5 Diskussion

Die Vielfalt an Regulationsmöglichkeiten der Säuger-ACs spiegelt die Bandbreite der Signalkaskaden über den *second messenger* cAMP wider. Bis heute existieren keine mechanistischen Modelle zu den isoform-spezifischen Regulationen der partikulären Säuger-ACs. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fokussierten sich auf die Regulatoren Gβγ und Ca/CaM und führten zur Identifizierung ihrer molekularen Signalmotive auf den jeweiligen Effektoren ACII und ACI.

5.1 Gβγ-Regulationsmotive auf der ACII

5.1.1 Die C1b-Domäne

Für die C1b-Domäne als eine Schlüsselregion der isoform-spezifischen AC-Regulation sprechen sowohl theoretische Überlegungen als auch experimentelle Daten.

Die C1b-Domäne ist für die AC-Katalyse entbehrlich, sie kann diese aber beeinflussen. Die strukturell flexible C1b-Domäne ist zusammen mit der zweiten Transmembrandomäne M2 das Bindeglied der beiden Hälften des AC-Pseudo-Heterodimers. Sie ist damit in einer günstigen Position, die Anordnung der beiden katalytischen a-Subdomänen zueinander zu modulieren und darüber als intrinsischer Regulator zu fungieren. So wurde ihr eine autoinhibitorische Funktion zugesprochen, da es zu einer Steigerung der katalytischen Aktivität bei Deletion ihrer C1b-Domäne an halbierten Modellen verschiedener Isoformen kam (Scholich et al., 1997b, Sunahara et al., 1997, Weitmann et al., 2001). Es wurde außerdem von intramolekularen Kontakten der C1b-Domäne zu anderen Bereichen der cytosolischen AC-Domänen berichtet (Scholich et al., 1997a, Simpson et al., 2006). Die Kristallstruktur der C1b-Domäne ist von keiner AC-Isoform bekannt. Es existieren aber CD-Daten (*circular dichroismus*), die darauf hinweisen, dass die C1b-Domäne der ACVII verschiedene liganden-abhängige, metastabile Konformationen einnehmen kann (Beeler et al., 2004).

Gleichzeitig stellt die C1b-Domäne mit ihrer hohen Sequenz-Variabilität eine optimale Angriffsfläche für isoform-spezifische Regulatoren dar. Die C1b-Domäne der Isoform ACI ist nachweislich in die ACI-spezifische Stimulation durch Ca/CaM involviert (Vorherr et al., 1993), und die ACVI besitzt in ihrer C1b-Domäne eine cAMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylierungsstelle, über die ein negatives *feedback*-Signal von cAMP vermittelt wird (Chen et al., 1997b). Auch im Fall der ACII-Stimulation durch Gβγ gab es Hinweise auf eine Beteiligung der variablen C1b-Domäne. Diesbezügliche Studien basieren auf Konstrukten coexprimierter ACII-Hälften, bei denen die C1b-Domäne C-terminal nicht durch Übergang zur M2-Domäne fixiert ist (Weitmann et al., 2001).

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Versuchsstrategie ging darüber hinaus: Alle AC-Mutationen wurden an intakten partikulären Enzymen voller Länge durchgeführt. In Fragen nach der funktionellen Relevanz größerer Regionen wie der C1b-Domäne wurde dies mit Hilfe von AC-Chimären bewerkstellig. Es wurde die zu untersuchende Domäne einer AC-Isoform durch die entsprechende Domäne einer nicht oder andersartig regulierten Isoform ausgetauscht. So konnten am intakten Enzym Rückschlüsse auf die Funktion der Domäne gezogen werden, ohne dass die Insertion AC-fremder Sequenzen nötig gewesen wäre. Die funktionelle Relevanz der C1b-Domäne für die ACII-Stimulation durch Gβγ wurde anhand einer Chimäre der ACII bestätigt, bei der die C1b-Domäne durch die der Gβγ-inhibierbaren Isoform ACI ausgetauscht war. Die resultierende Mutante ACII.IC1b wurde nicht mehr durch Gβγ stimuliert, war ansonsten aber funktionell aktiv. Damit war auch am intakten AC-Enzym erwiesen, dass die C1b-Domäne der ACII speziell für deren Gβγ-Regulierbarkeit eine wichtige Rolle spielt. Im direkten Vergleich zum ACII-Wildtyp war zudem auffällig,

dass trotz identischer katalytischer Zentren (IIC1a-IIC2a) der alleinige C1b-Austausch zu erheblichen Aktivitätsverlusten bei der Stimulation durch $G\alpha_s$ führte.

Die Befunde der ACII.IC1b-Chimäre unterstrichen die Idee vom flexiblen, auf die C1a-C2a-Orientierung Einfluss nehmenden Verbindungselement und bestätigten die spezielle Funktion der C1b-Domäne der ACII als essentielle Regulationsdomäne für Gβγ. Mit diesem Versuchsansatz konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die eingeführte C1b-Domäne der ACI ein eigenes inhibitorisches Gβγ-Signal auf die ACII transferiert und damit eine möglicherweise noch vorhandene Gβγ-Stimulierbarkeit der ACII kompensiert. Erst bei Substitutionen durch die Gβγ-insensitive Sequenz NAAIRS konnte sichergestellt werden, dass den daraus resultierenden Veränderungen der Gβγ-Regulierbarkeit keine Beeinflussung durch die insertierte Sequenz selbst zugrunde lag.

Nach Studie der vollständigen C1b-Domäne wurden im nächsten Schritt kleinere Sequenzabschnitte der C1b-Domäne ausgewählt und mit Hilfe des flexiblen, sich seiner strukturellen Umgebung anpassenden Hexapeptids NAAIRS untersucht. Die NAAIRS-Substitutionen im C-terminalen Bereich der C1b-Domäne führten zu ähnlichen Einbussen der $G\alpha_s$-Stimulation, wie es schon zuvor an der ACII.IC1b-Chimäre beobachtet wurde. Dies bestätigte die Rolle der C1b-Domäne als intrinsischer Modulator des katalytischen Zentrums.

Das für die Gβγ-Stimulation notwendige C1b-Motiv konnte über den NAAIRS-Versuchsansatz genau eingegrenzt werden und wurde nach seinen letzten fünf Aminosäuren PFAHL-Motiv genannt (Diel et al., 2006). Das PFAHL-Motiv kommt ausschließlich in den drei AC-Isoformen vor, die durch Gβγ stimulierbar sind. Es stellte sich die Frage, ob PFAHL einen eigenständigen Signal-Mediator für Gβγ darstellt, das heißt, ob es allein in der Lage ist, das Gβγ-stimulatorische Signal zu vermitteln, oder ob es in Kooperation mit noch unbekannten - auf anderen Domänen der ACII liegenden - Regulationsmotiven agiert. Diese Frage wurde mit Hilfe einer Chimäre beantwortet, bei der die C1b-Domäne der ACII, einschließlich PFAHL-Motiv, in die ACIII transferiert wurde. Bis zum damaligen Zeitpunkt galt die Isoform ACIII als Gβγ-insensitiv. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass die ACIII durch Gβγ inhibiert wird (siehe dazu auch Abschnitt 5.2). Trotzdem konnten die Gβγ-ACIII-Daten für die vorliegende Fragestellung verwendet werden, da die Mutante ACIII.IIC1b in ihrem Verhalten gegenüber Gβγ keinen Unterschied zum ACIII-Wildtyp aufwies. Daraus folgte, dass die Vermittlung des Gβγ-Signals außer dem PFAHL-Motiv weiterer ACII-spezifischer Regionen bedarf (Diel et al., 2006).

5.1.2 Die C2a-Domäne

Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass in chimärischen I-II-Konstrukten ein schwaches stimulatorisches Gβγ-Signal vermittelt wird, solange eine Verankerung in der Plasmamembran gewährleistet ist, beispielsweise über die Transmembran-Domäne von CD8-Rezeptoren (Weitmann, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß diese Stimulation auf die C2a-Domäne[1] der ACII zurückzuführen ist (siehe Abbildung 4.11). Trotz Anwesenheit der ACII-C2a-Domäne war diese Feinregulation in den Gβγ-insensitiven PFAHL-Mutanten nicht messbar. Ursache dafür könnten geringe Konformationsänderungen an der katalytischen C2a-Domäne sein, die durch die Mutationen in der C1b-Domäne als intrinsischem Regulator ausgelöst werden könnten. Dadurch bliebe die Funktionsfähigkeit des katalytischen Zentrums zwar grundsätzlich erhalten, schwache regulatorische Einflüsse wie die von Gβγ gegenüber der C2a-Domäne jedoch wären möglicherweise verhindert.

Um die Funktion der C2a-Domäne der ACII bezüglich der Vermittlung des stimulatorischen Gβγ-Signals am intakten Enzym voller Länge zu untersuchen, wurden durch Austausch der jeweiligen C2-Domänen zwei ACI,II-Chimären konstruiert. Die eine Chimäre, ACII.IC2, war katalytisch inaktiv. Die spiegelbildliche Chimäre, ACI.IIC2, hingegen

---

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

war bemerkenswert aktiv. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeiten der katalytischen a-Subdomänen war also die Isoform-Kombination der katalytischen Domänen von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung des katalytischen Zentrums. Während sich die Konstellation IC1a-IIC2a zu einem effizienten katalytischen Dimer anordnete, war die Kombination IIC1a-IC2a nicht in der Lage, ein funktionierendes katalytisches Zentrum zu formen.

Aufgrund der Inaktivität der ACII.IC2-Mutante blieb die Frage offen, ob die C2a-Domäne der ACII notwendig ist für die Stimulierbarkeit durch Gβγ. Mit Hilfe der ACI.IIC2-Mutante konnte aber die Fähigkeit der ACII-C2a-Domäne, ein Gβγ-stimulatorisches Signal auf eine intakte AC zu übertragen, überprüft werden. Während in Gegenwart von $G\alpha_s$ ein stimulatorischer Gβγ-Effekt zu beobachten war, zeigte die Chimäre in Anwesenheit von Forskolin keine Reaktion auf Gβγ. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass der ohnehin schwach ausgeprägte Synergismus von Gβγ mit Forskolin auf der Mutante noch schlechter zum Tragen kam als beim ACII-Wildtyp. Außerdem ist es denkbar, dass angesichts der außergewöhnlich effizienten Stimulation durch Forskolin die maximale katalytische Aktivität der Chimäre schon mit Forskolin allein erreicht und damit generell keine Stimulation mehr möglich war (Stimulation mit 100 μM Forskolin: ACI-Wildtyp ~ 10-fach, ACII-Wildtyp ~ 5-fach, ACI.IIC2 ~ 45-fach!). In ihrer Aktivierung durch $G\alpha_s$ hob sich die Mutante hingegen nicht von den Wildtyp-ACs ab (Stimulation mit 80 nM $G\alpha_s$: ACI-Wildtyp ~ 5-fach, ACII-Wildtyp ~ 30-fach, ACI.IIC2 ~ 25-fach), und das zuvor an halbierten Chimären beobachtete Verhalten gegenüber Gβγ konnte am intakten Enzym bestätigt werden: Die C2a-Domäne der ACII war in der Lage, bei Vorstimulation mit $G\alpha_s$ ein schwaches stimulatorisches Signal von Gβγ zu übertragen. Somit stellte sich wieder die Frage nach dem dafür verantwortlichen Motiv auf der Domäne.

Die auf der C2a-Domäne lokalisierte und bekanntermaßen mit Gβγ interagierende QEHA-Region konnte hierfür ausgeschlossen werden. Ein Austausch der QEHA-Region durch entsprechende Sequenzen anderer Gβγ-insensitiver bzw. Gβγ-inhibierbarer AC-Isoformen hat keinen Einfluss auf die Gβγ-Stimulierbarkeit der ACII (Weitmann et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass nach NAAIRS-Substitutionen innerhalb der QEHA-Region (AS 956-982, siehe Abbildung 4.15) die ACII-Regulierbarkeit durch Gβγ erhalten blieb. Damit war eindeutig bewiesen, dass die QEHA-Region keine funktionelle Bedeutung für die Vermittlung der Gβγ-Regulation hatte. Es musste demnach ein anderes C2a-Motiv die Funktion eines Gβγ-Signal-Mediators übernehmen.

Eine Feinkartierung, die an der C1b-Domäne zur Identifizierung des PFAHL-Motivs geführt hatte, war für die C2a-Domäne problematisch, da C2a Bestandteil des katalytischen Zentrums ist. Obwohl bei den innerhalb der C2a-Domäne durchgeführten NAAIRS-Substitutionen von vorneherein all die Sequenzen ausgespart wurden, von denen eine direkte Beteiligung an Katalyse, $G\alpha_s$/Forskolin-Stimulation oder Interaktion mit der C1a-Domäne bekannt war (Tesmer et al., 1997), war ein Großteil der Mutanten katalytisch inaktiv und konnte nicht auf Gβγ-Regulierbarkeit untersucht werden.

Ein entscheidender Vorteil für molekulare Studien an der C2a- gegenüber der C1b-Domäne ist die Kenntnis der C2a-Kristallstruktur. Bei genauer Struktur- und Sequenzanalyse der C2a-Domäne fiel eine Region auf, die günstige Voraussetzungen für die Rolle eines isoform-spezifischen Regulationsmotivs bot: Die nach ihren zentralen Aminosäuren benannte KF-Schleife ragt aus dem katalytischen Zentrum heraus und stellt somit einen optimalen Angriffspunkt für Regulatoren dar. Außerdem verbindet die KF-Schleife die zwei Strukturelemente der C2a-Domäne, die als Hauptkomponenten für die intensiven Kontakte mit der C1a-Domäne und die Ausbildung des katalytischen Spalts verantwortlich sind: auf der einen Seite das β2`-Faltblatt, welches sich auf der Spitze der β4-β5-Schleife von C1a anlagert, auf der anderen Seite die α´2-Helix, die mit dem N-terminalen Segment der β1- und dem C-Terminus der β4-Struktur von C1a interagiert (Abbildung 5.1). So hätten die bei einem Andocken von Gβγ möglicherweise verursachten Konformationsänderungen der KF-Schleife erhebliche Auswirkungen auf die Interaktionen der katalytischen Domänen.

Es war zudem auffällig, dass im Gegensatz zu der hohen Primärstruktur-Ähnlichkeit aller neun AC-Isoformen in Umgebung der KF-Schleife diese selbst eine isoform-spezifische Konservierung aufweist: Die sieben Aminosäuren der KF-Schleife sind nur in den drei Isoformen konserviert, die durch Gβγ stimuliert werden (siehe Abbildung 4.16).
Da ein kompletter Hexapeptid-Austausch in der Schleife zu einer inaktiven Mutante führte, wurden einzelne Aminosäure-Paare der KF-Schleife durch ein Alanin-Dipeptid (AA) ersetzt. Die katalytische Funktion blieb hierbei erhalten, so dass die Relevanz der KF-Schleife für die Gβγ-Regulierbarkeit untersucht und der eindeutige Beweis erbracht werden konnte, dass die KF-Schleife tatsächlich eine essentielle Rolle in der ACII-Stimulation durch Gβγ spielte (siehe Abbildung 4.19).

5.1.3 Gβγ-Interaktion mit der ACII: Bindungs- und Signaltransferregionen

Die Existenz mehrerer räumlich getrennter Regulationsregionen für Gβγ wird schon länger diskutiert. So wurde beispielsweise für die Gβγ-inhibierbare ACI eine Beteiligung beider cytosolischer Domänen C1 und C2 an der Gβγ-Regulation beschrieben (Wittpoth et al., 1999). Von PLC2 sind ebenfalls zwei Gβγ-Regulationsmotive bekannt, eines davon ist wie die KF-Schleife der ACII eine direkte Komponente des katalytischen Zentrums (Bonacci et al., 2005).
Mit dem PFAHL-Motiv und der KF-Schleife der ACII ist die erste Identifizierung genau eingegrenzter Gβγ-Regulationsmotive auf einer AC gelungen. Beide Motive kommen exklusiv in den drei AC-Isoformen vor, die durch Gβγ stimuliert werden, der ACII, ACIV und ACVII. Es wurden keine vergleichbaren Sequenzen in anderen Gβγ-Effektoren gefunden. Die Stimulation aller drei AC-Isoformen durch Gβγ scheint also über dieselben AC-spezifischen Motive vermittelt zu werden.
Nicht geklärt werden konnte, ob die Motive direkt mit Gβγ interagieren. Diesbezügliche Peptid-Kompetitionsstudien mit synthetischen Peptiden der PFAHL- oder KF-Sequenz wiesen nicht auf eine Gβγ-Bindung hin (Daten nicht gezeigt). Dies ist aber kein Beweis dafür, dass die Motive im nativen Enzym nicht mit Gβγ interagieren, da unbekannt ist, ob die gelösten Peptide dieselbe Konformation annehmen wie im Kontext der ACII.
Bei bisherigen Studien an isolierten AC-Domänen erwies sich die C1b-Domäne als äußerst diffizil. So ist es bisher nicht gelungen, die komplette Domäne als stabiles Polypeptid zu exprimieren. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde ein isoliertes C1b-Fragment der ACVII charakterisiert, die in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen CD-Daten wurden davon abgeleitet (Beeler et al., 2004). Es umfasst allerdings nur einen Teil der gesamten C1b-Domäne, das PFAHL-Motiv der ACVII liegt N-terminal davon. Bei Untersuchungen der Gβγ-Bindung an immobilisierte GST-Fusionsproteine der ACII konnten Weitmann und Mitarbeiter 2001 eine direkte Interaktion von Gβγ mit der gesamten C1b-Domäne nachweisen.
Auch für die C2a-Domäne wurde eine direkte Bindung von Gβγ gezeigt. Dies war wegen der in der C2a-lokalisierten QEHA-Region zu erwarten (siehe Abschnitt 1.3.1). Wie in Abschnitt 5.1.3 erläutert, ist die Primärstruktur der QEHA-Region im Gegensatz zur PFAHL- und KF-Sequenz nicht relevant für die Gβγ-Stimulation der ACII, da sie ohne Beeinflussung der Gβγ-Regulation substituiert werden kann. Andererseits ist die direkte Interaktion eines QEHA-Peptids mit Gβγ in verschiedenen Studien nachgewiesen. Demnach ist bezüglich der beschriebenen ACII-Motive eine Unterscheidung vorzunehmen in ein reines Gβγ-Bindungsmotiv GBD (*general binding domain*), die QEHA-Region, und für den Gβγ-Effekt funktionsrelevante Regionen STR (*signal transfer region*), das PFAHL- und das KF-Motiv. Eine ähnliche Differenzierung in GBD und STR für Gβγ wurde erst kürzlich an spannungsabhängigen Natriumkanälen vorgenommen: Ein Natriumkanal-Motiv bindet als Peptid in Kompetitionsstudien nachweislich an Gβγ, es spielt aber keine wichtige Rolle für die Gβγ-Regulierbarkeit des Kanals, was anhand von Chimären zwischen Gβγ-stimulierbaren und Gβγ-insensitiven Natriumkanal-Isoformen oder Punktmutationen innerhalb des Motivs bewiesen wurde. Eine Aufhebung des Gβγ-Signals wurde hingegen bei Deletion eines an anderer Stelle des Kanals gelegenen Motivs beobachtet (Mantegazza et al., 2005).

Weder Spezifität noch Affinität der Gβγ-QEHA-Interaktion sind besonders hoch (Scott et al., 2001). Bei Kompetitionsstudien musste das QEHA-Peptid in einem fast 1000-fachen molaren Überschuss zu Gβγ eingesetzt werden, ein Peptid der analogen ACI-Region kann in diesen Konzentrationen ebenfalls mit Gβγ-Effektoren kompetieren (Weitmann et al., 2001). Die Region scheint demnach ein generelles Modul der Gβγ-regulierten ACs zu verkörpern, das mit Gβγ interagiert, ohne dabei ein Signal zu vermitteln, und das eher über seine Sekundär- als über seine Primärstruktur definiert wird. Welche Rolle also könnte die QEHA-Region in Bezug auf die Gβγ-Regulation der ACII spielen? Es wäre vorstellbar, dass sich QEHA an Gβγ anlagert und dabei zwei Funktionen ausübt, (i) die einer lokalen Gβγ Konzentrationserhöhung, wodurch ein Kontakt mit der räumlich benachbarten KF-Schleife begünstigt würde (siehe Abbildung 5.1), und (ii) die Funktion eines Gβγ-Occupators: QEHA bindet vermutlich an die Gβ-Oberfläche, die für die Hauptinteraktionen von Gβγ verantwortlich ist, und kompetiert dadurch mit anderen Gβγ-Effektoren (Chen et al., 1995). In dieser Funktion ist die QEHA-Region *in vitro* für die Entfaltung des Gβγ-Signals auf die ACII verzichtbar, da Gβγ und ACII ohnehin ungestört interagieren können. *In vivo* hingegen - in Gegenwart zahlreicher Gβγ-Effektoren - könnte die Anwesenheit der QEHA-Region als eine Art Gβγ-„Haltegurt“ durchaus relevant sein.

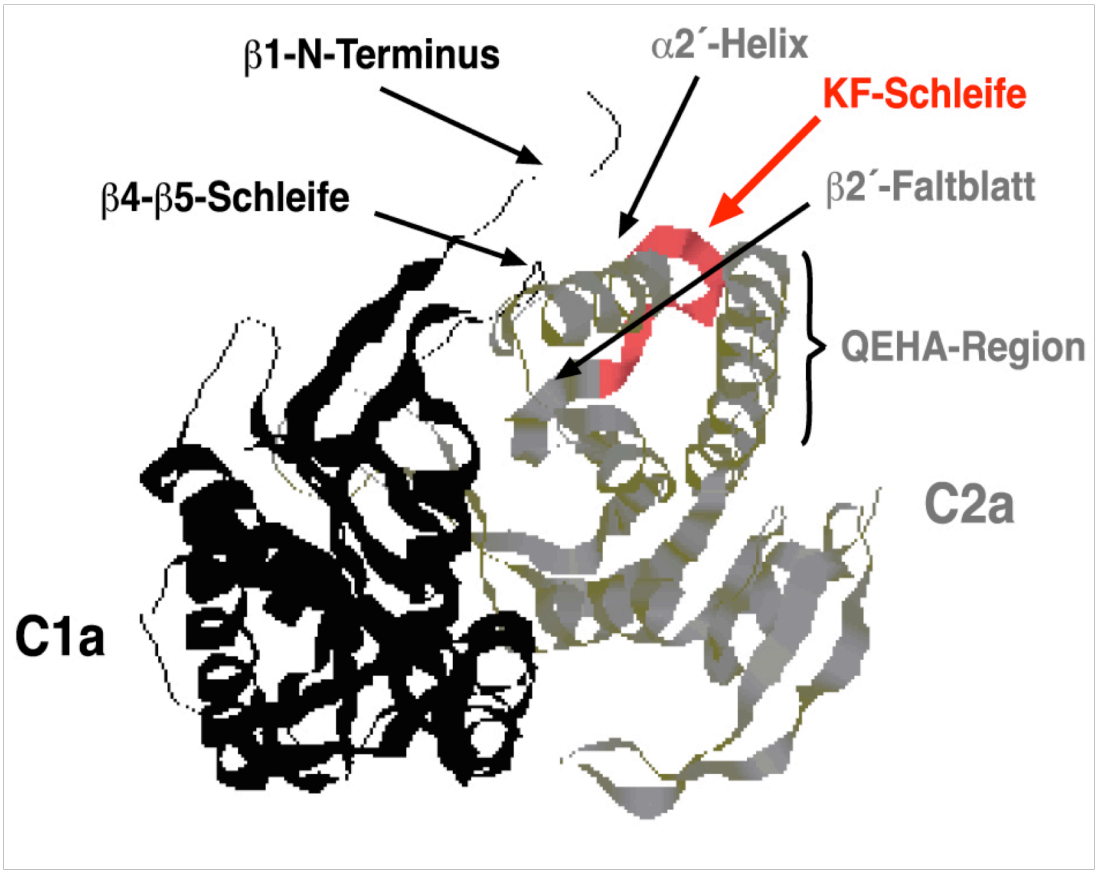


Abbildung 5.1: Die KF-Schleife im katalytischen Zentrum der AC
Struktur des katalytischen Zentrums aus ACV-C1a (schwarz) - ACII-C2a (grau) (Erläuterungen siehe Legende zu Abbildung 1.3). Die KF-Schleife ist rot hervorgehoben. Markiert sind die Sekundärstrukturelemente, die nach Tesmer et al. (1997) die Hauptkomponenten der intrazellulären Interaktion zwischen C1a- und C2a-Domäne darstellen (Details siehe Text). Die Klammer umfasst den C-terminalen Abschnitt der QEHA-Region (die ersten sieben Aminosäuren sind nicht in Kristallstruktur aufgelöst).

5.2 Die Isoform ACIII ist Gβγ-sensitiv

Während der in dieser Arbeit durchgeführten Studie zur ACII-Stimulation durch Gβγ wurde ein neuer isoform-spezifischer AC-Regulationsweg aufgedeckt: Die Inhibition der Isoform ACIII durch Gβγ (Diel et al., 2006).
Die ACIII wurde ursprünglich als „Gβγ-neutrale“ Umgebung verwendet, in der das ACII-PFAHL-Motiv in seiner Eigenschaft als Gβγ-Signaltransferregion untersucht werden sollte. Es wurde die ACIII ausgewählt, da sie die einzige Isoform war, von der bislang noch keine Gβγ-Sensitivität dokumentiert war (siehe Tabelle 1.1). Im Zuge der Experimente zur ACIII-PFAHL-Chimäre stellte sich jedoch heraus, dass die ACIII nicht neutral gegenüber Gβγ war. In Gegenwart der Costimulatoren Forskolin und Ca/CaM wurde sie durch Gβγ inhibiert (siehe Abbildung 4.10). Obwohl dies nicht die Standardbedingungen waren, unter denen die Gβγ-Regulation der ACII in dieser Arbeit untersucht wurde, war auch unter den für die ACIII modifizierten Bedingungen die ACII-Stimulierbarkeit durch Gβγ nachweisbar. Die Effizienz von Gβγ war bei Anwesenheit von Ca/CaM etwas abgeschwächt, was auf die von Liu und Mitarbeitern 1997 beschriebene Interaktion zwischen Gβγ und Ca/CaM zurückzuführen sein könnte.
Dass es sich bei der ACIII-Inhibition durch Gβγ nicht nur um einen sekundären Effekt - ausgelöst durch die Komplexierung des Stimulators Ca/CaM mit Gβγ - handelte, erwies sich dadurch, dass das Gβγ-Inhibitionsprofil der ACIII auch nach Vorstimulation mit Forskolin allein zu beobachten war. Gβγ wirkte demnach direkt auf die ACIII.
Damit reiht sich das gesamte zurzeit bekannte Regulationsmuster der ACIII in das der beiden anderen Isoformen ihrer Untergruppe (ACI und ACVIII) ein, in dem eine direkte Stimulation durch Ca/CaM und eine direkte Inhibition durch Gβγ ausgeübt werden kann. Im Gegensatz zu den Isoformen ACI und ACVIII hat jedoch der *in vitro* beobachtete stimulatorische Ca/CaM-Effekt auf die ACIII keine physiologische Relevanz, da die ACIII *in vivo* durch Ca/CaM unter Beteiligung der CaMKinaseII inhibiert wird (Choi et al., 1992, Wayman et al., 1995b, Wei et al., 1996). Für zukünftige Arbeiten wäre es demnach interessant zu überprüfen, ob die hier im *in vitro*-System neu entdeckte Inhibition der ACIII durch Gβγ *in vivo* ebenfalls stattfindet und in welche physiologischen Regelkreise dieser Vorgang eingebunden ist.
Die indirekte Inhibition der ACIII durch Ca/CaM legt die Grundlage der in ACIII-exprimierenden Zellen beobachteten cAMP- und Calcium-Oszillationen (Wayman et al., 1995a, Xia und Storm, 1997). Die ACIII wird in verschiedenen Geweben wie Hirn, Herz oder Retina exprimiert; besonders hohe Konzentrationen an ACIII findet man im olfaktorischen Epithel, wo ihr eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung von olfaktorischen Rezeptoren an cAMP-Regulationen zukommt (Bakalyar und Reed, 1990, Xia et al., 1992). Der hier entdeckten Regulation durch Gβγ, die die erste direkte Inhibition der ACIII-Aktivität darstellt, könnte eine entscheidende Funktion für die Kontrolle transienter cAMP-Produktionen in diesen Systemen zukommen.

5.3 Ca/CaM-Regulationsmotive auf der ACI

5.3.1 Die C1b-Domäne

Die variable C1b-Domäne der ACI trägt das Motiv AC28, für das sowohl eine direkte Bindung an Ca/CaM als auch eine funktionelle Rolle für die Ca/CaM-Stimulation der ACI nachgewiesen werden konnte (Vorherr et al., 1993, Wu et al., 1993). Bisher ging man von einem Ca/CaM-Signaltransfer einzig über dieses Motiv aus.

Hier wurde jedoch gezeigt, dass trotz Anwesenheit der ACI-C1b-Domäne in den Chimären ACII.IC1b und ACI.IIC2 beide Mutanten nicht durch Ca/CaM stimulierbar waren. Die Ca/CaM-Insensitivität der ACI,II-Chimären war unabhängig von deren Aktivitätszustand. Weder die schwach aktive Mutante ACII.IC1b reagierte auf Ca/CaM, noch die Mutante ACI.IIC2, deren basale Aktivität so hoch war, dass sie nicht nur bei $G\alpha_s$-Vorstimulation, sondern auch im Basalzustand auf ihre Ca/CaM-Regulierbarkeit getestet werden konnte. Dieser Befund steht in Diskrepanz zu den 1995 von Levin und Reed erhobenen Daten an HEK293-Zellen, die nach Transfektion mit ACI,II-Chimären, die die C1b-Domäne der ACI enthielten, ein deutliches stimulatorisches Ca/CaM-Signal zeigten. Die C1b-Domäne ist demnach in der Lage, in intakten Zellen ein Ca/CaM-Signal zu vermitteln. Wie stark dieses Signal im Verhältnis zur Ca/CaM-Stimulation der gesamten ACI ist, kann aus den Daten der damaligen Studie nicht abgeleitet werden, da Angaben zu den absoluten AC-Aktivitäten fehlen.

5.3.2 Die C2-Domäne

Mit den Ca/CaM-Befunden der ACI.IIC2-Chimäre stand fest, dass die C2-Domäne der ACI in die direkte Vermittlung des Ca/CaM-Signals auf die ACI involviert ist (Diel et al., eingereicht). Im Gegensatz zur Isoform ACII besitzt die ACI in ihrer C2-Domäne neben der katalytischen a-Subdomäne auch eine b-Subdomäne. Diese würde sich in ihrer Sequenz-Variabilität als Zielregion für isoform-spezifische Regulatoren eignen. Da die C2b-Domäne weder an der Ausbildung des katalytischen Zentrums direkt mitwirkt, noch C-terminal an der AC fixiert ist, sollte es möglich sein, unter Beibehaltung der katalytischen Funktionalität die C2b-Domäne vollständig zu entfernen. Die Mutante ACI.1094, bei der nur die C-terminale Hälfte der C2b-Domäne fehlte, wies ein dem Wildtyp sehr ähnliches katalytisches Profil auf. Unerwarteterweise war jedoch bei Mutante ACI.1054, bei der die gesamte C2b-Domäne trunkiert war, eine Reduktion in der basalen und auch $G\alpha_s$- oder Forskolin-stimulierten Aktivität zu verzeichnen.

Der Übergang von der katalytischen a-Subdomäne zu der nicht katalytischen b-Subdomäne ist nicht fest definiert. So könnten bei Konstruktion der ACI.1054-Mutante eventuell wichtige, noch zum C-terminalen Bereich der C2a-Domäne gehörende Aminosäuren entfernt worden sein. Die aufgelöste Kristallstruktur des katalytischen Zentrums, von dem die bisherigen mechanistischen Modelle abgeleitet wurden, entspricht dem Komplex aus der VC1a- und IIC2a-Domäne. Für die Isoform ACI gibt es also keine sicheren Aussagen dazu, welche Aminosäuren ihrer C2a-Domäne für die Katalyse essentiell sind. Da aber die C2a-Domänen der verschiedenen AC-Isoformen konserviert sind, wurden die an der ACII gewonnenen strukturellen und funktionellen Einblicke auf die ACI per Abgleich der C2a-Primärstrukturen übertragen. In einer Sequenz-Analyse basierend auf chemischer Ähnlichkeit verschiedener C2a-Domänen entsprechen die ersten beiden Aminosäuren (LE) der in ACI.1054 entfernten C2b-Domäne den beiden die β7´-Struktur der ACII-C2a-Domäne abschließenden Aminosäuren (VN, Tesmer et al., 1997). Ihre Deletion könnte demnach ein Grund für die reduzierte katalytische Effizienz der Mutante ACI.1054 sein.

Ungeachtet dessen erwies sich aber auch diese Deletionsmutante als gut stimulierbar durch Ca/CaM (siehe Abbildung 4.24). Die C2b-Domäne der ACI spielte offensichtlich keine Rolle für die isoform-spezifische Regulation durch Ca/CaM, so dass das verantwortliche Motiv in der C2a-Domäne der ACI zu suchen sein musste.

5.3.3 Das VLG-Motiv

Die C2a-Domäne der ACI besitzt in der Nähe ihres C-Terminus eine Region, die alle wichtigen Kriterien eines Ca/CaM-Bindungsmotivs aufweist (siehe Abschnitt 1.2.2.4). Die gemäß ihrer hydrophoben Aminosäuren an den Positionen 1,5,8 bezeichnete VLG-Region war bereits 1993 Vorherr und Mitarbeitern aufgefallen; in Peptidstudien zeigte das in der C1b-Domäne lokalisierte AC28-Motiv jedoch eine weitaus höhere Ca/CaM-Affinität, so dass die VLG-Region nicht weiter untersucht wurde. Aufgrund der hier nachgewiesenen Relevanz der C2a-Domäne für die Ca/CaM-Stimulation wurde die VLG-Region nun genauer überprüft. Wie bereits an der ACII gesehen, ist die NAAIRS-Substitution inmitten einer katalytischen Domäne risikoreich. Daher wurden in der VLG-Region nur zwei einzelne Aminosäuren mutiert: Die Alanin-Substitutionen wurden an den Positionen 1 und 5 der VLG-Sequenz durchgeführt (V1027 und L1031), da diese als entscheidend für die Funktion von Ca/CaM-Bindungsmotiven beschrieben wurden (Rhoads und Friedberg, 1997). Leider erwies sich die resultierende Mutante ACI.VLG/AAG als katalytisch inaktiv. Da keine Defekte bei der Expression und Membranlokalisation der Mutante ersichtlich waren, wurde offensichtlich das katalytische Zentrum durch die beiden Punktmutationen inaktiviert. Es ist nichts dokumentiert von einer katalytischen Funktion der beiden Aminosäuren des VC1a-IIC2a-Komplexes, die im Sequenzvergleich den ACI-Aminosäuren V1027 und L1031 entsprechen. Dass es aber trotz hoher Konservierung innerhalb der katalytischen Domänen isoform-spezifische Unterschiede in der Ausbildung des katalytischen Zentrums gibt, haben schon die spiegelbildlichen Chimären ACI.IIC2 und ACII.IC2 gezeigt (siehe Abschnitt 5.1.2).

Mit den Daten zu Mutante ACI.VLG/AAG stand nun fest, dass der N-terminale Bereich der VLG-Region mit den beiden Aminosäuren V1027 und L1031 notwendiger Bestandteil eines funktionierenden katalytischen Zentrums der ACI ist.

In Bezug auf die Beteiligung der VLG-Region an der Ca/CaM-Interaktion der ACI war es folglich nicht möglich, das bisherige Arbeitskonzept der Mutationsstudien an AC-Konstrukten voller Länge anzuwenden. Die Fähigkeit des VLG-Motivs, in die Ca/CaM-Regulation der ACI einzugreifen, wurde daher an einem synthetischen, die VLG-Region umfassenden Peptid (pVLG) untersucht. Es wurde anhand von drei unterschiedlichen Versuchsansätzen bewiesen, dass die VLG-Region direkt mit Ca/CaM interagiert: (i) einer Peptid-Bindungsstudie an dansyliertem Ca/CaM, (ii) einer Peptid-Kompetitionsstudie mit dem Ca/CaM-Effektor ACI und (iii) einer Peptid-Kompetitionsstudie mit dem Ca/CaM-Effektor CaMKinaseII. Die exakte Aminosäureabfolge der VLG-Sequenz war hierbei entscheidend, da der Austausch von zwei Aminosäuren innerhalb der VLG-Region (pAAG) bereits zu einem erheblichen Verlust der Interaktionsfähigkeit mit Ca/CaM führte (Diel et al., eingereicht).

Die Fluoreszenzmessungen an dansyliertem CaM zählen aufgrund ihrer hohen Sensitivität schon seit langem zur Methode der Wahl für reine Bindungsstudien zwischen CaM und Peptiden. Das pVLG-Peptid erwies sich als effizienter Ca/CaM-Interaktionspartner, vergleichbar mit dem Peptid des bekannten Ca/CaM-Bindungsmotivs der C1b-Domäne (pAC28). Diese Daten stehen in Widerspruch zu der Aussage von Vorherr und Mitarbeitern, dass ein der VLG-Region entsprechendes Peptid in Fluoreszenzmessungen an dansyliertem CaM so gut wie keinen Effekt ausübte. Die entsprechenden Daten wurden in der damaligen Studie nicht gezeigt (Vorherr et al. 1993). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz ist, dass das damals untersuchte VLG-Peptid direkt mit der ersten Aminosäure der VLG-Region begann, während die Sequenz des hier verwendeten Peptids pVLG drei Aminosäuren vor der VLG-Region einsetzte, womit eine korrekte Faltung der relevanten Sequenz erleichtert wurde. Dass das pVLG-Peptid ähnlich gefaltet ist wie die in das natürliche ACI-Umfeld eingebettete VLG-Sequenz, lässt sich auch aus der erfolgreichen Kompetition des Peptids mit der gesamten ACI um Ca/CaM schließen (siehe Abbildung 4.29).

pVLG übte aber nicht nur durch Ca/CaM-Komplexierung einen inhibitorischen Effekt auf die ACI aus, sondern es inhibierte die ACI zusätzlich selber. Eine direkte Interaktion des pVLG-Peptids mit der ACI ist nicht abwegig angesichts der oben beschriebenen Funktion der VLG-Region für die Integrität des katalytischen ACI-Zentrums.

Neben pVLG war außerdem auch pAC28 in der Lage, einen direkten inhibitorischen Effekt auf die ACI auszuüben, was auf intramolekulare Kontakte innerhalb der ACI zwischen ihrer C1b-Domäne und dem katalytischen Zentrum hinweist.
Auch mit einem nicht aus der AC-Familie stammenden Ca/CaM-Effektor, der CaMKinaseII, konnte das pVLG-Peptid erfolgreich kompetieren. Die Bindung des Peptids an Ca/CaM verhinderte demnach nicht nur die Ca/CaM-Interaktion mit der VLG-Sequenz der ACI, sondern sie führte außerdem zu einer Aufhebung der Ca/CaM-Regulationen anderer Effektoren. Dies kann an einer direkten sterischen Behinderung liegen, oder aber die mit der pVLG-Bindung einhergehende (mit Hilfe der Dansyl-Fluoreszenzmessung bereits nachgewiesene) Ca/CaM-Konformationsänderung war ursächlich für die Aufhebung der CaMKII-Interaktion an allosterischer Stelle des Ca/CaM.

5.3.4 Ca/CaM-Bindungsmotive der ACI: AC28 und VLG

In der ACI-Kompetitionsstudie war bei pVLG zwar eine deutliche Ca/CaM-Interaktion nachzuweisen, es war in seinem inhibitorischen Effekt jedoch weniger potent als das Peptid pAC28. Im Gegensatz dazu waren sich die während der Fluoreszenzstudien an dansyliertem Ca/CaM aufgenommenen Bindungs-Profile der beiden Peptide äußerst ähnlich. Die in der Fluoreszenzmessung eingesetzte CaM-Konzentration (80 nM) überstieg anscheinend die K_D-Werte beider Peptide. Die Peptid-Titrationen führten zu einem linearen Bindungssignal mit abruptem Eintritt in den Sättigungsbereich bei einem äquimolaren Peptid/CaM-Verhältnis. Um von der individuellen Peptid-Affinität abhängige Bindungskurven an CaM zu erhalten, hätte die CaM-Konzentration unterhalb der K_D für das jeweilige Peptid gewählt werden müssen. Dies war in diesem Experiment jedoch nicht möglich, ohne die Detektionsgrenze des Dansyl-Fluoreszenzsignals zu unterschreiten.
Im Kompetitionsversuch hingegen wurde die CaM-Affinität des jeweiligen Peptids abgeleitet von der Peptidkonzentration, bei der eine halbmaximale ACI-Inhibition erreicht war (IC_{50}). In diesem Versuch lag die eingesetzte CaM-Konzentration (200 nM) unterhalb der IC_{50}-Werte der beiden Peptide (500 nM bei pAC28 bzw. 10 μM bei pVLG), so dass der Unterschied der beiden Peptide in ihrer Affinität zu CaM deutlich wurde. Dass sich die IC_{50}-Werte der beiden Peptide hier so deutlich (Faktor 20) unterschieden, lag eventuell daran, dass die Peptide mit der intakten ACI voller Länge konkurrieren mussten. Diese besitzt sowohl die AC28- als auch die VLG-Sequenz, so dass pVLG zunächst gegen den stabilen Komplex des Ca/CaM mit der affineren AC28-Sequenz kompetieren musste, bevor es die gesamte ACI von Ca/CaM verdrängen konnte.
Neben ihrer Affinität zu Ca/CaM gab es noch einen weiteren Unterschied der beiden Peptide bezüglich ihrer CaM-Bindung. Im Rahmen der Fluoreszenzmessungen wurde festgestellt, dass pAC28 im Gegensatz zu pVLG auch bei Abwesenheit von Calcium in der Lage war, mit CaM zu interagieren (siehe Abbildung 4.28). Obwohl die ACI nachweislich nur durch Calcium-gebundenes CaM stimuliert wird, kann die Fähigkeit zur Bindung von inaktivem apoCaM über ihr AC28-Motiv äußerst sinnvoll sein: In intakten Zellen ist der Großteil des sich insgesamt auf etwa 10 μM belaufenden CaM im Komplex oder in Kompartimenten gehalten, während nur etwa 45 nM CaM frei zugänglich sind (Persechini und Cronk, 1999). Dieses Kontingent an verfügbarem CaM wird von der Anzahl an CaM-Bindungsproteinen um ein Zweifaches übertroffen. Daher ist anzunehmen, dass die ACI ihr AC28-Motiv nutzt, um im Ruhezustand der Zelle mit dem inaktiven CaM eine Präassoziation einzugehen und dieses somit an Interaktionen mit anderen Effektoren zu hindern. Somit wäre auch eine rasche Antwort des ACI/CaM-Komplexes auf einen intrazellulären Calcium-Anstieg gewährleistet, da keine Diffusion des Ca/CaM an seinen Effektor ACI mehr nötig wäre.

5.3.5 Mechanismen der AC-Stimulation durch Ca/CaM

Die bis vor kurzem allgemein akzeptierte Hypothese der Blockierung einer autoinhibitorisch wirkenden Enzymdomäne als stimulatorischer Mechanismus von Ca/CaM passte gut in das Bild der ACI-Stimulation angesichts der autoinhibitorischen Funktion, die der C1b-Domäne schon in verschiedenen Studien zugesprochen wurde (siehe Abschnitt 5.1.1).

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen aber, dass der Mechanismus der ACI-Regulation durch Ca/CaM komplexer ist als bisher angenommen. Neben der C1b-Domäne spielt die C2a-Domäne der ACI eine entscheidende Rolle.

Ein mögliches Szenario für die ACI-Stimulation bei Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration wäre, dass nach Aktivierung und der damit verbundenen Konformationsänderung des am AC28-Motiv vermutlich präassoziierten CaM eine Positionsänderung der C1b-Domäne und damit verbunden eine Abschwächung ihres autoinhibitorischen Effekts ausgelöst wird, und dass zusätzlich aktivierende Interaktionen des Ca/CaM direkt mit dem katalytischen Zentrum stattfinden. Das auf der katalytischen Domäne C2a lokalisierte Ca/CaM-Bindungsmotiv VLG formt nach Sekundärstrukturanalyse gemäß dem Chou-Fasman-Algorithmus eine Helix-Schleifen-Helix-Struktur, und die entsprechende Region im ACII-C2a-Kristall zeigt in einer Schleife vom ventralen Spalt weg - optimal für regulatorische Interaktionen (Abbildung 5.2). Ob der direkte Kontakt des Ca/CaM mit dem katalytischen Zentrum der ACI über das VLG-Motiv allein oder unter Einbeziehung weiterer gut zugänglicher C1a,C2a-Schleifenregionen stattfindet, ist von den vorgestellten Daten nicht abzuleiten.

Ein ähnliches mechanistisches Modell indizieren die kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen der Ca/CaM-stimulierbaren ACs der Pathogene *Bacillus anthracis* und *Bordetella pertussis*, in dem das Ca/CaM in ausgestreckter Form mit mehreren Schleifen des katalytischen Zentrums der ACs interagiert und dieses dadurch stabilisiert (siehe Abbildung 1.6). Dieser Aktivierungsmechanismus ist für beide Toxin-ACs ähnlich, obwohl sich die konkreten Interaktionsflächen und damit auch die Gesamt-Affinität beider ACs zu Ca/CaM deutlich voneinander unterscheiden (Guo et al., 2005).

Auch die beiden Ca/CaM-stimulierbaren Säuger-Isoformen ACI und ACVIII weisen unterschiedliche Ca/CaM-Bindungsmotive auf (die ACI-Motive liegen in der C1b- und C2a-Domäne, die ACVIII-Motive im N-Terminus und in der C2b-Domäne, Gu und Cooper, 1999), womit der in Abschnitt 1.1.5 beschriebene Unterschied in der Calcium-Sensitivität der beiden Isoformen erklärt werden kann. Auf der anderen Seite lassen sich auch hier - wie bei den beiden Toxin-ACs - einige Gemeinsamkeiten ableiten: Beide ACs besitzen ein zur CaM-Präassoziation fähiges Bindungsmotiv (das AC28-Motiv in der ACI und der N-Terminus in der ACVIII, siehe Abschnitt 1.2.2.4), die Ca/CaM-Regulationsmotive sind sowohl bei ACI als auch bei ACVIII auf beide Hälften des AC-Heterodimers verteilt und in beiden Enzymen kommt es zu intramolekularen Wechselwirkungen der Ca/CaM-Bindungsmotive mit anderen AC-Regionen (ACI: siehe Abschnitt 5.3.3, ACVIII: siehe Simpson et al., 2006). Angesichts der Homologie der katalytischen Zentren von ACI und ACVIII liegt die Vermutung nahe, dass auch hier - wie zuvor für die beiden Toxin-ACs beschrieben - der Ca/CaM-Effekt trotz unterschiedlicher Interaktionsmotive und Affinitäten der beiden ACs auf einem ähnlichen Aktivierungsmechanismus beruht.

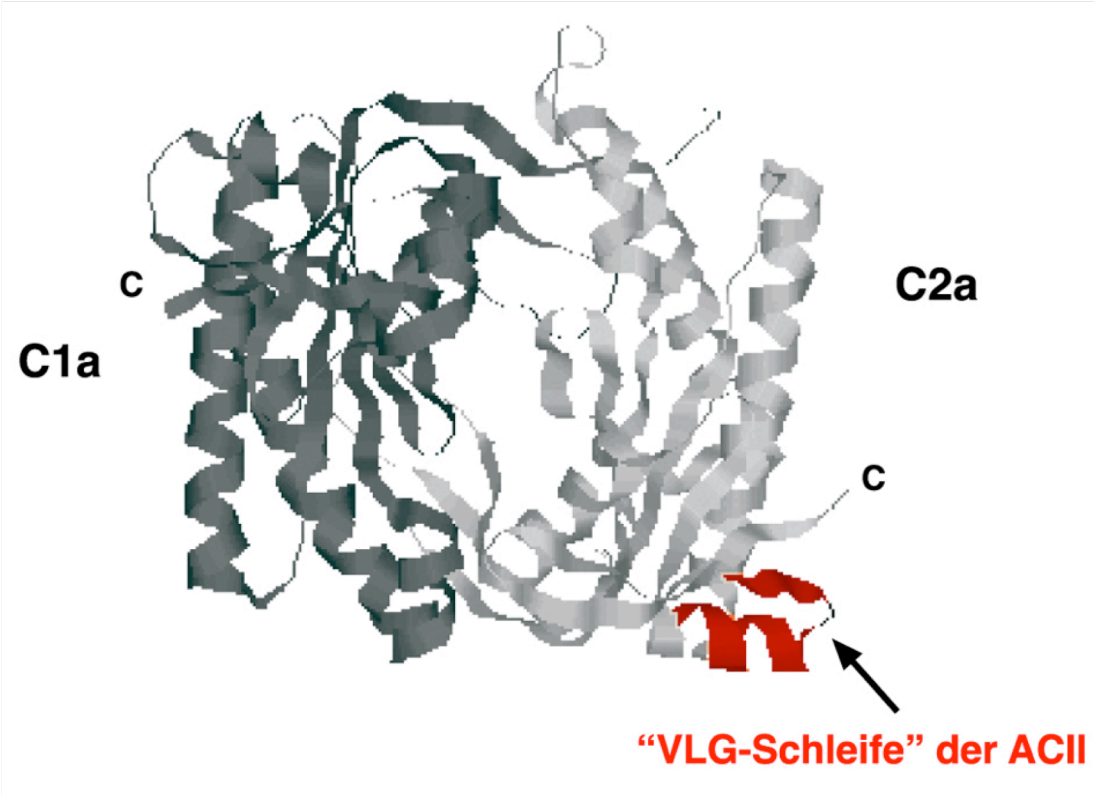
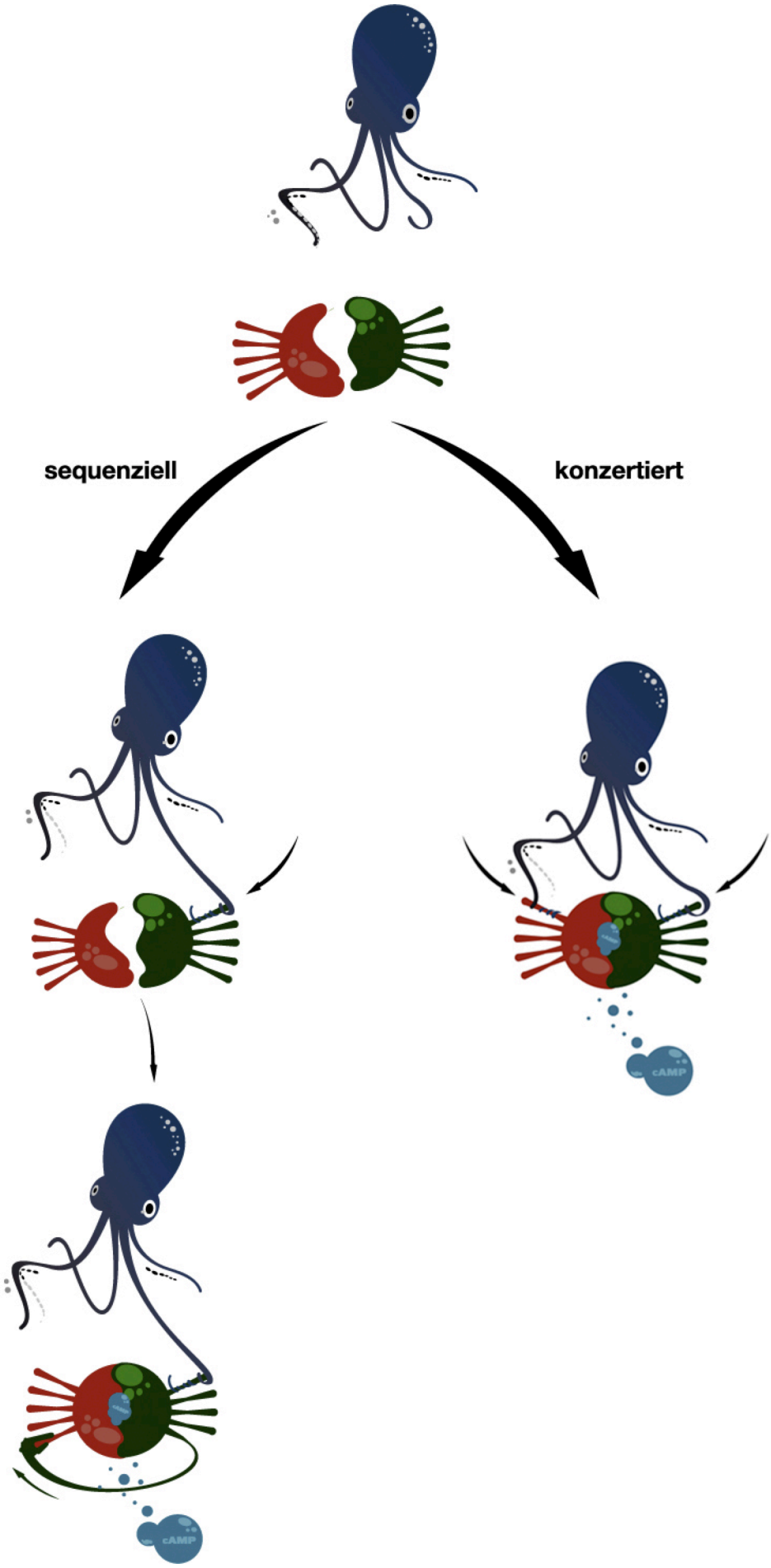


Abbildung 5.2: Die VLG-Schleife im katalytischen Zentrum der AC
Struktur des katalytischen Zentrums aus ACV-C1a (dunkelgrau) - ACII-C2a (hellgrau) (Erläuterungen siehe Legende zu Abbildung 1.3). Die ACII-Region, die im Sequenzvergleich der VLG-Region der ACI entspricht, ist rot hervorgehoben.

5.4 Isoform-spezifische AC-Regulationen

Es ist anzunehmen, dass in beiden Fällen der isoform-spezifischen Regulatoren Gβγ und Ca/CaM mehrere räumlich getrennte Kontaktflächen für die Modulation ihres jeweiligen Effektors ACII und ACI zum Einsatz kommen.
Die meisten der heute identifizierten Interaktionspunkte für die ACII (siehe Abbildung 1.4B) befinden sich auf der engen Oberseite des Gβ-Propellertorus, die auch für den Hauptkontakt mit Gα verantwortlich ist (Chen et al., 1997a, Ford et al., 1998; Li et al., 1998, Myung et al., 2000). Außerdem wurde eine Interaktion der ACII mit der N-terminalen Region von Gβγ nachgewiesen, die die *coiled-coil*-Struktur und das erste Propellerblatt umfasst (Yan und Gautam, 1996). Auf dem Regulator Ca/CaM sind zum heutigen Zeitpunkt keine konkreten Interaktionsregionen für die ACI bekannt. Die in den letzten Jahren aufgelösten Kristallstrukturen von Ca/CaM im Komplex mit verschiedenen anderen Effektoren zeigen aber, dass CaM generell unter Einsatz mehrerer Oberflächenregionen extensive Kontakte zu seinen Effektoren eingeht (siehe Abbildung 1.6, Vetter und Leclerc, 2003, Guo et al., 2005).
Ausgehend von diesen Befunden und den Daten, die in der vorliegenden Arbeit bezüglich der Regulationsmotive auf Effektor-Ebene (ACI und ACII) erhoben wurden, wird deutlich, dass die isoform-spezifische Regulation der ACII durch Gβγ und der ACI durch Ca/CaM nicht über eine einzige lokal begrenzte Interaktionsstelle vermittelt wird, sondern dass sowohl auf Regulator- als auch auf Effektor-Ebene mehrere Epitope für einen komplexen Regulationsmechanismus zur Verfügung stehen.
Die variable C1b-Domäne der beiden AC-Isoformen besitzt ein für die jeweilige Regulation essentielles Motiv (PFAHL für Gβγ und AC28 für Ca/CaM), in beiden Fällen wurde jedoch gezeigt, dass das Motiv allein nicht ausreicht, um das regulatorische Signal zu vermitteln.
Die konservierte C2a-Domäne ist unter Einsatz isoform-spezifischer Schleifen (KF für Gβγ und VLG für Ca/CaM), die aus dem katalytischen Zentrum herausragen, ebenfalls an der jeweiligen Regulation beteiligt. In der C2a-Domäne der ACII ist zudem eine Region (QEHA) bekannt, die als Bindungsdomäne für Gβγ agiert, ohne für die direkte Vermittlung des regulatorischen Gβγ-Signals relevant zu sein.
Für beide hier untersuchte ACs ist nicht auszuschließen, dass es neben den identifizierten Motiven weitere für die jeweiligen Regulatoren wichtige *hot spots* gibt (beispielsweise in der ebenfalls Gβγ-bindenden C2a-Domäne der ACII, siehe Abschnitt 1.3.1). Diese *hot spots* könnten generell aufgeteilt werden in (i) intermolekulare Bindungsregionen, die mit dem Regulator direkt interagieren, ohne dabei an der Signalweiterleitung aktiv mitzuwirken, (ii) Signaltransfer-Regionen, die ebenfalls direkt mit dem Regulator interagieren und dabei von diesem in einer Weise moduliert werden, dass es sich auf die Aktivität des Enzyms auswirkt und (iii) Regulationsmotive, die keinen direkten Kontakt mit dem Regulator eingehen, jedoch wichtiger Bestandteil für den intramolekularen Signalprozess des Effektors sind.
Aufgrund der hier aufgezeigten zentralen Rolle der C1b-Domäne für isoform-spezifische Regulationsprozesse an der AC wäre die strukturelle Entschlüsselung von Form und Orientierung dieser variablen Domäne in den verschiedenen Isoformen sehr hilfreich. Aus solchen Strukturdaten könnten die mechanistischen Grundlagen des C1b-Einflusses auf das katalytische Zentrum abgeleitet werden. Das große, noch weit entfernte Ziel bleibt die Strukturauflösung des gesamten Enzyms, einschließlich der zwölf Membran-integrierenden Helices. Ob jedoch die gesamte Strukturinformation der AC ausreichen wird, um die regulatorische Komplexität dieses Enzyms über Zeit und Raum erfassen zu können, ist anzuzweifeln.
Generell sind beide Hälften des heterodimerisch aufgebauten Enzyms involviert. Dies kann bezüglich der schon identifizierten regulatorischen Motive in den cytosolischen Teilen der AC festgehalten werden. Erst im Zusammenspiel beider Hälften wird die katalytische Aktivität der ACs voll entfaltet, und die allosterischen,


sequenziell
konzertiert
cAMP
cAMP

alle in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 angreifenden Stimulatoren wie $G\alpha_s$, Forskolin, oder - wie hier gezeigt - $G\beta\gamma$ und Ca/CaM besitzen Regulationsmotive auf jeweils beiden Hälften.
Der eigentliche Regulationsprozess kann dann konzertiert oder sequentiell ablaufen: Der Regulator greift simultan an beiden Hälften an und übt über eine Art Klammer einen positiven bzw. negativen Einfluss auf die Konstellation des katalytischen Zentrums aus; oder aber der Regulator dockt zunächst an einer Seite der AC an und löst dadurch eine intramolekulare Signalkaskade unter konsekutiver Beteiligung der einzelnen Regulationsmotive aus.
Unabhängig von der tatsächlichen Zahl regulatorischer Interaktionsstellen, die in dieser Arbeit eventuell noch nicht vollständig identifiziert wurden, ermöglichen die multiplen Regulationsmotive der AC-Isoformen diesem zentralen Enzym, vielfältige isoform-spezifische Signale zu integrieren und in ein für die Zelle leicht decodierbares Signal, cAMP, umzuwandeln. Für die intrazelluläre Umsetzung dieses Signals auf den zahlreichen Funktionsebenen einschließlich Metabolismus, Sekretion, Zellteilung/Zelldifferenzierung und Migration scheinen nicht nur die Menge an cAMP, sondern zudem die zeitlich und auch lokal gebildeten Konzentrationsgradienten von cAMP ausschlaggebend zu sein. Deren Form kann umso genauer dargestellt werden, desto feiner die AC über multiple Interaktionsstellen reguliert wird. Aufgrund des einheitlichen Katalysemechanismus der partikulären ACs konnte bisher eine pharmakologische Beeinflussung der cAMP-Gradienten nicht auf Ebene der AC erfolgen. Durch die hier beschriebene Identifizierung isoform-spezifischer AC-Regulationsmotive sollte es jetzt jedoch möglich sein, therapeutische Moleküle zu entwerfen und zu synthetisieren, die als Agonisten bzw. Antagonisten an diesen Schnittstellen regulatorischer Signale wirken.