

4 Ergebnisse

4.1 G $\beta\gamma$ -Regulationsmotive auf der ACII

4.1.1 Einfluss der C1b-Domäne der ACII

4.1.1.1 Bedeutung der C1b-Domäne für die G $\beta\gamma$ -Regulation

Die variable C1b-Domäne der ACII nimmt bei der Stimulation der ACII durch G $\beta\gamma$ eine entscheidende Rolle ein. Dies konnte bereits 2001 in unserem Labor am Modell coexprimierter ACII-Hälften gezeigt werden (Weitmann et al., 2001). Der Nachweis am intakten Enzym voller Länge stand noch aus.

Deshalb wurde eine Chimäre konstruiert, bei der die C1b-Domäne der ACII durch die der ACI ersetzt wurde: ACII.IC1b (Abbildung 4.1). Die im Methodenteil (3.2.7.2) erläuterte Klonierungsstrategie erlaubte einen Domänenaustausch unter Vermeidung künstlicher Sequenzinsertionen, so dass Mutante ACII.IC1b, sowie alle im Folgenden vorgestellten Chimären dieser Arbeit, an jeder Stelle ausschließlich Aminosäuren enthielten, die in mindestens einer der entsprechenden Ausgangs-AC-Isoformen enthalten sind.

Die Mutante ACII.IC1b wurde in Sf9 Zellen exprimiert und in deren Plasmamembran detektiert (siehe Abbildung 4.1D). Als Negativkontrolle dienten - wie bei allen anderen in dieser Arbeit untersuchten Mutanten - Sf9-Membranen, die mit einer äquivalenten MOI von β -Galactosidase-codierenden Baculoviren infiziert worden waren.

Da es sich bei der ausgetauschten Domäne nicht um eine der beiden das katalytische Zentrum bildenden C1a- und C2a-Domänen handelte, war kein gravierender Einschnitt in die generelle Aktivität der Mutante (Basalaktivität, G α_s /Forskolin-Stimulation) zu erwarten. Entsprechende Experimente zeigten jedoch, dass der Austausch der C1b-Domäne besonders gegenüber dem Stimulator G α_s deutliche Einbußen der Mutanten-Aktivität im Vergleich zum ACII-Wildtyp zur Folge hatte (Abbildung 4.2): Die für die Isoform ACII typische hohe G α_s -Stimulierbarkeit (ca. 30-fach) wurde durch den C1b-Austausch auf ein moderates Niveau (ca. 10-fach) reduziert, das auch durch Forskolin erreicht wird. Insgesamt lagen die basale wie auch die G α_s - und Forskolin-stimulierten Katalyseraten der durch Domänenaustausch generierten Mutante aber immer noch deutlich über denen der Sf9-endogenen Enzyme (siehe Methodenteil 3.2.6.1: Endogene Aktivitäten wurden in jedem AC-Assay an Sf9-Membranen ermittelt, die mit β -Galactosidase-codierenden Baculoviren infiziert worden waren).

Die Mutante wurde anschließend auf ihre Regulierbarkeit durch G $\beta\gamma$ untersucht. Sollte die C1b-Domäne der ACII verantwortlich sein für die Vermittlung der isoform-spezifischen Stimulation durch G $\beta\gamma$, so würde der Austausch durch die entsprechende Domäne der ACI zu einer Aufhebung der Stimulation führen. Tatsächlich war die ACII.IC1b-Mutante nicht mehr durch G $\beta\gamma$ zu regulieren. Bei G $\beta\gamma$ -Konzentrationen, die eine maximale Stimulation des ACII-Wildtyps bewirkten, war kein signifikanter Anstieg der Mutanten-Aktivität zu beobachten, unabhängig davon, ob G α_s (Abbildung 4.3A) oder Forskolin (Abbildung 4.3B) als Costimulator anwesend waren. Demnach ist die C1b-Domäne der ACII für die Stimulierbarkeit durch G $\beta\gamma$ auch am intakten Enzym notwendig (Diel et al., 2006).

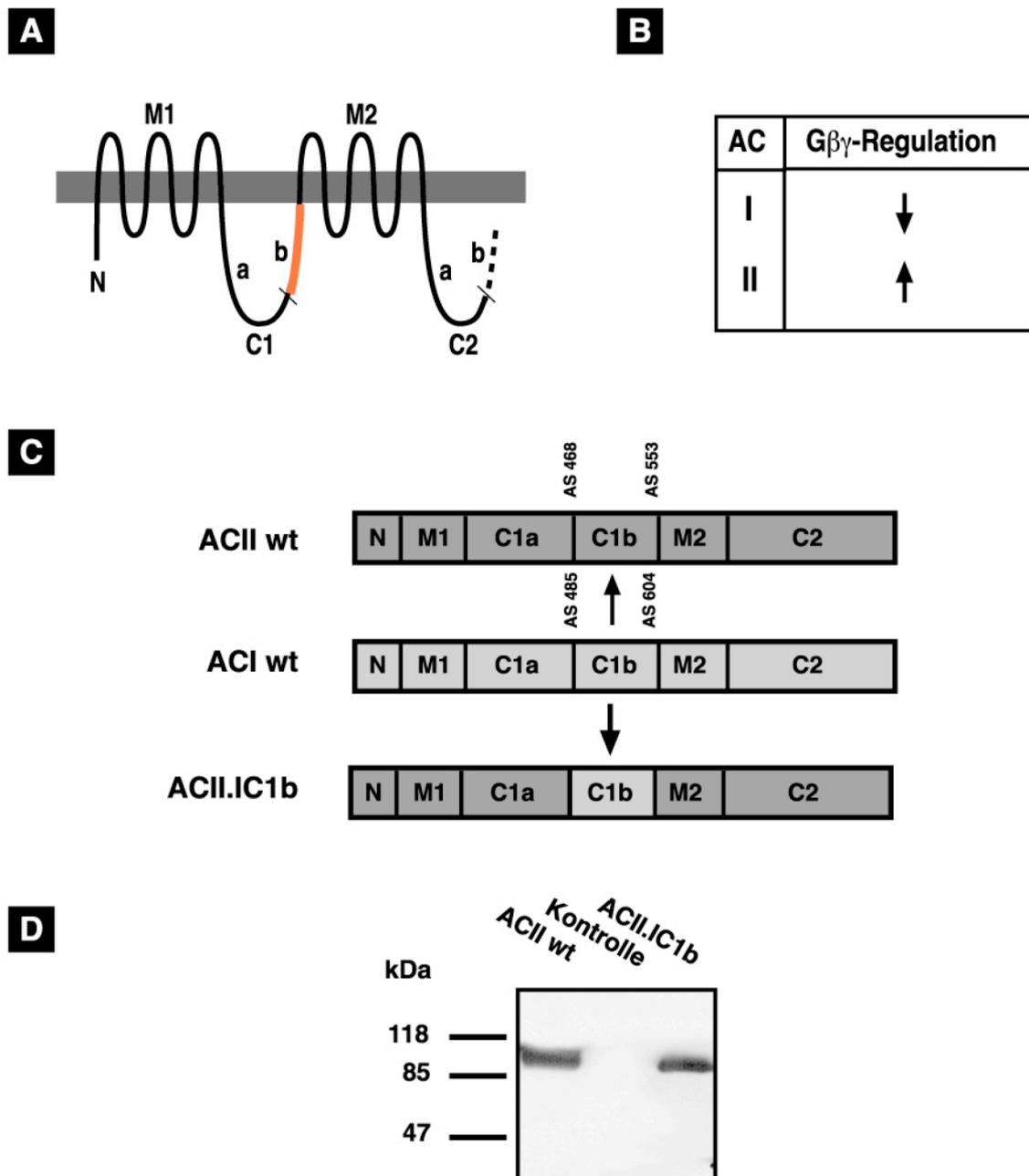


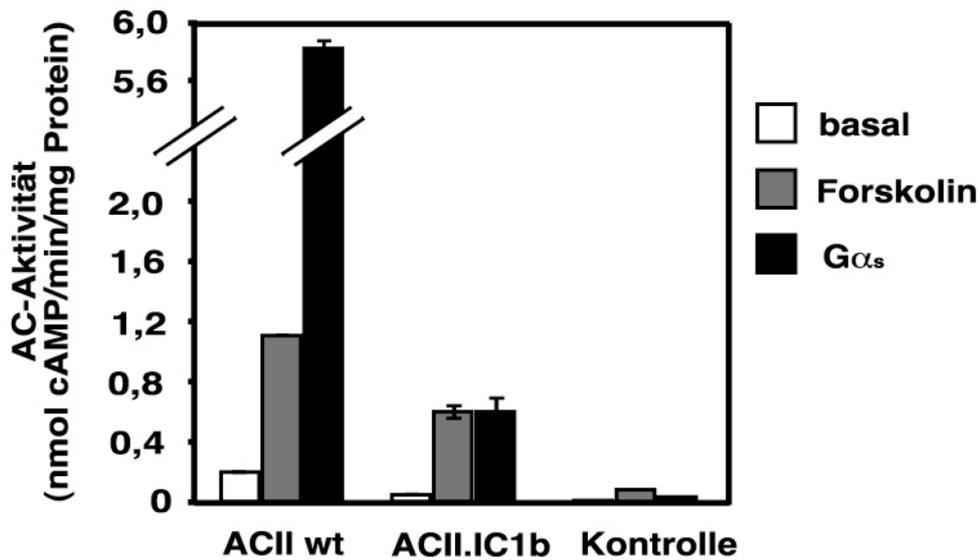
Abbildung 4.1: Konstruktion der Chimäre ACII.IC1b

(A) Topologie der AC (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 1.2). Die C1b-Domäne ist orange hervorgehoben.

(B) Regulation der ACI- und ACII-Aktivität durch G $\beta\gamma$. ↓: Inhibition, ↑: Stimulation.

(C) Schematische Darstellung der ACII.IC1b-Generierung aus den Wildtypen ACI (hellgrau) und ACII (grau). N: cytosolischer N-Terminus; M1: erste Transmembran-Domäne; C1a: a-Subdomäne der ersten cytosolischen Domäne; C1b: b-Subdomäne der ersten cytosolischen Domäne; M2: zweite Transmembran-Domäne; C2: zweite cytosolische Domäne. Angegeben sind die Positionen der Aminosäuren, die die C1b-Domäne begrenzen.

(D) Immunonachweis der Wildtyp-ACII und ACII.IC1b-Chimäre. Zwei μg Sf9-Membranprotein wurden über SDS-PAGE in einem 9%igen Gel aufgetrennt (Kontrolle: β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.2.5). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit dem MYC-spezifischen Antikörper detektiert.

**Abbildung 4.2: Aktivität der Chimäre ACII.IC1b**

Die AC-Aktivität der Membranen (20 μg Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACII-Wildtyp oder die ACII.IC1b-Chimäre exprimiert worden war, wurde ohne Regulator (basal) oder in Gegenwart von 100 μM Forskolin bzw. 80 nM $G\alpha_s$ ermittelt (Kontrolle: β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an.

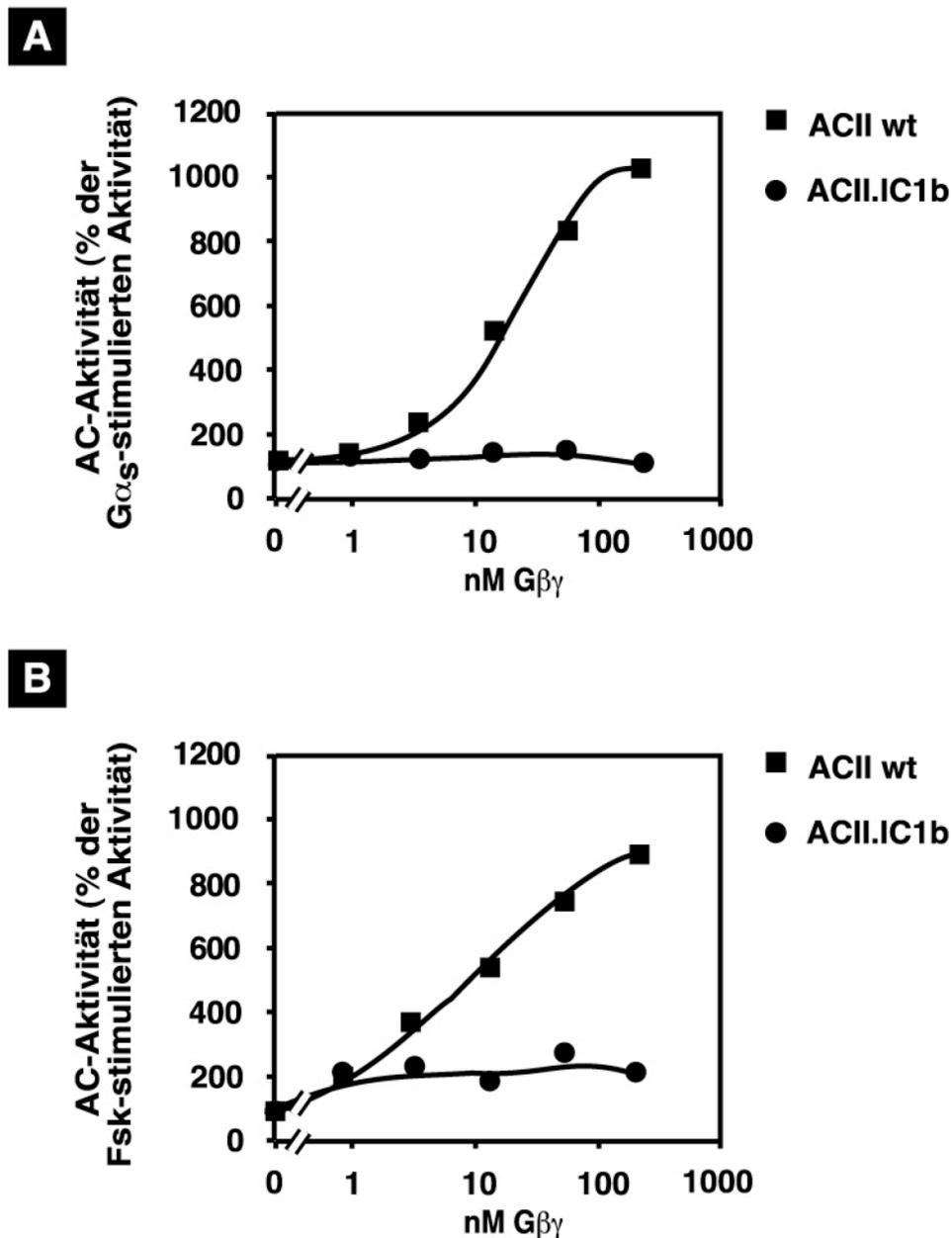


Abbildung 4.3: Regulierbarkeit der Chimäre ACII.IC1b durch $G\beta\gamma$

Die AC-Aktivität der Membranen (5 μg Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACII-Wildtyp oder die ACII.IC1b-Chimäre exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen $G\beta\gamma$ und 80 nM $G\alpha_s$ (A) bzw. 10 μM Forskolin (B) als Costimulator ermittelt. Dargestellt sind die $G\beta\gamma$ -stimulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivitäten ohne $G\beta\gamma$ in Gegenwart des jeweiligen Costimulators (100 %). Die $G\alpha_s$ -stimulierten Aktivitäten betragen für ACII 5,8 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACII.IC1b 0,6 nmol cAMP/min/mg Protein. Die Forskolin-stimulierten Aktivitäten betragen für ACII 1,3 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACII.IC1b 0,4 nmol cAMP/min/mg Protein. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt drei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

4.1.1.2 Das PFAHL-Motiv auf der C1b-Domäne

Im nächsten Schritt sollte auf der als G β γ -Regulationsdomäne identifizierten C1b-Domäne der ACII das verantwortliche Motiv genauer eingegrenzt werden. Bei der dafür durchgeführten Feinkartierung der C1b-Domäne wurde wieder an intakten ACII-Konstrukten voller Länge gearbeitet. In einem linearen Screening wurden sukzessive Blöcke von jeweils sechs Aminosäuren der C1b-Domäne durch das Hexapeptid NAAIRS (Asparagin-Alanin-Alanin-Isoleucin-Arginin-Serin) ausgetauscht, um den Einfluss jeder dieser „Minidomänen“ auf die G β γ -Stimulierbarkeit der gesamten ACII zu untersuchen. Von dem Hexapeptid NAAIRS ist bekannt, dass es in Anpassung an die flankierenden Motive in verschiedenen Proteinen unterschiedliche Sekundärstrukturen annehmen kann (Wilson et al., 1985). So wurde es schon öfter erfolgreich als Ersatz-Sequenz eingesetzt, um über Substitutionen die Funktion einer eingegrenzten Region zu untersuchen bei gleichzeitig minimaler Veränderung von Struktur und Funktionalität des gesamten Proteins (Sellers et al., 1998, Meigs et al., 2005). In einer Serie solcher Substitutionsmutationen in der C1b-Domäne der ACII wurden neun NAAIRS-Mutanten generiert (Abbildung 4.4A). Alle Mutanten konnten in ihrer Expression, Integrität und Plasmamembran-Lokalisation mittels Immunodetektion bestätigt werden (Abbildung 4.4B). Im anschließenden Aktivitätstest zeigten alle neun Mutanten signifikante basale, Forskolin- und G α_s -stimulierte Aktivitäten (Abbildung 4.5), allerdings mit zum Teil erheblichen Unterschieden. Während ACII.A472, ACII.A484 und ACII.A490 ein dem Wildtyp vergleichbares Profil zeigten, war bei den Mutanten ACII.A496 bis ACII.A546 eine Reduktion der Aktivitäten zu beobachten, insbesondere in Gegenwart von G α_s .

Die G β γ -Regulation jeder einzelnen Mutante wurde nach einer G α_s -Vorstimulation untersucht und mit dem entsprechenden Profil des ACII-Wildtyps verglichen (Abbildung 4.6). Alle Mutanten mit Substitutionsstellen N- und C-terminal von der Region, die in den drei Mutanten ACII.A490, ACII.A496, ACII.A503 ausgetauscht war, wurden durch G β γ stimuliert und wiesen ein dem ACII-Wildtyp ähnliches Regulations-Profil auf: Mit einer vergleichbaren apparenten Affinität ($EC_{50} \sim 20$ nM) war bei 300 nM G β γ die Sättigung erreicht. Eine Ausnahme stellte die Mutante ACII.A546 dar, welche eine schwächere Affinität ($EC_{50} \sim 70$ nM) zu G β γ entwickelte. Die durch diese sechs Mutanten abgedeckten Sequenzen der C1b-Domäne waren demnach nicht obligat für die G β γ -Regulation der ACII. Bei den drei Mutanten ACII.A490, ACII.A496 und ACII.A503 hingegen war ein deutlicher Verlust der G β γ -Regulation zu verzeichnen. ACII.A490 wurde nur bei hohen G β γ -Konzentrationen geringfügig stimuliert, bei ACII.A496 und ACII.A503 war keine G β γ -Sensitivität nachweisbar. Die in diesen Mutanten ausgetauschte Region der C1b-Domäne war somit notwendig für die Stimulierbarkeit der ACII durch G β γ . In Abbildung 4.7A sind die G β γ -Effekte auf die neun Mutanten in direktem Vergleich dokumentiert.

Bei Analyse der C1b-Primärstrukturen verschiedener AC-Isoformen (Abbildung 4.7B) fiel ein Sequenzabschnitt innerhalb der ansonsten sehr variablen Domäne auf, der in genau den drei Isoformen (ACII, ACIV, ACVII) konserviert ist, die durch G β γ stimuliert werden können. In anderen AC-Isoformen hingegen ist kein vergleichbares Sequenzmotiv zu finden. Die bei den zwei G β γ -insensitiven Mutanten ACII.A496 und ACII.A503 ausgetauschten Aminosäuren fielen exakt in diese Region, und die ersten drei Aminosäuren des Motivs wurden durch die nur schwach reaktive Mutante ACII.A490 abgedeckt. Die Region umfasst 17 Aminosäuren M-T-R-Y-L-E-S-W-G-A-A-K/R-P-F-A-H-L und wurde nach ihren letzten fünf Aminosäuren PFAHL-Motiv genannt. Die letzte Aminosäure Leucin (L) war zwar durch keine der NAAIRS Mutanten erfasst, wurde aber aufgrund des Sequenzvergleichs ebenfalls dem Motiv zugerechnet (Diel et al., 2006).

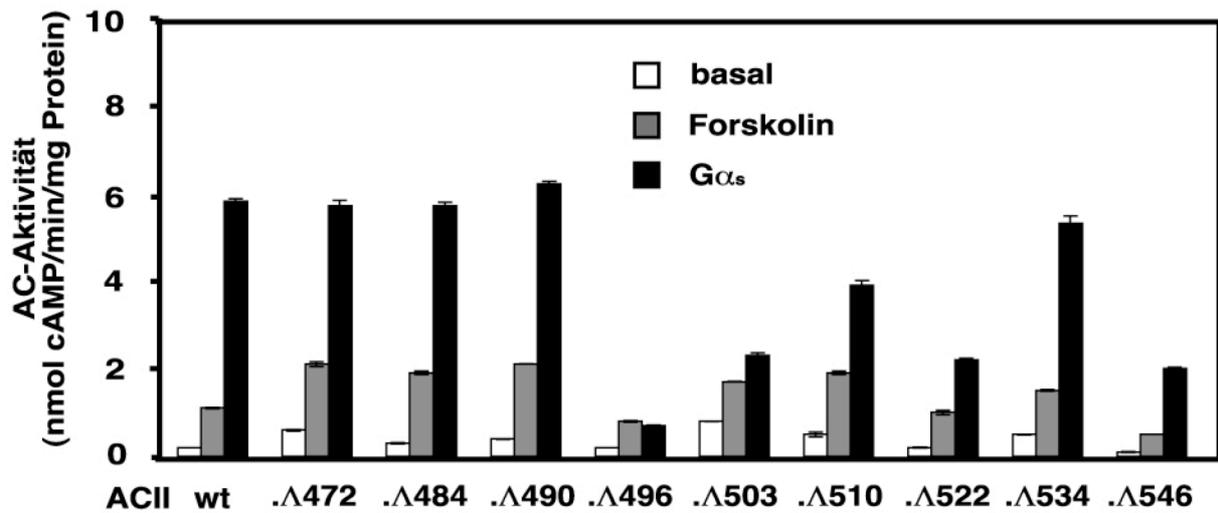


Abbildung 4.5: Aktivität der NAAIRS-Mutanten

Die AC-Aktivität der Membranen (20 μ g Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACII-Wildtyp oder eine der ACII.Axxx-Mutanten exprimiert worden war, wurde ohne Regulator (basal) oder in Gegenwart von 100 μ M Forskolin bzw. 80 nM G α_s ermittelt. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an.

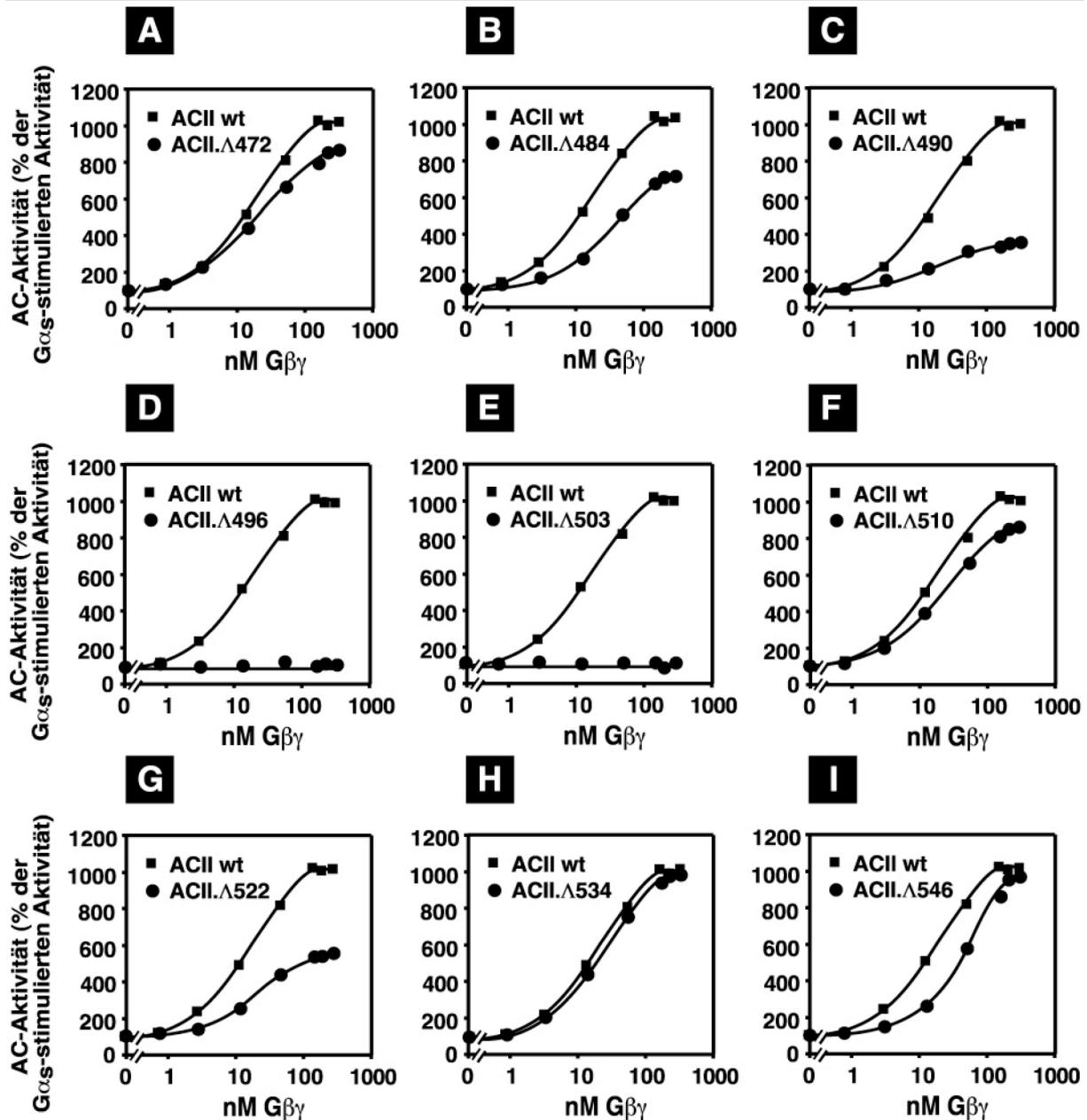


Abbildung 4.6: Regulierbarkeit der NAAIRS-Mutanten durch $G\beta\gamma$

Die AC-Aktivität der Membranen (5 μg Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACII-Wildtyp oder eine der neun NAAIRS-Mutanten ACII.Axxx (A-I) exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen $G\beta\gamma$ und 80 nM $G\alpha_s$ als Costimulator ermittelt. Dargestellt sind die $G\beta\gamma$ -stimulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivitäten mit $G\alpha_s$ allein (100 %). Die $G\alpha_s$ -stimulierten Aktivitäten betragen für ACII 5,8 nmol cAMP/min/mg Protein und für die NAAIRS-Mutanten 5,7 (ACII.Δ472) bzw. 5,7 (ACII.Δ484) bzw. 6,2 (ACII.Δ490) bzw. 0,7 (ACII.Δ496) bzw. 2,3 (ACII.Δ503) bzw. 3,9 (ACII.Δ510) bzw. 2,2 (ACII.Δ522) bzw. 5,3 (ACII.Δ534) bzw. 2 (ACII.Δ546) nmol cAMP/min/mg Protein. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

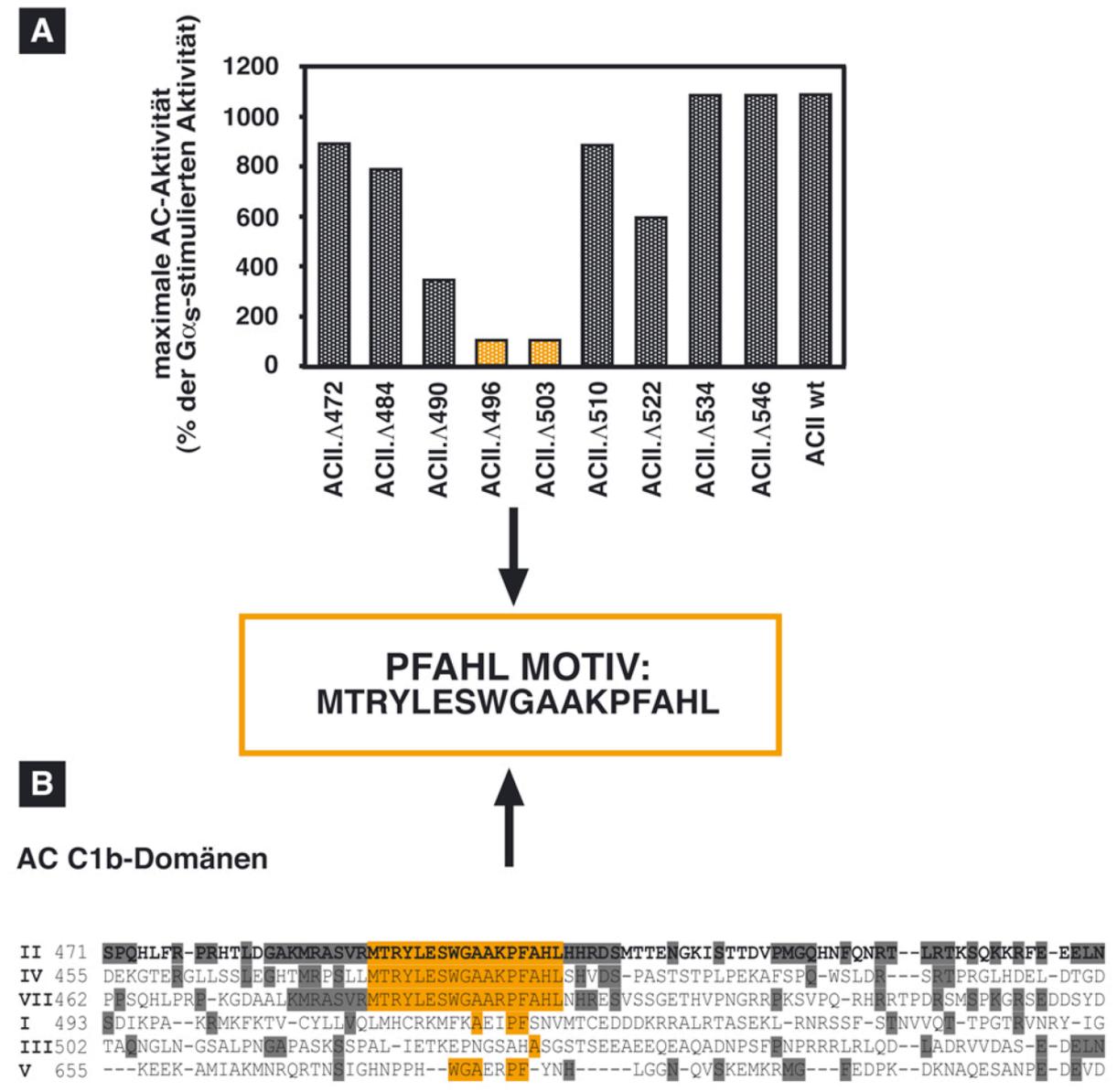


Abbildung 4.7: Das PFAHL-Motiv in der C1b-Domäne der ACII

(A) Übersicht über die maximale Stimulierbarkeit der in Abb. 4.6 gezeigten NAAIRS-Mutanten ACII.Axxx und der Wildtyp-ACII bei sättigenden Gβγ-Konzentrationen (300 nM). Orange markiert sind die beiden Säulen der Gβγ-insensitiven Mutanten ACII.A496 und ACII.A503.

(B) Sequenzvergleich der C1b-Domänen verschiedener AC-Isoformen. Verglichen werden die drei Gβγ-stimulierbaren ACII, ACIV und ACVII und die Isoformen ACI, ACIII und ACV als Beispiele für nicht durch Gβγ-stimulierte AC-Subfamilien. Die jeweiligen Positionen der ersten gelisteten Aminosäure jeder AC sind links vor dem Sequenzblock angegeben. Zur ACII identische Aminosäuren sind grau unterlegt, das PFAHL-Motiv ist orange unterlegt.

4.1.1.3 Hinlänglichkeit des PFAHL-Motivs für die G $\beta\gamma$ -Regulation

Nach Identifizierung des für die G $\beta\gamma$ -Stimulierbarkeit der ACII notwendigen PFAHL-Motivs sollte geklärt werden, ob dieses Motiv allein für die G $\beta\gamma$ -Stimulation ausreichend ist. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Insertion des PFAHL-Motivs in eine G $\beta\gamma$ -insensitive AC dieses Enzym G $\beta\gamma$ -sensibel machte. Dafür wurde eine Mutante der ACIII generiert, bei der die C1b-Domäne der ACIII durch die entsprechende Domäne der ACII, welche das PFAHL-Motiv enthält, ausgetauscht wurde: ACIII.IIC1b (Abbildung 4.8). Die Typ III AC bot sich als Zielstruktur an, da sie nach damaligem Kenntnisstand die einzige der insgesamt acht partikulären, Forskolin/G α_s -stimulierbaren Isoformen ACI-VIII war, von der keine G $\beta\gamma$ -Sensitivität dokumentiert war.

Nach Expression in Sf9-Zellen konnten der ACIII-Wildtyp und seine Mutante in ähnlich hoher Konzentration in den isolierten Sf9-Membranen detektiert werden wie die als Kontrolle dienende ACII (siehe Abbildung 4.8D). Beim üblichen Aktivitätstest wurde angesichts der im Vergleich zu anderen AC-Isoformen extrem niedrigen Aktivität der ACIII zusätzlich zu den basalen, G α_s - und Forskolin-stimulierten Bedingungen die Aktivierung mit Forskolin plus Ca/CaM gemessen, um präzise Messdaten zu erhalten (über 0,5 nmol/mg/min). Sowohl der ACIII-Wildtyp als auch die Mutante ACIII.IIC1b waren katalytisch aktiv (Abbildung 4.9). Während die G α_s -Stimulation bei Wildtyp und Mutante ähnlich war, wurde die Forskolin-Antwort der ACIII durch den C1b-Austausch abgeschwächt.

Im Folgenden wurde die G $\beta\gamma$ -Regulierbarkeit überprüft. Sie wurde in diesem Fall wegen der Messgenauigkeit in Gegenwart von Forskolin plus Ca/CaM untersucht (Abbildung 4.10A,B). Unerwarteterweise wurde der ACIII-Wildtyp in beträchtlichem Ausmaß durch G $\beta\gamma$ inhibiert. Mit einer IC₅₀ von etwa 10 nM wurde die ACIII-Aktivität bis zu 20 % ihrer ursprünglichen Aktivität durch G $\beta\gamma$ gesenkt. Ein nahezu identisches G $\beta\gamma$ -Inhibitionsprofil ergab sich auch bei alleiniger Forskolin-Vorstimulation in Abwesenheit des Costimulators Ca/CaM (Abbildung 4.10C), so dass der inhibitorische Effekt nicht nur auf eine reine Komplexierung von G $\beta\gamma$ mit Ca/CaM zurückzuführen war. Unter denselben Bedingungen wurde die ACII auch weiterhin durch G $\beta\gamma$ stimuliert (Abbildung 4.10B,D). Die Effizienz der ACII-Stimulation war bei Anwesenheit von Ca/CaM schwächer als mit Forskolin allein.

Entsprechende Untersuchungen an der Mutante ACIII.IIC1b zeigten ein der ACIII vergleichbares Inhibitionsprofil. G $\beta\gamma$ war in seiner inhibitorischen Wirkung auf die Mutante genauso potent und effizient wie beim Wildtyp. Die in die ACIII eingesetzte C1b-Domäne der ACII war demnach nicht in der Lage, stimulatorische G $\beta\gamma$ -Signale auf die ACIII zu übertragen und damit den inhibitorischen G $\beta\gamma$ -Effekt auf das ACIII-Gerüst auch nur ansatzweise zu kompensieren. Mit den an ACIII.IIC1b erhobenen Daten wurde deutlich, dass das in der C1b-Domäne der ACII lokalisierte PFAHL-Motiv kein isoliertes G $\beta\gamma$ -Regulationsmotiv darstellt. Es musste zusätzliche Regionen auf der ACII geben, die für die G $\beta\gamma$ -Regulation eine wichtige Rolle spielen (Diel et al., 2006).

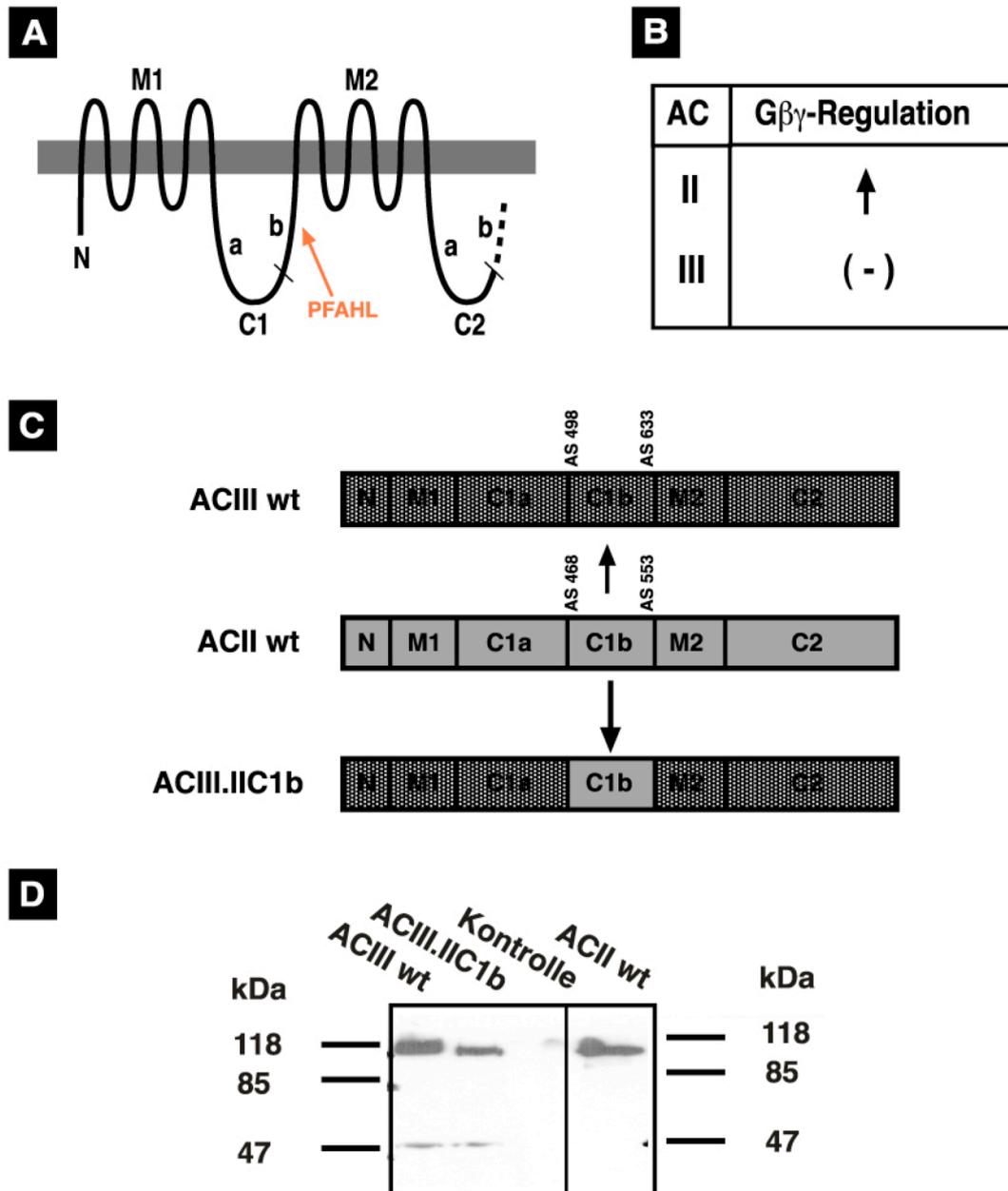


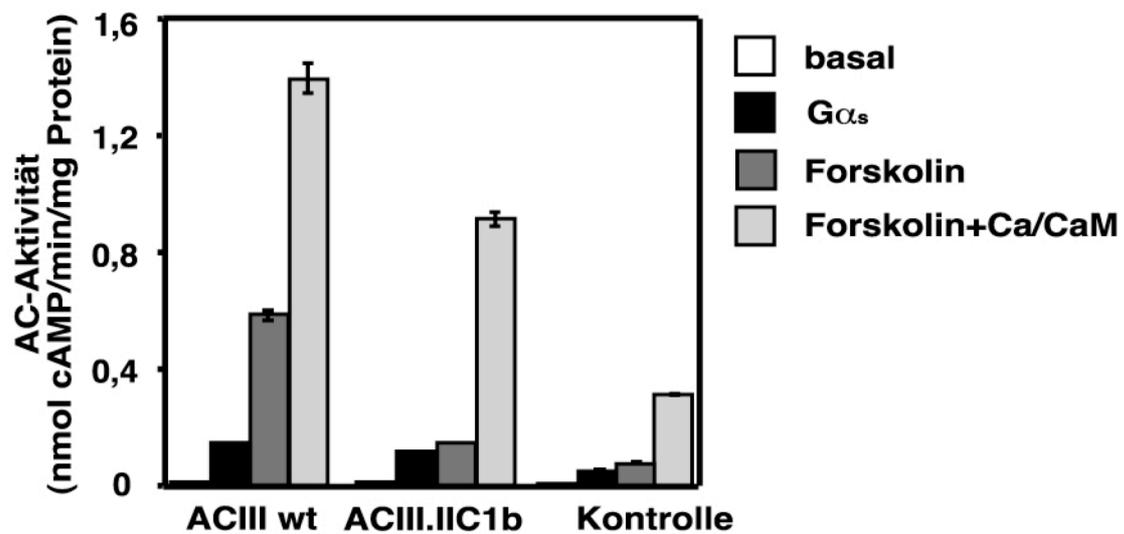
Abbildung 4.8: Konstruktion der Chimäre ACIII.IIC1b

(A) Topologie der AC (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 1.2).

(B) Regulation der ACII und ACIII durch Gβγ. ↑: Stimulation, (-): zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine Regulation bekannt.

(C) Schematische Darstellung der ACIII.IIC1b-Generierung aus den Wildtypen ACII (grau) und ACIII (dunkelgrau). Erläuterung der Domänen siehe Legende zu Abb. 4.1. Angegeben sind die Positionen der Aminosäuren, die die C1b-Domäne begrenzen.

(D) Immunonachweis der Wildtyp-ACII, Wildtyp-ACIII und ACIII.IIC1b-Chimäre mit dem MYC-spezifischen (ACII) bzw. ACIII-spezifischen Antikörper (ACIII, ACIII.IIC1b). Zwei µg Sf9-Membranprotein wurden über SDS-PAGE in einem 9 %igen Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit dem jeweiligen Antikörper detektiert.

**Abbildung 4.9: Aktivität der Chimäre ACIII.IIC1b**

Die AC-Aktivität der Membranen (20 µg Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACIII-Wildtyp oder die ACIII.IIC1b-Chimäre exprimiert worden war, wurde ohne Regulator (basal) oder in Gegenwart von 80 nM $G\alpha_s$, 100 µM Forskolin bzw. 100 µM Forskolin plus 30 µM Ca^{2+} / 2 µM CaM ermittelt (Kontrolle: β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an.

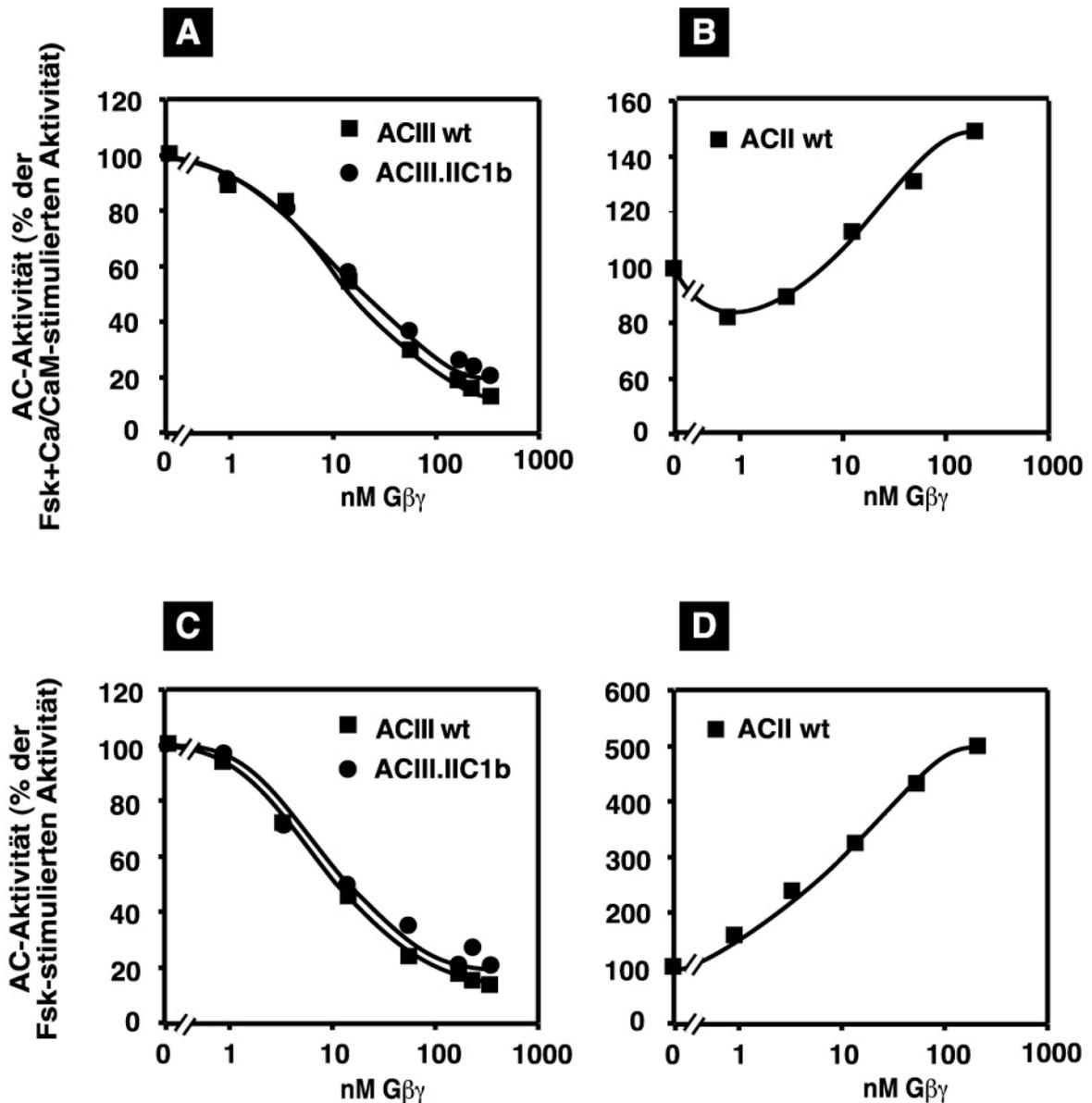


Abbildung 4.10: Regulierbarkeit der Chimäre ACIII.IIC1b durch Gβγ

Die AC-Aktivität der Membranen (20 µg Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACIII-Wildtyp, ACII-Wildtyp oder die ACIII.IIC1b-Chimäre exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen Gβγ und 100 µM Forskolin plus 30 µM Ca²⁺ / 2 µM CaM (A, B) bzw. 100 µM Forskolin (C, D) als Costimulator ermittelt. Dargestellt sind die Gβγ-regulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivitäten ohne Gβγ in Gegenwart des jeweiligen Costimulators (100 %). Die (Forskolin+Ca/CaM)-stimulierten Aktivitäten betragen für ACIII 1,4 nmol cAMP/min/mg Protein, für ACIII.IIC1b 0,8 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACII 1,7 nmol/min/mg Protein. Die Forskolin-stimulierten Aktivitäten betragen für ACIII 0,6 nmol cAMP/min/mg Protein, für ACIII.IIC1b 0,2 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACII 1,3 nmol/min/mg Protein. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β-Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt drei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

4.1.2 Einfluss der C2-Domäne der ACII

4.1.2.1 Bedeutung der C2-Domäne für die G β γ -Regulation

Da die C1b-Domäne der ACII mit ihrem PFAHL-Motiv für eine G β γ -Stimulation der ACII notwendig, aber nicht ausreichend war, wurde als nächstes untersucht, welche zusätzliche(n) ACII-Region(en) außerdem für die Vermittlung der G β γ -Stimulation wichtig war(en). Aus Studien anderer Gruppen (Tang et al., 1991) und vorangegangenen Arbeiten im eigenen Labor war bekannt, dass die Coexpression der AC-Hälften aus ACI (N-terminal) und ACII (C-terminal) eine aktive Chimäre (IM1C2+IIM2C2) generiert, die durch G β γ in geringem Ausmaß stimuliert werden kann. In Weiterführung dieser Experimente, die darauf hinwiesen, dass es sich um einen IIM2C2-spezifischen Effekt handelte, wurden hier in direktem Vergleich folgende coexprimierte AC-Hälften auf ihre G β γ -Stimulierbarkeit untersucht: Die C-terminale Hälfte der ACII (IIM2C2) wurde mit der N-terminalen Hälfte der nicht durch G β γ stimulierbaren ACI (IM1C1) oder ACV (VM2C2) coexprimiert. Als Kontrolle wurde die IM1C1-Hälfte mit der C-terminalen Hälfte der eigenen Isoform (ACI) coexprimiert, was wie erwartet zu einem G β γ -inhibierbaren Konstrukt führte.

Die in Abbildung 4.11 dargestellten G β γ -Regulationen zeigten deutlich, dass die zweite Hälfte der ACII (M2C2) eine Region enthielt, die in Anwesenheit von G α_s eine 1,5- bis 2-fache Stimulation durch G β γ vermittelte, und zwar unabhängig von der Herkunft der ersten Hälfte (M1C1) der Chimäre. Basierend auf früheren Experimenten bezüglich der Bedeutung der transmembranären M2-Domäne (Weitmann, 2001) konnte davon ausgegangen werden, dass diese Region in der cytosolischen C2-Domäne lokalisiert war.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun AC-Chimären voller Länge in einer singulären Polypeptidkette konstruiert, (i) um die schwache G β γ -Stimulation der C2-Domäne der ACII auch am intakten Enzym zu testen, und (ii) um die Notwendigkeit der C2-Domäne der ACII für die G β γ -Stimulierbarkeit zu überprüfen. Es wurden zwei Chimären aus den AC-Isoformen I und II konstruiert, bei denen jeweils die C2-Domäne durch die entsprechende Domäne der anderen Isoform ausgetauscht war: ACII.IC2 und ACI.IIC2 (Abbildung 4.12). Nach erfolgreicher Expression in Sf9-Zellen und Lokalisation in deren Plasmamembran (siehe Abbildung 4.12C,D) wurden die beiden Chimären auf ihre Aktivität überprüft. Hierbei musste festgestellt werden, dass die Chimäre ACII.IC2 katalytisch inaktiv war (Abbildung 4.13A). Auch bei gleichzeitiger Anwesenheit der auf die ACII synergistisch wirkenden Stimulatoren Forskolin plus G α_s oder dem ACI-Aktivator Ca/CaM waren keine nennenswerten AC-Aktivitäten in den Sf9-Zellmembranen zu verzeichnen. Die in Abbildung 4.12C dargestellte Immunodetektion zeigte, dass der Aktivitätsverlust nicht auf eine zu schwache Expressionsrate der Chimäre zurückzuführen war. Wegen der Inaktivität der Mutante ACII.IC2 war eine Untersuchung, ob die C2-Domäne der ACII eine notwendige Rolle bei der G β γ -Stimulation spielt, nicht möglich.

Die Chimäre ACI.IIC2 hingegen war hochaktiv (Abbildung 4.13B). Basal und G α_s -stimuliert war die Mutante ähnlich aktiv wie der ACII-Wildtyp, die Forskolin-stimulierte Aktivität der Mutante überstieg sogar die Werte der beiden Wildtyp-Isoformen ACI und ACII. Während also die Kombination der katalytischen Domänen IIC1a+IC2a kein cAMP generieren konnte, ergab die umgekehrte Konstellation IC1a+IIC2a eine katalytisch aktive Anordnung, die besonders effizient durch Forskolin stimuliert wurde.

Die G β γ -Regulierbarkeit der hochaktiven Chimäre ACI.IIC2 konnte genau untersucht werden, sowohl mit G α_s als auch mit Forskolin als Costimulator (Abbildung 4.14). Nach Stimulation mit Forskolin reagierte die Chimäre ACI.IIC2 nicht auf G β γ (siehe Abbildung 4.14B), mögliche Ursachen werden in Abschnitt 5.1.3 diskutiert.

Nach Stimulation mit $G\alpha_s$ ergab sich das von den coexprimierten AC-Hälften (siehe Abbildung 4.11) bekannte Bild: Es wurde eine schwache, aber signifikante Stimulation der ACI.IIC2-Chimäre durch $G\beta\gamma$ beobachtet (siehe Abbildung 14A). Das Ausmaß dieser $G\beta\gamma$ -Stimulation (1,6-fach) betrug ebenso wie bei den entsprechenden coexprimierten AC-Hälften IM1C1+IIM2C2 nur einen Bruchteil der ACII-Wildtyp-Stimulation (11-fach), was auch hier auf das fehlende PFAHL-Motiv zurückzuführen ist. Mit Hilfe der Mutante ACI.IIC2 wurde somit die Beteiligung der C2a-Domäne der ACII an der $G\beta\gamma$ -Stimulation am Enzym voller Länge bestätigt (Diel et al., eingereicht).

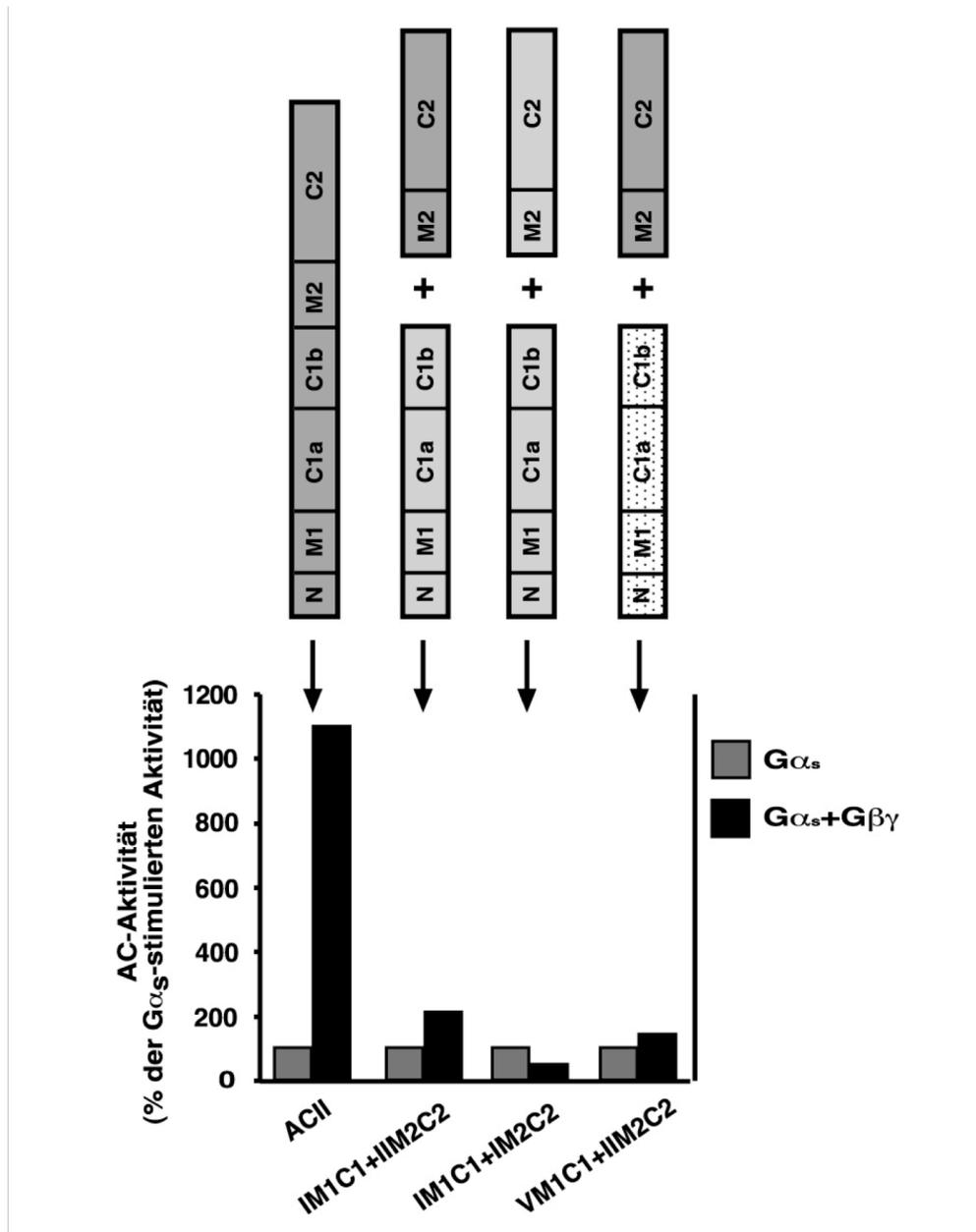


Abbildung 4.11: Regulierbarkeit von halbierten AC-Chimären durch $G\beta\gamma$

Schematische Darstellung der Wildtyp-ACII und der Chimären-Konstrukte aus coexprimierten AC-Hälften (M1C1: erste Hälfte; M2C2: zweite Hälfte). Dargestellt sind die drei untersuchten Kombinationen der Isoformen ACI (hellgrau), ACII (grau) und ACV (weißgrau). Erläuterung der Domänen siehe Legende zu Abb. 4.1.

Die AC-Hälften wurden in Sf9-Zellen coexprimiert (gekennzeichnet durch +) zur Generierung der Konstrukte IM1C1+IIM2C2, IM1C1+IM2C2 und VM1C1+IIM2C2. Die AC-Aktivität von 10 μg Membranprotein wurde in Gegenwart von 80 nM $G\alpha_s$ allein oder plus 200 nM $G\beta\gamma$ ermittelt. Dargestellt sind die $G\beta\gamma$ -stimulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivitäten mit $G\alpha_s$ allein (100 %). Die $G\alpha_s$ -stimulierten Aktivitäten betragen für ACII 5,8 nmol cAMP/min/mg Protein, für (IM1C1+IIM2C2) 1,7 nmol cAMP/min/mg Protein, für (IM1C1+IM2C2) 0,4 nmol cAMP/min/mg Protein und für (VM1C1+IIM2C2) 5,7 nmol cAMP/min/mg Protein. Die gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt drei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

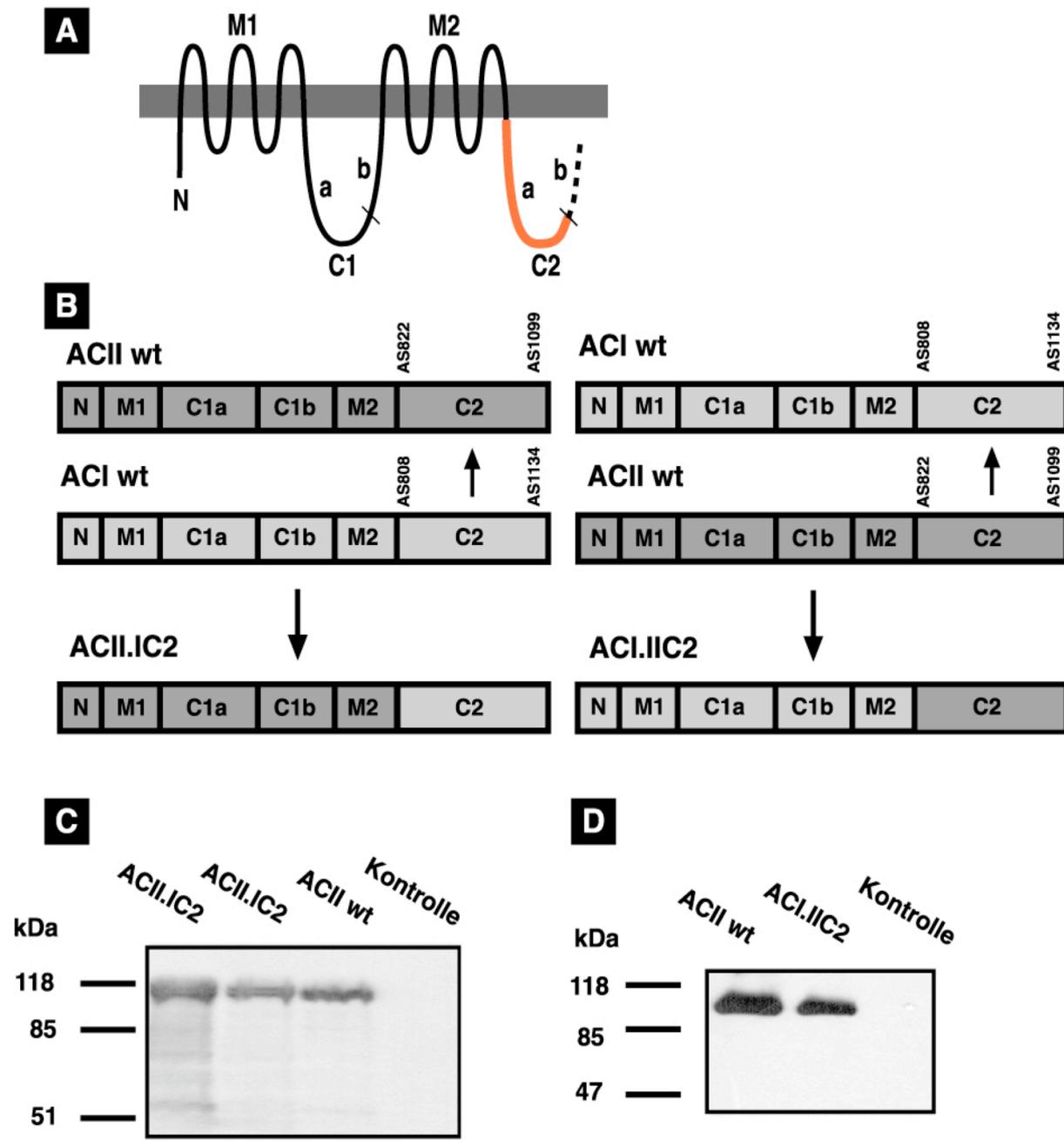


Abbildung 4.12: Konstruktion der Chimären ACII.IC2 und ACI.IC2

(A) Topologie der AC (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 1.2). Die C2-Domäne der ACII ist orange hervorgehoben.

(B) Schematische Darstellung der ACII.IC2- bzw. ACI.IC2-Chimären-Generierung aus den Wildtypen ACI (hellgrau) und ACII (grau). Erläuterung der Domänen siehe Legende zu Abb. 4.1. An gegeben sind die Positionen der Aminosäuren, die die C2-Domänen begrenzen.

(C,D) Immunonachweis der Wildtyp-ACII und der Chimären (C) ACII.IC2 (in zwei unabhängigen Membranpräparationen) bzw. (D) ACI.IC2. Zwei μg Sf9-Membranprotein wurden über SDS-PAGE in einem 9 %igen Gel aufgetrennt (Kontrolle: β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.2.5). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit dem MYC-spezifischen Antikörper detektiert.

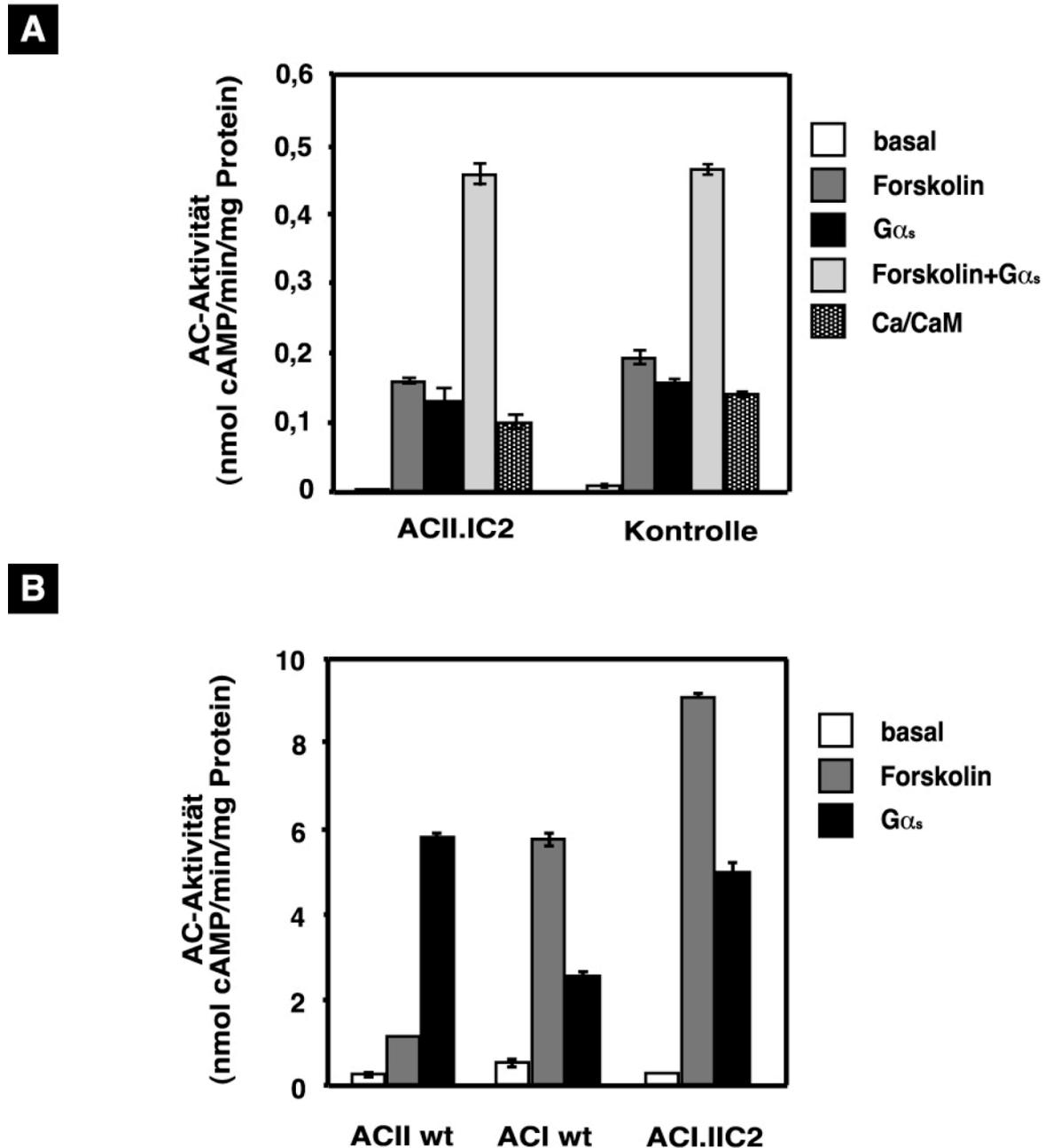


Abbildung 4.13: Aktivität der Chimären ACII.IC2 und ACI.IC2

(A) Die AC-Aktivität der Membranen (20 μ g Protein) von Sf9-Zellen, in denen die Chimäre ACII.IC2 exprimiert worden war, wurde ohne Regulator (basal) oder in Gegenwart von 100 μ M Forskolin bzw. 80 nM G α_s bzw. 10 μ M Forskolin plus 80 nM G α_s bzw. 100 μ M Ca²⁺ / 500 nM CaM ermittelt (Kontrolle: β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an.

(B) Die AC-Aktivität der Membranen (20 μ g Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACI-Wildtyp, ACII-Wildtyp oder die ACI.IC2-Chimäre exprimiert worden war, wurde ohne Regulator (basal) oder in Gegenwart von 100 μ M Forskolin bzw. 80 nM G α_s ermittelt. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an.

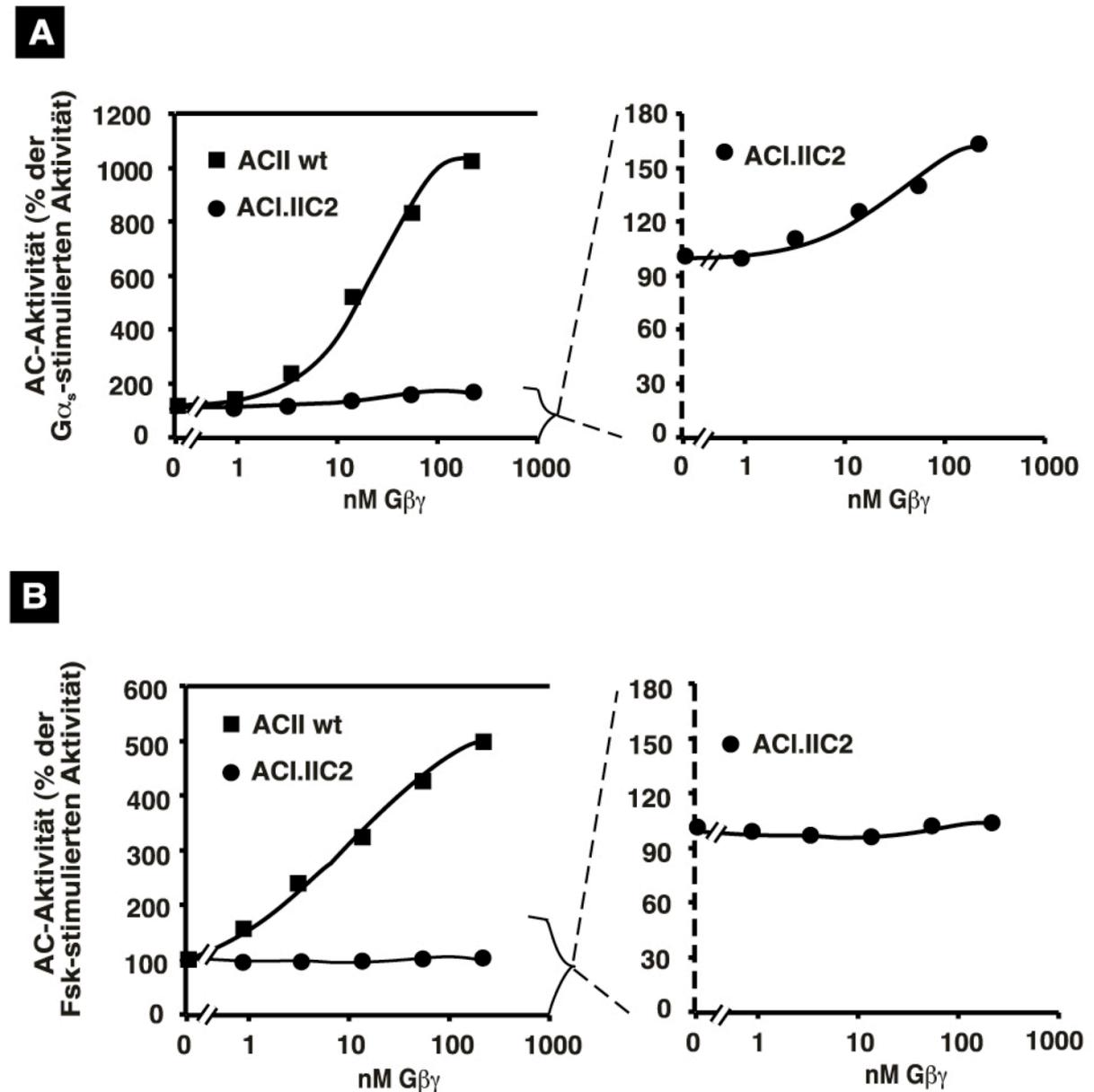


Abbildung 4.14: Regulierbarkeit der Chimäre ACI.IIC2 durch $G\beta\gamma$

Die AC-Aktivität der Membranen (5 μ g Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACII-Wildtyp oder die ACI.IIC2-Chimäre exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen $G\beta\gamma$ und 80 nM $G\alpha_s$ (A) bzw. 10 μ M Forskolin (B) als Costimulator ermittelt. Dargestellt sind die $G\beta\gamma$ -stimulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivitäten ohne $G\beta\gamma$ in Gegenwart des jeweiligen Costimulators (100 %). Links sind die Kurven des Wildtyps und der Chimäre im Vergleich gezeigt, rechts die Vergrößerungsausschnitte von 0-180 % der Chimären-Aktivität. Die $G\alpha_s$ -stimulierten Aktivitäten betragen für ACII 5,8 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACI.IIC2 14 nmol cAMP/min/mg Protein. Die Forskolin-stimulierten Aktivitäten betragen für ACII 1,3 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACI.IIC2 20 nmol cAMP/min/mg Protein.

Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt zwei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

4.1.2.2 Feinkartierung der C2-Domäne

Analog zu den Untersuchungen an der C1b-Domäne der ACII, sollte nun die zweite G $\beta\gamma$ -Signaltransferregion auf der C2a-Domäne¹ identifiziert werden. Die Feinkartierung der C2a-Domäne war erschwert, da sie Teil des katalytischen Zentrums ist, und somit ein Großteil der C2a-Aminosäuren essentiell für die katalytische Aktivität und nicht austauschbar ist. Bei den folgenden NAAIRS-Substitutionen wurden gezielt die Regionen ausgelassen, von denen eine direkte Beteiligung an katalytischen Funktionen (Cyclisierung, C1a-C2a-Interaktionen, G α_s -, Forskolin-Interaktionen) bekannt war (Tesmer et al., 1997). Es wurden insgesamt 16 NAAIRS-Mutanten in der C2a-Domäne generiert (Abbildung 4.15). Alle Mutanten waren in Sf9-Zellen exprimierbar und dort in der Plasmamembran lokalisiert. Bei der Aktivitätskontrolle musste jedoch festgestellt werden, dass acht dieser Mutanten keine katalytische Aktivität aufwiesen (nicht dargestellt). Die anderen acht Mutanten waren aktiv und konnten bezüglich ihrer G $\beta\gamma$ -Regulierbarkeit untersucht werden. Sie wurden alle durch G $\beta\gamma$ stimuliert (siehe Abbildung 4.15). Die zu identifizierende Region, bei deren Substitution es zu einem - dem PFAHL-Motiv vergleichbaren - Verlust der G $\beta\gamma$ -Stimulierbarkeit kommt, musste demnach an einer anderen Stelle der C2a-Domäne liegen. Diese war jedoch unter Aufrechterhaltung der katalytischen Integrität nicht mittels NAAIRS-Substitution zu analysieren.

Bei genauerer Betrachtung der Kristallstruktur der C2a-Regionen, die wegen inaktiver Mutanten nicht über NAAIRS-Substitution auf ihre G $\beta\gamma$ -Relevanz untersucht werden konnten, fiel eine Region auf, die in einer Schleife von dem ventralen Spalt des katalytischen Zentrums weg zeigt und somit optimal als Andockstelle für Regulatoren fungieren könnte (Abbildung 4.16A). Zudem weist genau diese Schleifenregion in der ansonsten konservierten C2a-Domäne eine auffällige Variabilität in der Primärstruktur der verschiedenen AC-Isoformen auf. Nur die drei durch G $\beta\gamma$ stimulierbaren Isoformen ACII, ACIV und ACVII sind in diesem Bereich hochkonserviert (Abbildung 4.16B). Die Region wurde nach ihren zentralen Aminosäuren als „KF-Schleife“ bezeichnet.

Abbildung 4.15: Lokalisation, Aktivität und G $\beta\gamma$ -Regulierbarkeit der ACII.C2-NAAIRS-Mutanten

Dargestellt ist die Sequenz der C2-Domäne der ACII mit Unterstreichung der Aminosäuren, von denen eine direkte Beteiligung an katalytischen Funktionen bekannt ist (Tesmer et al., 1997). Über der Sequenz sind die durch NAAIRS (Asparagin-Alanin-Alanin-Isoleucin-Arginin-Serin) ausgetauschten 6-Aminosäure-Blöcke gekennzeichnet, unter der Sequenz stehen die jeweiligen Mutanten-Bezeichnungen ACII. Δ xxx (nach der Position der ersten Aminosäure des substituierten Aminosäureblocks benannt). Die Sequenzen, deren Austausch zu katalytisch aktiven Mutanten führte, sind hellgrau unterlegt. Unter den jeweiligen Mutantendefinitionen ist die G $\beta\gamma$ -Regulierbarkeit der katalytisch aktiven Mutanten im Vergleich zum ACII-Wildtyp dargestellt (Erläuterungen siehe Legende zu Abb. 4.6).

¹ Da - wie in der Einleitung beschrieben - die ACII-Isoform keine C2b-Subdomäne besitzt, wird die zweite cytosolische ACII-Domäne hier im Folgenden C2a-Domäne genannt.

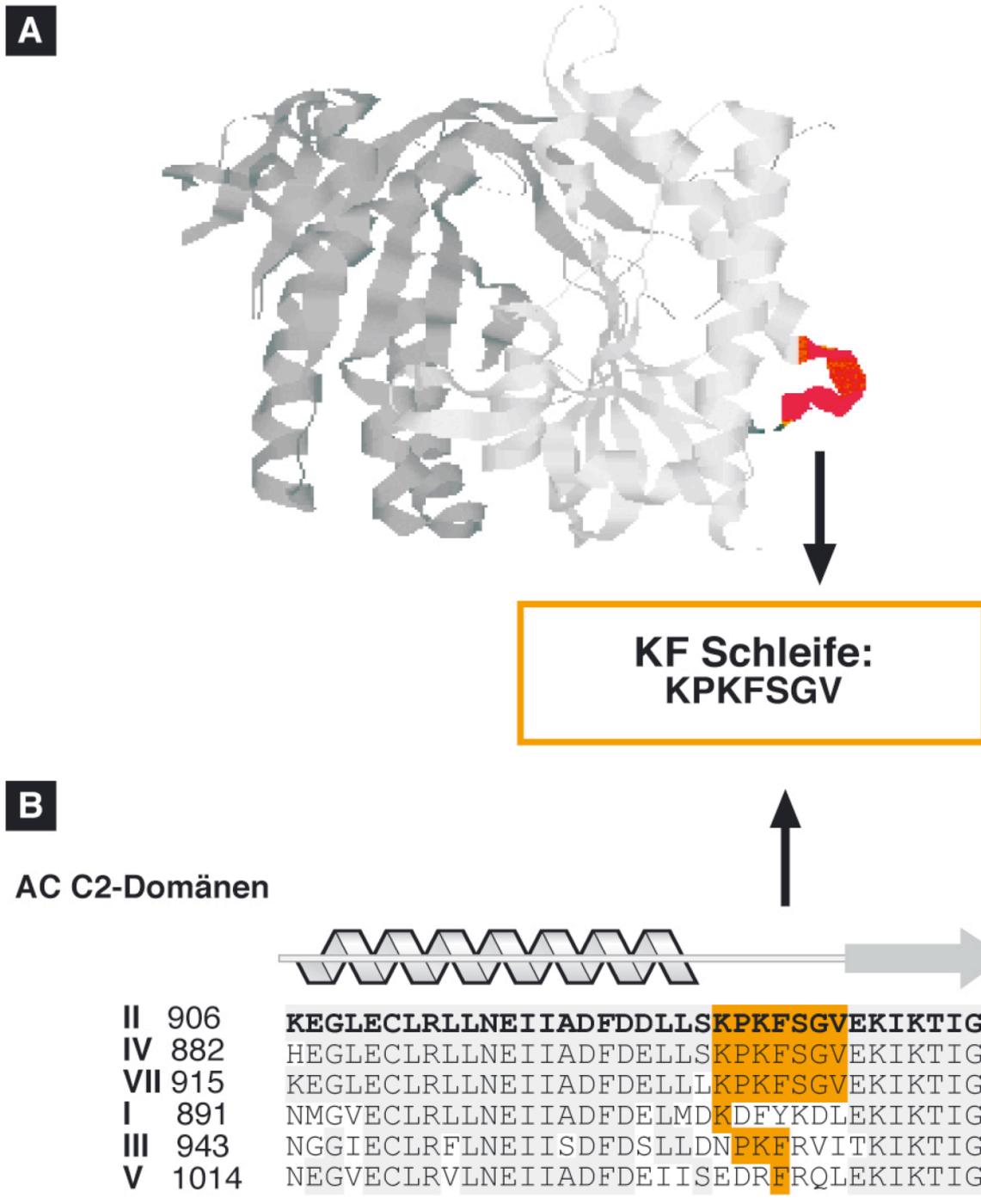


Abbildung 4.16: Die KF-Schleife in der C2-Domäne der ACII

(A) Tertiärstruktur des katalytischen Zentrums gebildet aus ACV-C1a (dunkelgrau) und ACII-C2 (hellgrau) nach Tesmer et al., 1997. Die Region der KF-Schleife in der ACII-C2-Domäne (AS 925-934) ist orange gefärbt.

(B) Sequenzvergleich der C2-Domänen verschiedener AC-Isoformen. Verglichen werden die drei G β -stimulierbaren ACII, ACIV und ACVII, und die Isoformen ACI, ACIII und ACV als Beispiele der nicht durch G β stimulierten AC-Subfamilien. Die jeweiligen Positionen der ersten gelisteten Aminosäure jeder AC sind links vor dem Sequenzblock angegeben. Zur ACII identische Aminosäuren sind grau unterlegt, in der Region der KF-Schleife sind sie orange unterlegt. Über der Sequenz sind die aus der Kristallstruktur der ACII-C2-Domäne abgeleiteten Sekundärstrukturen nach Tesmer et al., 1997 dargestellt.

4.1.2.3 Die KF-Schleife auf der C2-Domäne

Da der gleichzeitige Austausch von sechs Aminosäuren der KF-Schleife zu einer katalytisch inaktiven und somit nicht auf ihre G $\beta\gamma$ -Regulierbarkeit zu analysierenden Mutante (siehe ACII.A928 in Abbildung 4.15) geführt hatte, wurden nun in einem Verfahren höherer Auflösung sukzessive Aminosäure-Paare der KF-Schleife durch AA (Alanin-Alanin) substituiert. Es wurden vier solcher ACII.AA-Mutanten in der KF-Region konstruiert, wobei das als Strukturgeber möglicherweise wichtige Prolin (P929) in der Substitutions-Serie ausgelassen wurde (Abbildung 4.17). Alle vier Mutanten waren im Gegensatz zur NAAIRS-Mutante ACII.A928 katalytisch aktiv (Abbildung 4.18). Im Vergleich mit dem ACII-Wildtyp waren bei den Mutanten Unterschiede in den Aktivitäten zu beobachten. So besaß Mutante ACII.AA925 ein dem ACII-Wildtyp identisches basales, Forskolin- oder G α_s -stimuliertes Aktivitäts-Profil, während die anderen Mutanten im Vergleich dazu unter allen drei Bedingungen weniger cAMP generierten.

Im Anschluss wurde die Regulierbarkeit aller vier Mutanten durch G $\beta\gamma$ untersucht. Sollte die KF-Schleife ein für G $\beta\gamma$ wichtiges Motiv darstellen, so müsste sich dies in den Konstrukten mit mutierter KF-Schleife widerspiegeln. Die in Abbildung 4.19 dargestellten G $\beta\gamma$ -abhängigen Profile der vier Mutanten deuten auf ein G $\beta\gamma$ -Regulationsmotiv im zentralen Teil der KF-Schleife hin: Während die Substitutionen der die KF-Schleife flankierenden Aminosäurepaare keinen signifikanten Einschnitt in die G $\beta\gamma$ -Stimulierbarkeit der ACII-Mutanten erzeugten, war der G $\beta\gamma$ -Effekt nach AA-Mutation der in der Mitte der Schleife liegenden Aminosäuren stark reduziert bzw. aufgehoben. Die Mutante ACII.AA927 wies eine schwache Stimulierbarkeit auf, Mutante ACII.AA930 reagierte gar nicht auf G $\beta\gamma$. Die zentralen Aminosäuren der KF-Schleife waren also notwendig, damit G $\beta\gamma$ seinen stimulatorischen Effekt auf die ACII ausüben konnte (Diel et al., eingereicht).

Zusammenfassend waren mit dem PFAHL-Motiv auf der C1b-Domäne und der KF-Schleife auf der C2a-Domäne zwei Regionen der ACII identifiziert worden, die essentiell für die Vermittlung der isoform-spezifischen G $\beta\gamma$ -Regulation waren.

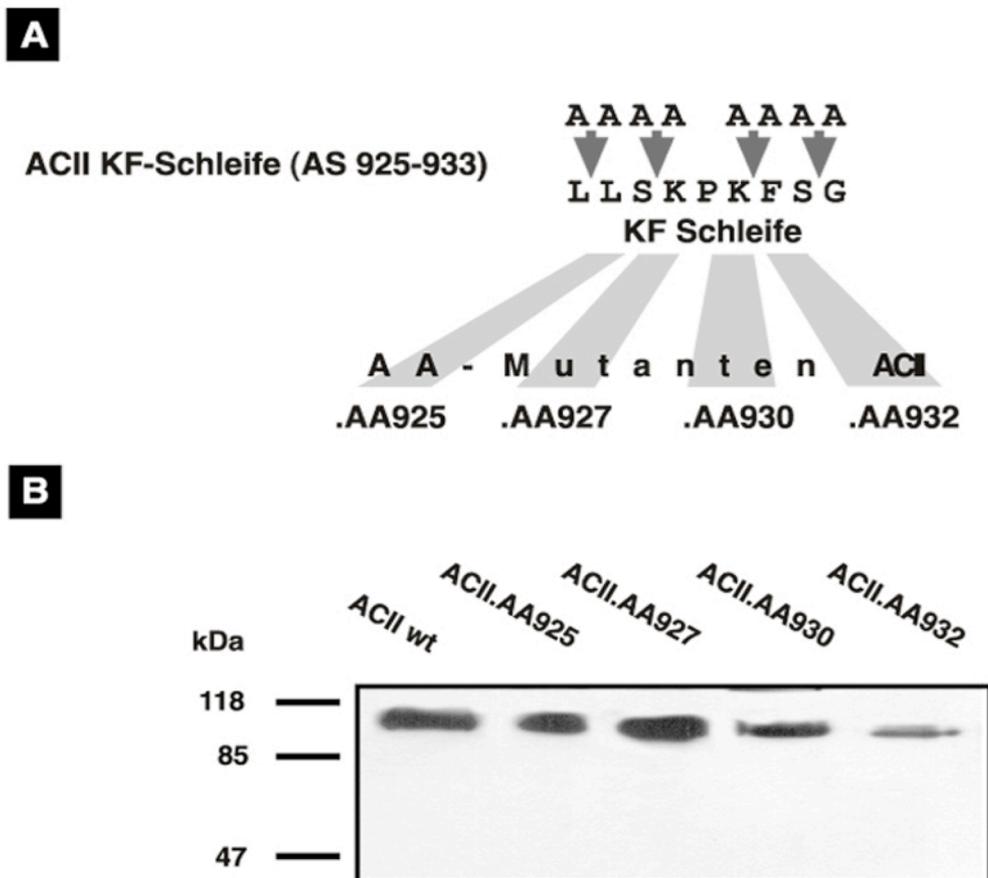


Abbildung 4.17: Konstruktion der AA-Mutanten ACII.AAxxx

(A) Übersicht über die AA-Mutanten an der KF-Schleife in der C2-Domäne der ACII. Dargestellt ist die Sequenz der KF-Schleife mit Kennzeichnung der Aminosäurepaare, die durch AA (Alanin-Alanin) ausgetauscht wurden. Die resultierenden Mutanten ACII.AAxxx sind nach der Position (xxx) der ersten Aminosäure des substituierten Aminosäurepaares benannt.

(B) Immunonachweis der Wildtyp-ACII und der vier Mutanten ACII.AAxxx. Zwei μg Sf9-Membranprotein wurden über SDS-PAGE in einem 9 %igen Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit dem MYC-spezifischen Antikörper detektiert.

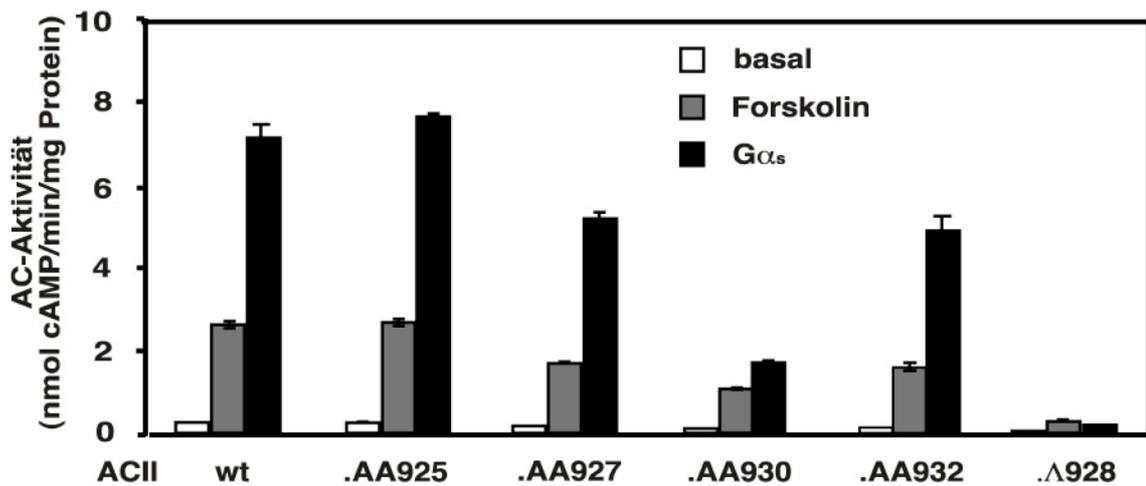


Abbildung 4.18: Aktivität der AA-Mutanten

Die AC-Aktivität der Membranen (20 µg Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACII-Wildtyp, eine der Mutanten ACII.AAxxx oder die NAAIRS-Mutante ACII.Δ928 exprimiert worden war, wurde ohne Regulator (basal) oder in Gegenwart von 100 µM Forskolin bzw. 80 nM Gα_s ermittelt. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β-Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an.

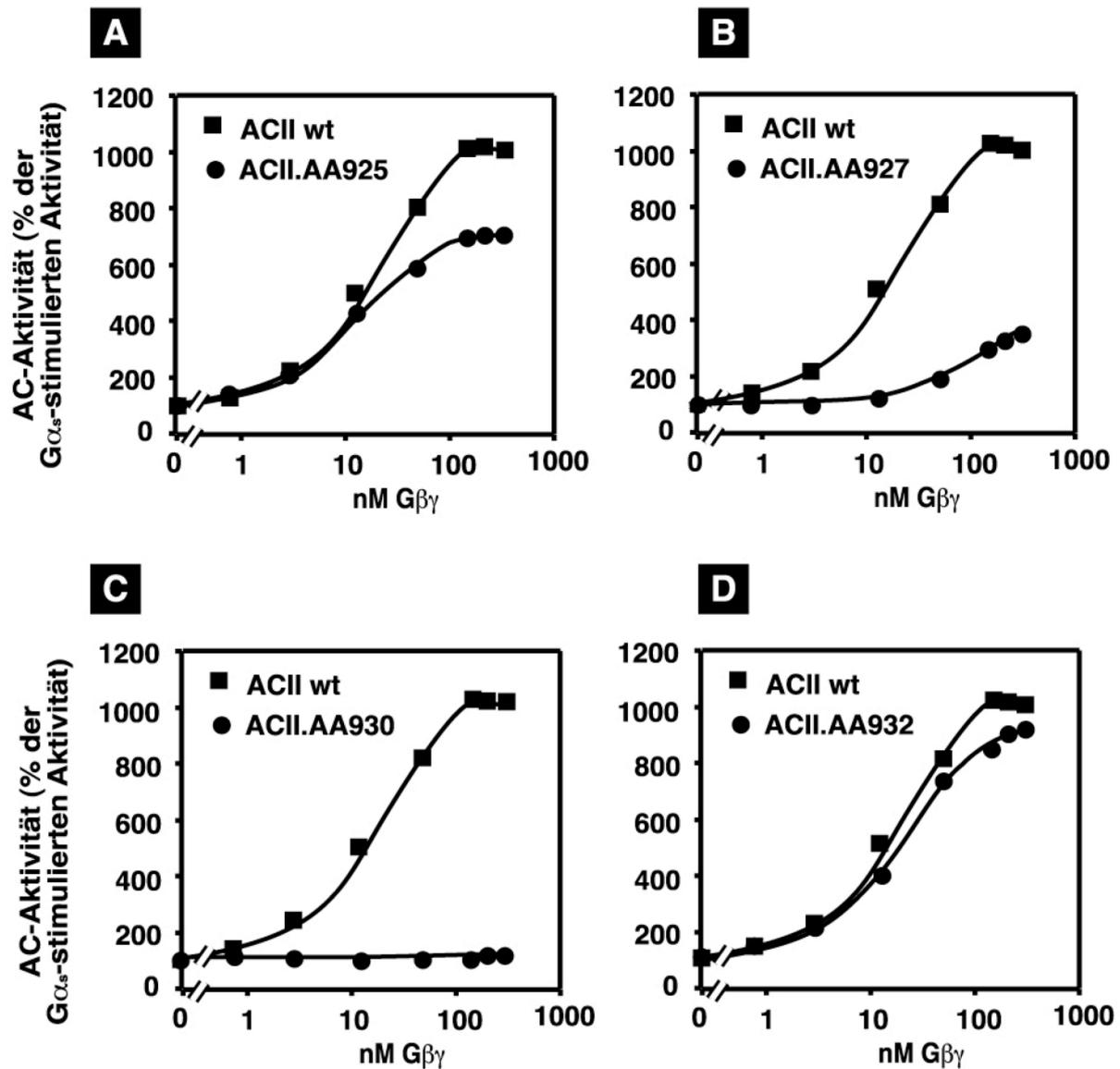


Abbildung 4.19: Regulierbarkeit der AA-Mutanten durch G $\beta\gamma$

Die AC-Aktivität der Membranen (5 μ g Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACII-Wildtyp oder eine der vier AA-Mutanten ACII.AAxxx exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen G $\beta\gamma$ und 80 nM G α_s als Costimulator ermittelt. Dargestellt sind die G $\beta\gamma$ -stimulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivität mit G α_s allein (100 %). Die G α_s -stimulierten Aktivitäten betragen für ACII 7,3 nmol cAMP/min/mg Protein und für die AA-Mutanten 7,9 (ACII.AA925) bzw. 5,5 (ACII.AA927) bzw. 2,1 (ACII.AA930) bzw. 5,2 (ACII.AA932) nmol cAMP/min/mg Protein. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert (β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

4.2 Ca/CaM-Regulationsmotive auf der ACI

4.2.1 Einfluss der C1b-Domäne der ACI

4.2.1.1 Hinlänglichkeit der C1b-Domäne für die Ca/CaM-Regulation

Auf der ACI ist schon seit längerer Zeit ein Regulationsmotiv für Ca/CaM bekannt: Das 28 Aminosäuren umfassende Motiv wird AC28 genannt und ist auf der C1b-Domäne der ACI lokalisiert (Vorherr et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde die in Abschnitt 4.1.1.1 beschriebene Chimäre ACII.IC1b herangezogen, um zu überprüfen, ob die C1b-Domäne der ACI allein ausreichend war, in einer Ca/CaM-insensitiven Isoform (ACII) ein Ca/CaM-stimulatorisches Signal zu vermitteln (Abbildung 4.20). Die Ca/CaM-Regulierbarkeit der Mutante wurde in Anwesenheit von $G\alpha_s$ untersucht (siehe Abbildung 4.20D). Während der ACI-Wildtyp eine bis zu 6,5-fache Stimulation der $G\alpha_s$ -vorstimulierten Aktivität aufwies ($EC_{50} \sim 10$ nM), verhielt sich die Chimäre ACII.IC1b identisch zum ACII-Wildtyp: Sie zeigte keinerlei Reaktion auf Ca/CaM. Das AC28-Motiv der C1b-Domäne war demnach in der ACI nicht allein für deren Ca/CaM-Stimulierbarkeit verantwortlich (Diel et al., eingereicht).

Abbildung 4.20: Aufbau und Ca/CaM-Regulierbarkeit der Chimäre ACII.IC1b

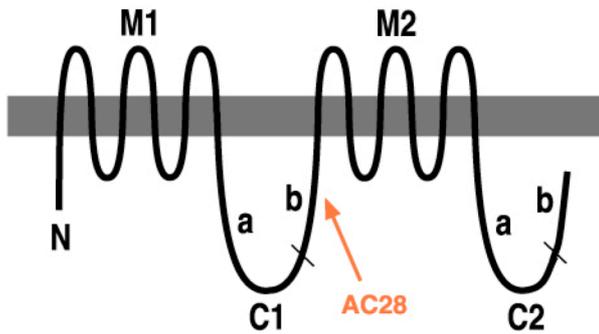
(A) Topologie der AC (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 1.2).

(B) Regulation der ACI und ACII durch Ca/CaM. \uparrow : Stimulation, $-$: keine Regulation.

(C) Schematische Darstellung der ACII.IC1b-Generierung (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 4.1).

(D) Regulierbarkeit der Chimäre ACII.IC1b durch Ca/CaM. Die AC-Aktivität der Membranen (10 μ g Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACI-Wildtyp, ACII-Wildtyp oder die ACII.IC1b-Chimäre exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen CaM bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 100 μ M und 80 nM $G\alpha_s$ als Costimulator ermittelt. Dargestellt sind die Ca/CaM-stimulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivitäten ohne Ca/CaM mit $G\alpha_s$ allein (100 %). Die $G\alpha_s$ -stimulierten Aktivitäten betragen für ACI 2,5 nmol cAMP/min/mg Protein, ACII 5,8 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACII.IC1b 0,6 nmol cAMP/min/mg Protein. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert ((β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

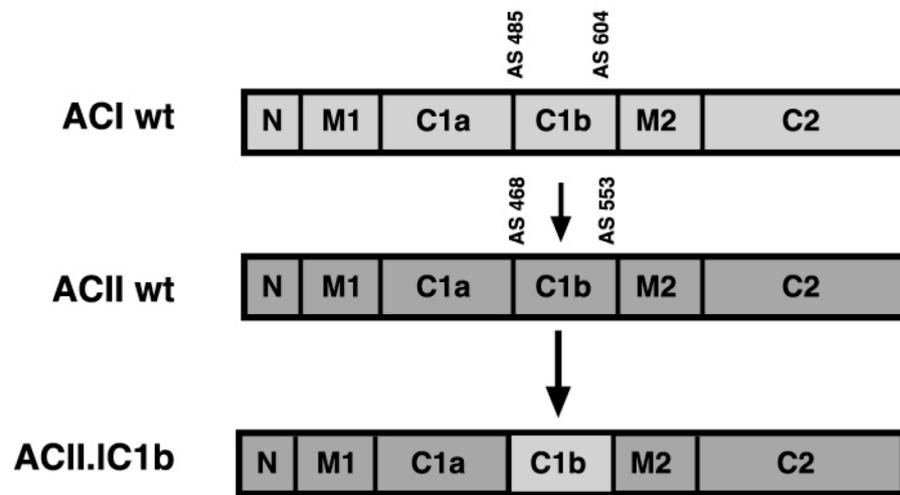
A



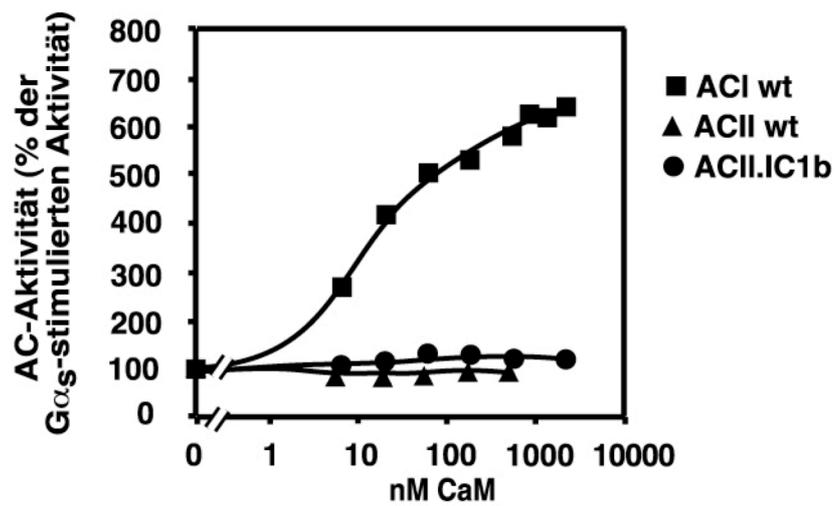
B

AC	Ca/CaM-Regulation
I	↑
II	-

C



D



4.2.2 Einfluss der C2-Domäne der ACI

4.2.2.1 Bedeutung der C2-Domäne für die Ca/CaM-Regulation

Da die C1b-Domäne der ACI mit ihrem AC28-Motiv nicht allein als Vermittler der Ca/CaM-Regulation ausreichte, sollte als nächstes geklärt werden, ob die gesamte C1-Domäne der ACI, eingebettet in die ACI-Transmembran-Domänen, alle Elemente enthielt, die für die Ca/CaM-Regulierbarkeit der ACI hinreichend sind. Hierfür wurde die in 4.1.2.1 beschriebene Chimäre ACI.IIC2 auf ihre Ca/CaM-Sensitivität hin untersucht (Abbildung 4.21).

Da die Mutante eine hohe katalytische Aktivität aufwies, wurde sie neben der bisher angewandten $G\alpha_s$ -Vorstimulation auch in Abwesenheit eines Costimulators auf ihre Ca/CaM-Regulierbarkeit überprüft. Gegenüber dem als Kontrolle dienenden ACI-Wildtyp wies Ca/CaM bei Abwesenheit von $G\alpha_s$ eine höhere Effizienz (maximal 10-fache Stimulation), aber schwächere Potenz ($EC_{50} \sim 50$ nM) auf als nach Vorstimulation mit $G\alpha_s$ (siehe Abschnitt 4.2.1).

In Abbildung 4.21D,E sind die AC-Aktivitäten der Chimäre ACI.IIC2 in An- und Abwesenheit von $G\alpha_s$ bei steigenden Konzentrationen Ca/CaM dargestellt. Obwohl die Chimäre bis auf die C2-Domäne alle Regionen der ACI-Isoform besaß, zeigte sie - wie zuvor ACI.IC1b - keine Reaktion auf Ca/CaM.

Mit diesem Ergebnis war erwiesen, dass die C2-Domäne der ACI eine entscheidende Rolle für die Vermittlung der Ca/CaM-Stimulation spielte (Diel et al., eingereicht).

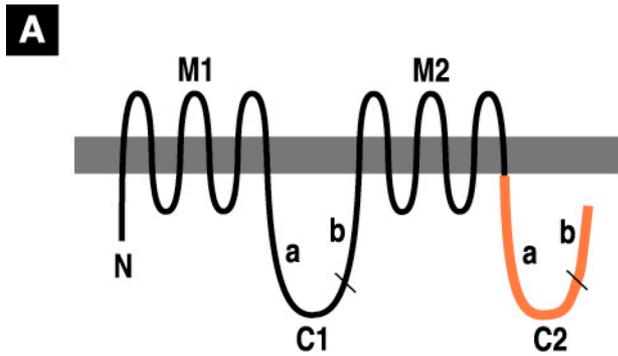
Abbildung 4.21: Aufbau und Ca/CaM-Regulierbarkeit der Chimäre ACI.IIC2

(A) Topologie der AC (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 1.2). Die C2-Domäne ist orange hervorgehoben.

(B) Regulation der ACI und ACII durch Ca/CaM. \uparrow : Stimulation, $-$: keine Regulation.

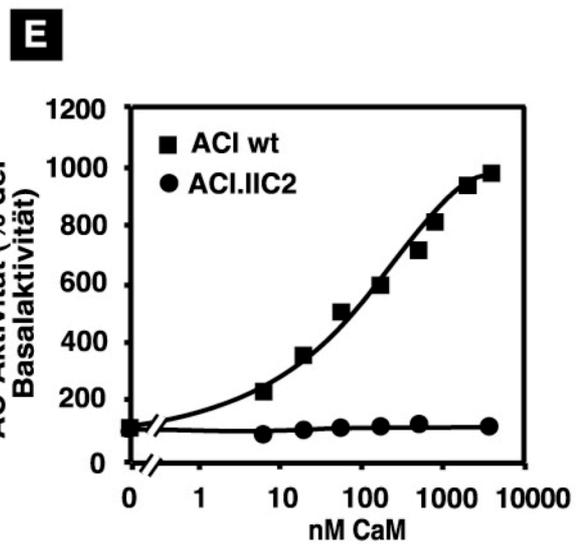
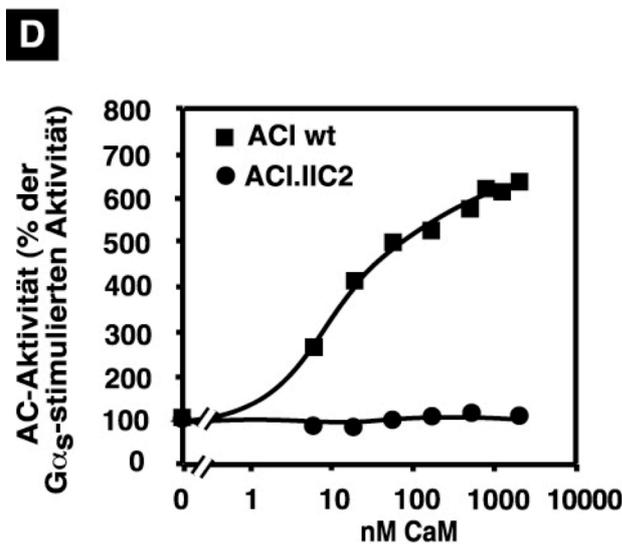
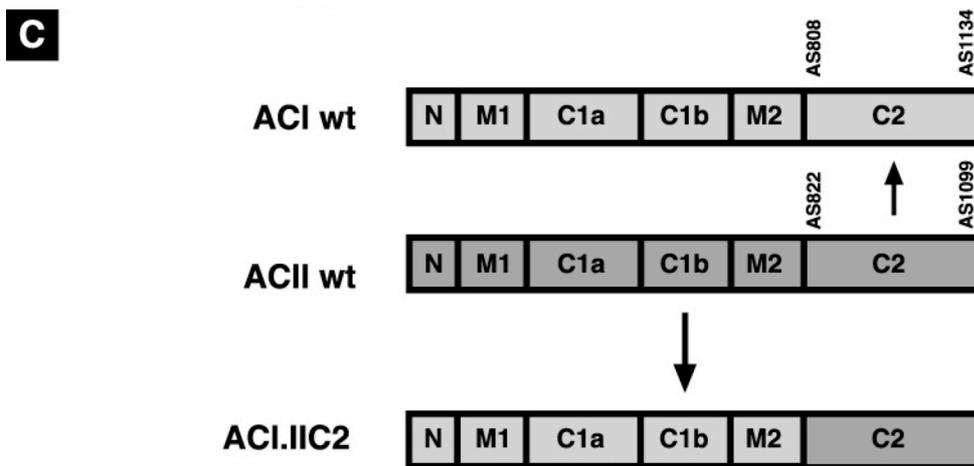
(C) Schematische Darstellung der ACI.IIC2-Generierung (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 4.12).

(D,E) Regulierbarkeit der Chimäre ACI.IIC2 durch Ca/CaM. Die AC-Aktivität der Membranen (10 μ g) von Sf9-Zellen, in denen der ACI-Wildtyp oder die ACI.IIC2-Chimäre exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen CaM bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 100 μ M und 80 nM $G\alpha_s$ als Costimulator (D) bzw. ohne Costimulator (E) ermittelt. Dargestellt sind die Ca/CaM-stimulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivitäten ohne Ca/CaM (100 %). Die $G\alpha_s$ -stimulierten Aktivitäten betragen für ACI 2,5 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACI.IIC2 5 nmol cAMP/min/mg Protein. Die basalen Aktivitäten betragen für ACI 0,5 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACI.IIC2 0,2 nmol cAMP/min/mg Protein. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert ((β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt drei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.



B

AC	Ca/CaM-Regulation
I	↑
II	-



4.2.2.2 Bedeutung der C2b-Domäne für die Ca/CaM-Regulation

Im Gegensatz zur Isoform ACII besitzt die ACI in ihrer zweiten cytosolischen Domäne neben der katalytischen a- auch eine variable b-Subdomäne. Da die C2b-Domäne das Enzym C-terminal abschließt und ihre Präsenz für die Ausbildung des katalytischen Zentrums nicht notwendig ist, sollte über Deletion der C2b-Domäne deren Bedeutung für die Ca/CaM-Stimulation überprüft werden.

Es wurden zwei ACI.C2b-Deletionsmutanten generiert (Abbildung 4.22): ACI.Δ1094, der die C-terminale Hälfte der C2b-Domäne fehlte, und ACI.Δ1057, bei der die gesamte C2b-Domäne trunziert war. Beide Mutanten wurden in Sf9-Zellen exprimiert und waren in deren Plasmamembran lokalisiert (siehe Abbildung 4.22C). Anschließend wurden die Aktivitäten der beiden Mutanten bestimmt (Abbildung 4.23): Während die Deletion der C-terminalen Hälfte der C2b-Domäne in Mutante ACI.Δ1094 keinen nennenswerten Einfluss auf die basale, $G\alpha_s$ - oder Forskolin-stimulierte Aktivität hatte, war bei Mutante ACI.Δ1057 eine deutliche Reduktion ihrer Aktivität zu vermerken. Sie betrug sowohl basal als auch in Anwesenheit von Forskolin oder $G\alpha_s$ ungefähr ein Zehntel von der Aktivität des ACI-Wildtyps. Es waren jedoch immer noch deutliche Unterschiede zu den endogenen Aktivitäten der Sf9-Membranen zu verzeichnen, so dass die Mutante auf ihre Ca/CaM-Regulierbarkeit untersucht werden konnte. In Abbildung 4.24 sind die Ca/CaM-Regulationsprofile der beiden Deletionsmutanten im Vergleich zum ACI-Wildtyp dargestellt. Die Ca/CaM-Stimulation der Mutante ACI.Δ1094 wurde sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von $G\alpha_s$ untersucht, in beiden Fällen verhielt sie sich identisch zum ACI-Wildtyp. Die zweite Hälfte der C2b-Domäne war also katalytisch und regulatorisch irrelevant, nicht nur für die basale, $G\alpha_s$ - und Forskolin-stimulierte Aktivität, sondern auch für die isoform-spezifische Ca/CaM-Stimulierbarkeit der ACI. Die insgesamt schwächer aktive Deletionsmutante ACI.Δ1057 konnte nur nach Vorstimulation mit $G\alpha_s$ auf ihre Ca/CaM-Reaktion hin getestet werden. Auch sie wurde signifikant (maximal 5-fach) mit einer dem Wildtyp ähnlichen Potenz ($EC_{50} \sim 10$ nM) durch Ca/CaM stimuliert. Somit war erwiesen, dass die gesamte C2b-Domäne der ACI nicht notwendig war für die Stimulation der ACI mit Ca/CaM (Diel et al., eingereicht).

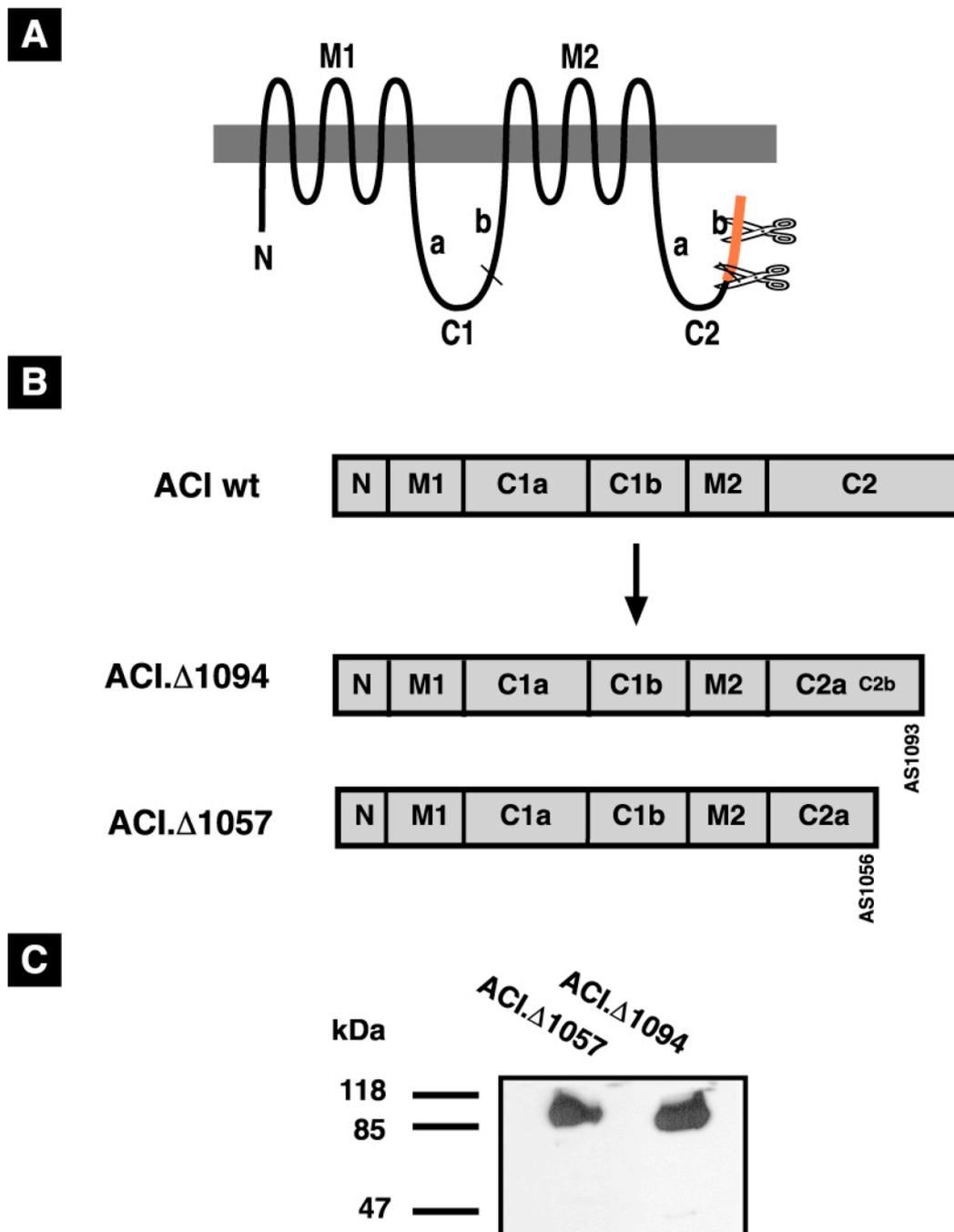
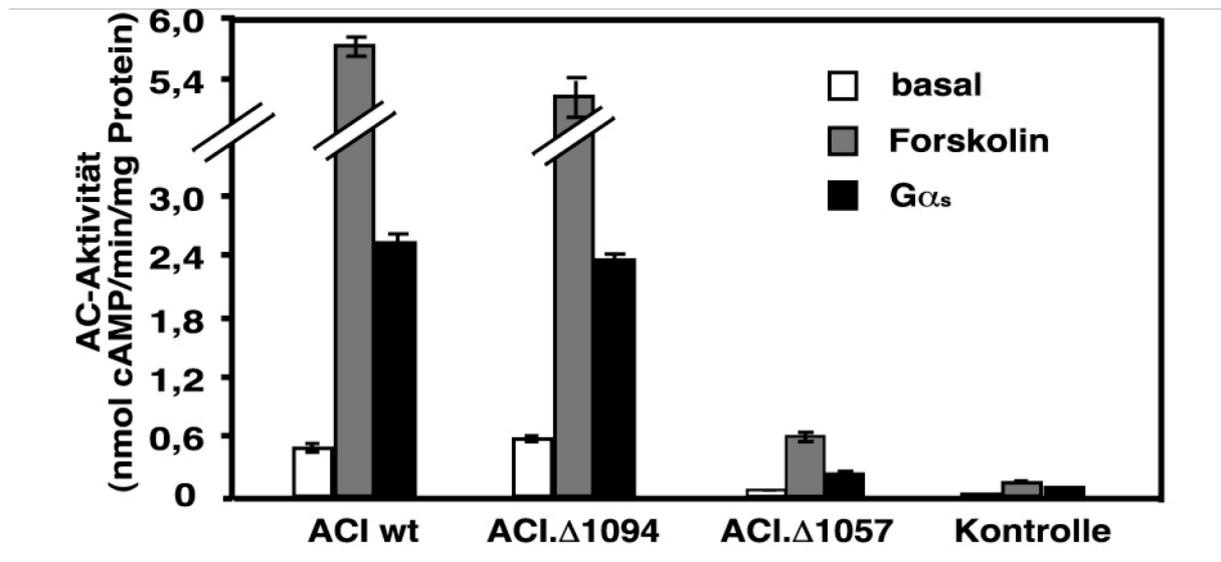


Abbildung 4.22: Konstruktion der ACI.C2b-Deletionsmutanten ACI.Δxxxx

(A) Topologie der AC (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 1.2). Die C2-Domäne der ACI ist orange hervorgehoben.

(B) Schematische Darstellung der Deletionsmutanten-Generierung aus dem ACI-Wildtyp. Erläuterung der Domänen siehe Legende zu Abb. 4.1.; hier mit zusätzlicher Angabe C2a: a-Subdomäne der zweiten cytosolischen Domäne; C2b: b-Subdomäne der zweiten cytosolischen Domäne. Angegeben sind die Positionen (xxxx) der Aminosäuren, an denen die C2-Domäne trunziert wurde.

(C) Immunonachweis der ACI.C2b-Deletionsmutanten ACI.Δ1057 und ACI.Δ1094. Zwei μg Sf9-Membranprotein wurden über SDS-PAGE in einem 9 %igen Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit dem MYC-spezifischen Antikörper detektiert.

**Abbildung 4.23: Aktivität der ACI.C2b-Deletionsmutanten**

Die AC-Aktivität der Membranen (20 µg Protein) von Sf9-Zellen, in denen der ACI-Wildtyp oder eine der Deletionsmutanten ACI.Δxxxx exprimiert worden war, wurde ohne Regulator (basal) oder in Gegenwart von 100 µM Forskolin bzw. 80 nM Gα_s ermittelt (Kontrolle: β-Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert an.

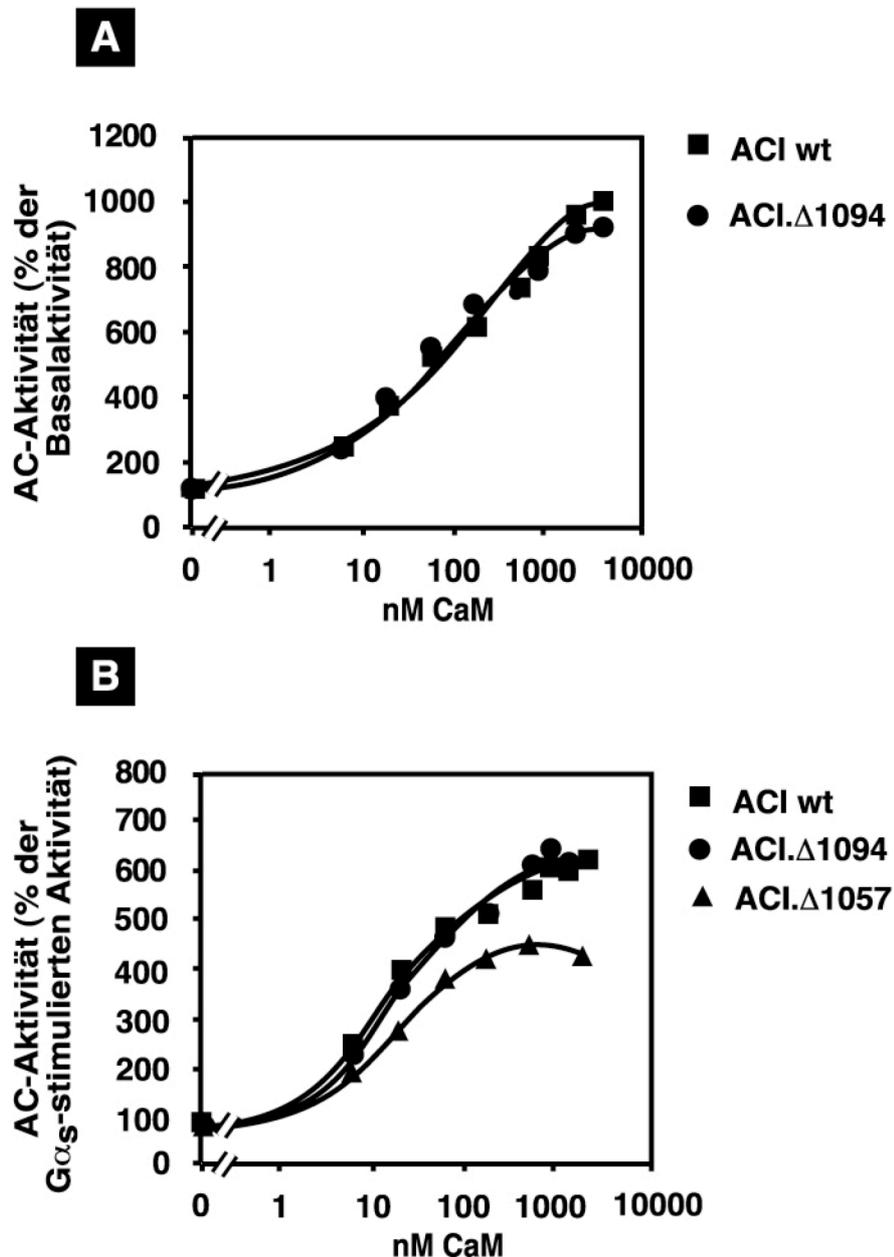


Abbildung 4.24: Regulierbarkeit der ACI.C2b-Deletionsmutanten durch Ca/CaM

Die AC-Aktivität der Membranen (10 μ g) von Sf9-Zellen, in denen der ACI-Wildtyp oder eine der beiden Deletionsmutanten ACI. Δ xxxx exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Konzentrationen CaM bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 100 μ M ohne Costimulator (A) oder mit 80 nM $G\alpha_s$ als Costimulator (B) ermittelt. Dargestellt sind die Ca/CaM-stimulierten AC-Aktivitäten normalisiert auf die AC-Aktivitäten ohne Ca/CaM (100 %). Die basalen Aktivitäten betragen für ACI 0,5 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACI. Δ 1094 0,6 nmol cAMP/min/mg Protein. Die $G\alpha_s$ -stimulierten Aktivitäten betragen für ACI 2,5 nmol cAMP/min/mg Protein, für ACI. Δ 1094 2,3 nmol cAMP/min/mg Protein und für ACI. Δ 1057 0,1 nmol cAMP/min/mg Protein. Alle gemessenen Aktivitäten wurden um die Sf9-endogene Aktivität korrigiert ((β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt drei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

4.2.2.3 Das VLG-Motiv auf der C2a-Domäne

Mit der Ca/CaM-Analyse der Chimäre ACI.IIC2 und der C2b-Deletionsmutanten stand fest, dass die C2-Domäne der ACI für die Ca/CaM-Stimulation der ACI notwendig war, ihre b-Subdomäne aber keine dafür wichtigen Elemente enthielt. Das zu identifizierende Ca/CaM-Regulationsmotiv musste demnach auf der katalytischen C2a-Domäne lokalisiert sein. Hier stellte sich ein ähnliches Problem wie bei der in Abschnitt 4.1 beschriebenen ACII-G β γ -Studie: Angesichts der direkten Beteiligung der meisten C2a-Aminosäuren an Funktionen des katalytischen Zentrums konnten keine weitflächigen Substitutionsexperimente durchgeführt werden, ohne die Aktivität der AC zu zerstören.

Daher wurde die C2a-Sequenz der ACI zunächst einer Inspektion nach bekannten Motiven unterzogen. Klassische CaM-Bindemotive sind etwa 20 Aminosäuren umfassende helicale Regionen mit hydrophoben Resten an ihren Positionen 1,5,8/10,(14), mit Aromaten im Bereich der Termini und mit einer Nettoladung von +3 bis +6 (siehe Abschnitt 1.2.2.4). Tatsächlich konnte innerhalb der ACI-C2a-Domäne eine Sequenz lokalisiert werden, die diese Eigenschaften aufweist. Sie besitzt hydrophobe Aminosäuren an ihren Positionen 1,5,8, eine Nettoladung von +4 und aromatische Aminosäuren in der Nähe ihrer Enden. Die Region wurde Bezug nehmend auf die Aminosäuren ihrer 1,5,8-Positionen „VLG-Region“ genannt (Abbildung 4.25).

Trotz der sonst ausgeprägten Sequenz-Übereinstimmung der C2a-Domänen verschiedener AC-Isoformen kommt die VLG-Region in der Ca/CaM-insensitiven ACII nicht vor und könnte daher Ursache sein für die fehlende Ca/CaM-Sensitivität der Chimäre ACI.IIC2 (siehe Abschnitt 4.2.2.1).

Angesichts dieser günstigen Voraussetzungen sollte experimentell überprüft werden, ob die VLG-Region tatsächlich für die Ca/CaM-Regulation der ACI eine Rolle spielt. Im Fall der KF-Schleife inmitten der katalytischen C2a-Domäne der ACII hatten wir die Erfahrung gemacht, dass eine Hexapeptid-Substitution zur Zerstörung der katalytischen Aktivität führte. Dipeptid-Substitutionen in derselben Region jedoch hatten zu katalytisch aktiven Mutanten geführt, an denen ihre G β γ -Regulation untersucht werden konnte (siehe Abschnitt 4.1.2.2). Im Fall der VLG-Region wurden nun gezielt die Aminosäuren V,L (Valin,Leucin) der laut Literatur für Ca/CaM-Bindungsmotive strategisch interessanten Positionen 1,5 am VLG-Motivs durch A (Alanin) substituiert (Abbildung 4.26A).

Die resultierende Mutante ACI.VLG/AAG war jedoch katalytisch inaktiv. Trotz hoher Expressionsraten in den heterolog genutzten Sf9-Zellen und korrekter Lokalisation der Mutante in der Plasmamembran (Abbildung 4.26B) unterschied sich ihre Aktivität nicht signifikant vom endogenen Sf9-Hintergrund (Abbildung 4.26C). Auch bei Forcierung der Reaktionsbedingungen in Form von Manganzusatz oder längeren Präinkubationszeiten mit den Stimulatoren (siehe Abbildung 4.26C) waren keine signifikanten Aktivitäten messbar, so dass eine Untersuchung der Ca/CaM-Sensitivität nicht möglich war.

Ob das VLG-Motiv in der ACI eine wichtige Rolle für die Ca/CaM-Regulation spielt, war mit diesem Versuchsansatz demnach nicht zu klären. Infolge dessen wurde auf Basis von synthetischen Peptiden weitergearbeitet. Es wurden vier Peptide verwendet (Abbildung 4.27):

Peptid pVLG: umfasst die 14 Aminosäuren des VLG-Motivs, flankiert von 3 oder 4 N- bzw C-terminal lokalisierten Aminosäuren;

Peptid pAAG: pVLG-Analogon mit Alanin-Substitutionen an den 1,5-Positionen des VLG-Motivs;

Peptid pAC28 (Positivkontrolle): Sequenz des Ca/CaM-Regulationsmotivs der C1b-Domäne der ACI, die nachweislich mit Ca/CaM interagiert (Vorherr et al., 1993);

Peptid pTT (Negativkontrolle): Sequenz einer C1a-Region der ACI, die nicht mit Ca/CaM interagiert.

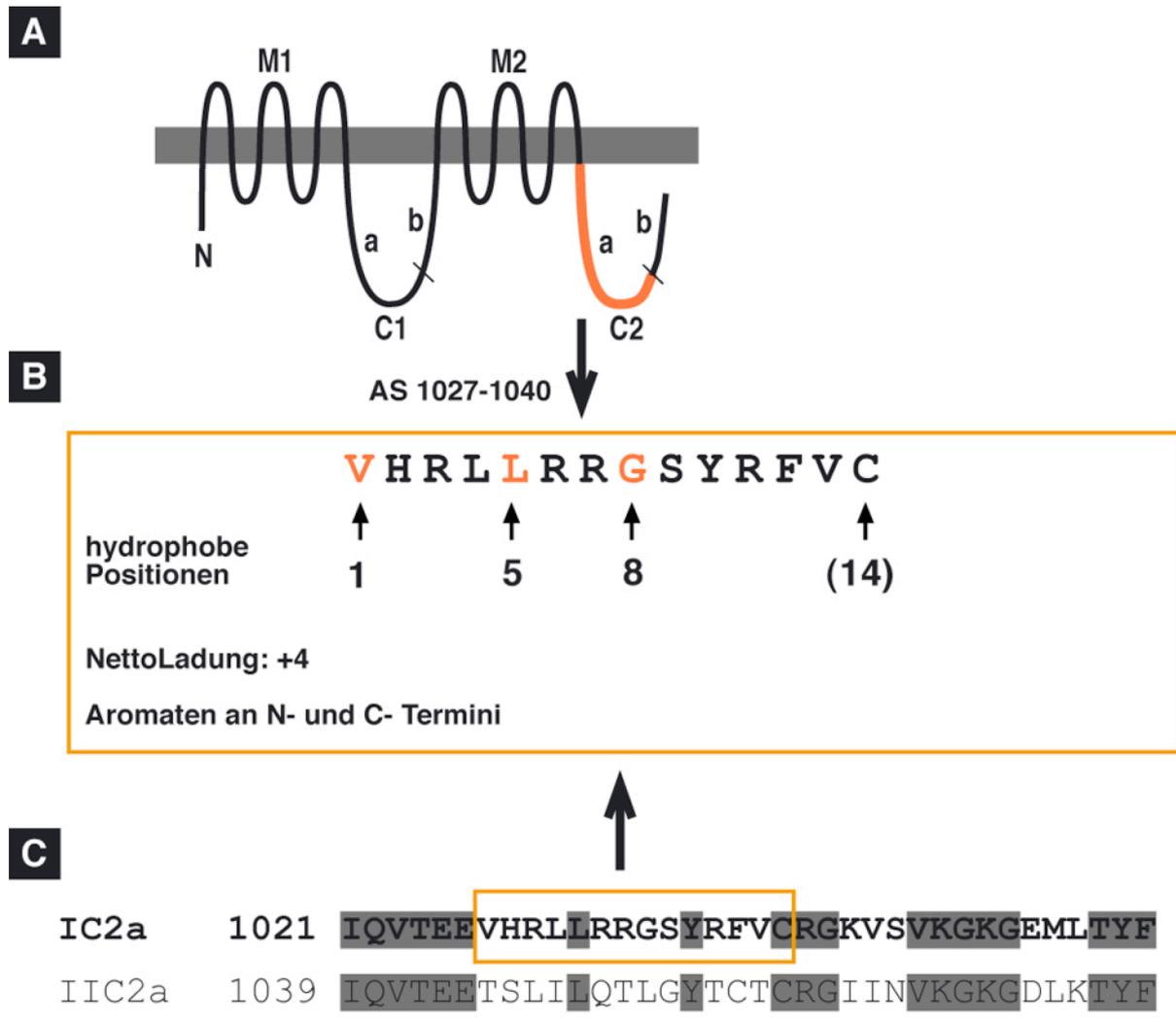


Abbildung 4.25: Das VLG-Motiv in der C2a-Domäne der ACI

(A) Topologie der AC (Beschreibung siehe Legende zu Abb. 1.2). Die C2a-Domäne ist orange hervorgehoben.
 (B) Innerhalb der C2a-Domäne der ACI befindet sich eine Sequenz, die einem klassischen Ca/CaM-Bindemotiv ähnelt mit hydrophoben Aminosäuren in den Positionen 1,5,8 (rot), einer hohen positiven Nettoladung und Aromaten in Nähe ihrer Termini.

(C) ACI,II-Sequenzvergleich eines C2a-Fragments aus dem Bereich des VLG-Motivs. Die jeweiligen Positionen der ersten gelisteten Aminosäure der beiden ACs sind links vor dem Sequenzblock angegeben. ACI-ACII identische Aminosäuren sind grau unterlegt, das VLG-Motiv ist orange eingerahmt.

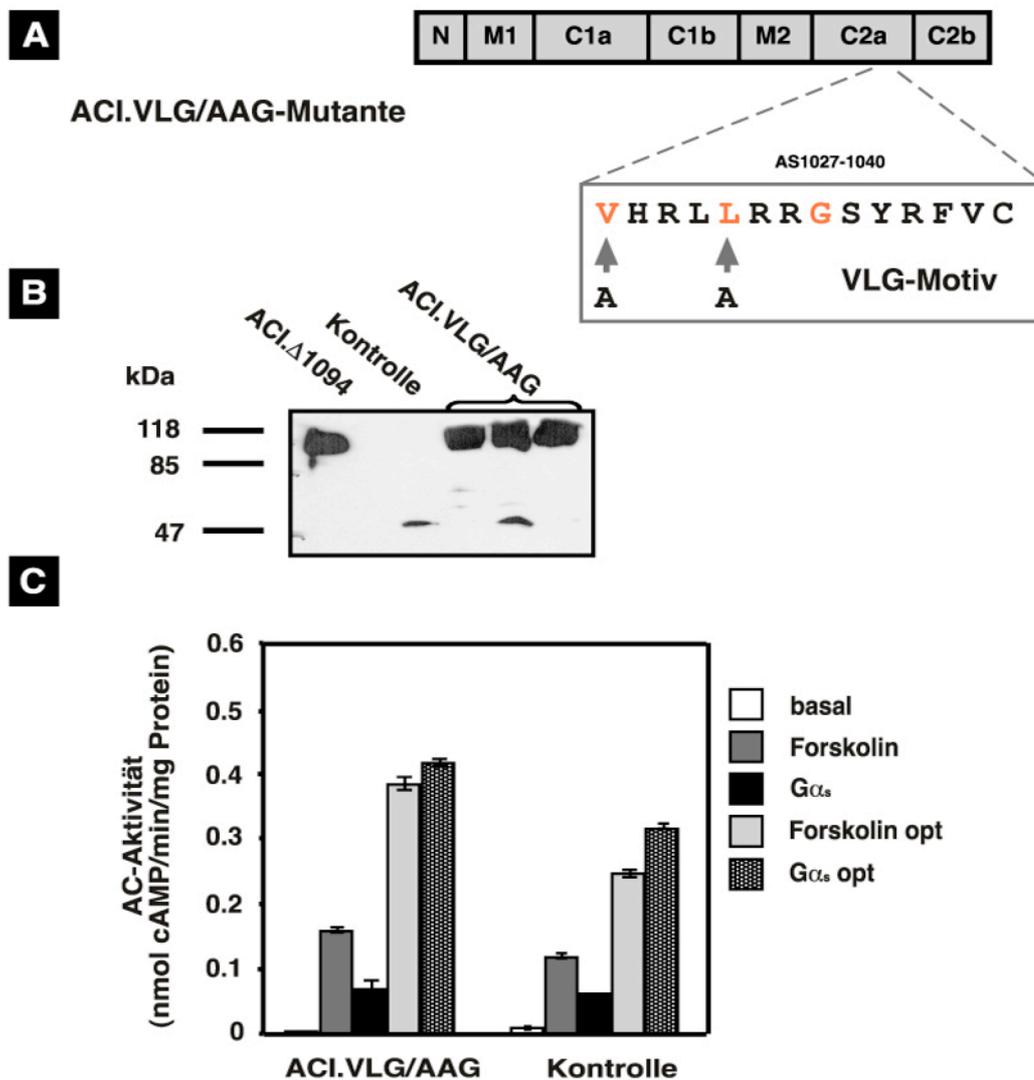


Abbildung 4.26: Mutante ACI.VLG/AAG

(A) Schematische Darstellung der ACI.VLG/AAG-Generierung aus dem ACI-Wildtyp. Erläuterung der Domänen siehe Legende zu Abb. 4.21. Die Sequenz des mutierten VLG-Motivs (AS 1027-1040) ist angegeben mit Kennzeichnung der beiden durch A (Alanin) substituierten Aminosäuren. Die drei für Ca/CaM-Bindung charakteristischen hydrophoben Positionen 1-5-8 sind orange gefärbt.

(B) Immunonachweis der Mutante ACI.VLG/AAG (in drei unabhängigen Membranpräparationen) und der ACI.C2b-Deletionsmutante ACI.Δ1094. Zwei μg Sf9-Membranprotein wurden über SDS-PAGE in einem 9 %igen Gel aufgetrennt (Kontrolle: β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.2.5). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit dem MYC-spezifischen Antikörper detektiert.

(C) Die AC-Aktivität der Membranen (20 μg Protein) von Sf9-Zellen, in denen die Mutante ACI.VLG/AAG exprimiert worden war, wurde ohne Regulator (basal) oder in Gegenwart von 100 μM Forskolin bzw. 80 nM G α_s unter den üblichen oder optimierten Reaktionsbedingungen „opt“ (Zusatz von 5 mM Mn $^{2+}$ und 10-minütige Präinkubation bei 30 °C) ermittelt (Kontrolle: β -Galactosidase-infizierte Sf9-Membranen, siehe 3.2.6.1). Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt drei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, die Fehlerbalken geben deren mittlere Standardabweichung an.

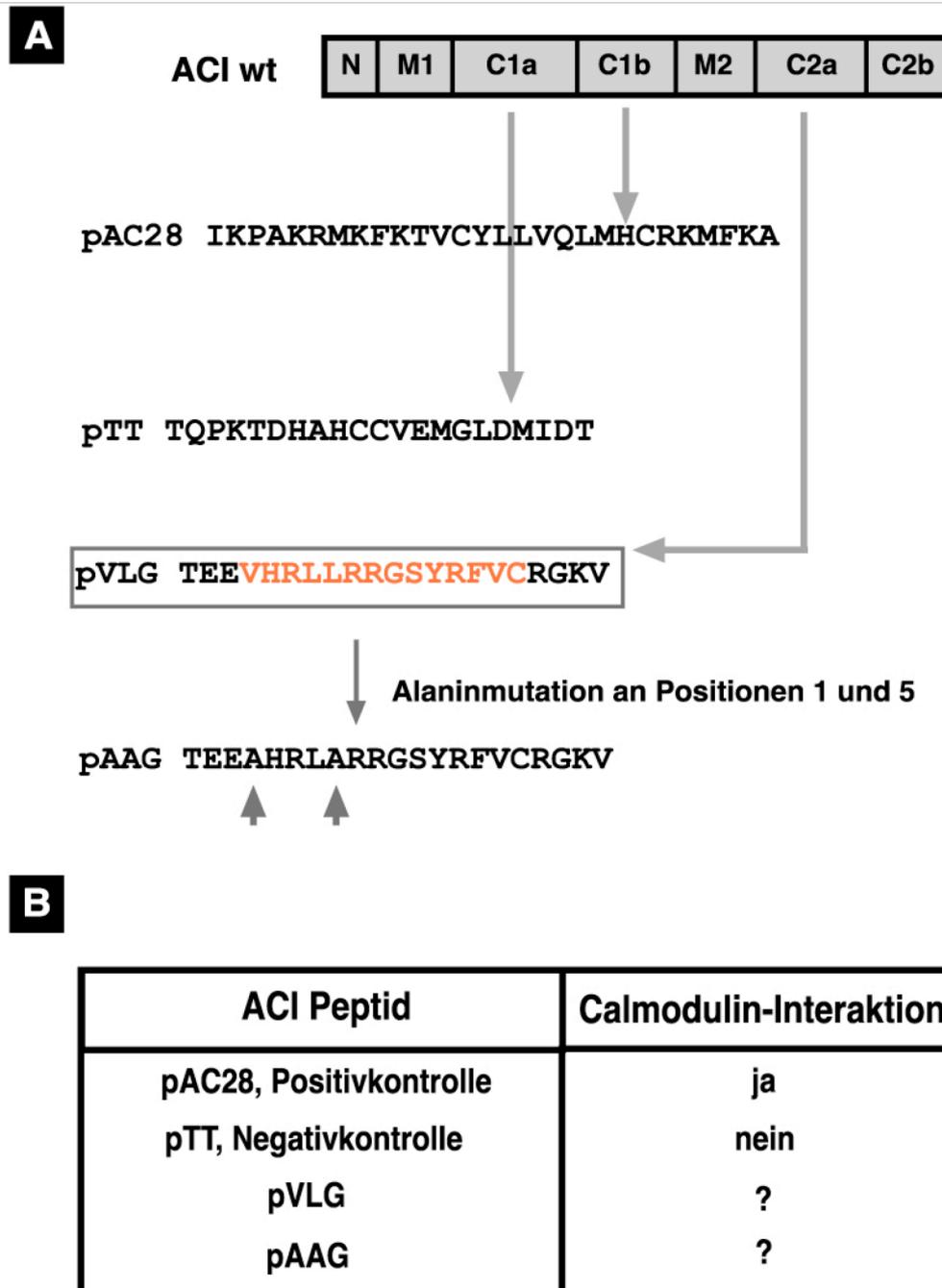


Abbildung 4.27: ACI-Peptide für Ca/CaM-Interaktionsstudien

(A) Übersicht über Sequenzen der synthetisierten ACI-Peptide pAC28 (AS 495-512) aus der C1b-Domäne, pTT (AS 363-383) aus der C1a-Domäne und pVLG bzw. pAAG (AS 1024-1044) aus der C2a-Domäne. Die Sequenz des VLG-Motivs ist orange gefärbt, die beiden durch Alanin substituierten Aminosäuren in pAAG sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

(B) Übersicht über schon bekannte Ca/CaM-Interaktionen der ACI-Peptide aus (A).

4.2.2.3.1 VLG-Peptid-Bindung an Ca/CaM

Als erstes wurde die Interaktionsfähigkeit der Peptide mit dansyliertem CaM untersucht (Abbildung 4.28). Der Dansyl (5-Dimethylaminonaphtalen-1-sulfonyl) -Rest ist ein Fluoreszenzmarker, der seine Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit von seiner Umgebung ändert. Sobald also die Bindung von Calcium und/oder eines Peptids oder Proteins die Konformation des dansylierten CaM ändert, wirkt sich dies auf die Fluoreszenz des Dansyl-Rests aus. Die Intensitätsänderung des zu messenden Dansyl-CaM-Fluoreszenzspektrums kann somit als Sensor für die Bindungsfähigkeit von Peptiden/Proteinen an CaM dienen (Kincaid et al., 1988, Kincaid et al., 1982).

In Abbildung 4.28A sind die Intensitätssteigerungen der gemessenen Dansyl-Ca/CaM-Fluoreszenz dargestellt, die durch Interaktion mit steigenden Mengen des jeweiligen Peptids verursacht wurden. Das Peptid pVLG bewirkte eine der Positivkontrolle pAC28 ähnliche Fluoreszenzänderung mit einer maximalen Intensitätssteigerung von 20 % der Dansyl-Ca/CaM-Fluoreszenz bei einem äquimolaren Peptid:Ca/CaM-Mengenverhältnis. Bei einem Mengenverhältnis von 1:2 (Peptid:Ca/CaM) waren genau 50 % der maximalen Intensitätssteigerung erreicht. Das Alanin-mutierte pVLG-Analogon pAAG verursachte im Vergleich zu pVLG eine deutlich schwächere Intensitätssteigerung, die auch bei 2,5-fachem Peptid-Überschuss noch keine Sättigung erreichte. Die Negativkontrolle pTT übte unter denselben Versuchsbedingungen keinen Effekt auf das Fluoreszenz-Spektrum des Dansyl-Ca/CaM aus. Diese Befunde wiesen eindeutig auf eine sequenz-spezifische Interaktion von pVLG mit Ca/CaM hin (Diel et al., eingereicht).

Es ist bekannt, dass der aktivierende CaM-Einfluss auf die ACI nur bei Calcium-Sättigung des CaM möglich ist. Im Folgenden wurde überprüft, inwiefern die schon beschriebene (AC28) und die hier neu identifizierte (VLG) Interaktionsregion der ACI in ihrer CaM-Bindung von Calcium abhängig waren. Dafür wurde der Einfluss des jeweiligen Peptids auf die Fluoreszenz-Intensität von Calcium-freiem Dansyl-CaM gemessen (Abbildung 4.28B). Erst danach wurde Calcium zugegeben, um die maximale Intensitätsänderung (siehe Abbildung 4.28A) der Ca/CaM-Peptid-Interaktion zu erreichen. Zuletzt wurde mittels EGTA-Zugabe überprüft, inwiefern die durch Peptid und/oder Calcium verursachte Fluoreszenzänderung revertierbar war. Das Experiment lieferte einen überraschenden Befund: Während bei den Peptiden pVLG und pAAG eine Änderung der Dansyl-CaM-Fluoreszenz erst nach Zugabe von Calcium zu messen und diese mit EGTA auch vollständig rückgängig zu machen war, konnte das Peptid pAC28 auch in Calcium-freiem Milieu eine beträchtliche Fluoreszenz-Änderung auslösen. Anschließende Zugabe von Calcium steigerte die Fluoreszenz dann nur noch geringfügig. Zugabe von EGTA führte nur zur Aufhebung der durch Calcium ausgelösten Intensitäts-Steigerung des CaM-pAC28-Komplexes. Das in der C1b-Domäne lokalisierte CaM-Bindungsmotiv AC28 war also in der Lage, unabhängig von Calcium mit CaM zu interagieren.

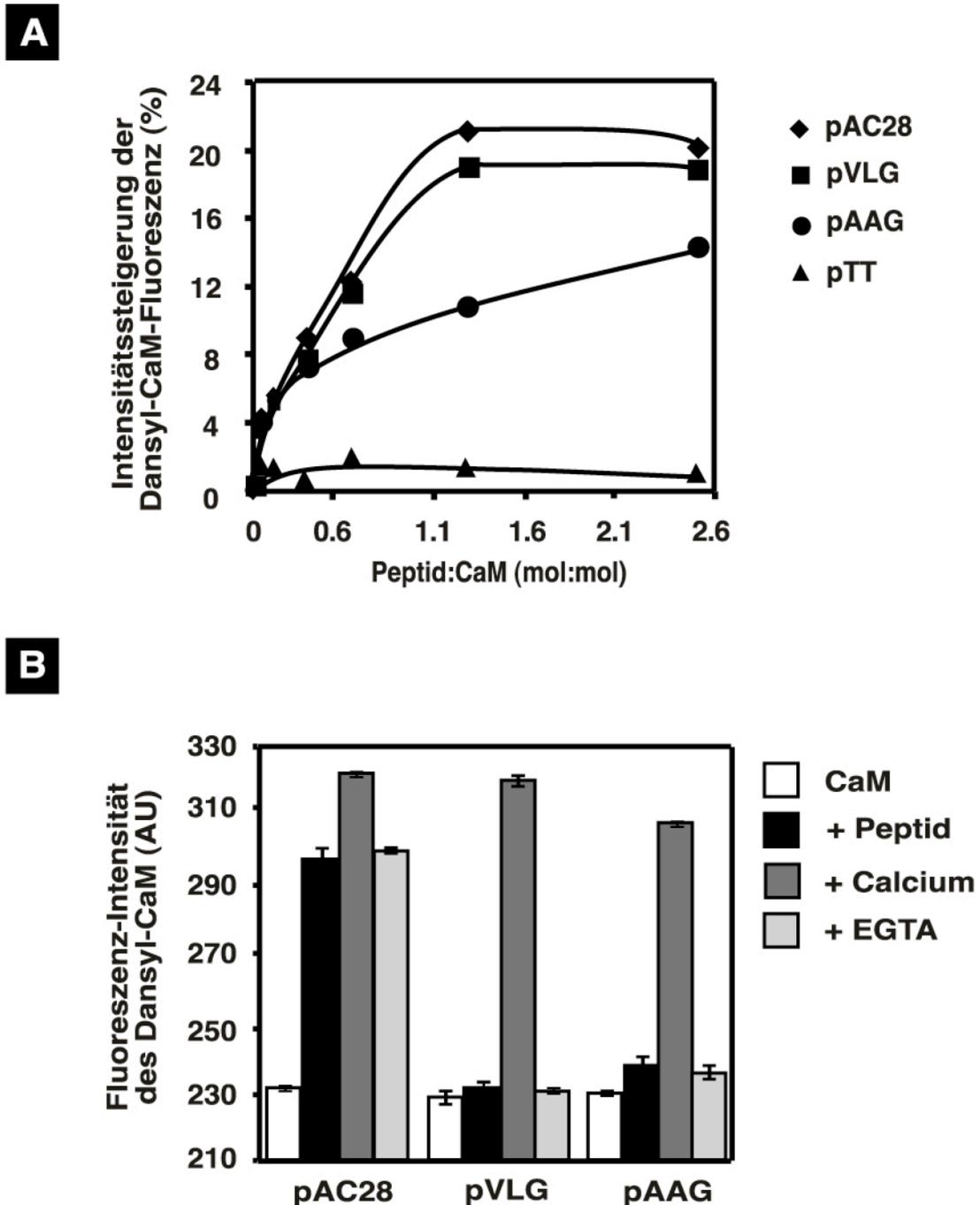


Abbildung 4.28: VLG-Peptid-Bindung an Dansyl-CaM

(A) Titration von 80 nM Dansyl-CaM mit den Peptiden pAC28, pVLG, pAAG und pTT in Anwesenheit von 0,5 mM Ca^{2+} . Excitation von Dansyl-CaM erfolgte bei 334 nm. Dargestellt sind die prozentualen Intensitätssteigerungen der bei 490 nm gemessenen Dansyl-CaM-Fluoreszenz bei steigenden Mengen Peptid: $(\text{Intensität}_{\text{Ca/DansylCaM+Peptid}} - \text{Intensität}_{\text{Ca/DansylCaM}}) \times 100 / \text{Intensität}_{\text{Ca/DansylCaM}}$.

(B) Calciumabhängigkeit der Peptid-Interaktionen mit Dansyl-CaM. Dargestellt sind die bei 490 nm aufgenommenen Fluoreszenzintensitäten (AU, *arbitrary units*) von 80 nM Dansyl-CaM allein oder in Gegenwart von 200 nM Peptid bzw. 200 nM Peptid plus 0,5 mM Ca^{2+} bzw. 200 nM Peptid plus 0,5 mM Ca^{2+} plus 5 mM EGTA. Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt drei unabhängig durchgeführte Experimente. Jede Messreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung vom dargestellten Mittelwert an.

4.2.2.3.2 VLG-Peptid-Kompetition mit der ACI um Ca/CaM

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die in den Fluoreszenzstudien gezeigte Interaktion des pVLG-Peptids mit Ca/CaM zu einer Funktionsänderung des Ca/CaM führte. Hierzu wurde die Fähigkeit von pVLG geprüft, mit der ACI um Ca/CaM zu konkurrieren. Die ACI wurde mit Ca/CaM stimuliert und ihre Aktivität in Gegenwart steigender Mengen Peptid ermittelt (Abbildung 4.29). Mit Ausnahme der Negativkontrolle pTT inhibierten alle untersuchten ACI-Peptide die ACI-Stimulation durch Ca/CaM. Dabei reduzierte sich die inhibitorische Potenz der Peptide in der Reihenfolge pAC28 > pVLG > pAAG: Eine 50 %ige Inhibition der Ca/CaM-stimulierten AC-Aktivität wurde bei einem molaren Peptid:Ca/CaM-Verhältnis von 2,5 (pAC28), 50 (pVLG), bzw. 300 (pAAG) erreicht. pVLG und pAC28 konnten die Aktivität der ACI um 90 % hemmen (10 % ihrer ursprünglichen Aktivität). Die Effizienz von pAAG hingegen war schwächer, hier sank die Aktivität der ACI nicht unter 40 % ihrer Anfangsaktivität.

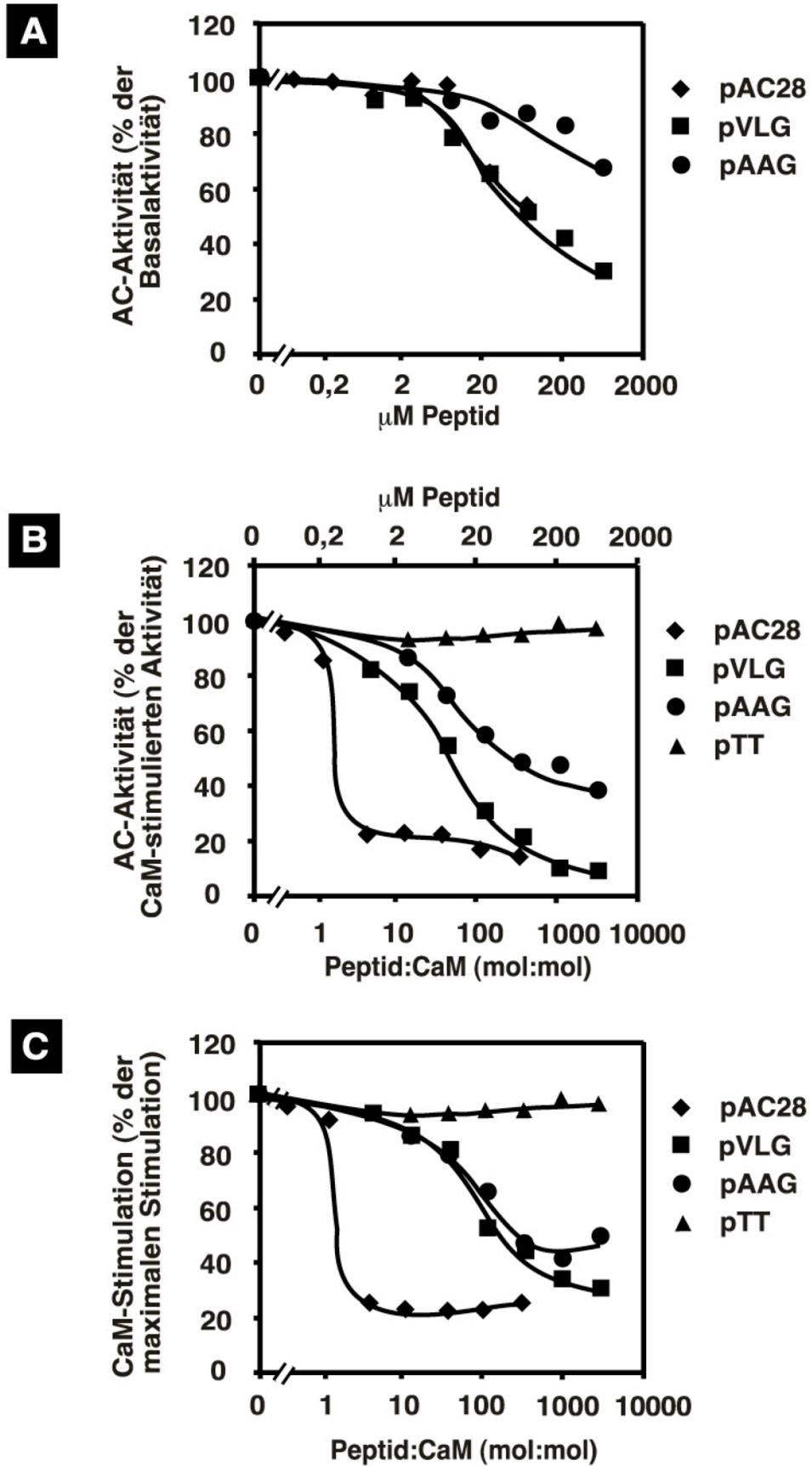
Als nächstes musste noch untersucht werden, ob die Peptide auch auf die ACI-Aktivität allein - in Abwesenheit des Stimulators Ca/CaM - einen Einfluss hatten (siehe Abbildung 4.29A), um zwischen einer kompetitorischen Bindung der Peptide an Ca/CaM und einer direkten Interaktion der Peptide mit dem Effektor ACI differenzieren zu können. Tatsächlich konnte in allen drei Fällen eine deutliche Hemmung der katalytischen ACI-Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Peptidmenge beobachtet werden, bei pAC28 und pVLG in ähnlichem Ausmaß (30 % der ursprünglichen basalen ACI-Aktivität), bei pAAG in abgeschwächter Form (70 % der ursprünglichen basalen ACI-Aktivität). Die ACI-Peptide interagierten demnach mit ihrem Ursprungsenzym ACI und beeinflussten damit dessen Aktivität. Für eine korrekte Bestimmung der inhibitorischen Komponente der Peptid-Bindung an Ca/CaM mussten daher die in den Konkurrenzexperimenten ermittelten Werte um den inhibitorischen Anteil korrigiert werden, der durch direkte Interaktion der Peptide mit der ACI verursacht wurde (siehe Abbildung 4.29C). Auch dieser um den Peptid-ACI-Effekt bereinigte Datensatz belegte, dass die Bindung von pVLG und pAC28 an Ca/CaM dessen ACI-regulatorischen Eigenschaften hemmte. pVLG wies dabei eine um den Faktor 20 niedrigere Potenz auf als pAC28 (Diel et al., eingereicht).

Abbildung 4.29: Konkurrenz des VLG-Peptids und der ACI um Ca/CaM

(A) Die AC-Aktivität der Membranen (10 µg) von Sf9-Zellen, in denen der ACI-Wildtyp exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von steigenden Mengen der Peptide pAC28, pVLG, pAAG oder pTT ermittelt. Dargestellt sind normalisierte AC-Aktivitäten, die sich wie folgt berechneten: $(AC\text{-Aktivität}_{\text{basal+Peptid}}) \times 100 / (AC\text{-Aktivität}_{\text{basal}})$. Die basale ACI-Aktivität ohne Peptid betrug 0,6 nmol cAMP/min/mg Protein. Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt zwei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

(B) Die AC-Aktivität der Membranen (10 µg) von Sf9-Zellen, in denen der ACI-Wildtyp exprimiert worden war, wurde in Gegenwart von 200 nM CaM bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 100 µM unter ansonsten zu (A) analogen Bedingungen ermittelt. Dargestellt sind normalisierte AC-Aktivitäten, die sich wie folgt berechneten: $(AC\text{-Aktivität}_{Ca/CaM+Peptid}) \times 100 / (AC\text{-Aktivität}_{Ca/CaM})$. Die Ca/CaM-stimulierte ACI-Aktivität ohne Peptid betrug 2,5 nmol cAMP/min/mg Protein. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, deren mittlere Standardabweichung unter 2 % lag.

(C) Dargestellt sind die normalisierten AC-Aktivitäten, die sich aus Daten eines von zwei repräsentativen Experimenten mit in (A) und (B) beschriebenen, parallel durchgeführten Messungen wie folgt berechneten: $(AC\text{-Aktivität}_{Ca/CaM+Peptid}) / (AC\text{-Aktivität}_{\text{basal+Peptid}}) \times 100 / ((AC\text{-Aktivität}_{Ca/CaM}) / (AC_{\text{basal}}))$.



4.2.2.3.3 VLG-Peptid-Kompetition mit der CaMKinaseII um Ca/CaM

Als nächstes wurde der Einfluss der Peptide pVLG, pAAG und pTT auf die Ca/CaM-stimulierte Aktivität der CaMKinaseII untersucht (Abbildung 4.30). Damit sollte überprüft werden, ob pVLG durch spezifische Bindung an Ca/CaM nicht nur zu einer Behinderung der ACI-Stimulation fähig war, sondern auch mit einem nicht ACI-verwandten Ca/CaM-Effektor wie der CaMKinaseII erfolgreich um Ca/CaM kompetieren konnte. Während die Negativkontrolle pTT nahezu keine Auswirkung auf die Ca/CaM-Stimulation der Kinase hatte, konnte pVLG die Kinase-Aktivität auf 50 % reduzieren. Dieselbe Menge des Alanin-mutierten Peptids pAAG verursachte dagegen nur eine Hemmung um ca. 15 %. Das vielen Ca/CaM-Bindungsmotiven gemeinsame Merkmal, dass den Aminosäuren an ihren Positionen 1,5 eine wichtige Funktion für die Ca/CaM-Interaktion zukommt, traf demnach auch auf das hier identifizierte VLG-Motiv zu (Diel et al., eingereicht).

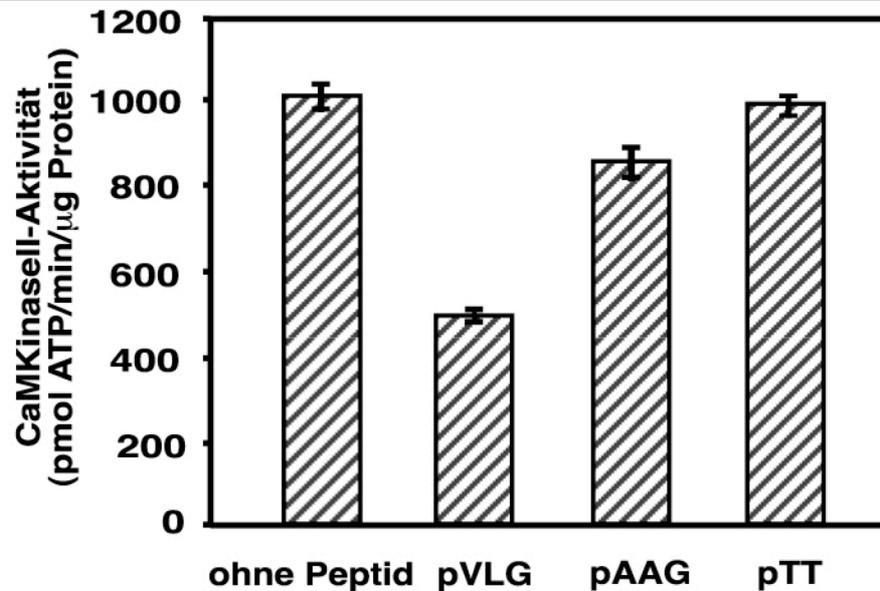


Abbildung 4.30: Konkurrenz des VLG-Peptids und der CaMKinase II um Ca/CaM

Die Aktivität von 5 ng CaMKinase II wurde in Gegenwart von 1 µM CaM / 1 mM Ca²⁺ allein oder bei einer Konzentration von 50 µM der Peptide pVLG, pAAG oder pTT ermittelt. Die Daten entstammen einem Experiment, das repräsentativ ist für insgesamt drei unabhängig durchgeführte Experimente. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt, die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an.