulieren sie die Geruchs-, Herz- und Gedächtnisfunktion (Tang et al., 1998, Tasken et al., 2004). Die Menge an intrazellulärem cAMP wird sowohl über dessen Synthese als auch über dessen Abbau kontrolliert. Für den Abbau von cAMP sind die Phosphodiesterasen (PDE) verantwortlich (Beavo et al., 1994). Die cAMP-Synthese erfolgt an den Adenylylcyclasen (AC), sie katalysieren die Umwandlung von ATP zu cAMP+PP_i.

ACs sind entwicklungsgeschichtlich alte Enzyme, sie sind in allen Organismen verbreitet. Entsprechend ihrem Vorkommen und ihrer Funktion werden sie in verschiedene Klassen eingeteilt. Eine detailierte Übersicht dazu wird in der Arbeit von Linder und Mitarbeitern (2003) gegeben. Die ACs der Klasse I kommen in vielen gram-negativen Bakterien vor, in *E. coli* zum Beispiel sind sie ein wichtiger Vermittler der Katabolit-Repression. Die Klasse II ACs sind extrabakteriell wirksame Toxine bestimmter Pathogene wie *Bacillus Anthracis* oder *Bordetella pertussis*, die erst durch eukaryotisches Calmodulin innerhalb der befallenen Wirtszellen aktiviert werden. Die unkontrollierte Generierung von cAMP schädigt die Wirtszelle und inhibiert die wirtseigene Immunabwehr. Die mit Abstand größte Kategorie stellt die Klasse III dar, zu der auch die Säuger-ACs gehören. Klasse III ACs kommen sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten vor, die Funktion des cAMP ist entsprechend divers und im Fall der niederen Organismen noch wenig untersucht. Gemeinsames Merkmal ist die Existenz der „cyclase homology domains“ (CHDs), die sich zu Homo- oder Heterodimeren anordnen und darüber das katalytische Zentrum ausbilden (Sinha et al., 2005). Die ACs der meisten Bakterien wie *Rhizobium* sind lösliche Proteine, in Hefen wie *Saccharomyces* liegen sie membranassoziiert vor, Parasiten wie *Trypanosoma* besitzen transmembranäre ACs mit einer Transmembranhelix. Säuger-ACs sind transmembranäre Proteine mit zwei CHDs und 12 Transmembranhelices. Neben diesen partikulären Säuger-ACs wurde außerdem eine lösliche Säuger-AC in Spermien gefunden (Braun und Dods, 1975, Tesmer, 2005). Ihre CHDs weisen jedoch höhere Aminosäureähnlichkeit zu denen der Cyano-und Mycobakterien auf als zu denen anderer eukaryotischer ACs, und ihre Aktivität wird durch andere Regulatoren moduliert als die der transmembranären ACs der Säuger (Buck et al., 1999).

Von den partikulären ACs wurden in Säugern bisher neun Isoformen kloniert und charakterisiert (ACI-ACIX). Alle Isoformen können durch die α-Untereinheit des stimulatorischen heterotrimeren G-Proteins ($G\alpha_s$) und - mit Ausnahme der ACIX - durch das pflanzliche Diterpen Forskolin aktiviert werden (siehe Abschnitt 1.1.4).

1.1.2 Topologie der partikulären Säuger-ACs

Die in der Plasmamembran verankerten Säuger-ACs sind modulartig aus einem cytosolischen N-Terminus, zwei Transmembrandomänen M1 und M2 (je ca. 20 kDa) mit jeweils sechs transmembranären Helices und zwei cytosolischen Domänen C1 und C2 (je 30-40 kDa) aufgebaut (Abbildung 1.2). Die cytosolischen Domänen unterteilt man jeweils in eine konservierte a-Subdomäne und eine variable b-Subdomäne. Die C1b-Subdomäne

ist relativ groß (ca. 16 kDa), die C2b-Subdomäne hingegen variiert in ihrer Größe und ist in manchen Isoformen, wie beispielsweise der ACII, gar nicht vorhanden (Gao und Gilman, 1991, Sunahara et al., 1996).
Die cytosolischen a-Subdomänen C1a und C2a enthalten die CHDs der membranständigen Säuger-ACs. Diese weisen eine signifikante Aminosäureähnlichkeit zu den CHDs der phylogenetisch verwandten Guanylylcyclasen auf. Die C1a- und C2a-Domänen der Säuger-ACs sind nicht nur untereinander, sondern auch innerhalb der neun AC-Isoformen konserviert. Ihre Heterodimerisierung ist Voraussetzung für die katalytische Aktivität der ACs. Als einzelne Moleküle exprimiert besitzen die C1a- oder C2a-Subdomänen kaum Enzymaktivität. Werden sie hingegen coexprimiert oder in Lösung gemischt, so resultiert dies in $G\alpha_s$- und Forskolin-stimulierter Enzym-Aktivität (Tang und Gilman, 1995, Whisnant et al., 1996, Yan et al., 1996).

1.1.3 Das katalytische Zentrum der partikulären Säuger-ACs

Entsprechend ihrer hohen Aminosäureähnlichkeit besitzen beide a-Subdomänen eine nahezu identische dreidimensionale Struktur. Sie organisieren sich zu einem pseudosymmetrischen Heterodimer, an dessen Grenzfläche, dem so genannten „ventralen Spalt“, das katalytische Zentrum ausgebildet wird (Abbildung 1.3). Bindung von ATP, $G\alpha_s$ oder Forskolin an das katalytische Heterodimer erfolgt in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Dessauer et al., 1997, Sunahara et al., 1997). Die heute bekannten Modellvorstellungen über den molekularen Ablauf der AC-Katalyse und Stimulation durch $G\alpha_s$/Forskolin basieren auf Mutationsstudien (Tang et al., 1995, Yan et al., 1997a,b, Hatley et al., 2000) und Kristallstrukturanalysen (Zhang et al., 1997, Tesmer et al., 1997, Tesmer et al., 1999, Liu et al., 1997a). Die Struktur des löslichen Komplexes aus den beiden katalytischen Domänen C1a-C2a zusammen mit den Stimulatoren $G\alpha_s$ und Forskolin ist entschlüsselt. Die Kristallstruktur wurde mit variierenden Kombinationen von Substratanaloga, *P-site*-Inhibitoren und zweiwertigen Metall-Ionen wie Mg^{2+} und Mn^{2+} untersucht. *P-site*-Inhibitoren sind Nucleosid-Analoga, die sich durch einen Purin-Ring auszeichnen. Sie inhibieren die katalytische Aktivität der Säuger-ACs, indem sie die cAMP-Bindungsstelle besetzen, noch bevor das zweite Produkt PP_i das katalytische Zentrum verlassen hat. So halten sie die AC in dem Produkt-gebundenen Konformationszustand, bei dem keine erneute Bindung von ATP mehr möglich ist (Dessauer und Gilman, 1997, Dessauer et al., 1999, Tesmer et al., 2000). Aufgrund kinetischer Studien geht man heute davon aus, dass ATP und der Komplex aus *P-site*-Inhibitoren/PP_i an dieselbe Stelle der AC binden. Der Purin-Ring wandert in eine hydrophobe Tasche, welche durch Aminosäuren der C1a- und C2a-Subdomänen ausgebildet wird, von denen die der C1a-Domäne hauptsächlich zu der Bindung der Metall-Ionen und Phosphatreste beitragen, während auf der C2a-Domäne die für die Spezifität des Adeninrings verantwortlichen Aminosäuren lokalisiert sind (Sunahara et al., 1998, Dessauer et al., 1999). Kinetische und strukturelle Analyse der *P-site*-Inhibition haben darauf hingewiesen, dass der molekulare Reaktionsmechanismus der cAMP-Synthese aus ATP komplex ist und mehrere verschiedene Konformationszustände beinhaltet. Die Substrat-Bindung wird von einem Wechsel eines „offenen“ in einen „geschlossenen“ Konformationszustand des katalytischen Zentrums begleitet, bei dem die Metall- und Phosphat-Bindungsstellen der C1a-Domäne in Richtung der Purin-bindenden Aminosäuren der C2a-Domäne rotieren und damit das katalytisch aktive Zentrum formen. Das aktive Zentrum der ACs besitzt sowohl strukturell als auch funktionell auffällige Ähnlichkeit zu dem der DNA-Polymerasen (Artymiuk et al., 1997), der Phosphoryltransfer beider Enzyme läuft wahrscheinlich nach dem gleichen „Zwei-Metall-Ionen-Mechansimus“ ab. Durch den Übergang in den geschlossenen Zustand nach Nukleotid-Bindung werden basische Aminosäuren in das aktive Zentrum gebracht, die mit Hilfe zweier Metall-Ionen das Triphosphat des Substrats, den pentavalenten Phosphat-Übergangszustand und die PP_i-Gruppe

des Produkts stabilisieren (Tesmer et al., 1999). Dieser Mechanismus des „Sich-Ineinanderschiebens“ beider Seiten des pseudosymmetrischen Heterodimers bietet eine optimale Angriffsfläche für allosterische Regulatoren. In Abbildung 1.3 sind die Bindungsstellen der Stimulatoren Forskolin und $G\alpha_s$ am löslichen Heterodimer dargestellt. Forskolin besetzt die hydrophobe Tasche im ventralen Spalt gegenüber der Substrat-Bindungsstelle und stabilisiert wahrscheinlich über eine Art „Klebemechanismus“ Interaktionen der beiden katalytischen Domänen (Tesmer et al., 1997, Zhang et al., 1997). $G\alpha_s$ bindet lateral an einen durch zwei C2a-Helices gebildeten Spalt und an einen N-terminalen Abschnitt der C1a-Domäne (Tesmer et al., 1997, Yan et al., 1997b, Zimmermann et al., 1998). Die Bindung bewirkt vermutlich eine Rotation der C1a-Domäne, die eine optimale Orientierung der C1a- und C2a-Domänen zueinander gewährleistet (Tesmer et al., 1997). Dieser Mechanismus der $G\alpha_s$-Stimulation ist spekulativ, da die Struktur des basalen C1a-C2a-Heterodimers ohne $G\alpha_s$ bis heute nicht entschlüsselt werden konnte. Als Näherung für den inaktiven Zustand wurde das Forskolin-gebundene C2a-Homodimer benutzt, dessen Kristallstruktur ohne $G\alpha_s$ bekannt ist (Zhang et al., 1997).

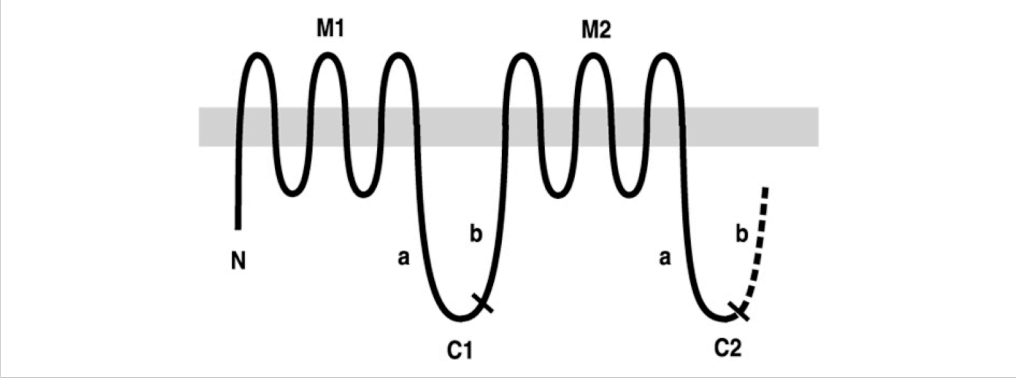

Abbildung 1.2: Topologie partikulärer Säuger-Adenylylcyclasen
Die Topologie transmembranärer Adenylylcyclasen wurde aus der Primärsequenz abgeleitet. N: cytosolische N-terminale Domäne; M1, M2: erste bzw. zweite Transmembrandomäne, C1, C2: erste bzw. zweite cytosolische Domäne; a, b: a b zw. b-Subdomäne der cytosolischen Domänen. Die C2b-Subdomäne (gestrichelt) ist in manchen Isoformen (z.B. ACII) nicht vorhanden. Der graue Balken symbolisiert die Plasmamembran.

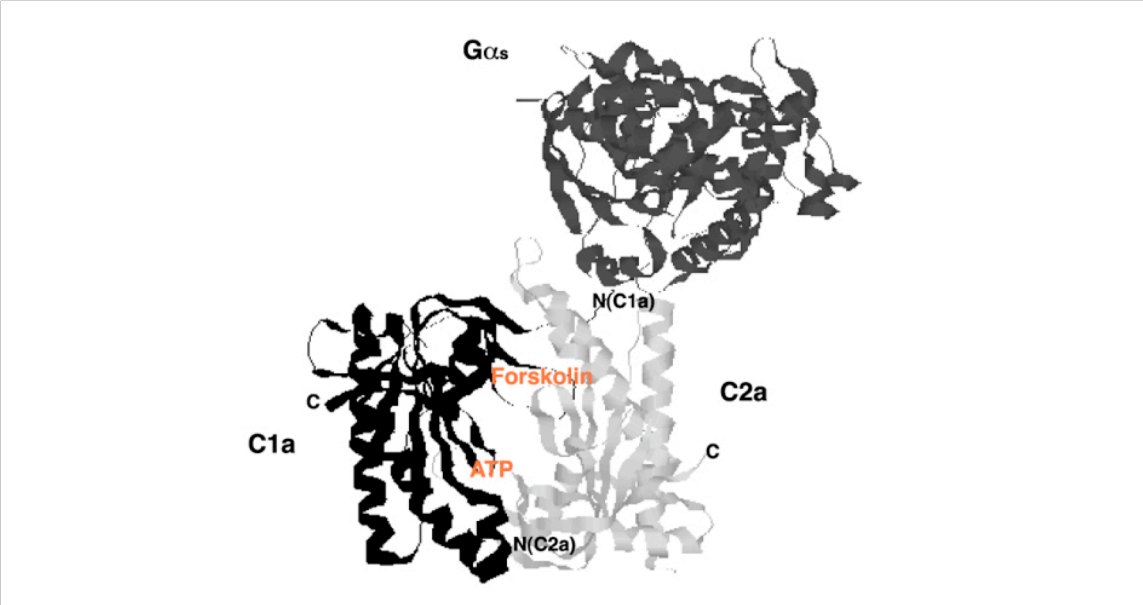

Abbildung 1.3: Struktur der katalytischen Domänen von Adenylylcyclasen komplexiert mit $G\alpha_s$
Struktur des katalytischen Zentrums aus ACV-C1a (schwarz) - ACII-C2a (hellgrau) mit $G\alpha_s$ (dunkelgrau) (Proteindatenbank; Nummer: 1CUL). Das Molekül ist so orientiert, dass sich die Plasmamembran in der Papierebene befindet. Die ATP- und Forskolin-Bindungsregionen sind in orange angegeben. N, C: N- und C-Termini der cytosolischen Domänen (die N-Termini befinden sich hinter der Papierebene).

1.1.4 Isoform-spezifische Expression und Regulation der partikulären Säuger-ACs

Neun verschiedene Isoformen membranständiger ACs sind heute im Säuger-Organismus bekannt; ihre Gene liegen unabhängig voneinander auf verschiedenen Chromosomen verteilt. Alle neun Isoformen werden - in unterschiedlichem Ausmaß - durch $G\alpha_s$ stimuliert, und auch die Forskolin-Stimulierbarkeit ist mit Ausnahme der ACIX bei allen partikulären Säuger-ACs zu beobachten. Die Vielzahl an topologisch ähnlichen AC-Isoformen (siehe Abschnitt 1.1.2) war anfangs überraschend, mittlerweile zeichnet sich jedoch jede einzelne der neun Isoformen durch ein individuelles Regulationsschema, gekoppelt an ein selektives Expressionsmuster, aus.

Ein präziser Expressionsnachweis jeder AC-Isoform wurde erschwert durch niedrige Expressionsraten und den Mangel an spezifischen hochaffinen Antikörpern. Die Expressionsmuster wurden hauptsächlich abgeleitet aus dem mRNA-Nachweis mittels RT-PCR oder *in-situ*-Hybridisierung. Im Hirn treten alle Isoformen auf, wobei jede einzelne auf diskrete Strukturen des zentralen Nervensystems beschränkt ist. Im peripheren Gewebe ist die Verteilung der Isoformen weitaus differenzierter. Eine ausführliche Beschreibung wird in der Arbeit von Hanoune und Defer (2001) gegeben.

Neben dem Stimulator $G\alpha_s$ wurde eine Vielzahl zusätzlicher regulatorischer Einflüsse auf die ACs entdeckt, auf die jede Isoform in einzigartiger Weise reagiert. So gibt es keine zwei Isoformen, die nach identischem Schema reguliert werden. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über die spezifische Verteilung und die Regulation der neun membranständigen Säuger-ACs.

Tab. 1.1 Vorkommen und Regulation der neun partikulären Säuger-ACs:

Gruppe	Isoform	Vorkommen	Regulatoren[1] neben $G\alpha_s$ und Forskolin[2]		
			G Protein-Untereinheiten	**Calcium-Effekte**	**Protein-Kinasen**
1: Ca/CaM-aktivierbar	ACI	Hirn	$G\beta\gamma$ ↓ $G\alpha_{i,o,z}$ ↓	Ca/CaM ↑ CaMKIV↓	PKC (↓) CaMKIV↓
	ACIII	olfaktorisches Epithel, Hirn, Sperma, Pancreas	$G\beta\gamma$ ↓[3]	*(Ca/CaM ↑)*[4] CaMKII ↓	PKC (↑) CaMKII ↓
	ACVIII	Hirn, Lunge	$G\beta\gamma$ ↓	Ca/CaM ↑	
2: Gβγ-aktivierbar	ACII	Hirn, Lunge, Skelettmuskel	$G\beta\gamma$ ↑		PKC ↑
	ACIV	Hirn	$G\beta\gamma$ ↑		PKC ↓
	ACVII	Hirn, Platelets, weit verbreitet	$G\beta\gamma$ ↑		PKC ↑
3: Ca^{2+}-inhibierbar	ACV	Herz, Hirn	*(Gβγ ↓)*[5] $G\alpha_{i,o,z}$ ↓	Ca^{2+} ↓	PKA ↓ PKC ↑
	ACVI	Herz, Niere, weit verbreitet	*(Gβγ ↓)*[5] $G\alpha_{i,o,z}$ ↓	Ca^{2+} ↓	PKA ↓ PKC ↓
4	ACIX	Hirn, Skelettmuskel, weit verbreitet		Calcineurin↓	

[1] CaMK: Ca/CaM-abhängige Kinase, PKA. Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, ↑: Stimulation, ↓ Inhibition, (): schwaches Signal
[2] Alle Isoformen werden durch $G\alpha_s$ aktiviert, Forskolin aktiviert alle Isoformen bis auf die ACIX
[3]: Im Rahmen dieser Arbeit entdeckt: ACIII wird *in vitro* direkt durch Gβγ inhibiert (Diel et al., 2006)
[4]: Ca/CaM stimuliert ACIII *in vitro* in Anwesenheit von Gpp(NH)p (5´-Guanylyl-β,γ-imidodiphosphat) oder Forskolin. In intakten Zellen wird die ACIII durch Ca/CaM inhibiert (siehe Text).
[5]: Direkte Inhibition der ACV und ACVI durch Gβγ wurde bisher nicht beobachtet (Wittpoth et al., 1999); Inhibition wurde beobachtet in Zellen, die ACV,VI und Gβγ überexprimieren (Bayewitch et al., 1998).

Im Hinblick auf ihre Regulationsmuster und ihre Sequenzähnlichkeiten kann man die neun Isoformen in vier Untergruppen einteilen (Patel et al., 2001). Die Isoformen der ersten Gruppe ACI, ACIII und ACVIII können mit Calcium/Calmodulin (Ca/CaM) stimuliert werden (Bakalyar und Reed, 1990, Tang et al., 1991, Choi et al., 1992, Krupinski et al., 1992, Cali et al., 1996). Ein direkter Ca/CaM-Einfluss auf die Aktivität der ACIII kann allerdings nur *in vitro* beobachtet werden, während *in vivo* die Ca/CaM-abhängige Stimulation der CaMKinaseII überwiegt, wodurch die ACIII inhibiert wird (Wayman et al., 1995b). Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Subgruppe ist die direkte Inhibition durch $G\beta\gamma$ (Tang und Gilman, 1991, Steiner et al., 2005). Die Tatsache, dass $G\beta\gamma$ einen inhibitorischen Einfluss auf die Isoform ACIII ausüben kann, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgedeckt (Diel et al., 2006). Die zweite Untergruppe enthält die $G\beta\gamma$-stimulierbaren Isoformen ACII, ACIV und ACVII (Feinstein et al., 1991, Gao und Gilman, 1991, Tang und Gilman, 1991, Yoshimura et al., 1996). Der stimulatorische $G\beta\gamma$-Effekt wird in Gegenwart von $G\alpha_s$ potenziert. Zur dritten Untergruppe der ACs werden die beiden Isoformen ACV und ACVI gezählt (Yoshimura und Cooper, 1992, Ishikawa et al., 1992). Ihr Merkmal ist die direkte Inhibition durch submikromolare Konzentrationen an Calcium, während Calcium in höheren Konzentrationen durch Kompetition mit den katalytischen Metall-Ionen auf alle AC-Isoformen inhibitorisch wirkt (Guillou et al., 1999). Keiner dieser Untergruppen zuzuordnen ist die Isoform ACIX, deren bislang einziges charakterisiertes Regulationsmerkmal die Inhibition durch Calcineurin ist.

Einige AC-Isoformen (ACI, ACV, ACVI) werden durch die α-Untereinheiten der G_i-Familie inhibiert. Es ist bekannt, dass $G\alpha_i$ an einer Stelle der C1a-Domäne der AC andockt, die der $G\alpha_s$-Bindungsstelle der C2a-Domäne in dem pseudosymmetrisch aufgebauten C1a-C2a-Komplex genau gegenüber liegt. Man nimmt an, dass dem inhibitorischen $G\alpha_i$-Mechanismus eine Rotation der C1a-Subdomäne zugrunde liegt, die in entgegengesetzter Richtung zu jener der $G\alpha_s$-Aktivierung verläuft (Dessauer et al., 1998).

Einige AC-Isoformen können durch Phosphorylierungen beeinflusst werden, sowohl in ihrer katalytischen Aktivität als auch in ihrer Sensitivität gegenüber anderen Regulatoren. So kann beispielsweise die Proteinkinase C (PKC) die Isoformen der AC-Untergruppe 2 durch Phosphorylierung aktivieren; in Gegenwart von $G\alpha_s$ hat die PKC auf die ACII zwar einen verstärkenden, auf die ACIV jedoch einen hemmenden Einfluss; die $G\beta\gamma$-Stimulierbarkeit beider Isoformen wiederum wird generell abgeschwächt durch die PKC-vermittelte Phosphorylierung (Zimmermann und Taussig, 1996).

Neben den in Tabelle 1.1 dargestellten AC-Regulatoren gibt es noch eine Anzahl weiterer, die AC-Aktivität beeinflussender Moleküle; eine Übersicht dazu wird in der Arbeit von Sunahara und Taussig gegeben (2002). Die biologische Relevanz dieser Modulationen ist noch weitgehend unbekannt. Ebenfalls ungeklärt ist die Frage, ob es ein endogenes Pendant zu Forskolin gibt. Forskolin wird von tierischen Zellen nicht produziert, die hydrophobe Tasche des katalytischen ventralen Spalts würde ohne Bindung eines Forskolin-ähnlichen Aktivators jedoch destabilisierend wirken.

Die isoform-spezifischen Regulationsmuster und die Tatsache, dass die ACs von der Stöchiometrie her die limitierende Komponente im GPCR-Signalweg sind, ermöglicht es ihnen, eine interpretative Rolle in der Signaltransduktion zu spielen, anstatt nur als linearer Mediator aufzutreten. Die Vielfalt an regulatorischen Signalen, auf die jede einzelne Isoform individuell reagiert, macht die ACs zu einem Knotenpunkt für den zellulären *cross-talk* unabhängiger Signalwege. Neben dem Repertoire an Rezeptoren ist demnach die Ausstattung an AC-Isoformen einer Zelle ausschlaggebend dafür, ob und wie die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch ein extrazelluläres Signal verändert wird.

Die Studien zu den individuellen Funktionen jeder AC-Isoform sind noch lange nicht abgeschlossen. Sie werden erschwert durch die Multiplizität an Isoformen in jedem Zell- und Gewebetyp, ihre niedrige Expressionsrate und das membranäre Umfeld. Andererseits kann die isoform-spezifische Regulation in Zusammenhang mit den individuellen Expressionsmustern schon einige Hinweise auf bestimmte physiologische Merkmale geben.

1.1.5 Physiologische Bedeutung der ACII- und ACI-Regulationen

Sowohl die ACII als auch die ACI stellen aufgrund der Vielfalt ihrer zum Teil gegenläufig wirkenden Regulatoren ideale Coinzidenzdetektoren dar, um Signale verschiedener gleichzeitig aktivierter Signalwege auf intrazellulärer Ebene in Form der cAMP-Konzentration zu integrieren.

1.1.5.1 ACII-spezifische Regulationen

Die Isoform ACII ist eine Art molekularer Schalter für die Impulse dreier verschiedener GPCR-Subtypen: $G\alpha_s$-koppelnde Rezeptoren (GsPCRs), $G\alpha_i$-koppelnde Rezeptoren (G_iPCRs), die den ACII-Stimulator $G\beta\gamma$ in ausreichenden Mengen freisetzen und $G\alpha_q$-koppelnde Rezeptoren (G_qPCRs), über deren Signaltransduktion der ACII-Stimulator PKC aktiviert wird. Hierbei fungiert die ACII nicht nur als linearer Effektor für die extrazellulären Rezeptorsignale, sondern sie besitzt zudem die Fähigkeit, diese miteinander zu verknüpfen über die synergistischen Amplifikationen gleichzeitig eintreffender Signale. So wird beispielsweise die $G\alpha_s$-Stimulation der ACII bei PKC-Phosphorylierung der AC überproportional verstärkt (Tsu und Wong, 1996).
Die ACII stellt neben der ACI und ACV die Haupt-Isoform des zentralen Nervensystems (ZNS) dar (Mons und Cooper, 1995). Speziell im Hippocampus dominieren die beiden Typen ACI und ACII. Experimentell konnte ihnen eine direkte Beteiligung an bestimmten Lernfunktionen von Mäusen nachgewiesen werden: Räumliches Training induzierte eine spezifische Veränderung der mRNA-Dichte und Aktivität der hippocampalen ACI und ACII (Mons et al., 2003).
Eine ACII-dominierte Expressionsrate wurde in den glatten Muskelzellen der Atemwege beobachtet. Mit ihrer Sensitivität für multiple extrazelluläre Stimuli wird die ACII daher als entscheidender Modulationsfaktor der Atemwegs-Resistenzfunktionen beschrieben (Ishikawa und Homcy, 1997). Die ACII wird generell eher in post-mitotischen neuronalen Zellen exprimiert, während sie kaum in noch proliferierenden Gewebetypen zu finden ist. Sie wird als homeostatisches Element der Proliferation gesehen, was auf die Kopplung der PKC-Sensitivität an stimulatorische $G\alpha_s$- und $G\beta\gamma$-Signale zurückgeführt wird (Pyne et al., 1994, Moughal et al., 1995, Smit et al., 1998, Hanoune und Defer, 2001).

1.1.5.2 ACI-spezifische Regulationen

Die Isoform ACI ist mit dem ihr eigenen Regulationsmuster in der Lage, die beiden *second messenger*-Signalwege von Calcium und cAMP miteinander zu verknüpfen. Bei intrazellulärem Anstieg der Calcium-Konzentration wird über das Calcium-bindende Protein Calmodulin (Ca/CaM) die cAMP-Produktion an der ACI aktiviert. In Zellen, die neben der ACI auch die Ca/CaM-abhängige KinaseIV exprimieren, wird die Ca/CaM-stimulierte cAMP-Produktion allerdings unterdrückt wegen Inhibition der ACI durch die Kinase-vermittelte Phosphorylierung.
Die über das stimulatorische Ca/CaM-Signal ausgelöste cAMP-Bildung an der ACI kann bei einer simultanen $G\alpha_s$-Aktivierung synergistisch verstärkt werden. Bei G_iPCR-Aktivierung ist die ACI-Aktivität außerdem

inhibitorischen Einflüssen via $G\beta\gamma$ und $G\alpha_i$ ausgesetzt. Die ACI stellt demnach einen empfindlichen Calcium-Sensor dar, der schon bei schwachem Calcium-Trigger transiente cAMP-Produktionen auslösen kann. Die ACI wird durch die zweite Ca/CaM-stimulierbare Isoform ACVIII ergänzt, die weniger inhibitorischen Einflüssen ausgesetzt ist. Sie reagiert mit einer fünffach niedrigeren Ca/CaM-Affinität erst auf hohe Calcium-Konzentrationen, wandelt diese dann aber in eine - verglichen mit der ACI - lang anhaltende cAMP-Antwort um (Xia et al., 1997).

Generell wird der ACI eine bedeutende Funktion für Formen der synaptischen Plastizität zugesprochen. Synaptische Antworten im ZNS werden moduliert durch cAMP- und Ca/CaM-abhängige Kinasen. Der *cross-talk* beider *second messenger*-Systeme erfolgt auf Ebene der ACI, die eine neurospezifische Expression und eine äußerst restriktive Verteilung in den Hirnregionen aufweist, die als Kompartimente für die Signalkomponenten synaptischer Calcium-Antworten gelten (Cooper et al., 1995, Mons et al., 1995, Mons et al., 1998). Studien an *knock out*-Mäusen bestätigten die Beteiligung der ACI an Lern- und Gedächtnisfunktionen (Xia et al., 1997). Des Weiteren wurde eine Beteiligung der neuronalen Ca/CaM-abhängigen ACs an der Entwicklung von chronischem Schmerz und von Drogenabhängigkeit nachgewiesen (Vadakkan et al., 2006, Vortherms et al., 2006).

1.2 Die isoform-spezifischen AC-Regulatoren Gβγ und Ca/CaM

1.2.1 Aufbau und Funktion von Gβγ

1.2.1.1 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: der α-Untereinheit, die GTP bindet und zu GDP hydrolysiert, und der β- und γ-Untereinheit. Die α-Untereinheit (Gα) kann als Monomer isoliert werden, während die β- und γ-Untereinheiten in der Regel als Komplex vorliegen, der als funktionelle Einheit angesehen wird (Gβγ). Im inaktiven Zustand liegt der GDP-gebundene trimere Komplex Gαβγ vor, er ist an der Membran assoziiert und bindet an heptahelicale Rezeptoren (GPCRs). Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt eine Konformationsänderung des Gα, die wiederum den Austausch von GDP zu GTP an Gα beschleunigt. Der GTP-gebundene G-Protein-Komplex dissoziiert daraufhin in Gα-GTP und Gβγ, die unabhängig verschiedene Effektoren modulieren. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der Gα-Untereinheit wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert, woraufhin Gα wieder die inaktive Konformation einnimmt, die mit Gβγ reassoziiert. Somit inaktiviert sich der Signal-Übertragungsvorgang der G-Proteine innerhalb weniger Sekunden durch die GTP-Hydrolyse von selbst (Hepler und Gilman, 1992, Neer, 1995, Hamm, 1998). Einige mit Gα-GTP interagierende Proteine, die so genannten RGS-Proteine (*regulator of G protein signaling*), können deren GTPase-Aktivität beschleunigen (Watson et al., 1996, Wieland und Chen, 1999). Dazu gehören auch einige Gα-Effektoren, wie beispielsweise die ACV (Scholich et al., 1999). Neben der klassischen GPCR-vermittelten Anregung des G-Protein-Zyklus können heterotrimere G-Proteine auch Rezeptor-unabhängig aktiviert werden mit Hilfe von so genannten AGS-Proteinen (*activator of G protein signaling*, Cismowski et al., 1999, Takesono et al., 1999). Der Aktivierung liegen je nach Mitglied der AGS-Familie unterschiedliche Mechanismen zugrunde (Davis et al., 2005, Malik et al., 2005).

Die Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine wird anhand der Gα-Untereinheit des jeweiligen G-Proteins vorgenommen (Cabrera-Vera et al., 2005, Simon et al., 1991, Wilkie et al., 1992). Es wurden bisher mehr als 20 Gα-Untereinheiten entdeckt, die gemäß ihrer Sequenzähnlichkeit in vier Familien unterteilt werden: G_s, G_i, G_q, G_{12}. Die Gα-Untereinheiten unterscheiden sich in ihrer Effektor-Spezifität. Die Stimulation membranständiger Säuger-ACs durch $G\alpha_s$ war namens-gebend für das G_s-Protein. Dementsprechend wurden die G_i-Proteine nach der inhibierenden Wirkung ihrer Gα-Untereinheit auf manche AC-Isoformen benannt.

1.2.1.2 Zusammensetzung und Struktur von Gβγ

Obwohl der Gβγ-Komplex heterotrimerer G-Proteine aus zwei Polypeptidketten, Gβ und Gγ, besteht, stellt er eine funktionelle Einheit dar, die - mit Ausnahme des labilen Komplexes $G\beta_5\gamma_x$ - unter physiologischen Bedingungen nicht dissoziiert. Die Gβ-Untereinheit besteht aus zwei strukturell unterschiedlichen Regionen (Sondek et al., 1996): Das N-terminale Segment ist eine α-Helix aus etwa 20 Aminosäuren, der restliche Teil des Moleküls bildet ein sich siebenmal wiederholendes Sequenzmotiv, das so genannte *WD-repeat*. Damit gehört Gβγ der mehr als 150 Mitglieder umfassenden *WD-repeat*-Superfamilie an, deren gemeinsames Merkmal die Assemblierung großer makromolekularer Komplexe ist. Die repetitiven Einheiten des Gβ lagern sich zu einer

Propeller-Struktur zusammen (Abbildung 1.4). Diese besteht aus sieben Propellerblättern, die jeweils aus vier antiparallelen β-Faltblättern geformt werden. Die zirkuläre Struktur wird gewährleistet, indem ein einzelnes *WD-repeat* nicht mit einer stabil gefalteten Propellerblatt-Domäne korrespondiert, sondern jeweils beim vierten, äußeren ß-Faltblatt jedes Propellerblatts beginnt und an der äquivalenten Position des folgenden Blatts endet. Ein *WD-repeat* kann unterteilt werden in eine hochkonservierte Region aus etwa 40 Aminosäuren, die in der Regel von den Aminosäurepaaren GH und WD flankiert sind und einer Region von variabler Länge zwischen WD und dem folgenden GH-Paar. Die variablen Regionen formen die äußeren β-Faltblätter jedes Propellerblatts und bilden so einen Ring um den Gβ-Torus, der den zahlreichen spezifischen Gβγ-Protein-Interaktionen dient. Die Gβ-Struktur bietet verschiedene Kontaktoberflächen an: Die Oberfläche der N-terminalen Helix, die Innenwand des zentralen Propellertunnels, den Außenring um den Propellertorus und die Ober- und Unterseite des Propellers, und zwar mit unterschiedlichem Durchmesser aufgrund einer Spreizung der β-Faltblätter. Wie in Abbildung 1.4A dargestellt, bindet Gα an die enge Oberseite des Gβ-Propellers, außerdem kommt es zu Kontakten mit dessen Außenring (Wall et al., 1995). Die Gβγ-Kontaktregion am Gα-GDP ist eine hydrophobe Tasche. Diese wird bei GTP-Bindung zerstört, was die reduzierte Affinität zu Gβγ erklärt. Eine ausführliche Zusammenfassung der verschiedenen aktivitätsabhängigen Gα-Konformationen und der intermolekularen Kontakte zwischen Gα und Gβγ wird in Arbeiten von Sprang (1997) und Rens-Domiano und Hamm (1995) gegeben.

Die Gγ-Untereinheit lagert sich an der breiten Unterseite des Gβ-Propellers an. Zusätzlich formt ihr N-Terminus eine superspiralisierte Struktur (*coiled-coil*) mit der N-terminalen Helix des Gβ. Dass Gγ keine Kontakte mit sich selber, sondern nur mit Gβ eingeht, ist eine Erklärung für die hochstabile Bindung der beiden Interaktionspartner (Wall et al., 1995, Sondek et al., 1996, Lambright et al., 1996, Clapham und Neer, 1997).

Die Gγ-Untereinheit enthält eine C-terminale Isoprenylgruppe. Die posttranslationale Isoprenylierung erfolgt am Cystein des CAAX-Motivs. Die Aminosäure X des CAAX-Motivs determiniert die Art des Isoprenylrests: Handelt es sich um ein Serin, wird ein Farnesylrest (C15) angehängt, handelt es sich um ein Leucin, wird eine Geranylgeranylgruppe (C20) gebunden (Ray et al., 1995). Die Lipid-Modifikation ist wichtig für die Membranverankerung von Gβγ, spielt aber auch eine Rolle bei der Interaktion mit anderen Proteinen (Higgins und Casey, 1996, Gautam et al., 1998, Myung et al., 1999).

Nicht nur Gγ, sondern auch die Gα-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine werden lipid-modifiziert. Alle Gα-Gruppen, mit Ausnahme von $G\alpha_t$, enthalten über Thioester-Bindung ein Palmitat an einem ihrer Cysteine. Die Familie der $G\alpha_i$ besitzt zudem ein irreversibel amid-gebundenes Myristat an seinem N-terminalen Glycin (Lipidmodifikation des $G\alpha_t$ besteht nur zu 5 % aus Myristat). $G\alpha_s$ hingegen besitzt dort eine amidisch gebundene Palmitoylgruppe, die von profunder Bedeutung für die Interaktionen von $G\alpha_s$ mit den ACs ist (Kleuss und Krause 2003).

Gegenwärtig sind fünf verschiedene Gβ- und 12 Gγ-Untereinheiten aus Säugern bekannt (Downes und Gautam, 1999). Die Gβ-Untereinheiten können mit vielen, jedoch nicht generell mit allen Gγ-Untereinheiten assoziieren (Spring und Neer, 1994). Wegen der zahlreichen Kombinationen von G-Protein-Untereinheiten ist die Signaltransduktion in Zellen hochspezifisch. Die individuellen Gβγ-Komplexe unterscheiden sich in ihren Interaktionen mit Gα-Untereinheiten, Rezeptoren und Effektoren (Myung et al., 2006). Beispielsweise konnte in GH3-Rattenhypophysenzellen gezeigt werden, dass verschiedene Gβγ-Paare spezifisch mit unterschiedlich gespleißten $G\alpha_o$-Formen kombinierten ($\alpha_{o1}\beta_3\gamma_4$ und $\alpha_{o2}\beta_1\gamma_3$), um dann selektiv entweder den inhibitorischen

muskarinergen Rezeptor ($\alpha_{o1}\beta_3\gamma_4$) oder Somatostatin-Rezeptor ($\alpha_{o2}\beta_1\gamma_3$) mit dem spannungsabhängigen Calciumkanal der GH3-Zellen funktionell zu koppeln (Kleuss et al., 1991, 1992, 1993).

Die Gβ-Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht von 35-37 kDa, wohingegen die Gγ-Untereinheiten mit 6-8 kDa deutlich kleiner sind. Während die ersten vier Gβ-Isoformen eine 80-90 %ige Aminosäureähnlichkeit zueinander aufweisen, ist $G\beta_5$ zu ihnen nur etwa 50 % identisch (Watson et al., 1996). Der Komplex $G\beta_5\gamma_x$ ist sehr labil und seine physiologische Funktion wird in Frage gestellt. Gβγ-Effektoren wie beispielsweise die ACII werden von ihm nicht reguliert (Bayewitch et al., 1998).

Die Effektorspezifität des Gβγ-Komplexes wird nicht nur durch Gβ, sondern auch durch Gγ bestimmt. So moduliert beispielsweise die Kombination $G\beta_1\gamma_2$ die Aktivität der ACs wesentlich potenter als $G\beta_1\gamma_1$ (Iniguez-Lluhi et al., 1992, Ueda et al., 1994). Ausschlaggebend für die Spezifität der Gγ-Untereinheit ist nicht nur die - verglichen mit der Gβ-Familie - weitaus größere Divergenz der Aminosäuresequenz verschiedener Gγ-Isoformen, sondern auch die Art ihrer Isoprenylierung (Myung et al., 2006).

Auch selektive Expressionsmuster wurden bei bestimmten Gβγ-Dimeren beobachtet, so ist $G\beta_1\gamma_1$ charakteristisch für die Retina, während $G\beta_1\gamma_2$ die Haupt-Gβγ-Komponente des Hirns darstellt (Fawzi et al., 1991, Tamir et al., 1991).

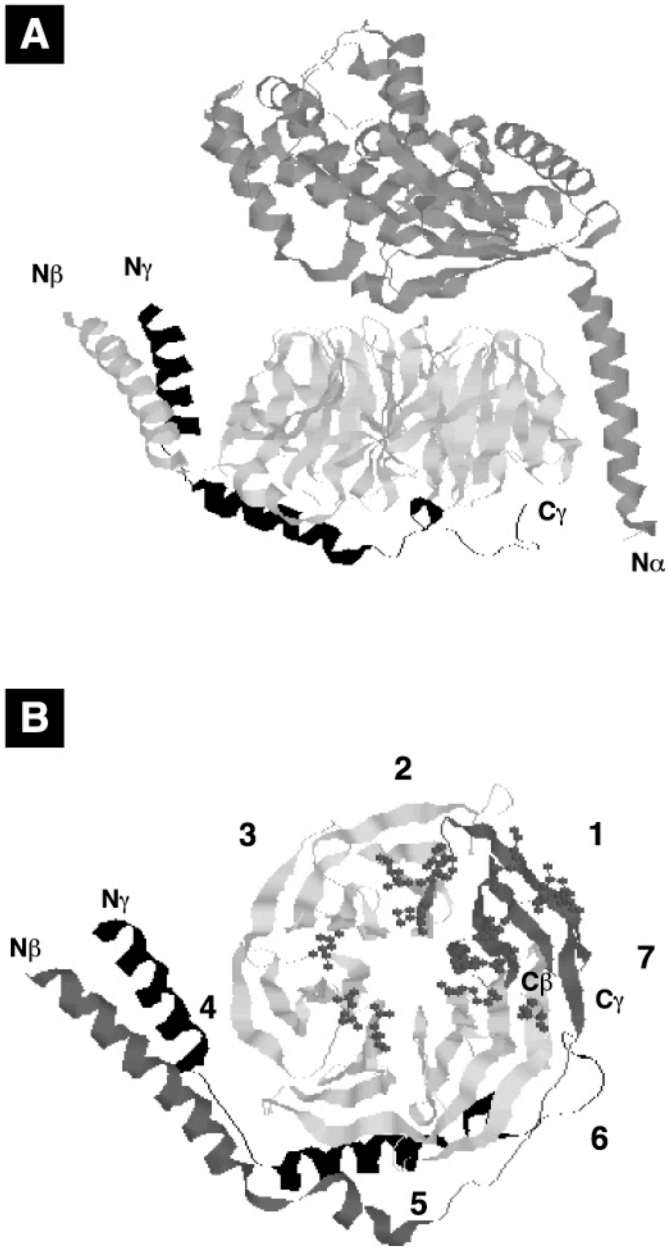

Abbildung 1.4: Struktur des Gβγ-Komplexes
(A) Struktur des $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$-Heterotrimers (Proteindatenbank; Nummer: IGP2). Die enge Oberseite des Gβ-Propellers zeigt nach oben. Die Gα-Untereinheit ist in grau, die Gβ-Untereinheit in hellgrau und die Gγ-Untereinheit in schwarz dargestellt. N- und C-Termini sind angegeben (die C-Termini von Gα und Gβ sind nicht sichtbar).
(B) Struktur des $G\beta_1\gamma_2$-Komplexes mit der engen Oberseite des Gβ-Propellers dem Betrachter zugewandt. Die Gβ-Untereinheit ist in hellgrau und die Gγ-Untereinheit in schwarz dargestellt. N- und C-Termini sind angegeben. Die Propellerblätter sind so nummeriert, dass die erste konservierte *WD-repeat* - Sequenz in Blatt „1“ beginnt. Die mit der ACII interagierende $G\beta_1$-Region ist dunkelgrau hervorgehoben; einzelne für die ACII-Bindung essentielle Aminosäuren sind in *ball and stick* dargestellt (Ford et al., 1998, Li et al., 1998, Myung et al., 2000, Yan und Gautam, 1996).

1.2.1.3 Effektoren von Gβγ

Früher ging man von einer Funktionsaufteilung der heterotrimeren G-Proteine aus, bei der die Gα-Untereinheit als die Effektor-regulierende Einheit angesehen wurde, während Gβγ lediglich die Aufgabe eines Membranankers und negativen Regulators von Gα zugesprochen wurde (Sternweis, 1986). Der erste direkte Nachweis, dass Gβγ selbst in der Lage ist, Effektoren zu regulieren, wurde an Kalium-selektiven Ionenkanälen (I_{KACh}) erbracht, die in Anwesenheit gereinigter Gβγ-Dimere aktiviert wurden (Logothetis et al., 1987). Seitdem wächst die Liste der Proteine, an denen eine direkte Interaktion und Modulation durch Gβγ gezeigt werden kann, stetig. Eine detailierte Übersicht zu den heute bekannten Gβγ-Effektoren wird in der Arbeit von Cabrera-Vera und Mitarbeitern (2005) gegeben. Zu ihnen gehören neben den ACs unter anderem spannungsabhängige Calciumkanäle vom P/Q- und N-Typ (Ikeda et al., 1996, Herlitze et al., 1996), die Kaliumkanäle GIRK1,2,4 *(G protein-gated inwardly rectifying K^+-channel*, Logothetis et al., 1987, Reuveny et al., 1994), β-adrenerge Rezeptorkinasen β-ARK aus der GRK-Familie (G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen, Pitcher et al., 1992), Phosducin (Bauer et al., 1992), Centrin (Pulvermüller et al., 2002), Phospholipasen PLCβ2,3 (Katz et al., 1992, Sternweis et al., 1994), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Stephens et al., 1994, Tang and Downes, 1997) und verschiedene Komponenten der MAPK-Kaskade (Inglese et al., 1995). Neben der Modulation von Effektoren wurden Gβγ-Interaktionen unter anderem mit RACK1 (*Receptor for Activated C Kinase 1*, Chen et al., 2005) oder Calcium/Calmodulin (Liu et al, 1997b) beschrieben, deren Funktion in der indirekten Regulation bestimmter Gβγ-Signalwege durch Besetzung der dafür relevanten Gβγ-Kontaktflächen vermutet wird (Gautam et al., 1998).

1.2.1.4 Molekulare Mechanismen der Gβγ-Interaktionen

Mit der kontinuierlich wachsenden Liste von Gβγ-Effektoren stieg auch das Interesse an den Mechanismen der Gβγ-spezifischen Signalvermittlung. Über Mutagenese- und Peptidinteraktions-Studien ist es gelungen, einige Effektor-Kontaktregionen auf Gβ zu ermitteln (Ford et al., 1998, Panchenko et al., 1998, Li et al., 1998). Hierbei wurde die Beobachtung gemacht, dass jeder Effektor zwar sein eigenes spezifisches Set an Gβ-Aminosäuren kontaktiert, diese Interaktionsflächen jedoch nicht immer getrennt voneinander liegen, sondern häufig einander überlappen und zudem in die Gα-Bindungsfläche hineinreichen. Dieses Phänomen spricht für die Hypothese, dass Gα die Gβγ-Regulationen durch Verdecken der dafür notwendigen Effektor-Kontaktflächen aufhebt. Anders als Gα nämlich ändert Gβγ seine Konformation bei Dissoziation des Heterotrimers kaum, so dass eine sterische Behinderung durch Gα eine plausible Erklärung dafür ist, dass Gβγ im heterotrimeren Komplex keinen regulatorischen Einfluss auf seine Effektoren ausübt. Die Möglichkeit einer simultanen Bindung mehrerer Effektoren an Gβγ (Liu et al., 1997b) unterstreicht das Bild der rigiden Gβγ-Konformation, die weder durch Gα- noch Effektor-Bindung gestört wird und - solange keine sterische Behinderung auftritt - unabhängige Gβγ-Interaktionen gleichzeitig zulässt. Einzige Ausnahme ist eine bei Bindung von Phosducin beobachtete Konformationsänderung von Gβ, die die Assoziation von Gβγ mit anderen Effektoren verhindert (Gaudet et al., 1996, Myung et al., 2000).

Nahezu keine der bis heute identifizierten Interaktionsflächen für den Effektor ACII (siehe Abbildung 1.4B) ist in die Gβγ-Interaktion mit der Isoform ACI involviert (Yan und Gautam, 1996, Chen et al., 1997a, Ford et al., 1998, Li et al., 1998, Myung et al., 2000). Auch nah verwandte Gβγ-Effektoren besitzen demnach alle ihre eigenen Kontaktfelder auf der Gβ-Oberfläche, die zwar partiell überlappen können, jedoch nicht identisch sind.

Am Gγ wurden ebenfalls effektor-spezifische Regionen per Mutationsanalysen untersucht. Man kann Gγ in drei funktionell verschiedene Regionen aufteilen: Das Zentrum ist an der Interaktion mit Gβ beteiligt, während die beiden Randregionen für die Rezeptor- und Effektorspezifität verantwortlich sind. Im Hinblick auf AC-Regulationen wurde kürzlich gezeigt, dass der N-Terminus in die ACII-Stimulation, der C-Terminus in die ACI-Inhibition involviert ist (Myung et al., 2006).

Auch wenn die Untersuchungen der Interaktions-Domänen auf Gβγ noch lange nicht abgeschlossen sind, ist schon jetzt klar ersichtlich, dass nicht jedem Effektor eine einzige abgegrenzte Bindungsregion zugeordnet ist, sondern dass mehrere, räumlich voneinander getrennte Kontaktpunkte auf Gβγ existieren. Bei Studien verschiedener Kontaktflächen für PLCβ2 wurde die Theorie einer funktionellen Aufteilung der verschiedenen Kontaktpunkte in STR (*signal transfer region*) und GBD (*general binding domain*) aufgestellt. STR sind allein in der Lage, das regulatorische Signal auf den Effektor zu übertragen, GBDs hingegen binden an den Effektor, ohne diesen dabei zu manipulieren, blockieren ihn aber in der Interaktion mit anderen Partnern. Mit der funktionellen Auflösung in STRs und GBDs ist die Basis gelegt für die gezielte Synthese von Agonisten (Nachahmung der Rezeptor-abhängigen Regulation) und Antagonisten (Blockade der Rezeptor-abhängigen Regulation) auf intrazellulärem Niveau zwischen Regulator und Effektor (Buck et al., 1999).

Auch auf Ebene der Effektoren, wie beispielsweise der ACII, der PLCβ2, der β-ARK und GIRK4 wurden schon konkrete Gβγ-Bindungsmotive lokalisiert (Chen et al., 1995, Bonacci et al., 2005, Koch et al., 1994, Lodowski et al., 2003). Die Motive weisen im Vergleich keine universellen, auf alle Effektoren zutreffenden Merkmale auf. Zur Charakterisierung markanter Sequenzen physiologisch relevanter Gβγ-Bindungsmotive wurde mit Hilfe einer Phagenbank ein Screen von Peptiden zufälliger Sequenz an $G\beta_1\gamma_2$ durchgeführt (Scott et al., 2001). Diese Methode eignet sich zur Identifizierung energetisch besonders günstiger Protein-Kontaktpunkte, so genannter *hot spots* (Davis et al., 2005). Hierbei wurde eine Sequenz (SIRK) identifiziert, die allen Richtlinien eines solchen *hot spot* (Delano, 2002, Ma et al., 2001) gerecht wird. Sie weist in ihren Wechselwirkungen einige Unterschiede zu den bisher identifizierten Bindungsmotiven der Gβγ-Effektoren auf. Im Vergleich zu von diesen Motiven abgeleiteten Peptiden hat das SIRK-Peptid eine 10-100-fach höhere Affinität zu Gβγ. Außerdem ist es in seiner Kompetition mit anderen Gβγ-Bindungspartnern selektiv, während beispielsweise das QEHA-Peptid der ACII das Gβγ unspezifisch in seiner Interaktion mit anderen Proteinen blockiert (Chen et al, 1995, Scott et al., 2001). *In vivo*-Studien ergaben, dass SIRK als AGS (*Activator of G-protein-signaling*, siehe Abschnitt 1.2.1.1) fungiert, das heißt, es fördert durch Bindung an Gβγ dessen Freisetzung von Gα-GDP und ermöglicht dank seiner selektiven Kompetition mit Gβγ-Effektoren die gezielte Aktivierung bestimmter Gβγ-Signalwege, wie z.B. der Stimulation der Erk1/2 (Goubaeva et al., 2003). Andere Gβγ-Bindungsmotive wie QEHA hingegen sind nicht in der Lage, die Dissoziationskonstante des heterotrimeren G-Protein-Komplexes zu ändern. Die Kristallstruktur des hochaffinen Gβγ-SIRK-Komplexes ist mittlerweile entschlüsselt (Davis et al., 2005), der genaue Mechanismus der AGS-vermittelten Gβγ-Aktivierung ist allerdings noch nicht verstanden.

1.2.2 Aufbau und Funktion von Ca/CaM

1.2.2.1 Calcium-bindende Proteine

Im Vergleich zu anderen Metallen vermittelt Calcium eine Fülle wichtiger Funktionen wie Knochenmineralisierung, Blutgerinnung, Zellmembranstabilisierung und intrazelluläre Signalweiterleitung bei Zellaktivierungen. Die cytosolische Calcium-Konzentration tierischer Zellen liegt bei etwa 10^{-7} mol/l und steigt auch nach hormoneller Aktivierung kaum über 10^{-5} mol/l. Jede Wechselwirkung enzymatischer Systeme mit intrazellulärem Calcium kann aufgrund dieser Tatsache nur dann erfolgen, wenn sie über hochaffine Bindungsstellen für Calcium verfügen. Darüber hinaus müssen solche Bindungsstellen sehr spezifisch für Calcium sein, da intrazellulär andere zweiwertige Kationen, vor allem Magnesium, in einer Konzentration von etwa 10^{-3} mol/l vorkommen. Es wurde jedoch festgestellt, dass Calcium meist nicht direkt, sondern unter Einschaltung Calcium-bindender Proteine auf die von ihm beeinflussten enzymatischen Systeme einwirkt. Im Herz- und Skelettmuskel handelt es sich dabei um das Troponin, das aus drei Untereinheiten besteht, von denen Troponin C als Calcium-Rezeptor bei der Regulation der Muskelkontraktion dient. In Nicht-Muskelzellen wurde als Calcium-bindendes Protein das Calmodulin (CaM) nachgewiesen, ein aus einer einzelnen Peptidkette bestehendes Protein, dessen Aminosäuresequenz große Ähnlichkeit hat mit der des Troponin C.

CaM ist in der Natur weit verbreitet, es kommt ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vor. Etwa 1 % des gesamten zellulären Proteins tierischer Zellen besteht aus CaM. Dort kommt es nicht nur im Cytosol vor, sondern ist auch an verschiedene zelluläre Organellen assoziiert. Aus unterschiedlichen Organismen isolierte CaM-Moleküle weisen bemerkenswerte Übereinstimmungen in ihren physikalischen, biologischen und chemischen Eigenschaften auf. So besteht zum Beispiel - trotz multipler CaM-kodierender Gene - eine 100 %ige Übereinstimmung der CaM-Aminosäuresequenz in Vertebraten.

1.2.2.2 Struktur und Calcium-Bindung des Calmodulins

CaM ist ein hitze- und säurestabiles monomeres Protein, das bei einem Molekulargewicht von 16,7 kDa vier Calcium-Ionen binden kann (Crouch und Klee, 1980). Jede der vier Calcium-bindenden Regionen wird von zwei α-Helices aus jeweils zehn Aminosäuren gebildet, die durch eine nicht-helicale Schleife voneinander getrennt sind, an die Calcium unmittelbar gebunden wird. Diese *hlh*-Konformation (*helix-loop-helix*) weist große Ähnlichkeit zur Calcium-koordinierenden „EF-Schleife“ des Parvalbumins auf und wird in Anlehnung an ihre räumliche Ähnlichkeit zu einem ausgestreckten Zeigefinger und dem Daumen einer Hand auch „EF-Hand“ genannt. Sie ist ein typisches Merkmal der Calcium-Rezeptorproteine (Nakayama und Kretsinger, 1994, Ikura, 1996, Nelson und Chazin, 1998). Sechs Aminosäuren der *hlh*-Schleife, die Positionen +X,+Y,+Z,-Y,-X,-Z eines oktaederähnlichen Gehäuses besetzend, interagieren direkt oder indirekt mit Calcium (Abbildung 1.5). Ihr Charakter ist ausschlaggebend für die Calcium-Affinität einer isolierten *hlh*-Region (Wu und Reid, 1997b). Aufgrund von kooperativen Wechselwirkungen am CaM lässt sich im nativen Enzym die Affinität zu Calcium jedoch nicht allein aus der Summe der molekularen Eigenschaften jeder einzelnen der Calcium-koordinierenden Aminosäuren ableiten.

Die CaM-Struktur ähnelt einer Hantel, aus zwei strukturell ähnlichen globulären Domänen bestehend, die durch ein flexibles zentrales Bindungselement verbunden sind. Jede Domäne besitzt ein Paar der Calcium-bindenden *hlh*-Motive, die jeweils durch ein kurzes antiparalleles β-Faltblatt miteinander verknüpft werden: Die *hlh*-Motive I und II formen die N-terminale Domäne, die *hlh*-Motive III und IV die C-terminale Domäne von CaM. Die Konformation und die funktionelle Bedeutung des nur acht bis zehn Aminosäuren umfassenden zentralen Bindungselements der beiden globulären CaM-Domänen werden kontrovers beschrieben (Vetter und Leclerc, 2003). Im Kristall ist die Region als α-Helix aufgelöst, in Lösung hingegen liegt sie völlig unstrukturiert vor, so dass die beiden globulären Domänen keine fest definierte Orientierung zueinander einnehmen, sondern flexibel und unabhängig voneinander in Bewegung sind.

Ein Vergleich der Strukturen des Calcium-freien (apoCaM) und Calcium-gebundenen (Ca/CaM) Zustands zeigt, dass die Gesamtstruktur und die Verteilung der Sekundärstrukturelemente in beiden Molekülen sehr ähnlich sind, jedoch ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der interhelicalen Winkel in beiden Domänen zu verzeichnen ist (Chou et al., 2001, Finn et al., 1995, Ikura, 1996, Kuboniwa et al., 1995). Calcium-Bindung induziert letztlich den Konformationswechsel von einem größtenteils hydrophilen, geschlossenen Zustand in eine weniger kompakte offene Struktur mit Ausstülpung großer hydrophober Bindungstaschen auf beiden Domänen, was eine Aktivierung des CaM für die Interaktion mit seinen zahlreichen Effektoren zur Folge hat. Die Kristallstrukturen des apoCaM- und Ca/CaM-Moleküls sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

Die Calcium-Bindungseigenschaften der N-und C-terminalen globulären Domänen unterscheiden sich. Die C-terminale Seite weist mit einer K_D von etwa 0,2 μM eine zehnfach höhere Affinität zu Calcium auf als die N-terminale Seite (Potter et al., 1983, Ogawa und Tanokura, 1984). Während sich die beiden globulären Domänen gegenseitig nicht in ihrer Calcium-Bindung beeinflussen, wurde bei den beiden Calcium-Bindungsstellen am affineren C-Terminus eine positive Kooperativität beobachtet (Wu und Reid, 1997a).

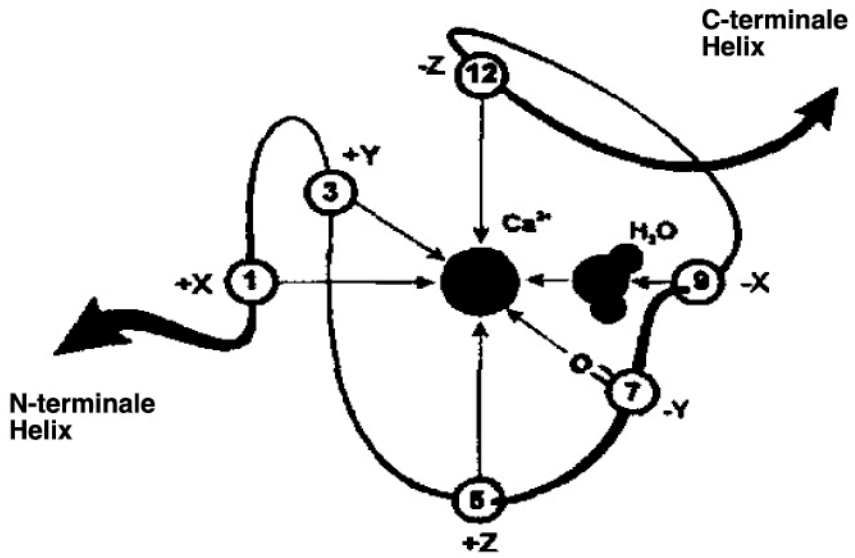

Abbildung 1.5: *hlh*-Motiv des (Ca/)CaM
Schematische Darstellung der Schleife eines Calcium-bindenden *hlh*-Motivs nach Wu und Reid (1997). Die Calcium-koordinierenden Aminosäuren sind als Nummern 1,3,5,7,9,12 dargestellt. Sie besetzen die Positionen +X,+Y,+Z,-X,-Y,-Z eines oktaederähnlichen Gehäuses. Weitere Details siehe Text.

Abbildung 1.6: Strukturen des (Ca/)CaM
(A) Struktur des apoCaM (Proteindatenbank; Nummer: 1CFD). Die N-terminale globuläre CaM-Domäne zeigt nach oben, die C-terminale globuläre CaM-Domäne zeigt nach unten. Details siehe Text.
(B) Struktur des Ca/CaM (Proteindatenbank; Nummer: 1CLL). Die N-terminale globuläre CaM-Domäne zeigt nach oben, die C-terminale globuläre CaM-Domäne zeigt nach unten. Die Calcium-bindenden Regionen sind dunkel hervorgehoben. Details siehe Text.
(C) Struktur des Ca/CaM - CaMKIIa-Peptid - Komplexes (Proteindatenbank; Nummer: 1CM1). Ca/CaM ist in hellgrau, das Peptid ist in dunkelgrau dargestellt. Die N-terminale globuläre CaM-Domäne zeigt nach oben, die C-terminale globuläre CaM-Domäne zeigt nach unten.
(D) Struktur des Ca/CaM - Anthrax-Toxin(AC) - Komplexes (Proteindatenbank; Nummer: 1K93). Ca/CaM ist in hellgrau, die AC ist in dunkelgrau dargestellt. Die N-terminale globuläre CaM-Domäne zeigt nach oben, die C-terminale globuläre CaM-Domäne zeigt nach unten. Details siehe Text.

1.2.2.3 Effektoren von Ca/CaM

Als erster Effektor von CaM wurde die Phosphodiesterase in Hirn und Herz beschrieben (Cheung, 1970). Anschließende „Neu-Entdeckungen“ des in den verschiedensten zellulären Prozessen involvierten Calcium-Bindeproteins führten zu einer redundanten Namensgebung, unter anderem *Ca^{2+}-dependent regulator protein (CDR)* oder auch einfach nur *activator protein*. Zu den Effektoren des heute mit dem generell akzeptierten Namen Calmodulin bezeichneten Calcium-Bindeproteins gehören verschiedene Kinasen (CaMKinasen, Myosin Light Chain Kinasen, Phosphorylase Kinasen oder NAD Kinasen) oder auch zahlreiche Cytoskelett/Muskel-Proteine wie beispielsweise Dystrophin oder Caldesmon. Des weiteren gibt es eine bedeutende Gruppe von Effektoren, über die Ca/CaM einen direkten Einfluss auf die verschiedenen *second messenger*-Systeme ausübt; zu diesen Effektoren gehören die ACs, sowie Calcium-ATPasen, Phosphodiesterasen, Inositol-3-Kinasen, NO-Synthasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Means et al., 1991, Vogel, 1994, Crivici und Ikura, 1995, Niki et al., 1996). Vor allem die Netzwerke der beiden *second messenger* cAMP und Calcium werden durch Ca/CaM auf verschiedenen Ebenen miteinander verknüpft, zum einen über Ca/CaM- und cAMP-abhängige Phosphorylierungen, zum anderen über die direkte Ca/CaM-Regulation von ACs und PDEs. Eine direkte Verbindung heterotrimerer G-Proteine und Ca/CaM ist ebenfalls beschrieben über die schon in Abschnitt 1.2.1.3 erwähnte Interaktion zwischen Gβγ und Ca/CaM, die gegenseitig ihren Einfluss auf andere Proteine modulieren können (Liu et al., 1997b).

Neben seiner Funktion als Calcium-Bindeprotein kann CaM außerdem mit einer Reihe von Proteinen in Calcium-unabhängiger Form interagieren. Details zu Funktionen des apoCaM werden von Jurado und Mitarbeitern (1999) zusammengefasst und diskutiert.

1.2.2.4 Molekulare Mechanismen der Ca/CaM-Interaktionen

Trotz seiner geringen Größe bietet CaM mit seiner biglobulären Struktur und den vielfältigen Konformationsänderungen in Abhängigkeit von der Calcium-Bindung an die vier flexibel zueinander gelagerten Domänen genügend Angriffsflächen für seine zahlreichen Interaktionspartner. CaM kann in Calcium-freiem, partiell Calcium-gebundenem oder in Calcium-gesättigtem Zustand unterschiedliche Bindungen eingehen (Jurado et al., 1999), die Interaktion mit Peptiden kann wiederum die Affinität des CaM zu Calcium beeinflussen (Brown et al., 1997, Peersen et al., 1997). Die beiden globulären Domänen können unabhängig voneinander agieren, indem sie verschiedene Regionen eines oder mehrerer Proteine binden.

Mehrere Kinetikstudien bezüglich Calcium-abhängiger Bindung und Aktivierung von CaM-Effektoren beschreiben die Bildung von Ca_2-CaM-Enzym-Intermediärkomplexen bei einer Calcium-Konzentration, die nur zu einer Calcium-Besetzung der affineren C-terminalen CaM-Domäne führt (Bayley et al., 1996, Johnson et al., 1996, Persechini et al., 1996). Erst bei steigenden Calcium-Konzentrationen wird nun auch die N-terminale globuläre Domäne aktiviert. Diese kann dann an die Zielstruktur binden und damit den regulatorischen Ca/CaM-Effekt auslösen. Der entscheidende Punkt dieses Mechanismus ist die Abkopplung der initialen Bindung des CaM von einer tatsächlichen Aktivierung des Zielproteins, die bei Überschreitung einer bestimmten Calcium-Konzentration schnell und effektiv an dem schon gebundenen Effektor erfolgen kann. Eine Präassoziation mit CaM im Ruhezustand der Zelle wurde beispielsweise bei verschiedenen Typen von Calcium- und auch Kaliumkanälen nachgewiesen (Schumacher et al., 2001, Bradley et al., 2004, Kim et al., 2004). Eine kürzlich erschienene Studie bezüglich der ACVIII-Stimulation durch Ca/CaM beschreibt die Existenz zweier räumlich getrennter ACVIII-Motive mit unterschiedlicher Funktion: Eine reine CaM-Bindungsregion am N-Terminus der

ACVIII, die eine Präassoziation mit CaM über dessen C-globuläre Domäne eingehen kann, und eine CaM-Signaltransferregion am C-Terminus der ACVIII, an die erst bei Überschreitung einer bestimmten Calcium-Konzentration das nun Calcium-gesättigte CaM unter Beteiligung beider CaM-Domänen weitergeleitet wird (Simpson et al., 2006).

Die mechanistischen Details der Effektor-Erkennung und -Aktivierung durch Ca/CaM sind in den meisten Fällen noch unbekannt. Genaue strukturelle Untersuchungen werden durch die multimere und transmembranäre Natur vieler Effektoren erschwert. Die Existenz von nur transient gebildeten CaM-Effektor-Präassoziationen ist ein weiteres Hindernis.

Die meisten Ca/CaM-Studien in der Vergangenheit basierten auf Interaktionen mit synthetischen Peptiden von CaM-Bindungsmotiven als Ersatz für die Zielproteine voller Länge. Die CaM-Bindungsregionen verschiedener Proteine weisen keine bemerkenswerten Sequenzähnlichkeiten auf. Es konnten dennoch Gemeinsamkeiten abgeleitet werden, die als Richtlinien für die Vorhersage von CaM-Erkennungsregionen dienen. Diese sind nicht zwingend, da auch CaM-Bindungsmotive bekannt sind, die keine dieser Kriterien erfüllen (Crivici und Ikura, 1995, Rhoads und Friedberg, 1997, Hoeflich und Ikura, 2002, **http://calcium.uhnres.utoronto.ca**).

Es gibt das so genannte „IQ-Motiv“ mit der Konsensussequenz IQxxxRGxxxR“, das in Tandem-Wiederholungen auftritt und dabei an multiple CaM-Moleküle bindet. Es wurde jedoch eher mit Calcium-unabhängigen CaM-Interaktionen in Verbindung gebracht.

Typische Calcium-abhängige CaM-Bindungsmotive formen kleine, etwa 20 Aminosäuren umfassende, amphiphile Helices mit hydrophoben Resten an konservierten Positionen, einer positiven Nettoladung und aromatischen Aminosäuren in Nähe ihrer Enden.

Ein Vergleich der Strukturen von Ca/CaM allein und im Komplex mit Peptiden, die solche helicalen Ca/CaM-Bindungsmotive aufweisen, zeigt, wie sich die beiden globulären CaM-Domänen um das Peptid stülpen und es somit in einem hydrophoben Tunnel einschließen (Ikura et al., 1992, Meador et al., 1992, Meador et al., 1993). In Abbildung 1.6C ist die Struktur eines solchen Ca/CaM-Helixpeptid-Komplexes am Beispiel der Ca/CaM-Bindungsregion der CaMKIIα dargestellt.

Die helicalen Ca/CaM-Bindungsmotive wurden häufig in der Nähe oder inmitten von autoinhibitorisch wirkenden Enzymdomänen lokalisiert. Dies führte zu der Hypothese einer Behinderung autoinhibitorischer Enzym-Regionen als Grundlage für die Ca/CaM-vermittelte Aktivierung. Autoinhibitorische Domänen wurden unter anderem in den Ca/CaM-Effektoren Calcium-Pumpe, PDE, MLCK, Calcineurin oder NO-Synthase nachgewiesen (Zurini et al., 1984, Edelman et al., 1985, Olson et al., 1990, Montgomery et al., 2000, Hubbard und Klee, 1989).

Dank intensiver struktureller Arbeiten der letzten Jahre wurden tiefer gehende Einblicke in die Ca/CaM-Regulationen gewonnen, die über reine Ca/CaM-Peptid-Interaktionen hinausgehen. Der Modellvorstellung einer Aufhebung autoinhibitorischer Aktivitäten wurden andere Regulations-Mechanismen zur Seite gestellt. So wurde die Aktivierung durch eine Effektor-Dimerisierung am Beispiel des Calcium-abhängigen Kaliumkanals beschrieben (Schumacher et al., 2001). Im Fall des Anthrax-Ödemfaktor (EF), einer Ca/CaM abhängigen AC aus *Bacillus anthracis*, erfolgt die Aktivierung wieder über einen anderen Mechanismus: Während frühere Peptid-Studien die gewohnte Einstülpung des Ca/CaM um sein AC-Bindungsmotiv indiziert hatten, zeigte die Kristallstruktur der gesamten katalytischen AC-Domäne mit Ca/CaM, dass dieses in Wirklichkeit in ausgestreckter Form an die AC bindet und dabei Strukturelemente an mehreren Stellen des aktiven Zentrums stabilisiert (Drum et al., 2002).

Die Struktur des Ca/CaM-Komplexes mit dem Anthrax-Toxin ist in Abbildung 1.6D dargestellt. Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt, dass die der Anthrax-AC strukturell ähnliche AC von *Bordetella pertussis* (CyaA) auf vergleichbare Weise durch Ca/CaM aktiviert wird, die Art der Interaktion zwischen Ca/CaM und den beiden ACs sich jedoch deutlich unterscheidet (Guo et al., 2005).

Das Beispiel der beiden AC-Toxine zeigt deutlich, dass Ca/CaM auf weitaus vielfältigere Weise mit seinen Effektoren interagieren kann als bis vor kurzem angenommen. Um diese komplexen Mechanismen aufzuklären sind aber Studien an Zielproteinen voller Länge notwendig.

1.3 Die isoform-spezifischen Stimulationen der ACII durch Gβγ und der ACI durch Ca/CaM

1.3.1 Sind Gβγ-Regulationsmotive auf der ACII bekannt?

Aus Experimenten an immobilisierten ACII-Domänen ist bekannt, dass Gβγ an alle drei cytosolischen Domänen (C1a, C1b und C2) der ACII binden kann (Weitmann et al., 2001). Eine Sequenz, die dem von Scott und Mitarbeitern identifizierten Gβγ - *hot spot* SIRK (siehe Abschnitt 1.2.1.4) vergleichbar wäre, ist jedoch in keiner der ACII-Domänen zu finden.

Die bei Beginn der vorliegenden Arbeit einzige identifizierte Gβγ-Bindungsstelle ist die auf der C2-Domäne der ACII (AS 956-982) lokalisierte, nach ihren N-terminalen Aminosäuren benannte QEHA-Region. Ihre Interaktion mit Gβγ wurde an einem synthetischen QEHA-Peptid mit Hilfe verschiedener *in vitro*-Techniken wie *cross-linking* (Weng et al., 1996), *yeast-two-hybrid-screening* (Yan und Gautam, 1996) und Effektor-Kompetitionen (Chen et al., 1995) nachgewiesen. Die Affinität des QEHA-Peptids zu Gβγ ist jedoch niedrig verglichen mit anderen Gβγ-bindenden Peptiden (Scott et al., 2001).

Eine anfänglich abgeleitete funktionelle Relevanz der QEHA-Region für die ACII-Stimulation durch Gβγ kann mittlerweile ausgeschlossen werden, da ein Austausch der ACII-spezifischen QEHA-Region durch entsprechende Sequenzen der nicht Gβγ-stimulierbaren Isoformen ACI oder ACIII möglich ist, ohne den stimulatorischen Gβγ-Effekt zu beeinträchtigen (Weitmann et al., 2001).

Eine funktionell wichtige Rolle für die Gβγ-Stimulierbarkeit der ACII scheint hingegen die variable C1b-Domäne zu spielen, da sie im Modell coexprimierter ACII-Hälften essentiell ist für deren Gβγ-Sensitivität (Weitmann et al., 2001).

1.3.2 Sind Ca/CaM-Regulationsmotive auf der ACI bekannt?

Basierend auf Sequenzanalysen wurde Anfang der 90er Jahre ein Ca/CaM-Regulationsmotiv auf der ACI identifiziert (Vorherr et al., 1993). Das so genannte AC28-Motiv (AS 495-522) ist in der variablen C1b-Domäne der ACI lokalisiert. Es erfüllt nicht alle in Abschnitt 1.2.2.4. beschriebenen Merkmale Calcium-abhängiger CaM-Bindungsmotive, weist aber die typische hydrophobe/basische Aminosäure-Zusammensetzung auf und besitzt einen aromatischen Rest in Nähe seines N-Terminus.

Die spezifische Ca/CaM-Bindung dieses Motivs wurde mit Hilfe eines synthetischen AC28-Peptids auf Grundlage von Fluoreszenzmessungen und Effektor-Kompetitionsstudien bestätigt (Vorherr et al., 1993). Außerdem konnte eine funktionelle Relevanz des Motivs für die ACI-Stimulation durch Ca/CaM nachgewiesen werden anhand von Punktmutationen innerhalb der AC28-Sequenz, die zu veränderten Ca/CaM-Sensitivitäten der ACI-Mutanten führten (Wu et al., 1993).

Abgesehen davon sind die Details zum molekularen Mechanismus der ACI-Aktivierung durch Ca/CaM unbekannt. Es gibt bisher keine strukturellen Daten zu dem synthetischen AC28-Peptid - geschweige denn zu größeren ACI-Fragmenten - im Komplex mit Ca/CaM, aus denen Regulationsmechanismen abgeleitet werden könnten, wie es kürzlich anhand der Toxin-ACs EF und CyaA gelungen ist (siehe Abschnitt 1.2.2.4).

Insgesamt stellte sich zu Beginn der Arbeit folgendes Bild dar: Eine Beteiligung der variablen C1b-Domäne der ACII und ACI als Vermittler des jeweiligen stimulatorischen Gβγ- bzw. Ca/CaM-Signals war in beiden Fällen dokumentiert. Auf der ACII war allerdings noch kein genaues Regulationsmotiv für Gβγ identifiziert. Generell unklar war, ob der Gβγ- bzw. Ca/CaM-Signaltransfer auf der jeweiligen AC-Isoform über ein einziges in der Primärstruktur eingegrenztes Motiv oder aber unter Einsatz mehrerer räumlich getrennter AC-Strukturen abläuft.