

Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften
Universität-Bayreuth

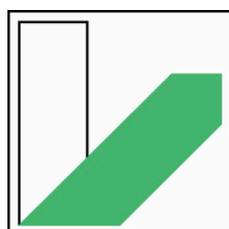
Strukturelle und biochemische Charakterisierung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase

Wissenschaftliche Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Silke Kleinbölting

Bayreuth 2014



**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom September 2010 bis Februar 2014 in Bayreuth am Lehrstuhl für Biochemie Abteilung für Strukturbiologie unter Anleitung von Prof. Dr. Clemens Steegborn angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat).

Dissertation eingereicht am: 24.06.2014

Zulassung durch die Prüfungskommission: 02.07.2014

Wissenschaftliches Kolloquium: 27.10.2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter: Prof. Dr. Clemens Steegborn

Zweitgutachter: Prof. Dr. Paul Rösch

Vorsitz: Prof. Dr. Matthias Ullmann

Prüfer: Prof. Dr. Matthias Breuning

"Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen."

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klassifizierung von Cyclasen	2
1.2	Topologie der Klasse III Cyclasen	3
1.3	Katalytischer Mechanismus von Klasse III Cyclasen	4
1.4	Lösliche humane Adenylyl-Cyclase (hsAC)	7
1.5	Regulation der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase	10
1.6	Inhibitoren der Adenylyl-Cyclase	11
1.6.1	<i>P-site</i> Inhibitoren	12
1.6.2	Selektive Inhibitoren der löslichen Adenylyl-Cyclase	13
2	Zielsetzung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Bakterienstämme	17
3.1.2	Nährmedien	17
3.1.3	Antibiotika	18
3.1.4	Puffer und Lösungen	18
3.1.5	Vektoren	21
3.1.6	Oligonukleotide	21
3.1.7	Protein- und Nukleinsäurestandards	21
3.1.8	Enzyme	21
3.1.9	Chemikalien	22
3.1.10	FPLC-Säulenmaterial	22
3.1.11	<i>Kit</i> -Systeme	22
3.1.12	Geräte	22
3.1.13	Verbrauchsmaterialien	24
3.2	Molekularbiologische Methoden	25
3.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
3.2.2	Analytische Schnell-PCR (<i>Fast</i> -PCR)	25
3.2.3	Überprüfung der DNA und Isolierung	26
3.2.4	Klonierung	26
3.2.5	Transformation	26
3.2.6	Kultivierung von transformierten Bakterienzellen	26
3.2.7	Kontrolle und Lagerung der klonierten Konstrukte	26
3.2.8	Herstellung des rekombinanten Bacmids und Virus	27
3.3	Proteinbiochemische Methoden	27
3.3.1	Analytische Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	27

3.3.2	Präparative Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	27
3.3.3	Präparative Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen	27
3.3.4	Präparativer Zellaufschluss	28
3.3.5	Affinitätschromatographie	28
3.3.6	Ionenaustauschchromatographie (IEC)	28
3.3.7	Größenausschlusschromatographie	29
3.3.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.3.9	Konzentrierung des Proteins durch Ultrazentrifugation	29
3.3.10	Proteinkonzentrationsbestimmung	29
3.4	Biophysikalische Methoden	30
3.4.1	Aktivitätsmessungen mittels Umkehrphasen-HPLC	30
3.4.2	Affinitätsbestimmung	30
3.4.3	Proteinverifikation mittels MS	30
3.5	Kristallstrukturanalyse	30
3.5.1	Kristallisation	30
3.5.2	Cryoprotektion	31
3.5.3	Komplexstrukturen	31
3.5.4	Röntgenstrukturanalyse und Datensammlung	31
3.5.5	Experimentelle Phasierung	32
3.5.6	Modellbau und Strukturverfeinerung	34
3.5.7	Bioinformatik	34
4	Ergebnisse	36

4.1	Reinigung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase	36
4.2	Strukturelle Charakterisierung des <i>apo</i> -Enzyms	37
4.3	Die lösliche Adenylyl-Cyclase im Komplex mit ApC _{pp}	42
4.4	Substratinteraktion der löslichen Adenylyl-Cyclase	46
4.4.1	ATP	46
4.4.2	GTP	51
4.5	Produktkomplexe der löslichen Adenylyl-Cyclase	52
4.5.1	Pyrophosphat-Komplex	52
4.5.2	cAMP-Komplex	53
4.5.3	cAMP- und Pyrophosphat-Komplex	54
4.6	Aktivierung der humanen löslichen AC	55
4.6.1	Bicarbonat	55
4.6.2	Komplexstruktur mit Aktivator und Substrat	59
4.6.3	Einfluss des pHs	60
4.7	Inhibitoren	61
4.7.1	Untersuchung des Inhibitors KH7	61
4.7.2	Inhibition durch Stilbene	63
4.7.3	Initiale Untersuchungen von verschiedenen zellulären Botenstoffen	67
4.7.4	Effekte von Tetramsäuren	67

5	Diskussion	71
5.1	Expression verschiedener hsAC Konstrukte	71
5.2	Struktureller Vergleich der hsAC	71
5.3	Substratbindestelle	76
5.3.1	Ausbildung der Substratbindestelle	76
5.3.2	Substrataffinität	77
5.3.3	Substraterkennung	81
5.4	Ablauf der Cyclisierungsreaktion	83
5.4.1	Freisetzung der Produkte	86
5.5	Regulation der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase	87
5.5.1	Bicarbonatbindestelle	87
5.5.2	Aktivierung durch Bicarbonat	89
5.5.3	Einfluss des pH-Wertes	93
5.5.4	Potentielle Regulatorbindestelle	93
5.6	Inhibierung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase	94
5.6.1	KH7	96
5.6.2	DIDS	97
6	Zusammenfassung	99
7	Abstract	101
8	Abkürzungsverzeichnis	103
9	Literaturverzeichnis	108
10	Anhang	114
11	Danksagung	131
12	Lebenslauf	132
13	Publikationen und Tagungsbeiträge im Rahmen der Dissertation	134
14	Eidesstattliche Versicherung und Erklärung	135

Abbildungsverzeichnis

1	Einleitung	1
Abbildung 1.1	Übersicht der cAMP-abhängigen Signalwege in Säugern	1
Abbildung 1.2	Topologieschema der verschiedenen Klasse III Cyclasen	4
Abbildung 1.3	Substratbindestelle in Adenylyl-Cyclasen	5
Abbildung 1.4	Katalytischer Mechanismus der Klasse III Adenylyl-Cyclase	5
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung der Domänen der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase	7
Abbildung 1.6	Bildung von Mikrodomänen in der gesamten Zelle	9
Abbildung 1.7	Aktivierung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase	10
Abbildung 1.8	Komplexe von <i>P-site</i> Inhibitoren mit transmembranen Adenylyl-Cyclasen	12
Abbildung 1.9	Bindung von Catecholestrogen an die Adenylyl-Cyclase CyaC	13
4	Ergebnisse	36
Abbildung 4.1	Charakterisierung verschiedener hsAC Konstrukte	37
Abbildung 4.2	Kristalle und Diffraktion von <i>apo</i> hsAC _{cat} -Kristallen	38
Abbildung 4.3	Durch Quecksilber modifizierte Cysteine	40
Abbildung 4.4	Struktur der katalytischen Domäne der hsAC in <i>apo</i> -Form	41
Abbildung 4.5	Oberflächendarstellung der hydrophoben Bindetasche der <i>apo</i> -Struktur	42
Abbildung 4.6	Darstellung des ApCpp-Komplexes	43
Abbildung 4.7	Vergleich des ApCpp-Komplexes mit der <i>apo</i> -Struktur	44
Abbildung 4.8	Zweidimensionale Darstellung der ApCpp-Koordination	45
Abbildung 4.9	Oberflächendarstellung der hsAC _{cat} -Struktur	46
Abbildung 4.10	Umsatz von ATP in Kristallen und Affinität der Produkte	47
Abbildung 4.11	Einfluss der Produkte auf die Adenylyl-Cyclaseaktivität der hsAC	48
Abbildung 4.12	Einfluss von divalenten Ionen auf die hsAC	48
Abbildung 4.13	Struktur der hsAC _{cat} mit gebundenem ATP	49
Abbildung 4.14	Bindung des ATP-Liganden.	50
Abbildung 4.15	Einfluss von GTP auf die hsAC	51
Abbildung 4.16	Pyrophosphat-Komplex der hsAC	52
Abbildung 4.17	cAMP-Bindestellen in der hsAC-Struktur	53
Abbildung 4.18	Produktkomplexe mit cAMP und PP _i	54

Abbildung 4.19 HCO_3^- -Komplexstruktur von hsAC_{cat}	56
Abbildung 4.20 Validierung der BBS durch HSeO_3^- und HSO_3^-	56
Abbildung 4.21 Einfluss von Bicarbonat, Biselenit und Bisulfit auf die hsAC	57
Abbildung 4.22 Einfluss von Ionen auf das hsAC_{cat} -Protein	58
Abbildung 4.23 Einfluss von Bicarbonat auf Substrat- und Produktaffinität	59
Abbildung 4.24 Komplexstruktur mit Substratanalogon und Bisulfit	60
Abbildung 4.25 pH-Optimum der hsAC_{cat}	61
Abbildung 4.26 Charakterisierung von KH7 als sAC -Inhibitor	62
Abbildung 4.27 Anomales Br-Signal von KH7	62
Abbildung 4.28 Stilbene als Inhibitoren	63
Abbildung 4.29 DIDS-Komplexstruktur	64
Abbildung 4.30 Detaillierte DIDS II und III Bindestellen	64
Abbildung 4.31 Bindestelle von DIDS I	65
Abbildung 4.32 Bindung von DIDS	66
Abbildung 4.33 Kompetitive Bindung des DIDS I Moleküls mit ApCpp	66
Abbildung 4.34 Einfluss verschiedener zellulären Effektoren auf die hsAC Aktivität	67
5 Diskussion	71
Abbildung 5.1 Vergleich der beiden katalytischen Domänen C1 und C2 der hsAC	72
Abbildung 5.2 Strukturbasiertes Sequenzalignment der Cyclasen	73
Abbildung 5.3 Überlagerung der Bicarbonatbindestelle von hsAC mit CyaC	75
Abbildung 5.4 Darstellung der offenen Ionenbindestelle	76
Abbildung 5.5 Überlagerung verschiedener Substratkomplexe von Adenylyl-Cyclasen	80
Abbildung 5.6 Vergleich der Ionenbindestellen	81
Abbildung 5.7 Syn- und anti-Konformation von GTP in hsAC modelliert	82
Abbildung 5.8 Vorgeschlagener Cyclisierungsmechanismus der hsAC	84
Abbildung 5.9 Bewegung des $\beta 7$ - $\beta 8$ Loops	84
Abbildung 5.10 Lage und Einfluss von Lys95 und Arg176 auf die BBS	88
Abbildung 5.11 Änderung durch Bindung von HCO_3^-	89
Abbildung 5.12 Die Regulatorbindestelle von tmACs und hsAC im Vergleich	93
Abbildung 5.13 Potentielle Protein-Protein-Interaktionsstelle in der hsAC	94
Abbildung 5.14 Überlagerung der 2-CE gebundenen CyaC Struktur mit der ApCpp-Struktur der hsAC	95
Abbildung 5.15 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration von DIDS	97
Abbildung 5.16 DIDS-Bindestelle	97

6	Zusammenfassung	99
	Abbildung 6.1 Vorgeschlagenes Modell für die Bicarbonataktivierung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase	99
7	Abstract	101
	Abbildung 7.1 Proposed model of the human soluble adenylyl cyclase activated by bicarbonate	101

Die Verwendung von kopiergeschützten Abbildungen erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Verlage American Society for Biochemistry and Molecular Biology, American Chemical Society und Elsevier.

Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	1
	Tabelle 1.1 Inhibitoren der Adenylyl-Cyclase	14
3	Material und Methoden	17
	Tabelle 3.1 PCR-Ansatz	25
	Tabelle 3.2 PCR-Programm	25
4	Ergebnisse	36
	Tabelle 4.1 Statistiken der Datensammlung des nativen Datensatzes	38
	Tabelle 4.2 Derivate und Inkubationsbedingungen für die Herstellung von schweratomderivatisierten Kristallen	39
	Tabelle 4.3 Statistiken der Datensammlung der anomalen Datensätze	40
	Tabelle 4.4 Koordination des Ca^{2+} -Ions in der ApC _{pp} -Struktur	44
	Tabelle 4.5 Koordination des Mg^{2+} -Ions in der <i>in-situ</i> -PP _i -Struktur	47
	Tabelle 4.6 Koordination des Ca^{2+} -Ions in der <i>in-situ</i> -PP _i -Struktur	49
	Tabelle 4.7 Koordination des Na^{+} -Ions in der ATP-Struktur	50
	Tabelle 4.8 Einfluss von Tetramsäuren auf die hsAC	68
5	Diskussion	71
	Tabelle 5.1 Vergleich der der Abstände von Ion B zu den Koordinationspartnern	78
10	Anhang	114
	Tabelle 10.1 Integration der Diffraktionsdaten und Verfeinerung	114
	Tabelle 10.2 Kristallisations- und <i>Soaking</i> bedingungen	123
	Tabelle 10.3 14 initiale Cokristallisationsbedingungen für hsAC mit ApC _{pp}	120

1 Einleitung

Die Kommunikation zwischen Zellen erfolgt über den konstanten Austausch von Signalen mit der Umgebung, welche interpretiert werden. Dies hat intrazelluläre sowie extrazelluläre Effekte zur Folge. Dieses multiple Signalsystem besteht aus primären Botenstoffen wie Neurotransmitter und Peptidhormonen, die ausschließlich als extrazelluläre Signalüberträger dienen. Intrazellulär werden die ankommenden Signale oft in sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) umgewandelt, welche die Signaltransduktionskaskade innerhalb der Zelle aufrechterhalten, weiterleiten und interpretieren können. Zu den bekanntesten *second messenger* gehören neben Calciumionen (Ca^{2+}), Inositoltriphosphat (IP_3) und Stickstoffmonoxid (NO) auch cyclische Nukleotide.^[1-5] Der Botenstoff cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) wurde erstmals 1957 von Earl Sutherland und Rall, welche den Begriff *second messenger* nachhaltig prägten, im Zusammenhang mit der neu entdeckten Enzymklasse der Adenylyl-Cyclase (ACs) beschrieben.^[6,7]

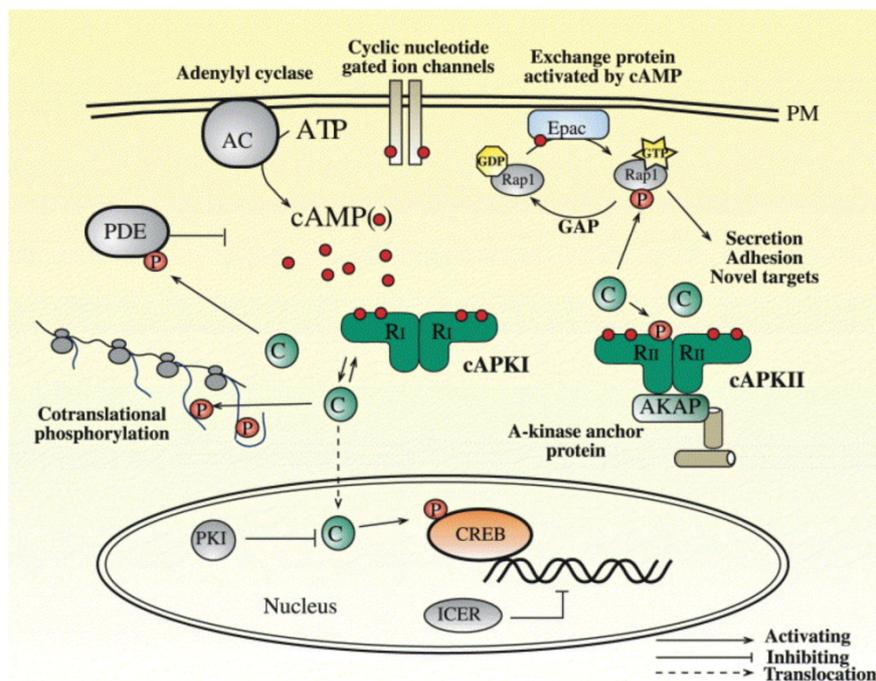


Abbildung 1.1: Übersicht der cAMP-abhängigen Signalwege in Säugern. cAMP-gesteuerte Ionenkanäle können durch die Erhöhung der cAMP-Konzentration reguliert werden. Die Bindung von cAMP erfolgt dabei am cytoplasmatischen Teil. cAMP-abhängige Proteinkinasen (cAPKI/II, auch als PKA bezeichnet) können durch Bindung von cAMP ihre katalytische Untereinheit (C) von der regulatorischen Untereinheit (R) abspalten. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung von Zielproteinen. Durch Translokation der katalytischen Untereinheit in den Zellkern können auch hier Proteine (z. B. CREB) phosphoryliert werden. Proteine wie EPAC werden durch cAMP direkt stimuliert und können den Austausch von GDP zu GTP an Rap1 katalysieren. Die cAMP-abhängigen Signalwege werden durch Phosphodiesterasen (PDEs) negativ reguliert. (entnommen aus Kopperud *et al.*)^[8]

cAMP ist als universeller Botenstoff sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Systemen zu finden.^[4] In eukaryotischen Systemen sind bereits verschiedene Klassen an Effektorproteinen bekannt, welche durch cAMP reguliert werden (Abb. 1.1).^[8]

Das bekannteste durch cAMP-regulierte Protein ist die Proteinkinase A (PKA, auch als cAMP-abhängige Proteinkinase cAPK bezeichnet). Die Bindung von cAMP induziert eine Dissoziation der katalytischen Untereinheiten von den regulatorischen Untereinheiten, wodurch die katalytische Untereinheit aktiviert wird und in der Lage ist Proteine gezielt zu phosphorylieren (Abb. 1.1). Dies kann sowohl im Cytosol als auch durch Translokation im Nukleus geschehen, was zur Genexpression führt.^[9] cAMP-gesteuerte Ionenkanäle können durch die Erhöhung der cAMP-Konzentration geöffnet werden, wodurch es zum In- bzw. Efflux von Ionen kommen kann (Abb. 1.1).^[10,11] Der cAMP-abhängige Austauschfaktor EPAC (*exchange proteins activated by cAMP*), der mit der Membran assoziiert ist, bildet einen weiteren bedeutenden cAMP-abhängigen Signalweg. Durch die Bindung von cAMP wird EPAC aktiviert und der Austausch von GDP zu GTP an der GTPase Rap1 (*ras related protein 1*) beschleunigt (Abb. 1.1).^[9] Die unzähligen cAMP-abhängigen Effekte in den Zellen machen Adenylyl-Cyclasen, die intrazellulär cAMP herstellen, zu einer wichtigen Enzymklasse, deren Regulation und katalytischer Mechanismus bereits seit langer Zeit untersucht wird.

1.1 Klassifizierung von Cyclasen

Adenylyl-Cyclasen katalysieren die Reaktion von ATP (Adenosin-5'-triphosphat) zum Botenstoff cAMP und Pyrophosphat (PP_i). Antagonisten der Adenylyl-Cyclase sind die Phosphodiesterasen (PDEs), welche cAMP durch Hydrolyse in AMP umwandeln und damit für eine zusätzliche Regulation des intrazellulären cAMP-Levels sorgen (Abb. 1.1).^[12,13]

Darüber hinaus können aber auch PDEs durch cAMP reguliert werden, wie im Falle der PDE 10, die durch Bindung von cAMP an ihre GAF-Domäne (cGMP-spezifische Phosphodiesterase, Adenylyl-Cyclase und FhlA-Domäne) aktiviert werden kann.^[8,14]

Cyclasen lassen sich basierend auf Sequenzhomologien der katalytischen Domäne in sechs verschiedene Klassen einteilen^[15–17]: Enzyme der Klasse I Adenylyl-Cyclasen kommen ausschließlich in *gram*-negativen Prokaryoten (γ - und δ -Proteobakterien) wie beispielsweise dem Enterobakterium *E. coli* vor.^[17] Die Adenylyl-Cyclase aus *E. coli* wurde als Stellvertreter der Klasse I bereits intensiv untersucht. Das Enzym dient hier zur Vermittlung der Katabolitrepression. Die AC steigert in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle (Laktose) ihre

Aktivität und bedingt durch die Erhöhung der cAMP-Konzentration, werden cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren wie CAP (*catabolite activator protein*) aktiviert.^[18] Katabolitreprimierte Enzyme werden exprimiert und *E. coli* ist dann in der Lage, Laktose für seinen Metabolitstoffwechsel zu nutzen.^[18,19]

Calmodulin-aktivierte Toxine wie beispielsweise aus *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Bordetella pertussis* bilden die zweite Klasse der Cyclasen. Diese Virulenzfaktoren werden in die Wirtszelle geschleust, durch Calmodulin aktiviert und sorgen durch ihre Cyclaseaktivität für pathogene cAMP-Konzentrationen.^[20]

Für die Klassen IV-VI sind nur wenige Vertreter bekannt, die bislang nur aus Bakterien stammen, jedoch teilweise bereits strukturell und biochemisch untersucht wurden.^[15,21–23] Sie unterscheiden sich in ihrer Sequenz signifikant von den bereits beschriebenen Klassen.

Klasse III bildet mit Abstand die größte Untergruppe der Cyclasen, denn sie enthält sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Vertreter.^[16,17,24] Neben den Adenylyl-Cyclasen gehören auch die Guanylyl-Cyclasen (GCs) zu dieser Klasse, die GTP (Guanosin-5'-triphosphat) zum Botenstoff Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) umwandeln.^[25]

1.2 Topologie der Klasse III Cyclasen

Enzyme der Klasse III, die auch als universelle Klasse bezeichnet wird, sind Multidomänenproteine. Cyclasen können neben der katalytischen Domäne eine Reihe weiterer funktionaler und regulatorischer Domänen wie beispielsweise Kinase-Homologie-Domänen (KHD) oder GAD-Domänen besitzen.^[24,26–30] Sie lassen sich grundsätzlich zwei verschiedenen Topologien zuordnen: cytosolische Cyclasen und Cyclasen, die in die Zellmembran integriert sind und mindestens eine transmembrane Helix besitzen.^[31,32] Alle Mitglieder dieser Klasse besitzen eine konservierte Architektur der katalytischen Domänen.^[16,30] Biochemische Daten und Strukturen zeigen, dass für die Aktivität eine Dimerisierung der katalytischen Domänen notwendig ist. Die aktiven Zentren befinden sich dabei immer im Bereich der Dimerkontaktfläche (Abb. 1.2).^[16]

Die transmembrane Guanylyl-Cyclasen sowie die bakteriellen Klasse III Cyclasen bilden Homodimere, welche aus zwei sequenziell identischen katalytischen Domänen bestehen. In der Dimer Grenzfläche entstehen durch Dimerisierung zwei katalytische Zentren (Abb. 1.2).^[24,33]

Im Falle der löslichen Cyclasen (sGC oder sAC) sowie der transmembranen Adenylyl-Cyclasen (tmACs) aus Säugern bildet sich ein Heterodimer, bestehend aus zwei strukturell

äquivalenten katalytischen Untereinheiten (Abb. 1.2) aus.^[34–36] Hierbei können die katalytischen Domänen durch einen Polypeptidlinker verbunden sein wie beispielsweise bei der löslichen Adenylyl-Cyclase (Pseudoheterodimer bestehend aus C1 und C2). Liegen die katalytischen Domänen auf zwei eigenständigen Polypeptidketten (C_α und C_β), so bildet sich ein echtes Heterodimer aus.^[24]

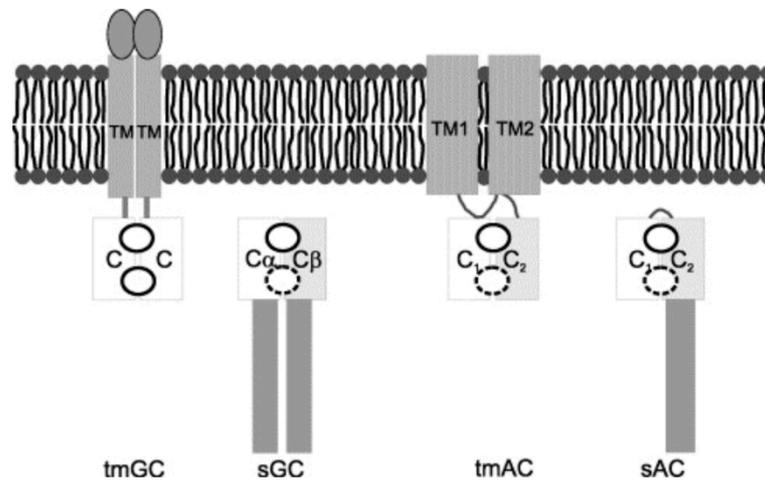


Abbildung 1.2: Topologieschema der verschiedenen Klasse III Cyclasen. Um katalytisch aktiv zu sein, bilden Enzyme der Klasse III ein Dimer, welches aus strukturell konservierten katalytischen Domänen (C) besteht. Hierbei können die katalytischen Untereinheiten entweder auf eine Polypeptidkette (pseudo-Heterodimer) oder auf zwei getrennten Polypeptidketten (Homodimer/Heterodimer) lokalisiert sein. Homodimere bilden immer zwei aktive Zentren aus (dargestellt durch Kreise). Heterodimere können lediglich ein aktives Zentrum und ein degeneriertes inaktives Zentrum (dargestellt durch gestrichelte Kreise) ausbilden. TM - Transmembrane Domäne. (entnommen aus Kamenetsky *et al.*)^[16]

Durch die Heterodimerisierung bildet sich eine asymmetrische Dimergrenzfläche, die ein vollständiges aktives Zentrum mit allen katalytisch essentiellen Aminosäuren und ein degeneriertes inaktives Zentrum enthält (Abb. 1.2).^[35,37] Die katalytischen Aminosäuren sind dabei auf beide Domänen verteilt. Die beiden Domänen sind dabei innerhalb des Dimers *head-to-tail* zueinander angeordnet.^[16]

1.3 Katalytischer Mechanismus von Klasse III Cyclasen

Der Mechanismus dieser Enzymunterklasse ist vermutlich einheitlich, unabhängig von der Anzahl der katalytischen Zentren.^[16] Es handelt sich dabei um eine pseudo-bimolekulare nukleophile Substitution (S_N2 -Reaktion), die metallabhängig ist.^[38,39] Das aktive Zentrum wird von zwei sequenziell und strukturell konservierten Aspartaten gebildet (Abb. 1.3), welche die Phosphatgruppen des Substrats ATP mit Hilfe von zwei divalenten Kationen (Ion A und Ion B) koordinieren.^[40,41] Die negativ geladenen Phosphatgruppen werden außerdem durch Arginin, Lysin und das Peptidrückgrat stabilisiert.^[16] Die Ribose hingegen

besetzt einen überwiegend hydrophoben Bereich, der sequenziell nicht vollständig konserviert ist.^[16] In transmembranen ACs und Guanylyl-Cyclasen wird die Ribose am Ringsauerstoff durch ein Serin oder ein Tyrosin koordiniert.^[35,42] Die lösliche Adenylyl-Cyclase, aber auch bakterielle Vertreter, weisen an dieser Sequenzposition ein Alanin auf (Abb. 1.3), das nicht in der Lage ist, die Ribose über die Seitenkette zu koordinieren, wodurch sich vermutlich unterschiedliche Substrataffinitäten ergeben.^[16,41]

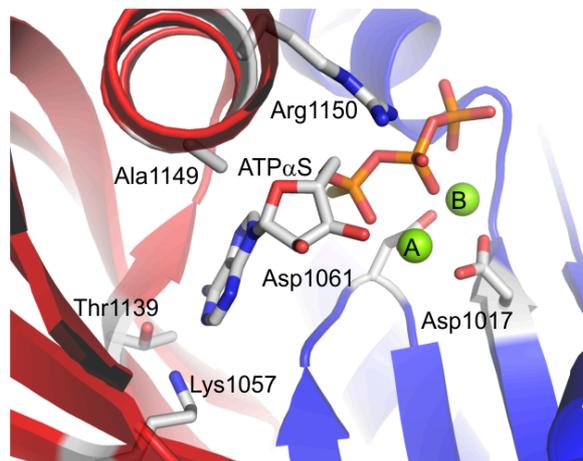


Abbildung 1.3: Substratbindestelle in Adenylyl-Cyclasen. Das Substratanalogon ATP α S wird in der Substratbindestelle von CyaC von verschiedenen Resten (Stick-Darstellung) koordiniert. CyaC ist eine AC aus dem Cyanobakterium *S. platensis*, welches als Homodimer (C1 in rot und C2 in blau) vorliegt und vergleichbare Eigenschaften zur sAC besitzt. Die Ionenbindestellen A und B sind jeweils mit einem Magnesiumion besetzt. PDB-Code 1WC1.^[16,41]

Die Purinbase interagiert in Adenylyl-Cyclasen mit zwei polaren Aminosäuren (Abb. 1.3): einem konservierten Lysin am N1-Stickstoff und einem Aspartat (bei tmACs) oder Threonin (bei sACs) an der Aminogruppe (N6-Position), was die Selektivität dominiert.^[16]

Die konzertierte Reaktion (Abb. 1.4) erfolgt über einen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe der Ribose am P α Atom und einem gleichzeitigen Freisetzen des Pyrophosphats (PP $_i$).

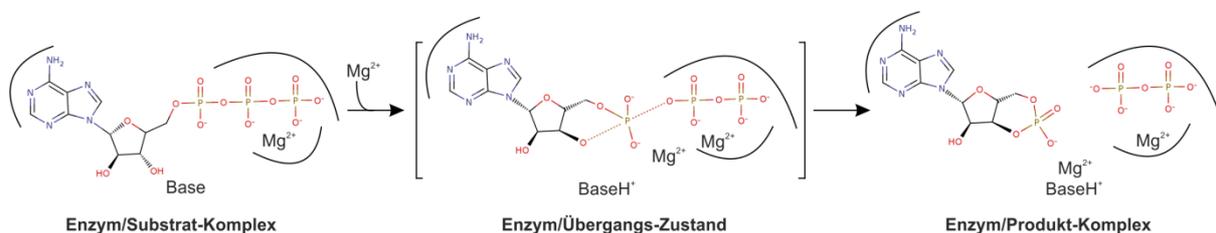


Abbildung 1.4: Katalytischer Mechanismus der Klasse III Adenylyl-Cyclase. Schematischer Reaktionsablauf der konzertierten Reaktion von ATP zu cAMP und PP $_i$, welche durch zwei divalente Metallionen katalysiert wird. Der Übergangszustand wird durch einen pentavalenten Komplex mit Hilfe eines katalytischen Magnesiumions stabilisiert. Das 3'-OH des Zuckers kann das P α Atom nukleophil angreifen, gleichzeitig wird Pyrophosphat abgespalten. (entnommen aus Kamenetsky *et al.*)^[16]

Hierbei stabilisiert Ion B die negativen Ladungen des gebundenen Substrats an P_β und P_γ beziehungsweise am entstehenden Produkt PP_i . Ion A stabilisiert den trigonal-bipyramidalen Übergangszustand der ablaufenden Reaktion und aktiviert darüber hinaus vermutlich die angreifende 3'-OH-Gruppe direkt oder indirekt durch ein Wassermolekül oder Hydroxidion (Abb. 1.4).^[16,40,41]

Das Substrat induziert bei Bindung oder Umsetzung eine Schließung des katalytischen Zentrums.^[40,41] Dies geht mit der Bewegung der α 1-Helix, sowie der Positionsänderung des β 7- β 8 Loops in Richtung des aktiven Zentrums einher.^[41] Diese Schließung des katalytischen Zentrums könnte für eine Streckung des Substrates im Bereich des α -Phosphates sorgen, was wiederum die Katalyse antreibt und das entstehende Produkt Pyrophosphat aus dem zentralen katalytischen Zentrum verschiebt.^[43,44]

Die Besetzung der Ionenbindestellen mit divalenten Ionen, die essentiell für die Bindung des Substrats und für die ablaufende Reaktion sind, kann variieren. In die zweiwertige Ionenbindestelle B kann bei allen Klasse III Cyclasen ein Magnesiumion binden.^[40,41] In löslichen ACs kann diese Bindestelle B jedoch auch mit einem Calciumion besetzt werden, was zu einer Aktivitätssteigerung führt.^[45] Dies wurde mittels Eu^{3+} und Sr^{2+} , welche vorzugsweise in eine Calciumbindestelle binden, strukturell validiert.^[41] Die hohe Koordinationsgeometrie (oktaedrisch) weist zusätzlich auf eine Ca^{2+} -Bindung hin. Die dadurch verbesserte Komplexierung des ATP-Phosphatanteils resultiert in einer gesteigerten Affinität für das Substrat.^[45] Im Falle der tmAC führt die Zugabe von hohen mikromolaren Calciumkonzentrationen allgemein zu einem inhibitorischen Effekt durch Bindung von Ca^{2+} in der Ionenbindestelle A.^[43] Durch die Bindung von Ca^{2+} wird die inaktive Konformation im ATP- oder PP_i -gebundenen Zustand stabilisiert.^[46] Lediglich zwei Isoformen der tmAC werden bereits durch submikromolare Konzentrationen inhibiert, was mechanistisch noch ungeklärt ist.^[47]

Zweiwertige Manganionen sind, bedingt durch ihre stärkeren lewis-sauren Eigenschaften, ebenfalls in der Lage die Cyclaseaktivität *in vitro* zu steigern. Jedoch hat dies auf Grund der geringen Konzentration an intrazellulären Mn^{2+} -Ionen keine physiologische Relevanz.^[32,48] Mn^{2+} bevorzugt eine oktaedrische Koordination und bindet ebenfalls in Ionenbindestelle B.^[40] Der K_m verbessert sich bei der löslichen Adenylyl-Cyclase um etwa das 10-fache auf 0,8 mM, wenn dem Enzym ausschließlich Manganionen zur Verfügung stehen.^[45]

Unter physiologischen Bedingungen ist die Ionenbindestelle A, die eine kleinere Koordinationszahl (tetrahedral) aufweist, mit einem Magnesiumion besetzt.^[16] Aber auch

Zinkionen, welche tmACs bereit bei geringen Konzentrationen inhibieren, können diese Ionenbindestelle besetzen.^[40]

Cyclasen können neben ihrem eigentlichen Substrat auch andere Purinderivate mit ähnlichen Affinitäten binden und teilweise umsetzen. Jedoch ist hier die katalytische Reaktion stark vermindert.^[42]

1.4 Lösliche humane Adenylyl-Cyclase (hsAC)

In Säugern kodieren zehn verschiedene Gene für Adenylyl-Cyclasen.^[16] Insgesamt neun transmembrane ACs werden durch stimulierte G-Proteingekoppelte Rezeptoren, welche die Signale über heterotrimere G-Proteine an die tmAC weitergeben, gesteuert.^[35,49] Sie spielen damit eine zentrale Rolle bei der Zellantwort basierend auf extrazellulären Signalkaskaden. Des Weiteren können tmACs im Unterschied zu löslichen ACs durch Forskolin, einem pflanzlichen Diterpen, aktiviert werden.^[50–53]

Lediglich ein Gen kodiert für eine lösliche Adenylyl-Cyclase, die nicht durch heterotrimere G-Proteine reguliert wird.^[31,54]

Die beiden bisher bekannten Isoformen der löslichen Adenylyl-Cyclase mit ihren unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften werden durch alternatives Splicing des ADCY10-Gens (Chromosomlokalisierung 1q24) erzeugt.^[54,55] Das Volllängeprotein (hsAC_{fl}) mit 187 kDa besitzt neben den N-terminalen katalytischen Domänen C1 und C2 ein autoinhibitorisches Motiv gefolgt von einer hämbindenden Domäne (Abb. 1.5).^[26]

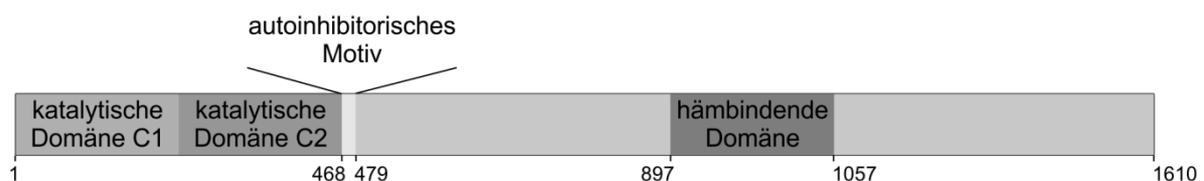


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Domänen der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase. Das Volllängeprotein besteht aus zwei N-terminalen katalytischen Domänen (C1 und C2) gefolgt von einem autoinhibitorischem Motiv. Im C-terminalen Bereich konnte eine hämbindende Domäne identifiziert werden.^[26]

Eine weitere, wesentlich kleinere Isoform der hsAC (50 kDa) wurde in Rattentestikeln gefunden.^[55] Diese verkürzte Variante (hsAC_i) weist lediglich den katalytischen N-terminalen Bereich auf (Abb. 1.5).^[55] Es konnte gezeigt werden, dass die verkürzte Form eine mindestens zehnfach höhere Cyclaseaktivität aufweist.^[54,56] Das autoinhibitorische Motiv verringert die Adenylyl-Cyclaseaktivität indem es die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) reduziert ohne die Substrataffinität zu beeinflussen.^[57]

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase ist in zahlreichen cAMP-abhängigen Signalkaskaden involviert und konnte bereits in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.^[58–62] Die hsAC ist dabei ubiquitär in allen Zellkompartimenten, sowohl im Cytosol, Zellkern, an Microtubulis und Centriolen sowie in Mitochondrien, zu finden.^[63–65]

Erstmals entdeckt wurde die lösliche Adenylyl-Cyclase in Spermien von Säugetieren als bicarbonatabhängige (HCO_3^-) Cyclase.^[66,67] Die sAC ist für den physiologischen Reifeprozess der Spermien nach der männlichen Ejakulation notwendig.^[68] Bicarbonat induziert drei cAMP-abhängige Prozesse: die hyperaktive Motilität (Bewegungsaktivität), die Kapazitation (Reifungsprozess) sowie die Akrosomreaktion (Bindung an die Eizelle).^[69,70] Hierbei ist die lösliche AC für den intrazellulären cAMP-Anstieg verantwortlich und wird durch Bicarbonat direkt aktiviert.^[45,71,72] Der massive Einstrom von Bicarbonat ist bedingt durch einen Ausstrom von Chloridionen aus der Zelle. Beim Einstrom von Bicarbonat mit Hilfe der Anionenaustauscher SLC26A3 und SLC26A6 (*solute carrier family 26, Nummer 3 und 6*) wird gleichzeitig Chlorid in die Zelle geschleust. Der Efflux von Chloridionen durch den Ionenkanal CTFR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sorgt für eine Reduzierung der intrazellulären Chloridkonzentration, wodurch der gekoppelte Einstrom von Bicarbonat und Chlorid aufrecht erhalten werden kann.^[73,74] Das cAMP, welches durch Stimulation der hsAC entsteht, interagiert mit der katalytischen Untereinheit C_α der PKA. Eine C_α -Null-Mutante in Mäusen führt zu Unfruchtbarkeit.^[75] Knock-out Experimente haben gezeigt, dass Mäuse mit einer sAC-Deletion ihre Fruchtbarkeit ebenfalls vollständig verlieren.^[76,77]

Die lösliche Adenylyl-Cyclase konnte auch in Astrozyten nachgewiesen werden. Hier fungiert sie ebenfalls als Bicarbonatsensor und sorgt durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Konzentration für die Verstärkung der Glykolyse. Als Folge wird Lactat in den extrazellulären Raum freigesetzt, welches von Neuronen als Energiesubstrat aufgenommen wird. sAC ist daher für die Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen basierend auf Metaboliten essentiell.^[78,79]

Darüber hinaus ist die hsAC ein essentieller Sensor für die Säure/Base-Homöostase in Organismen. Die Erhöhung der cAMP-Konzentration durch die hsAC führt als weiterleitender (*downstream*) Effekt zur Integration von Protonenpumpen in die basolaterale Membran, welche Protonen aus dem Blut zum pH-Ausgleich in die Zelle leiten.^[80] Neu entdeckte Signalwege sehen zudem eine Verbindung zwischen der pH-Regulation der bicarbonataktivierten hsAC und dem Recycling von H^+ -ATPasen in Vakuolen (V-ATPase).^[81]

Die lösliche Adenylyl-Cyclase spielt eine Schlüsselrolle bei der durch Ischämie induzierten Translokation des pro-apoptotischen Proteins Bax in Mitochondrien.^[82] In Endothelzellen kann die Aktivität der löslichen Adenylyl-Cyclase daher die Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs zur Apoptose modulieren.^[83]

Bei der Differenzierung von Neuronen spielen sowohl der Nervenwachstumsfaktor (NGF) als auch cAMP eine entscheidende Rolle. Hierbei ist die essentielle Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration verantwortlich für die Aktivierung des G-Proteins Rap1 mittels NGF.^[59]

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase hat aber auch diverse Aufgaben im Zellkern. In Nierenzellen ist die hsAC ein wichtiger Mediator für die aldosteronbasierte Signalweiterleitung. Hier wird durch cAMP der Transkriptionsfaktor CREB1 (cAMP response element-binding protein 1) aktiviert, was durch die gesteigerte Expression von α -Natriumkanälen und der Na^+/K^+ -ATPase- α schließlich zu einer Formsteifheit der Epithelzellen führt.^[84]

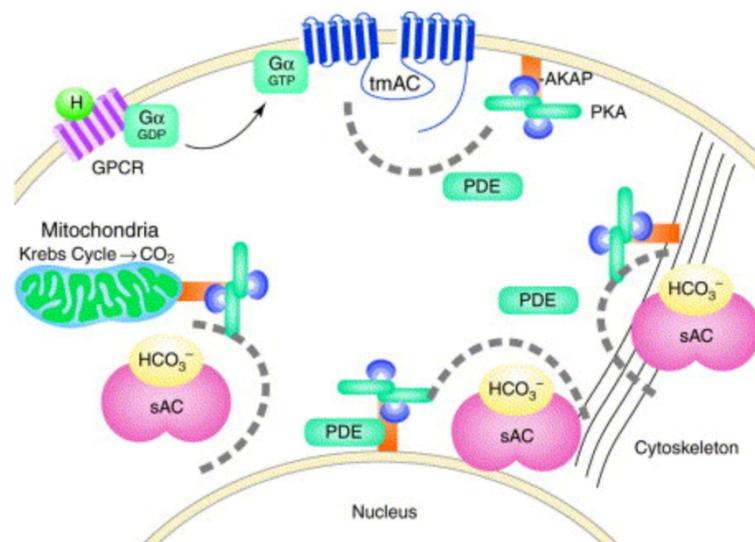


Abbildung 1.6: Bildung von Mikrodomänen in der gesamten Zelle. Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase ist in der Lage ubiquitär in der gesamten Zelle cAMP zur Verfügung zu stellen. Dadurch kommt es zur Ausbildung von sogenannten Mikrodomänen, welche lokal Signale mit Hilfe des sekundären Botenstoffs cAMP an die direkte Umgebung weiterleiten. (entnommen aus Zippin *et al.*)^[85]

Anhand der verschiedenen Rollen, welche die hsAC innerhalb der Zelle einnehmen kann, wird deutlich, dass es sich hierbei um einen Sensor für intrazelluläre pH-Veränderungen und Bicarbonat handelt.^[81,86,87] Die Aufgabe, den *second messenger* cAMP lokal in allen Zellkompartimenten (Abb. 1.6) bereitzustellen, kann nur ein ubiquitär vorkommendes Enzym übernehmen, da die Diffusion von cAMP innerhalb der Zelle ineffizient und nur begrenzt möglich ist.^[88,89] Durch die weitläufige Diffusion von cAMP würde die Selektivität und

Spezifität des Signals verloren gehen.^[63] Der Wirkungsradius von cAMP beträgt etwa 1 μm in der Umgebung von Adenylyl-Cyclasen. Die freie Diffusion ist dabei durch die Phosphodiesterasen der Umgebung limitiert.^[89] Stattdessen bilden sich kleine Microdomänen, bei denen die lösliche Adenylyl-Cyclase und Effektoren der Signalkaskade colokalisiert sind (Abb. 1.6).^[10,63,90]

1.5 Regulation der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase

Die physiologische Regulation der verschiedenen Cyclasen ist vielfältig. Während die transmembranen Adenylyl-Cyclasen extrazellulär durch die Signalweiterleitung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren weiter über heterotrimere G-Proteine reguliert werden, werden lösliche Cyclasen über kleine Signalmoleküle aktiviert.^[16,32,58] Im Falle der löslichen Guanylyl-Cyclase aktiviert Stickstoffmonoxid das Enzym.^[91,92] Die humane transmembrane Guanylyl-Cyclase wird hingegen durch kleine Peptidhormone wie beispielsweise das atriale natriuretische Peptid (ANP) extrazellulär reguliert und aktiviert.

Die lösliche Adenylyl-Cyclase wird durch die Erhöhung der intrazellulären Bicarbonatkonzentration auf 10-15 mM physiologisch aktiviert.^[45,85,93] Die hsAC wird durch seine zelluläre Funktion daher als Bicarbonatsensor beschrieben.^[94] Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass Bicarbonat lediglich eine Steigerung der maximalen Aktivität (V_{max}) hervorruft und nicht die Affinität zum Substrat erhöht.^[45] Die mittlere effektive Konzentration beträgt dabei für Bicarbonat 11 mM.^[37] Darüber hinaus ist Bicarbonat in der Lage, den autoinhibitorischen Effekt des Enzyms bei hohen Substratkonzentration ab 7,5 mM aufzuheben (Abb. 1.7A).^[45]

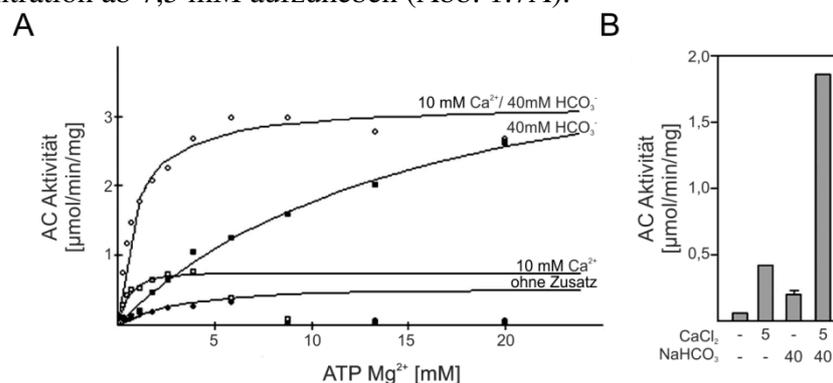


Abbildung 1.7: Aktivierung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase. **A** Michaelis-Menten Auftragung der spezifischen Cyclaseaktivität der hsAC. Die Zugabe von Calcium und Bicarbonat zeigt einen aktivierenden Effekt auf das Enzym. **B** Balkendiagramm der aktivierenden Effekte von CaCl_2 und HCO_3^- . (entnommen und modifiziert aus Litvin *et al.*)^[45]

Eine weitere Steigerung der Aktivität durch Verbesserung der Substrataffinität können divalente Calciumionen hervorrufen (Abb. 1.7A). Die Zugabe von CaCl_2 steigert die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit $K_m^{(\text{Mg})}$ von 12-16 mM um das 6-fache ($K_m^{(\text{Mg/Ca})} = 1,7\text{-}3\text{ mM}$).^[45] Calcium interagiert dabei direkt mit der löslichen Adenylyl-Cyclase und nicht indirekt über Calmodulin wie bei verschiedenen tmACs nachgewiesen wurde.^[45,95] Strukturelle Untersuchungen an einem homologen Protein CyaC aus *Spirulina platensis* (Sequenzidentität 26 %), welches häufig als Modellorganismus für die hsAC verwendet wird, bestätigten die direkte Aktivierung durch Ca^{2+} . Hierbei besetzt das Calciumion die Ionenbindestelle B, wodurch die negativ geladenen Pyrophosphate besser koordiniert werden.^[41] Calcium alleine hat jedoch keinen Effekt auf die ATP-Inhibition bei hohen Konzentrationen. Die Anwesenheit von Calcium und Bicarbonat hat einen synergistischen Effekt (Abb. 1.7B).^[45] *In vitro* Experimente zeigen, dass sowohl Bicarbonat als auch Ca^{2+} notwendig ist, um eine hyperaktive Motilität von Spermien zu erzeugen.^[96] Das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -System ist ein hervorragendes Puffersystem.^[85] Die Carboanhydrase (CA) sorgt dabei für ein Gleichgewicht zwischen CO_2 und Bicarbonat.^[97] Durch den massiven Einstrom von Bicarbonat kommt es kurzfristig intrazellulär zu einem pH-Anstieg, der die Aktivität der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase zusätzlich steigert.^[41,98] Die geringe apparente Substrataffinität von hsAC im millimolaren Bereich steht im direkten Zusammenhang mit der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber intrazellulären ATP-Fluktuationen.^[99]

1.6 Inhibitoren der Adenylyl-Cyclase

Auf Grund ihrer bedeutenden Rolle in biologischen Systemen und wegen der verschiedenen Isoformen bieten sich Cyclasen als Zielproteine (*Drug Targets*) für die Entwicklung von Inhibitoren oder Aktivatoren an.^[100] Die Fülle an *in vitro*-getesteten Inhibitoren und den bereits bekannten Inhibitionsmechanismen verdeutlicht diese Rolle als mögliches *Drug Target*.^[101] Die größte Herausforderung besteht derzeit darin, eine isoformspezifische Inhibition zu gewährleisten, um gezielt Fehlfunktionen in der Zelle regulieren zu können.^[102] Die zentrale Rolle der hsAC bei der Spermatose bietet die Möglichkeit, als Kapazitationshemmer ein Kontrazeptiv für den Mann zu entwickeln.^[56] Alternativ hätte ein pharmakologischer Aktivator der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase fertilisationsfördernde Eigenschaften.

1.6.1 *P-site* Inhibitoren

Die sogenannten *P-site* Inhibitoren, welche eine intakte Purinbase besitzen, stellen die bisher größte Klasse der Adenylyl-Cyclaseinhibitoren dar. Diese Inhibitoren zeichnen sich durch ihre Analogie zu Adenosin oder Adeninnukleotidanaloga aus und sind nichtkompetitive oder unkompetitive Inhibitoren.^[102,103]

Die physiologische Bedeutung von *P-site* Inhibitoren ist bislang noch unklar, jedoch können nachgewiesene *in vivo*-Konzentrationen von 2'-Desoxy-3'-AMP oder 3'-AMP die Cyclaseaktivität in verschiedenen Geweben bereits unterbinden.^[103,104] *P-site* Inhibitoren wie 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxy-3'-AMP oder 2',5'-Dideoxy-3'-ATP (2',5'-ddATP) binden als Produktanaloga (Abb. 1.8) und verhalten sich kompetitiv zu cAMP.^[44]

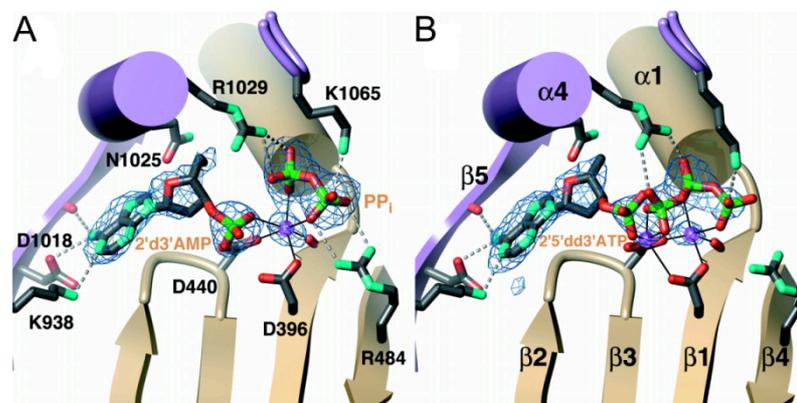


Abbildung 1.8: Komplexe von *P-site* Inhibitoren mit transmembranen Adenylyl-Cyclasen. **A** Komplex mit 2'-Desoxy-3'-AMP und Pyrophosphat in der Substratbindestelle der transmembranen Adenylyl-Cyclase. **B**. Komplex der transmembranen Adenylyl-Cyclase mit 2',5'-Dideoxy-3'-ATP im katalytischen Zentrum. (entnommen aus Tesmer *et al.*)^[43]

Die Bindung des Inhibitors führt zu einem stabilen produktinhibierten Komplex (*dead-end* Komplex) mit Pyrophosphat.^[103] Die Freisetzung von PP_i ist bei den untersuchten tmACs der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.^[44] Untersuchungen zeigten, dass sich diese Inhibitor-Klasse nichtkompetitiv im Bezug auf das Substrat verhält und zusätzliches Pyrophosphat die Inhibition verstärkt.^[103] Durch Modifikation der Adenosinderivate konnte eine moderate Spezifität für Isoformen der tmACs erzeugt werden. Die Wirksamkeit der *P-site* Inhibitoren geht mit der Modifikation der Purinbase beziehungsweise des Phosphatanteils einher (2',5'-Dideoxy-Adenosin-3'-tetraphosphat < 2',5'-Dideoxy-3'ATP < 2',5'-Dideoxy-3'-ADP < 2',5'-Dideoxy-3'-AMP < 2'-Desoxy-3'-AMP < 3'AMP < s-Adenosin < Adenosin).^[103]

Durch ihre Homologie zum Substrat sind diese Inhibitoren kaum isoformspezifisch, beziehungsweise interagieren teilweise mit anderen nukleotidbindenden Proteinen. In Folge

der niedrigen Substrataffinität der hsAC eignen sich Vertreter dieser Substanzklasse nicht als Inhibitoren für die lösliche Adenylyl-Cyclase.

1.6.2 Selektive Inhibitoren der löslichen Adenylyl-Cyclase

Catecholesterogenderivate (CE) können an Adenylyl-Cyclasen binden und inhibieren das Enzym nichtkompetitiv in Bezug auf das Substrat. Durch die Bindung von CE in der Dimergrenzfläche der beiden katalytischen Domänen entsteht in Anwesenheit des Substrates eine nicht-produktive Konformation des Enzyms (Abb. 1.9). Hierbei kommt es zur Komplexierung des Ions A durch CE und damit zu einer Verzerrung des aktiven Zentrums, so dass die Cyclisierungsreaktion nicht mehr ablaufen kann.^[105] Der IC_{50} für CyaC aus *Spirulina platensis* für 2-Hydroxyestradiol (2-CE) beträgt *in vitro* 2 μ M und *in vivo* ~100 μ M. Die tmAC wird ebenfalls im mikromolaren Bereich inhibiert, jedoch ausschließlich in *in vitro* Experimenten.^[102,105]

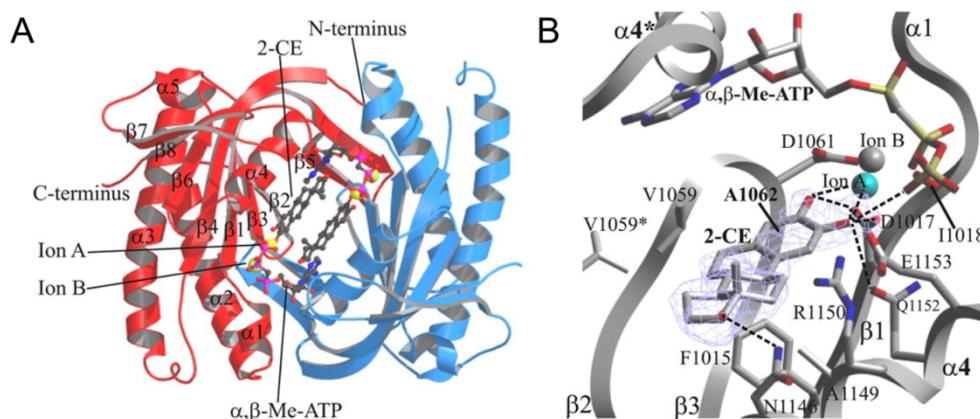
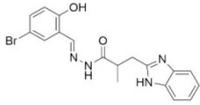
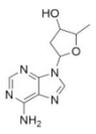
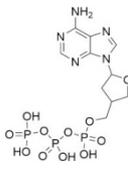
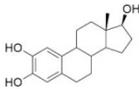
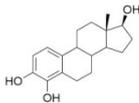
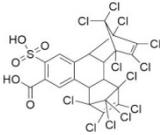
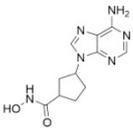
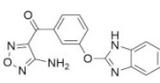


Abbildung 1.9: Bindung von Catecholesterogen an die Adenylyl-Cyclase CyaC. **A** Bindung von zwei Catecholesterogen-Molekülen an CyaC aus *S. platensis*. Die Bindung erfolgt in der Dimergrenzfläche und konkurriert nicht mit der Substratbindung. **B** Der Wirkmechanismus des CE-Moleküls beruht auf einer Stabilisierung der nichtproduktiven Konformation des Enzyms. Durch die Komplexierung des Ions A kann die Cyclisierungsreaktion im Enzym nicht mehr ablaufen. (entnommen Steegborn *et al.*)^[105]

Auf der Grundlage dieser neuen Inhibitorbindestelle sowie des neuen Wirkmechanismus wurden bereits weitere Derivate mit Hilfe von strukturbasiertem Design getestet.^[106] Problematisch bleibt hierbei, eine ausreichende Spezifität zwischen den verschiedenen Isoformen zu erreichen (Tab. 1.1).^[102,106]

KH7 ist der einzig bekannte spezifische Inhibitor für die humane lösliche Adenylyl-Cyclasen (Tab. 1.1) und patenrechtlich geschützt.^[107,108] Die Substanz inhibiert die hsAC mit einem IC_{50} von etwa 3 μ M und gilt als nichtkompetitiv.^[72] Der genaue Inhibitionsmechanismus konnte jedoch noch nicht im Detail geklärt werden.^[102]

Tabelle 1.1: Inhibitoren der Adenylyl-Cyclase. Aufgelistet sind verschiedenen Inhibitoren, die einen Effekt im Besonderen auf die humane löslichen Adenylyl-Cyclase haben. Die Substanzen sind der Übersichtlichkeit wegen lediglich mit ihrem Abkürzungsnamen in der Tabelle aufgelistet. Zum Vergleich wurden auch isoformspezifische *p-Site* Inhibitoren aufgelistet. KH7 (2-(1H-benzimidazol-2-ylthio)-N'-(5-bromo-2-hydroxybenzyliden) propanhydrazid), 2',5'-ddAdo (2',5'-Didesoxyadenosin), 2',5'-ddATP (2',5'-Didesoxy-3'-ATP), 2-CE (2-Hydroxyestradiol), 4-CE (4-Hydroxyestradiol), NCS 270718 (1,2,3,4,5,6,7,8,13,13,14,14-dodecachloro-1,4,4a,4b,5,8,8a,12b-octahydro-11-sulfo-1,4:5,8-dimethanotriphenylen-10-carbonsäure), PMC-6 (1R,4R-3-(6-Aminopurin-9-yl)-cyclopentan-carbonsäure-hydroxyamid), 1VE ((4-Azanyl-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-[3-(1H-benzimidazol-2-ylmethoxy)phenyl]methanon). *Lysat.

Inhibitor	Struktur	hsAC IC ₅₀	CyaC IC ₅₀	tmAC IC ₅₀	Quelle
KH7		3 µM	-	>> 100 µM	[72]
2'-5'-ddAdo		500 µM*	-	8 µM*	[102]
2'-5'-ddATP		130 µM	-	0,8 µM*	[102]
2-CE		-	2 µM	2 µM	[105]
4-CE		-	2 µM	-	[105]
NCS 270718		-	5 µM	moderate Inhibition	[106]
PMC-6		-	-	0,3-65,3 µM isoform- spezifisch	[109]
1VE		0,35 µM	-	-	[110]

Der bisher beste Inhibitor 1VE (Tab. 1.1) der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase zeigt bereits bei einer Konzentration von 360 nM halbmaximale Inhibition und besitzt wie KH7

eine Benzimidazolgruppe.^[110] Eine reine hsAC-Selektivität konnte für 1VE noch nicht nachgewiesen werden.

Ein direkter Vergleich verschiedener Inhibitoren ist schwierig, da die Reaktionsbedingungen sehr unterschiedlich sind: sowohl die Substratkonzentration (von 0,5–2,5 mM) wie auch die eingesetzten divalenten Kationen variieren. Darüber hinaus wurden neben gereinigten Proteinen auch Zelllysate verwendet.

Die Entwicklung pharmakologische spezifischer hsAC-Inhibitoren steht noch am Anfang, bietet aber durchaus ein weites Feld mit Anwendungsmöglichkeiten, wenngleich die Entwicklung eines männlichen Kontrazeptivum sich anbieten würde. Der hsAC spezifische Inhibitor KH7 könnte als Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung von Inhibitoren als sogenanntet *Lead Compound* dienen. Hierfür müsste aber der exakte Mechanismus aufgeklärt sowie Tierexperimente durchgeführt werden, um Effekte des Inhibitors im gesamten Organismus zu untersuchen. Strukturelle Informationen über das *Drug Target* würden hierbei entscheidende Vorteile bringen um bereits virtuell durch rationales Design oder per *Docking* die Suche nach Inhibitoren zu fokussieren.

2 Zielsetzung

Cyclisches-3'-5'-Adenosinmonophosphat kommt in Zellen als ubiquitärer Signalvermittler vor und wird durch Adenylyl-Cyclasen synthetisiert. Im Menschen gibt es neben neun transmembranen Adenylyl-Cyclase nur eine einzige bekannte lösliche Isoform. Die einzig bisher bekannten physiologische Aktivatoren für die hsAC sind Bicarbonat und Calciumionen. Darüber hinaus hat die ATP Substratkonzentration einen Einfluss auf die Aktivität der humanen lösliche Adenylyl-Cyclase.

Ziel dieser Arbeit war es die humane löslichen Adenylyl-Cyclase in löslicher Form zu exprimieren und biochemisch zu charakterisieren. Strukturelle Untersuchungen sollten helfen Unterschiede zu anderen Cyclasen aufzuzeigen und Einblicke in die Regulation der hsAC zu geben. Neben der strukturellen und biophysikalischen Untersuchung von Substrataffinität und Spezifität stand die Aktivierung durch Bicarbonat im Mittelpunkt. Mit Hilfe von Strukturen sollte die Bicarbonatbindestelle eindeutig identifiziert werden und der bisher ungeklärte Aktivierungsmechanismus durch HCO_3^- genauer beleuchtet werden.

Durch die besondere Rolle der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase in Zellen bietet sich das Enzym als *Drug Target* an. Daher sollten neben bereits bekannten Inhibitoren weitere Substanzen auf ihre inhibitorischen Effekte untersucht und anschließend ihre Wirkung mechanistisch aufgeklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp
GC5	F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 λ ⁻ T1R
C43 ::pREP::	ompT, hsdS (rB ⁻ , mB ⁻), gal(λcIts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm (DE3), [pREP] (kanR)
Rosetta (DE 3)	ompT, hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻), gal(λcIts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7gene1), dcm (DE3), pRARE2 (CmR)

3.1.2 Nährmedien

LB-Voll-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefe-Extrakt
LB-Platten-Agar	10 g/l Bacto-Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefe-Extrakt 16 g/l Bacto-Agar
TB-Voll-Medium	12 g/l Bacto-Trypton 24 g/l Hefe-Extrakt 0,4 % (v/v) Glycerin 2,31 g/l KH ₂ PO ₄ 12,54 g/l K ₂ HPO ₄

3.1.3 Antibiotika

Ampicillin	100 mg/l Medium
Chloramphenicol	34 mg/l Medium
Kanamycin	30 mg/l Medium
Spectinomycin	50 mg/l Medium

3.1.4 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Lösung	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Aktivitätspuffer HPLC	50 mM Tris HCl pH 8 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM CaCl ₂
6x DNA-Probenpuffer	2 mM Tris HCl pH 8,0 0,2 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
His ₆ -Elutionspuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5 300 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 500 mM Imidazol 2 mM β -Mercaptoethanol
His ₆ -Hochsalzpuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5 1 M NaCl 10 % (v/v) Glycerin 5 mM β -Mercaptoethanol

His ₆ -Lysepuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5 300 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 20 mM Imidazol 2 mM β -Mercaptoethanol
His ₆ -Niedersalzpuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5 50 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 5 mM β -Mercaptoethanol
dNTP-Lösung	0,5 mM dATP 0,5 mM dCTP 0,5 mM dGTP 0,5 mM dTTP
Färbelösung für SDS-Gele	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 4 g/l Coomassie <i>Brilliant Blue</i> R250 4 g/l Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G250
Gelfiltrationspuffer	50 mM Tris HCl pH 7,5 330 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 5 mM β -Mercaptoethanol
HPLC-Puffer A	100 mM Ammoniumacetat pH 8,8
HPLC-Puffer B	100 mM Ammoniumacetat pH 8,8 70% (v/v) Acetonitril

5x Laemmli Probenpuffer	50 mM Tris HCl 50 % (v/v) Glycerin 500 mM DTT 10 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
MBP-Lysepuffer	50 mM Tris HCL pH 8 200 mM NaCl 2 mM DTT
MBP-Elutionspuffer	50 mM Tris HCL pH 8 200 mM NaCl 2 mM DTT 10 mM Maltose
Messpuffer Affinitäten	50 mM Tris HCl pH 8 50 mM NaCl 15 mM CaCl ₂
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
TAE-Puffer	40 mM Tris HCl 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8
Verdünnungspuffer	50 mM Tris HCl pH 8 50 mM NaCl

3.1.5 Vektoren

pMAL-TEV	MPI Dortmund
pCDFduet	Novagen
pVL1392	Invitrogen
pGEX4T3	GE-Healthcare

3.1.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligodesoxyribonukleotide für die Klonierung wurden von der Firma MWG in HPSF-Reinheit (*high purity salt free*) Biotech bezogen.

GST 5EcoRV	GATATCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG
GST 5EcoRV_ <i>long</i>	TATAGATATCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG
hC1_3XhoI250_ <i>stop</i>	CTCGAGCTACCTCAGGAGGTTTTTGTGCTCAC
hC1_3XhoI250_ <i>stop_long</i>	TATACTCGAGCTACCTCAGGAGGTTTTTGTGCTCAC
hC2_5BamHI1_ <i>TevRec</i>	GGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAATTG
hC2_5BamHI1_ <i>TevRec_long</i>	TATAGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGAATTG
hC2_3EcoRI479_ <i>stop</i>	GAATTCCTAGTTGCAGATGAGGCACGCCATA
hC2_3EcoRI479_ <i>stop_long</i>	TATAGAATTCCTAGTTGCAGATGAGGCACGCCATA
5'MBP-sAC NdeI	TACAGACATATGAACACTCCAAAAGAAG
3'MBP-sAC XhoI	CCGCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGGACTTTCTCAGTACGGCCCC
malE	GGTCGTCGACTGTCGATGAAGCC
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator	CTAGTTATTGCTCAGCGGT

3.1.7 Protein- und Nukleinsäurestandards

1 kbp Marker	New England Biolabs
100 bp Marker	New England Biolabs
SDS-PAGE <i>Broad Range</i>	Bio-Rad

3.1.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase	New England Biolabs
DNase I	Roche Diagnostics

<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
<i>T4</i> -DNA-Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs

3.1.9 Chemikalien

Alle Chemikalien wurde im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Sigma Aldrich, Fluka, Merck, Roth und Jena Bioscience bezogen. KH7 wurde von unserem Kooperationspartner aus New York gestellt. Alle getesteten Tetramsäurederivate wurden von der Arbeitsgruppe Organische Chemie I der Universität Bayreuth synthetisiert. Der verwendete Proteaseinhibitor-Cocktail *cOmplete* stammte von der Firma Roche.

3.1.10 FPLC-Säulenmaterial

Nickelsäule HisTrap	GE-Healthcare
Superose 12 (10/300)	GE-Healthcare
Superdex 200 (10/300)	GE Healthcare
MonoQ	GE Healthcare
MBP-Trap HP	GE Healthcare

3.1.11 Kit-Systeme

Plasmid DNA <i>Extraction Mini Kit</i>	Favorgen
GEL/PCR <i>Purification Kit</i>	Favorgen

3.1.12 Geräte

Äkta purifier	GE-Healthcare
Analysewaage ACJ120-4A	Kern & Sohn
Autoklav VX-150	Systec
Avanti J26XP (Rotor JLA-8.1000)	Beckman
Avanti J-30I (Rotor JA 30.50Ti)	Beckman
Cryoanlage	Oxford Cryosystem (Oxford, UK)
DNA-Elektrophoreseeinheit	Roth

DNA-Gelelektrophoresekammer	Roth
Flex Cycler	Analytik Jena AG
Formulatrix	Formulatrix Europe
Gel Imaging System	Intas
Heizblock	Techne
Imaging System Odysee	Licor
Inkubator B50	Memmert
Inkubator Inova 4200	New Brunswick
Inkubator Multitron HAT	Infors
Kamera E-620	Olympus
Magnetrührer MR HeiStandard	Heidoph
Massenspektrometer LTQ (linear ion trap)	Thermo Fisher
<i>Mikrofluidizer</i>	Microfluidics Corporation
Mikroskop-Lichtquelle KL1500LCD	Olympus
Mikrozentrifuge	VWR
Nanodrop 1000 Spektrometer	peQLab Biotechnologie GmbH
Orbitalschüttler Rotamax 120	Heidolph
pH-Elektrode MP220	Mettler Toledo
Phoenix Mikrodispenser	Dunn Labortechnik GmbH
Präzisionswaagen TE 1502S	Sartorius
Röntgenanode 1 μ S	Incoatec
Röntgendetektor mar dtb 345	Mar Research
Schlauchpumpe P1	Pharmacia Biotech
SDS-Gelelektrophorese	Bio-Rad
Stereomikroskop <i>SZX16</i>	Olympus
Stromversorgung FV243	Consort
Stromversorgung Power PAC 300	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge (5424)	Eppendorf
Tischzentrifuge, kühlbar (5415R)	Eppendorf
UFLC	Shimadzu Scientific Instruments
Ultraschallbad	VWR

Vakuum Konzentrator <i>BA-VC-300H</i>	Sauer
Vortexer	Scientific Industrie
Wasseraufbereitung xCAD Dispenser	TKA
WPA CO 8000 Biowave Cell Density Meter	Biochrom
Zentrifuge 5804R (Rotor A-4-44)	Eppendorf
Zentrifuge Scanspeed (Rotor GLP-mw-r250)	Scanspeed

3.1.13 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
24- <i>well</i> -Platten	Hampton
96- <i>well</i> -Platten MRC2	Molekulare Dimension
Amicon Ultra 3000/10000/30000 Da	Millipore
Deckgläschen 18 mm	VWR
Kulturplatten	Sarstedt
Membranfilter	Hartenstein
NAP-Säulen	GE-Healthcare
Pipettenspitzen	Star Lab
Plastikküvetten	Hartenstein
Sterilfilter	Minisart
Vivaspin 10000 Da	Satorius
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	Sarstedt

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) für die selektive *in vitro* Amplifikation von doppelsträngigen DNA-Sequenzen (*Templates*) mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden (3.1.6) wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 3.1: PCR-Ansatz.

dNTP-Mix	2 mM
DMSO	5 % (v/v)
MgCl ₂	1 mM
Template-DNA	100 ng
Polymerase	2,5 U
5'Primer und 3'Primer je	100 pmol

Das verwendete PCR-Programm enthielt die im Folgenden dargestellten Temperaturschritte.

Tabelle 3.2: PCR-Programm.

Denaturierung	98 °C	3 min	30 Zyklen
Denaturierung	98 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	56 °C	60 s	
Extension	72 °C	50 s	
Extension	72 °C	10 min	

Die Extensionszeit variierte je nach Länge des herzustellenden PCR-Fragments, sowie nach Polymerase und wurde jeweils individuell angepasst. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels DNA-Gelelektrophorese (3.2.3) kontrolliert.

3.2.2 Analytische Schnell-PCR (*Fast-PCR*)

Die analytische *Fast-PCR* diente der Überprüfung von Klonierungserfolgen. Hierfür wurde ein Klon von einer Kulturplatte mittels einer Pipettenspitze in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 10 µl des PCR-Ansatzes (Tab. 3.1) hinzugegeben. Es wurde das identische Programm wie zur Fragmentherstellung verwendet (Tab. 3.2). Anschließend erfolgt die Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3)

3.2.3 Überprüfung der DNA und Isolierung

Mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung von 1 %iger Agarose Lösung, die mit 1 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt war, wurden die negativ geladenen DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert. Die isolierte Gel-DNA-Bande wurde mit Hilfe des Favorgene-Kits gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.4 Klonierung

Die hergestellten DNA-Fragmente bzw. Vektoren wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen spezifisch verdaut. Bei der Wahl der Pufferbedingungen, Inkubationstemperaturen, sowie Inkubationszeiten wurden die jeweiligen Angaben des Herstellers verwendet. Die Größe der erzeugten Fragmente wurde mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3) kontrolliert.

Um DNA-Fragmente in einen Vektor zu ligieren wurden 50 bis 100 ng linearisierter Vektor mit dem 3 bis 5-fachen Überschuss des geschnittenen DNA-Fragments mit Hilfe der T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.2.5 Transformation

Für die Transformation von DNA in chemisch kompetente Zellen wurden die *E. coli* Zellen und die DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch einen Hitzeschock bei 42 °C für zwei Minuten. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde die Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C und 500 rpm geschüttelt, anschließend abzentrifugiert und auf Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausgestrichen.

3.2.6 Kultivierung von transformierten Bakterienzellen

LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika wurde mit einer Einzelkolonie, die von einem transformierten *E. coli* Bakterium stammt inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht bei 180 rpm und 37 °C inkubiert.

3.2.7 Kontrolle und Lagerung der klonierten Konstrukte

Für die Kontrolle wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli* mit Hilfe Plasmid-Aufreinigungs-Kit der Firma Favorgen zunächst isoliert. Nach Angaben des Herstellers wurden hierfür 5 ml einer

Übernachtskultur verwendet. Klonierungserfolge wurde anschließend mit Hilfe einer Sequenzierung validiert. Diese erfolgte durch die Firma MWG.

3.2.8 Herstellung des rekombinanten Bacmids und Virus

Die Herstellung des rekombinanten Bacmids, welches das hsAC_{cat} Konstrukt AS 1-469 mit C-terminalem Hexahistidin-*tag* enthält (Sequenz für hsAC siehe Anhang), sowie die Transfektion und Amplifikation des Virus erfolgte bereits 2008 durch die Firma Diarect.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Analytische Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Um die optimalen Expressionsbedingungen der verschiedenen klonierten Konstrukte zu finden, wurden die Proteine in kleinem Maßstab exprimiert und mittels SDS-PAGE (3.3.7) analysiert.

Hierzu wurden 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektionsantibiotika mit 500 µl Übernachtskultur inokuliert und bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 mit IPTG (Endkonzentration 0,1 mM IPTG) induziert. Die Expression erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte Kultur bei 37 °C für vier Stunden.

3.3.2 Präparative Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression von Proteinen wurde zunächst eine Vorkultur aus LB-Medium, die mit der entsprechenden Glycerinkultur und entsprechendem Selektionsantibiotikum inokuliert wurde, über Nacht im Thermoschüttler bei 37 °C und bei 160 rpm hergestellt. Die Expressionskultur wurde 1:100 mit der Vorkultur inokuliert. Die Induktion erfolgte bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,6 bis 0,8 durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG. Die Proteinexpression erfolgte für 12 Stunden bei 20 °C. Anschließend wurden die Zellen bei 12000 g bei 15 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde im jeweiligen Lysepuffer resuspendiert (3 ml/g) und anschließend in 50 ml Falcons bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3 Präparative Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen

Das hsAC Protein (1-469 mit C-terminalem His₆-*tag*) wurde in Zusammenarbeit mit dem HZI Braunschweig durch Joop van den Heuvel unter Verwendung der TIPS-Methode (*Titerless Infected-cells preservation and scale-up*) in *High5* Insektenzellen exprimiert.^[111] Zunächst

wurde der Virus in *SF21* Zellen amplifiziert. Anschließend wurden *High5* Insektenzellen mit Virus in einem Verhältnis $\text{MOI} = 3$ (Multiplizität der Infektion) infiziert. Diese BIIC Zellen (*baculovirus infected insect cells*) wurden in Stickstoff gelagert. Für die Expression wurde ein Liter Insektenzellen $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml mit 1 ml BIIC (10^7 Zellen/ml) infiziert. Die Zellkulturen wurden bei einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml weiter inkubiert bis sie einen Zelldurchmesser von 2-3 μm erreicht hatten. Etwa 48 Stunden nach Proliferationsende wurden die Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.4 Präparativer Zellaufschluss

Die gefrorenen Zellen wurden nach Zugabe eines Proteaseinhibitormix 20 Minuten bei 4°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des *Mikrofluidizers* aufgeschlossen. Um einen vollständigen Aufschluss zu gewährleisten, wurde dieser Vorgang zweimal durchgeführt. Danach erfolgte die Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen, Proteinen sowie Zellartefakten durch Zentrifugation bei 60000 g und 4°C . Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet verworfen.

3.3.5 Affinitätschromatographie

Alle überexprimierten Proteinkonstrukte wurde im ersten Schritt mittels FPLC (*fast protein liquid chromatography*) an einer Nickel-NTA-Säule oder MBP-Säule isoliert.

Der Überstand der Zentrifugation (3.3.4) wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die 1 ml His-Trap Nickelsäule oder 2 ml/ml auf die 5 ml MBP-Säule aufgetragen und anschließend mit 30 Säulenvolumina His₆-Lysepuffer oder MBP-Lysepuffer gewaschen.

His-getaggte Proteine wurden mittels linearem Gradienten (20 mM bis 400 mM Imidazol, His₆-Lysepuffer und His₆-Elutionspuffer) eluiert, MBP-Fusionsproteine mit 10 mM Maltose (MBP-Elutionspuffer). Die verschiedenen Wasch- und Reinigungsschritten, sowie die Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (3.3.8) analysiert.

3.3.6 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Für die Ionenaustauschchromatographie wurde eine MonoQ-Säule verwendet. Das Protein wurde unter Niedersalzbedingungen (His₆-Niedersalzpuffer) an die Säule gebunden und mit Hilfe eines linearen Gradienten von 50 mM bis 300 mM NaCl (His₆-Niedersalzpuffer und

His₆-Hochsalzpuffer) von der Säule eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (3.3.8) analysiert.

3.3.7 Größenausschlusschromatographie

Es wurden für die Reinigung der Proteine folgende Säulen verwendet: Superdex S200 10/300 GL und Superose S12 10/300.

Die Säulen wurden jeweils mit 2 Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Nach der Probenbeladung wurde mit 1,5 Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer bei einer Flussrate von 0,5ml/min eluiert und der Durchfluss fraktioniert gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen mit Hilfe der SDS-PAGE (3.3.8) analysiert.

3.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Hilfe von 14 % (w/v) SDS-Gelen.^[112-114] Um eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten, wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 mV für 60 Minuten. Anschließend wurden die Gele mit SDS-Färbelösung für 1 Minute in der Mikrowelle gefärbt und mit Wasser entfärbt.

3.3.9 Konzentrierung des Proteins durch Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der Ultrazentrifugation wurde die Proteinlösung auf die gewünscht Endkonzentration bzw. Endvolumen aufkonzentriert. Die gewählte Membran hatte ein Ausschlussvolumen (MWCO, *molecular weight cut off*) von 30 kDa und wurde nach Herstellangaben bei 4 °C verwendet.

3.3.10 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde mit Hilfe eines Absorptionsspektrometers durch die Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes (Gleichung 1) bestimmt (Proteinparameter siehe Anhang):

$$E = \varepsilon * c * d \quad (\text{Gleichung 1})$$

E = Extinktion

ε = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke

3.4 Biophysikalische Methoden

3.4.1 Aktivitätsmessungen mittels Umkehrphasen-HPLC

Zur Quantifizierung von cAMP und ATP im Adenylyl-Cyclaseassay wurde die Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigchromatographie (*reversed-phase HPLC*; *high performance liquid chromatography*) verwendet. Die Auftrennung der Nukleotide erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 100 mM Ammoniumacetatpuffer pH 8,8 und 7,5 % (v/v) Acetonitril auf einer C18 X-Bridge Säule. Die Detektion der Nukleotide erfolgte bei 254 nm mit Hilfe des UV-Absorptionsdetektors. Durch Kalibrierung konnten cAMP und ATP quantitativ bestimmt werden. Für die Aktivitätsmessungen in Aktivitätspuffer wurden 80-100 ng hsAC_{cat} Protein verwendet. Das Protein wurde in Verdünnungspuffer vorverdünnt. Die Aktivität wurde jeweils in unabhängigen Duplikaten gemessen und die Daten anschließend mit dem Programm Graphit ausgewertet.

3.4.2 Affinitätsbestimmung

Zur Bestimmung von Affinitäten wurde ein Nanotemper Monolith NT-Labelfree verwendet.^[115] Die Affinität verschiedener Liganden wurde hierbei zu 0,4 µM hsAC_{cat} Protein mittels Thermophorese bestimmt. Das Fluoreszenzsignal ergab sich aus insgesamt fünf Tryptophanen von hsAC_{cat}. Es wurden jeweils zwei unabhängige Messungen bei 25 % LED-Power und 30 % Laserintensität gemessen. Die Messungen wurden normiert und anschließend mit dem Programm Graphit ausgewertet.

3.4.3 Proteinverifikation mittels MS

Für die Proteinanalytik wurden die Proben zunächst mit Trypsin nach einem etablierten Protokoll verdaut und die Peptide anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert.^[116]

3.5 Kristallstrukturanalyse

3.5.1 Kristallisation

Die Kristallisation von *apo*-hsAC_{cat} erfolgte unter Verwendung der *hanging drop* Dampfdiffusionsmethode. Hierbei wurden 500 µl Reservoirlösung verwendet und der Proteintropfen mit einer Konzentration von 7-9 mg/ml 1:1 (je 1 µl) mit Reservoirlösung

versetzt. Die Kristallisation erfolgte bei 4 °C und 0,1 M Natriumacetat pH 4,8, 0,2 M Tri-Natriumcitrat, 15 % (v/v) PEG 4000 und 10 % (v/v) Glycerin.

3.5.2 Cryoprotektion

Um die Kristalle vor Strahlungs- bzw. Kälteschäden durch Wassereinschluss zu schützen, wurde eine Cryolösung bestehend aus 0,1 M Natriumacetat pH 4,8, 0,2 M Tri-Natriumcitrat, 18 % (v/v) PEG 4000 und 20 % (v/v) Glycerin verwendet. Die Kristalle wurden eine Minute in Cryolösung inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.5.3 Komplexstrukturen

Um eine geeignete Kristallisationsbedingung für hsAC_{cat} im Komplex mit einem Substratanalogen zu finden, wurden 96 neue Kristallisationsbedingungen (*Screening*) überprüft. Es standen zwei Substratanaloga zur Verfügung: Adenosin-5'-(α -thio)-triphosphat (ATP α S) mit einer Modifikation am α -Phosphat (Sauerstoff durch Schwefel substituiert) und α,β -Methylenadenosin-5'-triphosphat (ApCpp). Hier ist der Sauerstoff der Anhydridbindung zwischen α -Phosphat und β -Phosphat durch eine Methylengruppe ersetzt.

Für diese *Screening*-Ansätze wurde der JCSG⁺-Screen von Qiagen mit 45 μ l Reservoirlösung, 7 mg/ml Proteinlösung (versetzt mit je 7,5 mM ApCpp, MgCl₂ und CaCl₂), Reservoirlösung und ein *apo-Seeding-Stock* im Verhältnis 3:2:1 gemischt und bei 4 °C inkubiert. Ohne *Seeding* mit *apo*-Kristallen wurde weder mit ATP α S noch mit ApCpp eine Komplexstruktur erhalten.

Um Komplexstrukturen von hsAC_{cat} mit Kleinmolekülen wie Substrat, Produkt oder Inhibitoren zu erhalten, wurden die Proteine mit der Substanz unter Kristallisationsbedingung oder Cryobedingungen inkubiert (*soaking*). Je nach Substanz wurden verschiedene Inkubationszeiten und Konzentrationen gewählt (Tab. 2 Anhang).

3.5.4 Röntgenstrukturanalyse und Datensammlung

Die Kristalle wurden zunächst auf ihre Diffraktionsqualität mit einer emittierenden Kupferanode ($\lambda = 1,5419 \text{ \AA}$) bei 100 K getestet. Die hochauflösenden Datensätze wurden anschließend am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung (BESSY II, HZB Berlin) oder am SLS (*Suisse Light Source*, Paul Scherrer Institut Villigen, Schweiz) aufgenommen.^[117] Die Wellenlänge konnte dabei variiert werden, die Messstrategie wurde mit Hilfe von MOSFLM festgelegt. Die Indizierung, Skalierung und Datenreduzierung wurde

mit den Programmen XDS bzw. XSCALE durchgeführt.^[118–120] Die Festlegung der Auflösungsgrenze erfolgte über diverse Qualitätskriterien wie Vollständigkeit und Signal zu Rausch-Verhältnis $I/\sigma(I)$ in der höchsten Auflösungsschale (Gleichung 2). Darüber hinaus wurde die Qualität des Datensatz mit Hilfe des R_{meas} (Gleichung 3) und CC^* (Gleichung 4) analysiert.^{[121][122]}

$$\langle |I|/\sigma(I) \rangle = \frac{1}{N} \sum_h \frac{|I(h)|}{\sigma(I(h))} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h-1}} \sum_i^{n_h} |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

$$CC^* = \sqrt{\frac{2CC_{1/2}}{1+CC_{1/2}}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

h = Reflexe n = Anzahl $CC_{1/2}$ = Korrelationskoeffizient des halben Datensatzes (zufällig ausgewählt)
 I = Intensität

3.5.5 Experimentelle Phasierung

Da für die initiale Phasenbestimmung die Methode des molekularen Ersatzes (MR) mit topologisch ähnlichen Strukturen nicht erfolgreich war, wurden die Kristalle mit Schwermetallverbindungen, die Quecksilberatome, Bleiatome oder Europiumionen enthielten, *gessoaked* um Schwermetallerivate der Proteine zu erzeugen.^[123] Hierbei wurde sowohl die Konzentration als auch die Inkubationszeit für jede Schwermetallverbindung variiert (Tab. 4.1).

Schweratome sind in der Lage, Röntgenstrahlung spezifischer Wellenlänge zu absorbieren. Bei den anomalen Datensätzen wurde die Anregungswellenlänge (*Peak*) jeweils auf das anomale Schweratom angepasst, um das Phasenproblem durch anomale Dispersion lösen zu können. Die anomale Dispersion, welche durch Absorption und Reemission von Strahlung entsteht (*resonance effects in the scattering of radiation*), ist abhängig von der Wellenlänge, jedoch nicht vom Streuwinkel. Hierbei wird ein Elektron eines niedrigeren Energieniveaus durch die Frequenz der Röntgenstrahlung an der Absorptionskante auf ein höheres Niveau angehoben und dabei ein Röntgenphoton emittiert. Der atomare Streufaktor $f(\theta, \lambda)$ setzt sich

aus drei Komponenten zusammen: Dem normalen Streufaktor $f_0(\theta)$, sowie $f'(\lambda)$ (dispersiver Term) und $f''(\lambda)$ (Absorptionsterm). Bei Verwendung der Anregungswellenlänge werden f' und f'' maximal, was als anomale Streuung bezeichnet wird. Auf Grund der anomalen Streuung durch das Schweratom sind in derivatisierten Kristallen die Amplituden $|F_{hkl}|$ und $|F_{-h-k-l}|$ der Strukturformeln F_{hkl} und F_{-h-k-l} , die als Friedel's Paare bezeichnet werden, nicht mehr gleich. Die Strukturformeln F_{hkl} und F_{-h-k-l} sowie symmetrieverwandte Strukturformeln, für welche das Friedel Gesetz nicht gilt, werden als Bijvoet Paare bezeichnet. Die Lokalisation der Schweratome erfolgt unter Ausnutzung der wellenlängenspezifischen anomalen Streuanteile mit Hilfe der Patterson-Methode. Die Kenntnis der Schweratomposition ermöglicht die Berechnung der Proteinphasen.

Die anomale Dispersion eines einzelnen Derivatdatensatzes (Tab. 4.2) reichte jedoch nicht aus um initiale Phasen zu erhalten (*SAD - single anomalous diffraction/dispersion*). Hierfür wurde eine Kombination aus isomorphem Ersatz und anomaler Dispersion genutzt (*SIRAS - single isomorphous replacement/anomalous scattering*). Die zusätzliche Verwendung der SIR-Methode (*single isomorphous replacement*) war möglich, da die Kristalle isomorph waren. Die Intensitätsunterschiede zwischen nativem und derivatisiertem Kristall, welche auf das Schweratome zurückzuführen sind, waren messbar. Bei der isomorphen Ersatzmethode wird der Unterschied der Strukturformelamplitude der nativen Daten (F_P) und der derivatisierten Daten (F_{PH}) verwendet. Die Differenz der Strukturformelamplituden kann für die Lokalisation der Schweratome unter Verwendung der anomalen Differenz-Patterson-Funktion genutzt werden (Gleichung 5).

$$\Delta P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |\Delta F(hkl)|^2 \cos[2\pi (hu + kv + lw)] \quad (\text{Gleichung 5})$$

$$(\Delta F)^2 = (|F_{PH}| - |F_P|)^2 \quad F = \text{Amplitude}$$

Die Schweratomstrukturformeln (F_H) können dann für eine initiale Phasenbestimmung verwendet werden. Diese Art der Phasenbestimmung mit nur einem Schweratomderivat liefert jedoch zwei mögliche Werte für die Phase (Phasenambiguität). Für die Berechnung einer eindeutigen initialen Phasen wurden daher sowohl die isomorphe Ersatzmethode als auch anomale Differenzen erfolgreich verwendet (*SIRAS*).

Für die Bestimmung der Schwermetallpositionen und Berechnung der initialen Phasen wurde das Programm AUTOSOL mit den Komponenten HYSS, SOLVE, PHASER, RESOLVE und AUTOBUILD verwendet.^[124,125] Die Komponente HYSS (Hybrid Substructure Search)

lokalisiert die Position der anomalen Streuer mit Hilfe einer Kombination von Pattersonfunktion und direkter Methode aus den verwendeten Datensätzen, welche von SOLVE und PHASER dann zur Bestimmung einer experimentellen Phasen verwendet wurden.^[126–128] Die Unterprogramme RESOLVE, XTRIAGE und PHENIX.REFINE bilden dann automatisch ein initiales Modell ab, welches anschließend verfeinert und verbessert wurde.^[129,130]

3.5.6 Modellbau und Strukturverfeinerung

Der Bau des Proteinmodells in die Elektronendichte ($2mF_o-DF_c$) und die Korrektur von Atompositionen auf Grund der berechneten Dichte erfolgte mit dem Programm COOT 0.7.2.^[131,132] Anschließend wurde das Modell jeweils mit REFMAC5 verfeinert.^[133] Dies diente zur Korrektur der Geometrien des Modells und zur Anpassung des Modells an die experimentell bestimmten Amplituden, wodurch eine Verbesserung der Phasen erreicht wurde. Für alle Datensätze wurde bei REFMAC5 die TLS-Option verwendet sowie die isotrope Temperaturfaktoren verfeinert.^[134] Die Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Daten wurde mit Hilfe des R-Faktors (Gleichung 6) überprüft.

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs} - k|F_{calc}|}{\sum_{hkl} F_{obs}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

$|F_{obs}|$ = beobachtete Reflexe $|F_{calc}|$ = berechnete Reflexe

Der freie R-Faktor (R_{free}), welcher aus 5 % der gemessenen Reflexe berechnet wird, die aus dem Verfeinerungsprozess ausgeschlossen wurden und bei allen Datensätzen auf Grund der Isomorphie gleich gehalten wurden, diente zur Kreuzverifikation des Verfeinerungsverlaufes um Überverfeinerung zu erkennen.^[135] Die Berechnung erfolgt analog zum R-Faktor.

Liganden und Parameterdateien, welche noch nicht in der Proteindatenbank hinterlegt waren, wurden mit dem Programm PRODRG oder dem Grade-Web-Server (<http://grade.globalphasing.org>) erstellt.^[136]

3.5.7 Bioinformatik

Für die Darstellung von Ligandeninteraktionen wurde das Programm POSEVIEW (BioSolveIT GmbH) verwendet. Die Abbildungen wurden mit Hilfe von PYMOL (www.pymol.org) erstellt. Die Berechnung der elektrostatischen Oberfläche wurden mit Hilfe

des *Adaptive Poission-Boltzmann Solver* (APBS) Algorithmus in PYMOL erzeugt.^[137] Der Maßstab für die Farbdarstellung ist jeweils in der Abbildung angegeben, wobei negatives Potential in rot und positives Potential in blau dargestellt wurde. Die Darstellung von Aminosäuren erfolgt in der *Stick*-Darstellung mit Kohlenstoffatomen in grau oder bei Überlagerungen in der jeweiligen Farbe des Proteins, Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in blau, Schwefelatome in gelb und Selenatome in hellem orange. Ionen wurden jeweils in Kugeldarstellung dargestellt mit Chlorionen in orange, Magnesiumionen in grün, Calciumionen in gelb und Natriumionen in lila.

Der strukturbasierte Sequenzvergleich wurde mit dem Programm STRAP unter Verwendung der *superimposed native combinatorial extension* Methode (CE) durchgeführt.^[138,139] Für das strukturbasierte *Alignment* wurden die folgenden PDB-Strukturen verwendet: 4CLK (humane sAC C1 und C2), 1AZS (humane tmAC C1 und C2), 3R5G (CyaB aus *P. aeruginosa*), 1WC0 (CyaC aus *S. platensis*), 2W01 (Cya2 aus *Synechocystis*), 1YK9 (Rv1625c Mutante aus *M. tuberculosis*), 1YBT (Rv1900c aus *M. tuberculosis*), 1Y11 (Rv1264 aus *M. tuberculosis*), 1FX2 (Rezeptor-type AC Gresag 4.1 aus *T. brucei*), 3MR7 (α/β -fold family AC aus *S. pomeroyi*), 3UVJ (humane sGC C β), 2WZ1 (humane sGC C α), 3ET6 (lösliche GC β from *C. reinhardtii*).

4 Ergebnisse

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase ist eine von zehn im Menschen vorkommenden Adenylyl-Cyclasen.^[16] Sie nimmt als einzige lösliche Form eine besondere Rolle ein, da sie ubiquitär in Zellen vorkommt und lokal ATP zum sekundären Botenstoff cAMP umwandeln kann.^[63] Die Aktivierung der hsAC erfolgt nicht wie bei transmembranen Adenylyl-Cyclasen, welche strukturelle bereits charakterisiert wurden, über heterotrimere G-Proteine oder Forskolin sondern über Bicarbonat, Ca^{2+} und pH-Änderung.^[25,31,45,52,56,98] Von besonderem Interesse sind die beiden N-terminalen katalytischen Domänen, die als verkürzte Isoform im Menschen vorkommen und als ATP-Sensor beschrieben werden.^[55,99]

4.1 Reinigung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase

Für die biochemische und strukturelle Untersuchung der löslichen humanen AC wurde die verkürzte Isoform (hsAC_{cat} AS 1-468) in löslicher Form exprimiert und gereinigt. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass die Expression der katalytischen Domäne C2 einschließlich des autoinhibitorischen Motivs (AS 251-479) in löslicher Form möglich war.^[140] Weder die katalytische Domäne C1 (AS 1-250) noch der gesamte katalytische Teil (C1 und C2, AS 1-479) waren bisher in *E. coli* als GST-Fusionsprotein in löslicher Form exprimierbar.^[140]

Die Coexpression der C1-Domäne als GST-*getaggt*es (hsAC1-GST) und der C2-Domäne als His-*getaggt*es Konstrukt (hsAC2-His), sowie die anschließende gemeinsame Reinigung als Heterodimer, war nicht möglich. Die C1-Domäne ist trotz Coexpression weiterhin unlöslich. Die Verwendung eines MBP-*tags* für die Expression der verkürzten Isoform (AS 1-469 MBP-hsAC_{cat}) führte zwar zu löslichem Protein (Abb. 4.1A), welches jedoch nach der Affinitätschromatographie stark aggregierte (Abb. 4.1B) und keinerlei spezifische Cyclaseaktivität aufweist.

Die Änderung des Expressionssystems hin zu Insektenzellen (*High5*) führte schließlich zur erfolgreichen Expression der verkürzten Isoform der löslichen Adenylyl-Cyclase (AS 1-469 hsAC_{cat}). Hierfür wurde das katalytische Konstrukt mit einem C-terminalen Hexahistidin-*tag* versehen. Die Herstellung des rekombinanten Baculovirus wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Diarect (Freiburg) vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt. Die Expression erfolgte am HZI Braunschweig unter Verwendung der TIPS-Methode (*Titerless Infected-cells preservation and scale-up*).^[111]

Das Protein wurde mittels Affinitätschromatographie auf einer Nickelsäule, gefolgt von einer Chromatographie an einem starken Anionenaustauscher (MonoQ), gereinigt. Abschließend wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, um das Protein in einer homogenen Form zu erhalten. Nach Etablierung des Reinigungsprotokolls konnten aus vier Litern Insektenzellen etwa 800 μg hsAC_{cat} Protein gereinigt werden.

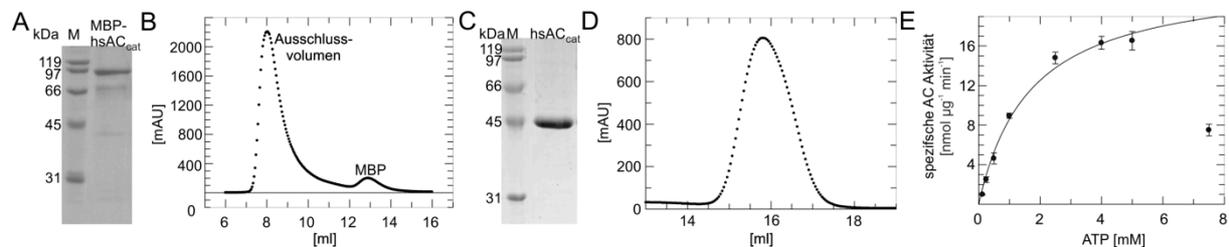


Abbildung 4.1: Charakterisierung verschiedener hsAC Konstrukte. **A** SDS-PAGE mit Bande des MBP-hsAC_{cat}-Proteins auf Höhe von etwa 97 kDa. **B** Größenausschlusschromatographie des MBP-hsAC_{cat}-Proteins, welches im Ausschlussvolumen der Superose S12 eluierte. **C** SDS-PAGE mit Bande des hsAC_{cat}-Proteins auf Höhe von 45 kDa. **D** Größenausschlusschromatographie des hsAC_{cat}-Proteins, welches als homogenes Monomer bei 15,8 ml von der Sephadex S200 10/300GL eluierte. **E** Michaelis-Menten Kinetik der spezifischen Adenylyl-Cyclaseaktivität des gereinigten hsAC_{cat}-Proteins mit einem K_m von $1,7 \pm 0,3$ mM.

Die Validierung der Proteinreinheit erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE. Das gereinigte Protein hsAC_{cat} weist keine weiteren Proteinverunreinigungen auf und eignet sich daher sowohl für kristallographische als auch biochemische Versuche (Abb. 4.1C). Zur weiteren Validierung der Proteinidentität wurde die Proteinbande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, anschließend mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnte das gereinigte Protein mit etwa 30 % Sequenzabdeckung eindeutig als hsAC_{cat} identifiziert werden. Das hsAC_{cat}-Protein eluierte in einem homogenen monomeren Peak bei der Größenausschlusschromatographie (Abb. 4.1D). Darüber hinaus wurde die spezifische Adenylyl-Cyclaseaktivität des gereinigten Proteins in Anwesenheit von Mg^{2+} und Ca^{2+} Ionen untersucht. Der berechnete K_m -Wert von $1,7 \pm 0,3$ mM stimmt mit dem Literaturwert (K_m 1,7-3 mM) überein (Abb. 4.1E).^[45] Das Enzym zeigt darüber hinaus die bekannte Substratinhibition bei ATP-Konzentrationen über 5 mM.^[45] Alle nachfolgenden Ergebnisse basieren auf dem gereinigten hsAC_{cat}-Protein aus Insektenzellen.

4.2 Strukturelle Charakterisierung des apo-Enzyms

Das gereinigte hsAC_{cat}-Protein wurde bei 4 °C und einer Proteinkonzentration von 6,8-7,5 mg/ml kristallisiert. Erste Proteinkristalle waren nach 24 Stunden zu erkennen. Nach weiteren drei bis vier Tagen hatten die Proteinkristalle ihre maximale Größe erreicht. Die

hsAC_{cat}-Kristalle waren raketenförmig, hatten eine Länge von 300 µm und einen Durchmesser von 20 µm (Abb. 4.2A).

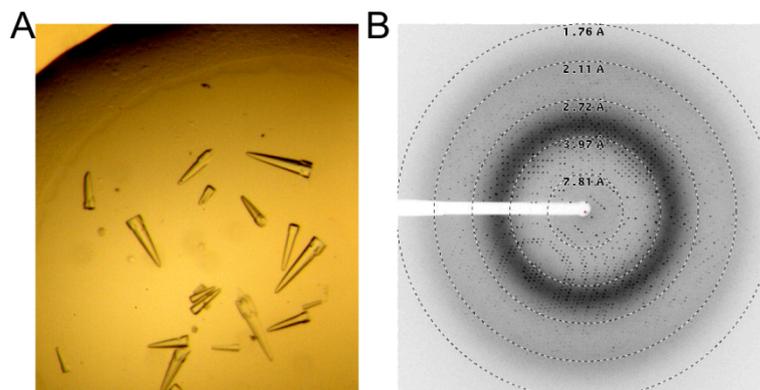


Abbildung 4.2: Kristalle und Diffraction von *apo* hsAC_{cat}-Kristallen. **A** Form und Größe der hsAC_{cat}-Kristalle nach vier Tagen bei 4 °C. **B** Diffraction der in A gezeigten Kristalle am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung BL 14.1 mit einer maximalen Auflösung von 1,7 Å.

Der native Datensatz (Abb. 4.2B) mit einer Auflösung von 1,7 Å (Tab. 4.1 sowie Tab. 1 Anhang) für die *de novo* Strukturbestimmung wurde am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung (HZB, BL 14.1) aufgenommen. Die Indizierung des Datensatzes ergibt ein hexagonales Kristallsystem in der Raumgruppe P6₃ (Raumgruppennummer 173). In der asymmetrischen Einheit befindet sich ein Monomer mit einem Lösungsmittelanteil von 55 %. Der Matthews-Koeffizient beträgt $V_m = 2,75 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$.^[141]

Tabelle 4.1: Statistiken der Datensammlung des nativen Datensatzes. In Klammern sind jeweils die Werte für die höchste Auflösungsschale dargestellt.

	<i>apo</i> -hsAC
Raumgruppe	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 99,7 c = 97,9 α, β = 90 γ = 120
Wellenlänge [Å]	0,97626
Auflösung [Å]	44,45-1,70 (1,75-1,70)
Anzahl der Reflexe	308465 (25534)
Anzahl der unigen Reflexe	60638 (6045)
Vollständigkeit	100 (100)
Multiplizität	5,1 (5,9)
R _{meas} [%]	7,4 (94,3)
Signal/Rausch-Verhältnis I/σ(I)	14,9 (1,9)
CC _{1/2}	99,9 (62,3)

Die Lösung der Struktur durch Molekularen Ersatz (MR) mit verschiedenen homologen Strukturen wie beispielsweise CyaC aus *S. platensis* (PDB-Code 1WC0 und 1WC1) oder der transmembranen Adenylyl-Cyclase (PDB-Code 1AZ1) war nicht erfolgreich. Um das Phasenproblem experimentell zu lösen, wurden die Kristalle mit verschiedenen Schwermetallverbindungen inkubiert (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Derivate und Inkubationsbedingungen für die Herstellung von schweratomderivatisierten Kristallen.

Derivat	Dauer
1 mM Quecksilberchlorid - HgCl ₂	1 Stunde
0,05 mM Thiomersal - C ₉ H ₉ HgO ₂ SNa	5 Stunden
1 mM Bleiacetat - Pb(OAc) ₂	5 Tage
ApC _{pp} , 30 mM MgCl ₂ , 30mM EuCl ₃	1 Tag

Die Verbindungen wurden unter Berücksichtigung des pH-Wertes der Kristallisationsbedingung ausgewählt. Quecksilber(II) ist in der Lage kovalent an Cysteine zu binden. Das eingesetzte Blei(II)-Acetat ist als planar koordiniertes Kation mit Glutamaten oder Aspartaten durch elektrostatische Interaktion oder Wasserstoffbrücken assoziiert. Lanthanoide wie Europium können Calciumbindestellen besetzen. Wie bereits für CyaC gezeigt wurde, kann durch Zugabe eines Substratanalogons Eu(III) als Kation in die vorhergesagten Ionenbindestelle B binden.^[41]

Zur Analyse, ob spezifisch derivatisierte Kristalle erhalten wurde, wurden wellenlängenspezifische Diffraktionsdaten (anomale Diffraktionsdaten) an der jeweiligen Absorptionskante gesammelt. Zwei der *gesoakten* Kristalle führten zu Datensätzen mit anomalem Signal. Der Datensatz, der aus dem Thiomersal-Ansatz resultierte, hat eine Auflösung von 1,7 Å und der des Bleiacetat-Ansatzes eine Auflösung von 1,9 Å (Tab. 4.3). Das signifikante anomale Signal reichte bei dem Quecksilberdatensatz bis zu einer Auflösung von 3,5 Å und bei dem Bleidatensatz bis 4 Å.

Mit Hilfe der anomalen Beugungsdaten des Thiomersal oder des Bleiacetat *gesoakten* Kristalls war es jedoch nicht möglich, die Struktur der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase unter Verwendung der *SAD*-Methode (*Single anomalous dispersion*) zu lösen. Durch die Verwendung der *SIRAS*-Methode (*Single isomorph replacement and anomalous dispersion*), eine Kombination von *SAD* und *SIR* (*Single isomorph replacement*), konnte mit Hilfe der anomalen Beugungsdaten des Thiomersal *gesoakten* Kristalls die Struktur der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase gelöst werden.

Tabelle 4.3: Statistiken der Datensammlung der anomalen Datensätze. In Klammern sind jeweils die Werte für die höchste Auflösungsschale dargestellt.

	Thiomersal-Datensatz	Bleiacetat-Datensatz
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 99,96 c = 98,12	a, b = 100,22 c = 98,01
	$\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$	$\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$
Wellenlänge [Å]	1,008000	0,950800
Auflösung [Å]	86,57-1,80 (1,85-1,80)	86,79-1,90 (2,00-1,90)
Anzahl der Reflexe	294647 (23110)	365884 (51712)
Anzahl der unigenen Reflexe	101373 (8047)	86795 (12374)
Vollständigkeit	99,7 (99,7)	100,0 (100,0)
Multiplizität	2,9 (2,9)	4,2 (4,2)
R _{meas} [%]	7,5 (55,1)	8,5 (48,1)
Signal/Rausch-Verhältnis I/σ(I)	13,5 (2,5)	14,2 (4,0)
CC _{1/2}	99,7 (73,0)	99,7 (89,0)
Anomale Korrelation	49 (bis 5 Å)	82 (bis 10 Å)
SigAno	1,26 (bis 5 Å)	1,32 (bis 10 Å)

Eine wichtige Voraussetzung ist dabei die Isomorphie der Kristalle, die in diesem Fall gegeben war (Variation der Gitterkonstanten um maximal 1 %). Bei der *SIRAS*-Methode wird einerseits die anomale Diffraktion des eingebrachten Schweratoms (Quecksilber) genutzt und zusätzlich die isomorphen Differenzen zwischen nativem und derivatisierten Kristall verwendet. Im derivatisierten Thiomersal Kristall waren zwei Cysteine (Cys253 und Cys393) kovalent durch Quecksilber modifiziert (Abb. 4.3).

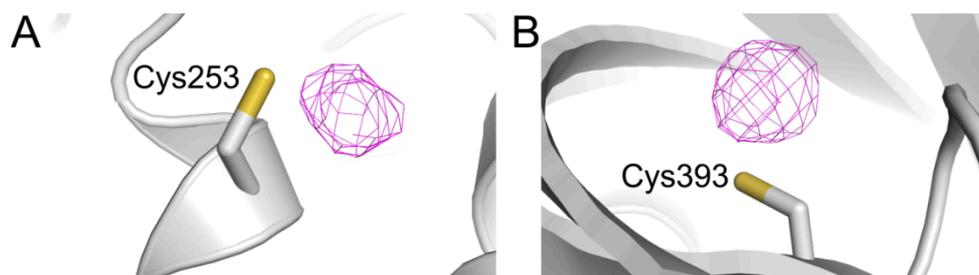


Abbildung 4.3: Durch Quecksilber modifizierte Cysteine. **A** Modifiziertes Schwefelatom an Cys253 (*Stick*-Darstellung) überlagert mit der anomale Dichtekarte in pink bei einem σ -Wert von 3. **B** Modifiziertes Schwefelatom an Cys393 (*Stick*-Darstellung) überlagert mit der anomale Dichtekarte in pink bei einem σ -Wert von 3.

Mit Hilfe des Programms HYSS konnte durch Kombination der Differenz-Pattersonfunktion mit der direkten Methode die Position der Schweratome im Kristallsystem berechnet und verfeinert werden. Der *Figure of merit (FOM)* für die daraus erhaltenen initialen Phasen beträgt 0,35, was eine ausreichende Qualität für die Strukturlösung anzeigt. Das Programm

PHENIX AUTOSOL konnte automatisiert ein initiales Modell, welches bereits 353 Aminosäuren enthält, erstellen. Das Modell korreliert zu 81,8 % (*overall map model correlation*) mit der Elektronendichtekarte und hatte einen R_{work} von 30 % sowie einen R_{free} von 28 %. Mit Hilfe des Bleidatensatzes war eine Lösung weder unter Verwendung der SAD noch der *SIRAS* Methode möglich.

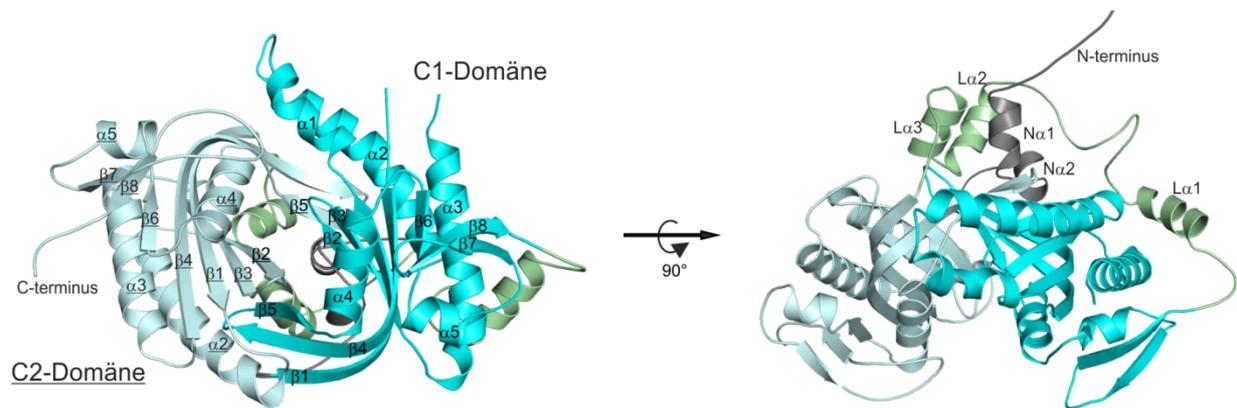


Abbildung 4.4: Struktur der katalytischen Domäne der hsAC in *apo*-Form. Übersicht über die Sekundärstrukturelemente in *Cartoon*-Darstellung. **A** Die katalytische Domäne C1 ist in cyan eingefärbt und die C2 Domäne in hellem cyan. Die verschiedenen Sekundärstrukturen sind einzeln markiert (C2-Elemente unterstrichen). **B** Die Struktur aus A um 90 ° gedreht. Hierbei ist deutlich das 4-Helixbündel zu erkennen, welches durch die N-terminalen Helices (grau) und zwei der *Linker*-Helices (grün) gebildet wird.

Die *apo*-Struktur der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase zeigt eine kompakte Dimerisierung der beiden katalytischen Domänen C1 (AS 33-218) und C2 (AS 288-463), welche *head-to-tail* zueinander angeordnet sind (Abb. 4.4A). Die Sekundärstrukturelemente wurden mit Hilfe des DSSP (*Define secondary structure of Protein*) Algorithmus definiert.^[142] Beide katalytischen Domänen sind durch einen *Linker* (AS 219-287) verbunden, der aus drei α -Helices ($L\alpha 1$ - $L\alpha 3$) besteht. Hierbei bilden die beiden Helices $L\alpha 2$ und $L\alpha 3$ mit den beiden zusätzlichen N-terminalen Helices $N\alpha 1$ und $N\alpha 2$ eine Subdomäne, die als 4-Helixbündel (Abb. 4.4B) beschrieben werden kann. Im *Linker*-Bereich befindet sich auch ein Cystein, welches chemisch durch β -Mercaptoethanol, das als Reduktionsmittel im Reinigungspuffer enthalten ist, modifiziert ist. Die Struktur enthält darüber hinaus keinerlei Hinweise auf posttranslationale Modifikationen. Der N-terminale Teil des Enzyms (AS 1-33) weist einen zusätzlichen unstrukturierten Bereich (AS 1-12) auf (Abb. 4.4B). Die katalytische Domäne C1 besitzt mit je acht zentralen β -Stränge und fünf α -Helices alle cyclasetypischen Strukturelemente (Abb. 4.4A). In der katalytischen Domäne C2 (Abb. 4.4A) ist dagegen keine $\alpha 1$ -Helix vorhanden.

Zwei *Loop*-Bereiche sind in der Struktur sehr variabel. Zum Einen der *Loop* zwischen Aminosäure 350 und 360, welcher lediglich mit einer Besetzung von 60 % im Modell

abgebildet werden konnte. Zum Anderen ein zweiter *Loop*-Bereich (AS 133-140), der so variabel ist, dass hier keine Modellierung möglich ist. Des Weiteren besitzt die Struktur viele Aminosäuren (etwa 4 % aller Aminosäuren) die eine zweite rotamere Konformation der Seitenketten aufweisen.

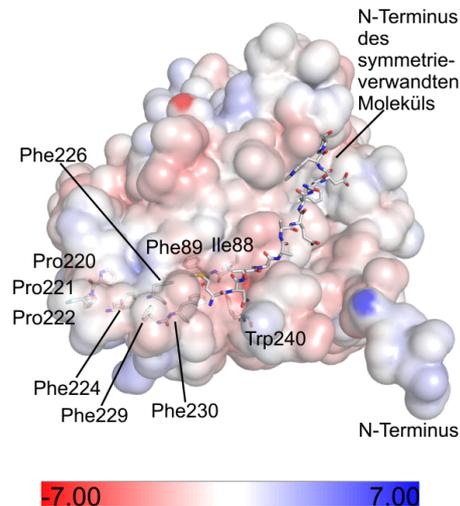


Abbildung 4.5: Oberflächendarstellung der hydrophoben Bindetasche der *apo*-Struktur. Elektrostatische Darstellung der Oberfläche des hydrophoben Bereichs, welcher mit dem N-Terminus eines symmetrieverwandten Proteinmoleküls (*Stick*-Darstellung) interagiert.

Das Protein besitzt darüber hinaus einen hydrophoben Bereich, der durch die Reste Phe89, Pro220-222, Phe224, 226, 229, 230 und Trp240 gebildet wird. Im Kristall assoziiert der 12-Aminosäuren lange unstrukturierte N-terminale Bereich eines symmetrieverwandten Monomers mit diesem hydrophoben Bereich (Abb. 4.5).

4.3 Die lösliche Adenylyl-Cyclase im Komplex mit ApCpp

Um die Substratbindestelle der löslichen Adenylyl-Cyclase zu untersuchen wurde eine Komplexstruktur mit einem nicht-hydrolysierbaren Substratanalogon gelöst. Es konnte sowohl durch Inkubation der *apo*-Kristalle mit 180 mM ApCpp und divalenten Kationen als auch durch Cokristallisation mit 7,5 mM ApCpp sowie je 15 mM $MgCl_2$ und $CaCl_2$ (Tab. 2 Anhang), eine Komplexstruktur erhalten werden. Um eine Cokristallisationsbedingung zu finden, wurde per *Seeding* mit *apo*-Kristallen 96 Kristallisationsbedingungen *gescreent*. Es konnten dabei erfolgreich 14 neue initiale Kristallisationsbedingungen (Tab. 3 Anhang) identifiziert werden. Eine dieser weiter optimierten Bedingungen (Tab. 2 Anhang) führte schließlich zur ApCpp-Struktur, die eine Auflösung von 2,20 Å hat (Tab. 1 Anhang). Das Protein kristallisierte in der gleichen Raumgruppe wie die *apo*-Form ($P6_3$).

Parallel dazu wurden *apo*-Kristalle mit 180 mM ApCpp inkubiert. Die daraus resultierende Komplexstruktur hat eine Auflösung von 1,95 Å. Mit Hilfe der *apo*-Struktur und Molekularem Ersatz konnten beide Strukturen gelöst werden. Beide erhaltenen Strukturen sind bis auf einzelne Lösemittelmoleküle identisch. Im Folgenden wird jeweils die kokristallisierte ApCpp-Struktur analysiert und mit anderen Strukturen verglichen.

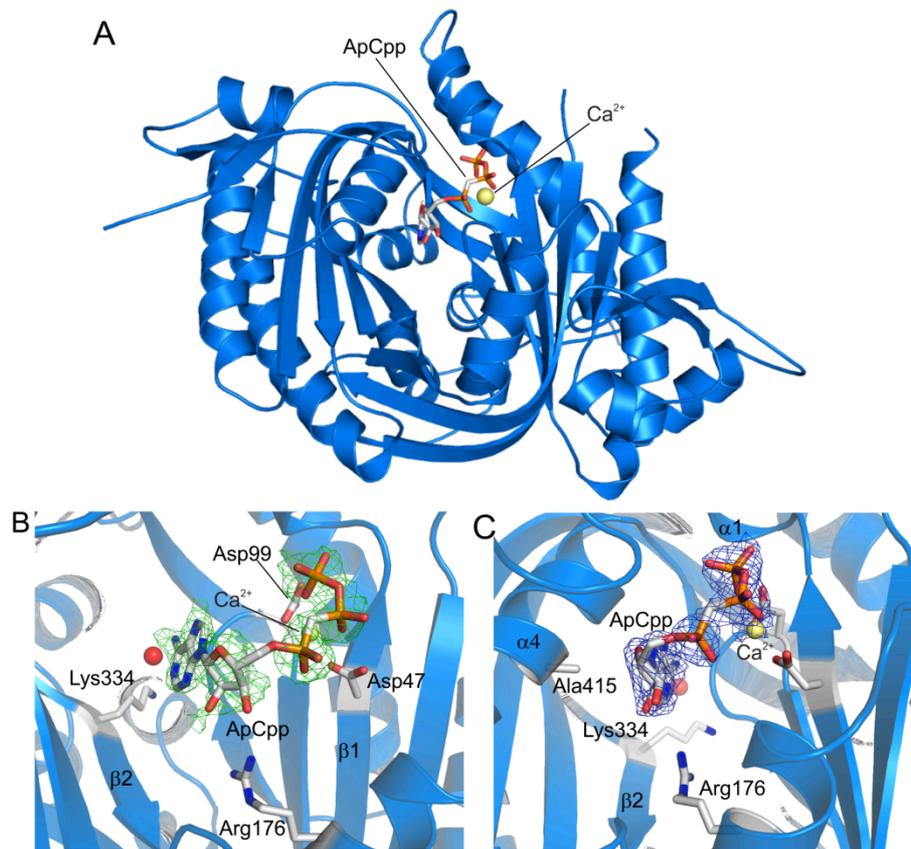


Abbildung 4.6: Darstellung des ApCpp-Komplexes. **A** Gesamtstruktur der ApCpp-Struktur mit ApCpp (*Stick*-Darstellung) und einem Ca^{2+} Ion (gelbe Kugeldarstellung), die im aktiven Zentrum der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase binden. **B** ApCpp-Bindestelle mit Substratanalogen und Aminosäuren in *Stick*-Darstellung sowie Ca^{2+} in Kugeldarstellung (gelb). Der Ligand ist mit der *omit* $F_o - F_c$ Differenzdichte (grün) bei einem σ -Wert von 2 überlagert. **C** ApCpp-Bindestelle mit Substratanalogen und Aminosäuren in *Stick*-Darstellung sowie Ca^{2+} in Kugeldarstellung (gelb). Der Ligand ist mit der $2F_o - F_c$ -Dichte (blau) bei einem σ -Wert von 1 überlagert.

Die Topologie des ApCpp-Komplexes bleibt im Vergleich zur *apo*-Struktur fast identisch. (Abb. 4.6A). Das Substratanalogen ApCpp ist sowohl in der Differenzdichte $F_o - F_c$ (Abb. 4.6B) also auch nach Einfügen in das Strukturmodell in der $2F_o - F_c$ (Abb. 4.6C) gut definiert. Einzelne Sekundärstrukturelemente und Aminosäuren zeigen jedoch weitreichende Änderungen zur *apo*-Struktur. Die Elongation des $\beta 1$ -Faltblattes (C1-Domäne) in Richtung der $\alpha 1$ -Helix, sowie die daraus resultierende Entwindung der $\alpha 1$ -Helix (C1-Domäne) sorgen dafür, dass sich die Bindestelle für das Substrat, genauer des Pyrophosphatanteils, bilden kann (Abb. 4.7). Besonders deutlich wird die Veränderung am Asp99, welches keine Salzbrücke mehr mit dem Arg176 eingeht, sondern mit Asp47 die Ionenbindestelle B bildet. Die

Seitenkette des Asp99 bewegt sich um 7,5 Å in Richtung Ionenbindestelle B. Das Asp47 bewegt sich um 1 Å weiter in Richtung Ionenbindestelle B (Abb. 4.7).

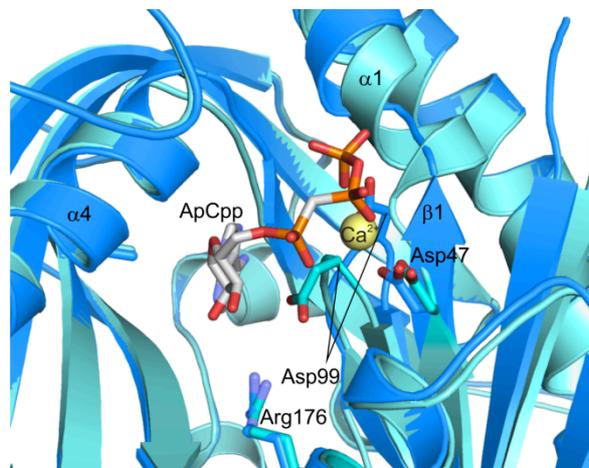


Abbildung 4.7: Vergleich des ApCcpp-Komplexes mit der *apo*-Struktur. Überlagerung des ApCcpp-Komplexes (blau) mit der *apo*-Struktur (cyan) in der *Cartoon*-Darstellung. ApCcpp (Kohlenstoffe in grau) und wichtige Aminosäuren in *Stick*-Darstellung.

Die Ionenbindestelle B ist in der ApCcpp-Struktur vermutlich mit einem Calcium besetzt. Dies deutet sich bei Vergleichen der Koordinationsgeometrie (6-fach-Koordination) sowie der Abstände (2,3–3,2 Å) des divalenten Kations zu seinen Koordinationspartnern an (Tab. 4.4).^[143,144]

Tabelle 4.4: Koordination des Ca²⁺-Ions in der ApCcpp-Struktur. Abstände der Aminosäuren zum Calciumion.

Koordination Ca ²⁺ -Ions	Abstand [Å]
Ile48 Carbonylsauerstoff	2,1
Asp 47	2,5
Asp 99	2,3
γ-Phosphat-Sauerstoff	2,5
β-Phosphat-Sauerstoff	2,7
H ₂ O	3,0

Koordiniert wird das Ion B (Abb. 4.7) neben den beiden Aspartaten und den γ- und β-Phosphatsauerstoffen von einem Wassermolekül sowie dem Carbonylsauerstoff des Ile48. Die Ionenbindestelle A ist in der ApCcpp-Struktur nicht besetzt. Das Ion A bindet während der Reaktion vermutlich nur transient, um den pentavalenten Übergangszustand zu stabilisieren.^[16,40]

Neben den Aspartaten bewegen sich die Aminosäuren 48-54, lokalisiert am Ende des β1-Faltblattes und Anfang der C1 α1-Helix, aus der Substratbindestelle heraus in eine offene Konformation, welche nun eine Substratbindung erlaubt. Das Ser49 dreht sich um etwa 5 Å

und interagiert nach Bindung des Substratanalogons nun mit dem Sauerstoff des β -Phosphates (2,6 Å). Dies wird erst möglich durch die Positionsänderung des Asp47, welches nun nicht mehr das Peptidrückgrat des Ser49 blockiert. Das Asp47 ist durch die Positionierung des Ions B in relativer Nähe zum Sauerstoff des β -Phosphates (2,8 Å) gerückt. Das Thr52 (2,5 Å) sowie das Asn412 (2,9 Å) koordinieren einen der Sauerstoffe am γ -Phosphat (Abb. 4.8). Das Substratanalogon ApCpp wird am γ -Phosphat außerdem von den Amidstickstoffen der Aminosäuren 50-52 (2,9-3,0 Å), einem Wassermolekül (2,3 Å) und Asp99 (2,5 Å) koordiniert. Das Arg416 koordiniert das α -Phosphat (2,8 Å) und die 3'-Hydroxylgruppe (3,9 Å). Der Zucker wird am Ringsauerstoff durch Asn412 koordiniert (3,4 Å, Abb. 4.7). Die beiden 2'- und 3'-Hydroxylgruppen der Ribose zeigen in einen hydrophoben Bereich der durch die Phenylreste 296, 336 und 338 gebildet wird (Abb. 4.8). Im Mittelpunkt dieser hydrophoben Tasche liegt das Arg176 (etwa 4 Å Abstand zur 2' und 3'OH-Gruppe).

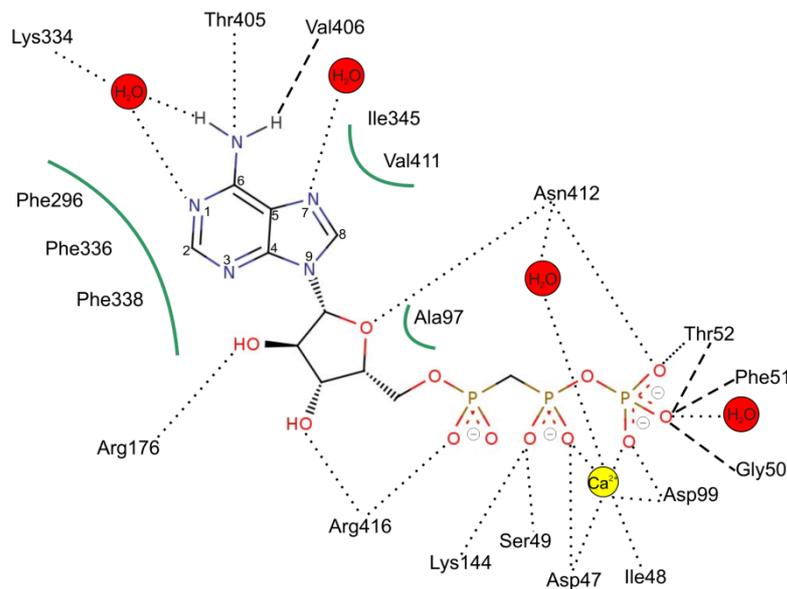


Abbildung 4.8: Zweidimensionale Darstellung der ApCpp-Koordination. ApCpp mit Aminosäuren der Umgebung, die das Substratanalogon koordinieren. Interaktion mit Seitengruppe der Aminosäuren ···, Interaktion mit dem Peptidrückgrat ---.

Der Adeninrest liegt ebenfalls in dem bereits für andere ACs beschriebenen hydrophoben Bereich, der in Richtung Adeninbindestelle durch Val411 und Ile345 erweitert wird. Die 6-Aminogruppe wird nur durch den Carbonylsauerstoff des Val406 (2,8 Å), sowie einem weiteren Wassermolekül (2,9 Å) koordiniert (Abb. 4.8). An Position 7N wird der Adeninrest in der Struktur von einem Wassermolekül koordiniert (2,9 Å). Eine direkte Interaktion der Purinbase durch das in ACs konservierte Lysin (Lys334) ist in der Struktur nicht zu erkennen, stattdessen interagiert das Lys334 indirekt über ein Wassermolekül mit der Base.^[16] Das

Lys334 verbleibt dabei in seiner *apo*-Position. Die Methylengruppe zwischen α - und β -Phosphat interagiert nicht mit dem Protein.

Bei einer genauen Betrachtung der Oberflächenpotentiale der $hsAC_{cat}$ -Struktur fällt auf, dass die Oberfläche des Proteins, welche den Eingang zum katalytischen Zentrum bildet, überwiegend positiv geladen ist (Abb. 4.9A).

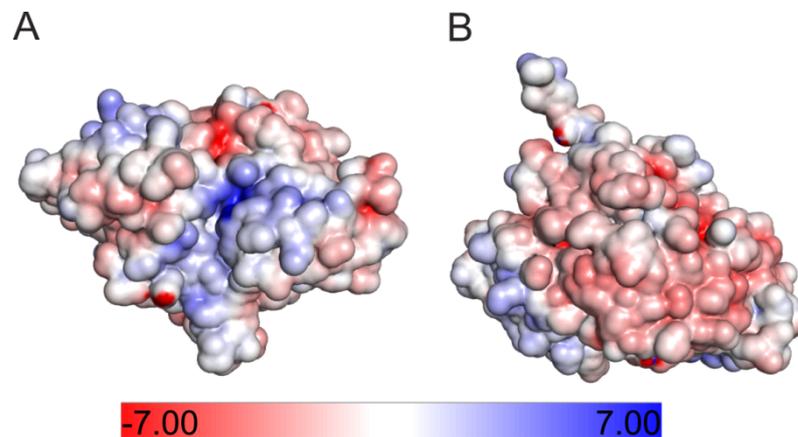


Abbildung 4.9: Oberflächendarstellung der $hsAC_{cat}$ -Struktur. **A** Elektrostatistische Oberfläche der $hsAC_{cat}$ -Struktur mit positiven Potentialen in blau, die zum aktiven Zentrum führen (Frontalansicht des katalytischen Zentrums). **B** Elektrostatistische Oberfläche der katalytisch abgewandten Seite der $hsAC_{cat}$ -Struktur mit negativen Potentialen in rot.

Das Substrat mit seinen negativ geladenen Phosphatgruppen kann daher leicht zur Substratbindestelle geleitet werden. Die entgegengesetzte Proteinoberfläche auf der abgewandten Seite ist stark negativ geladen (Abb. 4.9B).

4.4 Substratinteraktion der löslichen Adenylyl-Cyclase

4.4.1 ATP

Substratanaloga können, bedingt durch die Tatsache, dass sie nicht exakt dem Substrat entsprechen, teilweise unterschiedlich in der Substratbindestelle binden.^[41] Daher wurde auch die Bindung des Substrates ATP strukturell untersucht. Hierfür wurden *apo*-Kristalle mit ATP und verschiedenen Kationenkombinationen inkubiert.

Die Inkubation der *apo*-Kristalle mit 180 mM ATP und 180 mM $MgCl_2$ (Tab. 2 Anhang) resultiert in einer Struktur mit 1,80 Å (Tab. 1 Anhang), welche jedoch lediglich das Nebenprodukt Pyrophosphat (PP_i), komplexiert durch ein Mg^{2+} -Kation in der Ionenbindestelle B, enthält. Die Pyrophosphat-Bindestelle stimmt mit der Position des β - und γ -Phosphat des ApCpp-Liganden überein. Das Magnesiumion ist nur 5-fach koordiniert

(Tab. 4.5), da der Carbonylsauerstoff des Ile48 nicht mit dem Kation interagiert. Die Abstände sind vergleichbar zur Calcium-Koordination.

Tabelle 4.5: Koordination des Mg^{2+} -Ions in der *in-situ*- PP_i -Struktur. Abstände der Aminosäuren zum Magnesiumion.

Koordination Mg^{2+} -Ions	Abstand [\AA]
Asp 47	2,6
Asp 99	2,3
γ -Phosphat-Sauerstoff	2,9
β -Phosphat-Sauerstoff	2,8
H_2O	3,2

Die Umsetzung von ATP zum Produkt cAMP und Pyrophosphat (Abb. 4.10A) konnte in den Kristallen ablaufen, ohne dass die Konformationsänderung der Integrität des Kristallgitters schadet. Lys334 verbleibt in der Struktur nach der Reaktion unverändert und interagiert auch hier nicht mit dem N1-Stickstoff der Purinbase. Das Produkt cAMP ist nicht sichtbar und dissoziiert offenbar nach der Cyclisierungsreaktion aus dem Kristall (Abb. 4.10A).

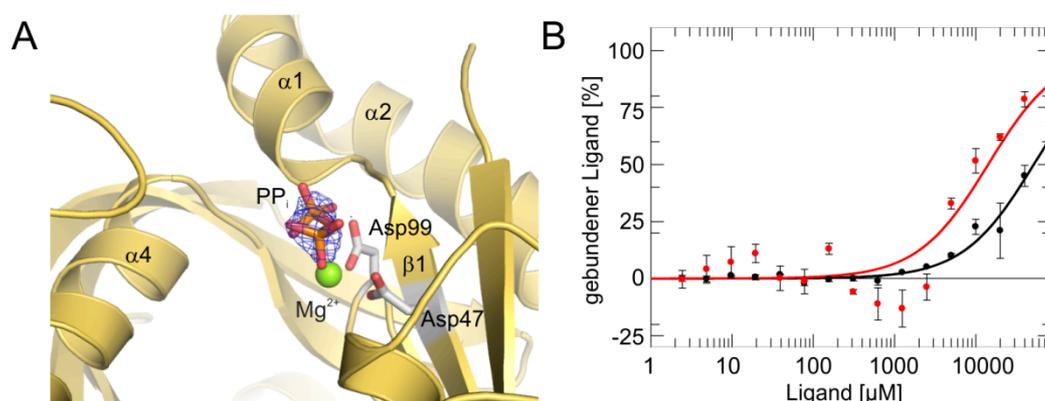


Abbildung 4.10: Umsatz von ATP in Kristallen und Affinität der Produkte. **A** Resultierende Struktur des ATP/ $MgCl_2$ -Soaks. PP_i überlagert mit der $2F_o-F_c$ -Differenzdichte in blau bei einem σ -Wert von 1. Aminosäuren in *Stick*-Darstellung sowie Mg^{2+} in Kugeldarstellung (grün). **B** Messung der Affinitäten für PP_i ($K_d = 14,2 \pm 0,3$ mM, rot) und cAMP ($K_d = 54,2 \pm 13,4$ mM, schwarz) zum *apo*-Enzym in Anwesenheit von Calcium.

Eine Inhibition durch das Substrat ATP bei hohen Konzentrationen, wie es in Lösung beobachtet wurde, ist in der Struktur nicht zu erkennen. Ein Vergleich der Affinitäten des Produkts cAMP und des Nebenprodukts Pyrophosphat (Abb. 4.10B) macht deutlich, dass das PP_i mit etwa 14 mM einen vierfach höhere Affinität zum $hsAC_{cat}$ -Protein besitzt als cAMP. Die höhere Affinität könnte den Verbleib von ausschließlich Pyrophosphat in der Struktur erklären. Die Affinität für cAMP konnte lediglich abgeschätzt werden, da hier keine Sättigung erreicht wurde.

Da PP_i eine messbare Affinität zum Enzym ausweist und bekannt ist, dass bereits geringe Konzentrationen der Produkte einen Einfluss auf die Aktivität von tmACs haben, im Besonderen durch eine unkompetitive Inhibierung durch Pyrophosphat, wurde deren Einfluss auf die Cyclisierungsreaktion von $hsAC_{cat}$ (Abb. 4.11) untersucht.^[44]

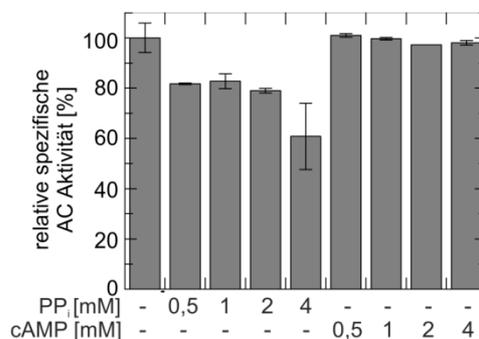


Abbildung 4.11: Einfluss der Produkte auf die Adenylyl-Cyclaseaktivität der hsAC. Untersucht wurde der Einfluss von Pyrophosphat- und cAMP-Konzentrationen im Bereich von 0,5-4 mM auf die Adenylyl-Cyclaseaktivität der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase.

Aus Löslichkeitsgründen wurden nur Produktkonzentrationen bis maximal 4 mM unabhängig voneinander untersucht. Pyrophosphat zeigt hierbei einen leicht inhibitorischen Effekt, der entweder auf eine kompetitive Bindung von PP_i oder auf die Komplexbildung von divalenten Ionen durch PP_i in der Lösung basieren könnte. cAMP zeigt keinerlei Inhibition der Cyclisierungsreaktion.

Um doch eine Struktur mit divalenten Ionen zu erhalten wurden die spezifischen Aktivitäten mit verschiedenen divalenten Kationen verglichen.

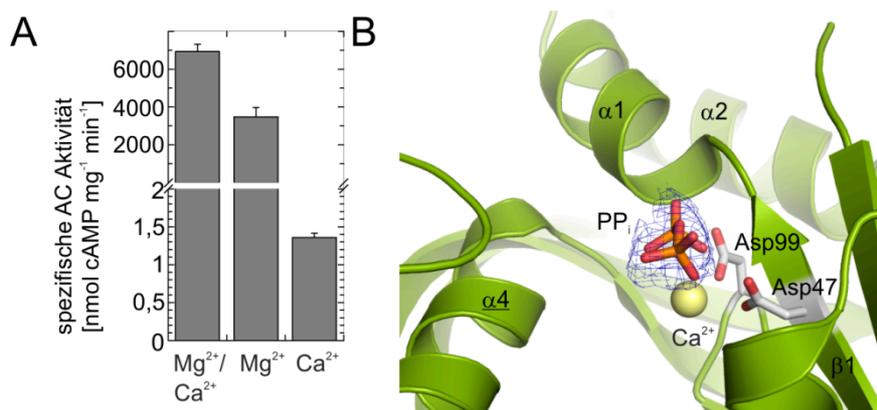


Abbildung 4.12: Einfluss von divalenten Ionen auf die hsAC. **A** Aktivität in Anwesenheit von je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen $6,93 \pm 0,38 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, 20 mM Mg^{2+} Ionen $3,48 \pm 0,50 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ und 20 mM Ca^{2+} Ionen $1,36 \pm 0,06 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. **B** Resultierende Struktur des ATP/ $CaCl_2$ -Soaks. PP_i überlagert mit der $2F_o - F_c$ -Differenzdichte (blau, bei einem σ -Wert von 1). Aminosäuren in *Stick*-Darstellung sowie Ca^{2+} in Kugeldarstellung (gelb).

Die spezifische Aktivität des $hsAC_{cat}$ -Proteins verringert sich von $6,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Ca^{2+} und Mg^{2+}) um die Hälfte auf $3,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Abb. 4.12A), wenn nur Magnesiumionen

für die Besetzung der beiden Ionenbindestellen zur Verfügung steht. Diese Aktivität reicht aus, um ATP im Kristall zu Pyrophosphat und cAMP umzusetzen. Die spezifische Aktivität des $hsAC_{cat}$ -Proteins in Anwesenheit von ausschließlich $CaCl_2$, führt zu einem Aktivitätsverlust um das 7000-fache auf $1,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Abb. 4.12A).

*Soaking*versuche mit 150 mM ATP und äquivalenten Mengen an Calciumchlorid (Tab. 2 Anhang) führten jedoch trotz der geringen Aktivität zu einer Struktur (Auflösung $2,00 \text{ \AA}$, Tab. 1 Anhang), die lediglich das Nebenprodukt Pyrophosphat enthält (Abb. 4.12B). Das Ca^{2+} -Ion, welches das PP_i koordiniert, ist wie im Falle des *in-situ*- PP_i -Komplexes hierbei nur 5-fach koordiniert (Tab. 4.6).

Tabelle 4.6: Koordination des Ca^{2+} -Ions in der *in-situ*- PP_i -Struktur. Abstände der Aminosäuren zum Calciumion.

Koordination Ca^{2+} -Ions	Abstand [\AA]
Asp 47	2,9
Asp 99	2,6
γ -Phosphat-Sauerstoff	2,6
β -Phosphat-Sauerstoff	2,9
H_2O	2,9

Das Pyrophosphat bindet vergleichbar zum β - und γ -Phosphat des ApCcp-Liganden. Calciumionen sind in der Lage, die Funktion des transient gebundenen Ions A, zu übernehmen. Dieser Vorgang scheint im Kristall im Vergleich zur Lösung stark verbessert, da hier die Reaktion lediglich stark verlangsamt abläuft.

Um enzymatische Aktivität auszuschließen wurden *apo*-Kristalle ohne Zugabe von divalenten Ionen mit 200 mM ATP (Tab. 2 Anhang) inkubiert. Die resultierende Struktur hatte eine Auflösung von $2,05 \text{ \AA}$ und enthält ATP als gebundenen Liganden.

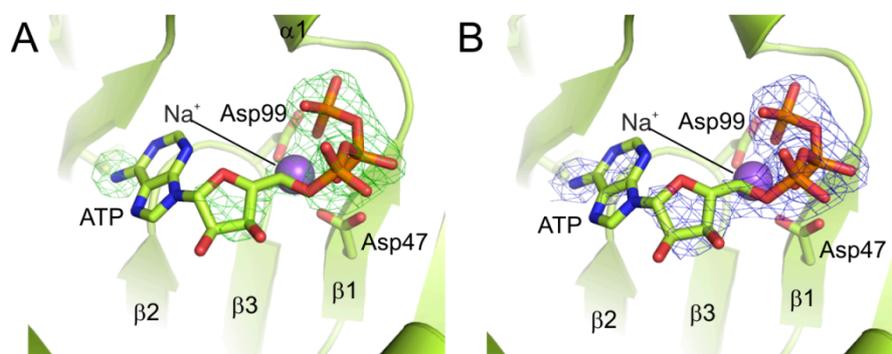


Abbildung 4.13: Struktur der $hsAC_{cat}$ mit gebundenem ATP. **A** ATP-Struktur der löslichen Adenylyl-Cyclase überlagert mit der *omit* F_o - F_c -Dichte (grün, bei einem σ -Wert von 3). **B** ATP-Struktur der löslichen Adenylyl-Cyclase überlagert mit der $2F_o$ - F_c -Dichte (blau, bei einem σ -Wert von 1). Aminosäuren und Ligand in *Stick*-Darstellung sowie Na^+ in Kugeldarstellung (lila).

Die Differenzdichte $F_o - F_c$ (Abb. 4.13A) bildet die drei Phosphate des ATPs deutlich ab. Nach Verfeinerung der Struktur mit dem ATP-Liganden sind diese ebenfalls deutlich in der $2F_o - F_c$ -Dichtekarte zu erkennen (Abb. 4.13B).

Die Ionenbindestelle B ist wahrscheinlich durch ein Natriumion, welches aus der Kristallisationsbedingung stammt, besetzt. Das Ion wird dabei 5-fach koordiniert (Tab. 4.6) und dient als Bindungspartner für den ATP-Liganden. Die Abstände der Koordinationspartner zum Na^+ sind mit 2,1 Å - 2,5 Å wie erwartet geringer als beim Mg^{2+} oder Ca^{2+} .

Tabelle 4.7: Koordination des Na^+ -Ions in der ATP-Struktur. Abstände der Aminosäuren zum Natriumion.

Koordination Na^+ -Ions	Abstand Å
Asp 47	2,5
Asp 99	2,4
γ -Phosphat-Sauerstoff	2,1
β -Phosphat-Sauerstoff	2,4
H_2O	2,3

Die Dichte für den Adenosinrest, besonders für die Purinbase, ist vergleichsweise schwach (Abb. 4.13), was auf eine hohe Flexibilität des Liganden hinweist.

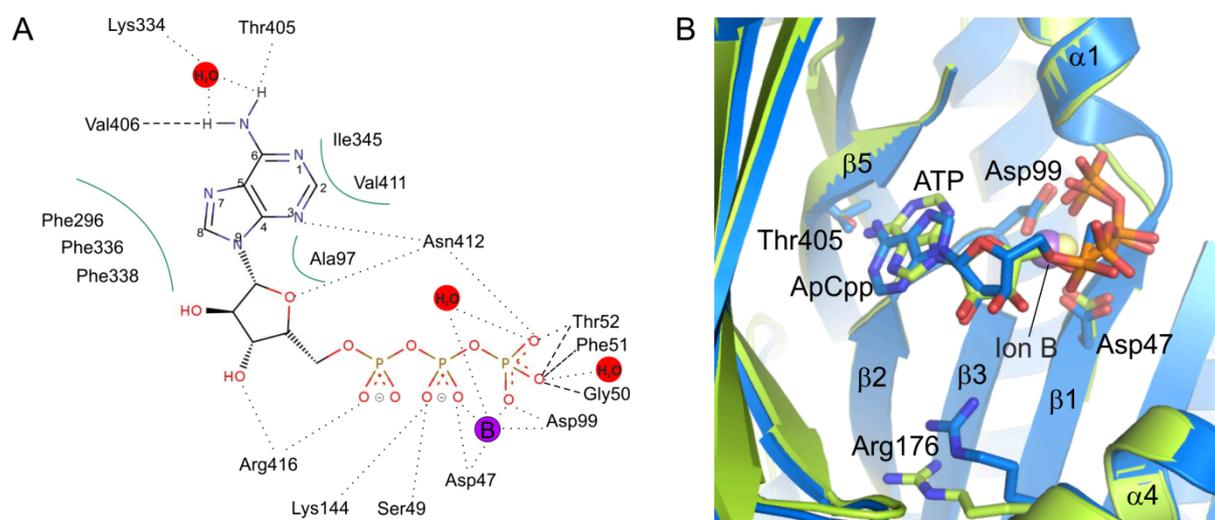


Abbildung 4.14: Bindung des ATP-Liganden. **A** Zweidimensionale Darstellung der ATP-Koordination. ATP mit Aminosäuren die das Substratanalogon koordinieren. Interaktion mit Seitengruppe der Aminosäuren \cdots , Interaktion mit dem Peptidrückgrat der Aminosäuren $- - -$. **B** Überlagerung des aktiven Zentrums der ATP-Ligandenstruktur in grün und der ApCpp-Struktur in cyan. Liganden in *Stick*-Präsentation und Ion B in Kugeldarstellung (lila = Na^+ und gelb Ca^{2+}).

Die Bindung des ATPs im hsAC_{cat} -Protein (Abb. 4.14A) ist teilweise vergleichbar mit der Bindung des Substratanalogons ApCpp. Das γ -Phosphat wird durch Asp99 (2,6 Å), Thr52 (2,9 Å), Asn412 (3,0 Å) und den Amidstickstoffen der Aminosäuren 50-52 (2,9-3,1 Å)

koordiniert. Die Aminosäuren Ser49 (2,7 Å), Lys144 (2,9 Å) und Asp47 (2,5 Å) bilden die Interaktionspartner für das β -Phosphat. Der Ringsauerstoff der Ribose wird durch das Asn412 (3,1 Å) koordiniert. Der Adenosinrest des ATPs bindet in die gleiche hydrophobe Tasche wie die Purinbase des Substratanalogons ApCcp. Die Base ist jedoch im Vergleich zum gebundenen ApCcp Liganden um etwa 180 ° um die *N*-glykosidische Bindung verdreht (syn-Konformation, Abb. 4.14B). Der Adeninrest wird dabei vom Carbonylsauerstoff des Val406 (2,7 Å) und der Seitenkette des Thr405 (3,5 Å) koordiniert, sowie einem Wassermolekül (2,5 Å), welches zwischen Lys334 und Base positioniert ist.

Ein Vergleich der ATP-Komplexstruktur mit der ApCcp-Komplexstruktur zeigt eine sehr geringe Abweichung beider Strukturen mit einem RMSD = 0,2 Å für 452 C $_{\alpha}$ -Atome (Abb. 4.14B). Die gebundenen Liganden hingegen zeigen eine strukturelle Abweichung von durchschnittlich RMSD = 1,9 Å für alle Ligandatome und einer maximalen Abweichung von bis zu 4,5 Å (Abb. 4.14B). Während die Lage des γ - und β -Phosphates identisch ist, ändert sich die Position des α -Phosphates um 1,3 Å. Diese Verschiebung setzt sich bis zum Adenosin fort, welches hier nicht mehr durch das Arg176 koordiniert wird (Abb. 4.14B). Die exakte Position der Base kann nicht genau beschrieben werden, da sie sehr schlecht durch die Differenzdichte definiert ist (Abb. 4.13A). Diese hohe Flexibilität deutet auf eine geringe Koordination des Liganden hin.

4.4.2 GTP

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase zeigt eine signifikante Guanylyl-Cyclaseaktivität von 0,76 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Diese Aktivität ist jedoch mit etwa 7,5 % verglichen zur Adenylyl-Cyclaseaktivität sehr gering (Abb. 4.15A).

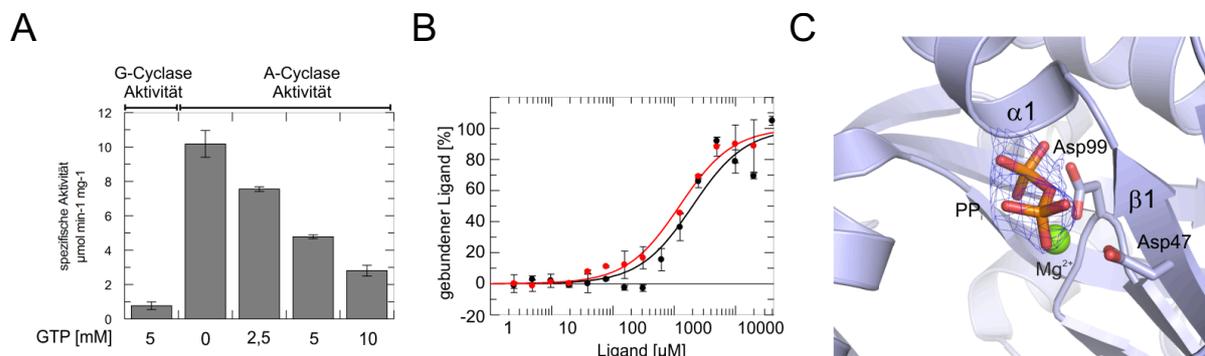


Abbildung 4.15: Einfluss von GTP auf die hsAC. **A** Die lösliche Adenylyl-Cyclase besitzt eine geringe G-Cyclaseaktivität von 7,5 % ($0,76 \pm 0,22 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) verglichen mit der A-Cyclaseaktivität. GTP wirkt inhibitorisch auf die A-Cyclaseaktivität mit einem K_i von etwa 1 mM. **B** Die Affinitäten von ATP ($2,03 \pm 0,42 \text{ mM}$, schwarz) und GTP ($1,22 \pm 0,07 \text{ mM}$, rot) sind vergleichbar. **C** Resultierende Struktur des GTP/MgCl₂-Soaks. PP_i überlagert mit der 2F_o-F_c-Dichte (blau, bei einem σ -Level von 1). Aminosäuren in Stick-Darstellung sowie Mg²⁺ in Kugeldarstellung (grün).

Die Affinitäten von GTP und ATP liegen mit 2,0 mM für ATP und 1,2 mM für GTP im vergleichbaren Rahmen (Abb. 4.15B) und weisen darauf hin, dass es erst nach der Bindung des Substrates und damit während der Umsetzung zur Diskriminierung zwischen den Purinbasen kommt. Durch die vergleichbaren Affinitäten kann GTP die lösliche Adenylyl-Cyclase kompetitiv mit einem K_i von ~ 1 mM inhibieren.

Das *soaken* von *apo*-Kristallen mit 200 mM GTP und 200 mM Mg^{2+} (Tab. 2 Anhang) resultierte, trotz der geringeren G-Cyclaseaktivität in Kristallen, in einer Struktur die lediglich PP_i und Mg^{2+} enthält (Tab. 1 Anhang). Die Umsetzung von GTP in Anwesenheit von Magnesiumionen scheint, trotz der geringen Aktivität in Lösung, wie bei ATP/Ca^{2+} im Kristall stark verbessert zu sein. Das Magnesiumion gebunden in der Ionenbindestelle B ist 4-fach durch die Aspartate 99 (2,2 Å) und 47 (2,6 Å) und dem β - und γ -Phosphat (2,8 Å und 2,7 Å) koordiniert (Abb. 4.15C).

4.5 Produktkomplexe der löslichen Adenylyl-Cyclase

Neben den bereits gezeigten *in situ* hergestellten Produktkomplexen durch Inkubation von *apo*-Kristallen mit ATP oder GTP und divalenten Kationen werden im Folgenden weitere Produktkomplexe untersucht, um Details der Cyclisierung weiter aufzuklären.

4.5.1 Pyrophosphat-Komplex

Durch Inkubation der *apo*-Kristalle mit 50 mM Pyrophosphat und äquimolarer Konzentration an $MgCl_2$ (Tab. 2 Anhang) konnte eine Pyrophosphat-Komplexstruktur mit einer Auflösung von 2,0 Å (Tab. 1 Anhang) erhalten werden (Abb. 4.16A).

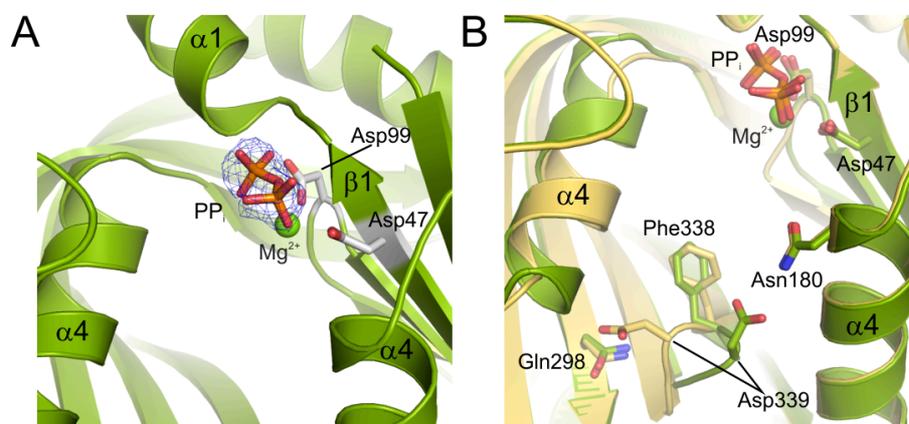


Abbildung 4.16: Pyrophosphat-Komplex der hsAC. **A** PP_i -Komplex der löslichen Adenylyl-Cyclase überlagert mit der $2F_o-F_c$ -Dichte (blau, bei einem σ -Wert von 1) für den Liganden PP_i (Stick-Präsentation). **B** Vergleich des gesoakten PP_i -Komplexes (grün) und des *in situ*, durch Inkubation der Kristalle mit ATP/Mg^{2+} hergestellten Komplexes (gelb). Mg^{2+} in Kugeldarstellung (grün) sowie die Aminosäurereste und jeweiligen Liganden in Stick-Darstellung.

Das Magnesium, welches die Ionenbindestelle B besetzt, ist durch die Sauerstoffe des Phosphats (3,0 Å) sowie durch die Aspartate 99 (2,3 Å) und 47 (2,6 Å) 4-fach koordiniert. Die Gesamttopologie ist mit den *in situ* hergestellten Pyrophosphat-Komplexen (PP_i-*in-situ*-Komplex) vergleichbar (RMSD = 0,9 Å für 452 C_α-Atom). Lediglich die Aminosäuren Phe338 und Asp339, welche auf dem C2 β2-β3 *Loop* lokalisiert sind, zeigen eine um etwa 4 Å (C_α-Position, 7 Å Asp339 Carboxylgruppe) verschobene Position im PP_i-*in situ*-Komplex verglichen mit der PP_i-Struktur (Abb. 4.16B). Im *in-situ*-PP_i-Komplex bildet das Asp339, welches in einer Tasche aus drei Methioninen zeigt (Met300, 418, 419), Wasserstoffbrücken zum Gln298 aus. Im PP_i-Komplex hingegen interagiert das Asp339 mit seiner Seitenkette mit dem Asn180 (3,2 Å) und mit dem Carbonylsauerstoff seines Peptidrückgrats mit der Seitenkette des Gln304 (2,8 Å).

4.5.2 cAMP-Komplex

Trotz der geringen Affinität des Produktes cAMP zur löslichen Adenylyl-Cyclase konnte durch Inkubation der Kristalle mit 200 mM cAMP (Tab. 2 Anhang) eine cAMP-Komplexstruktur erhalten werden (Auflösung 1,9 Å, Tab. 1 Anhang). Die Struktur enthält zwei cAMP-Moleküle. Neben der Bindung von cAMP im aktiven Zentrum wurde eine zweite cAMP-Bindestelle mit 100 % Besetzung identifiziert (Abb. 4.17A).

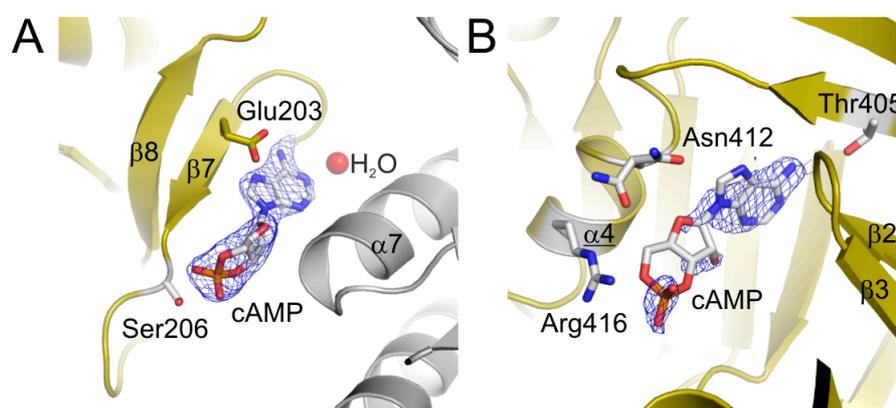


Abbildung 4.17: cAMP-Bindestellen in der hsAC-Struktur. **A** cAMP gebunden im Kristallkontakt zwischen β7-Faltblatt (oliv) und α1-Helix eines symmetrieverwandten Moleküls (grau). Koordinierende Aminosäuren und cAMP in *Stick*-Darstellung. Gebundener Ligand mit der 2F_o-F_c-Dichte in blau bei einem σ-Level von 1σ überlagert. **B** Zweite Bindestelle für den cAMP-Liganden (*Stick*-Darstellung) im aktiven Zentrum überlagert mit der 2F_o-F_c-Dichte in blau bei einem σ-Level von 1σ.

Diese zweite cAMP-Bindestelle befindet sich im Kristallkontakt mit einem symmetrieverwandten Molekül zwischen der α2-Helix eines hsAC Moleküls und dem β7-Faltblatt eines weiteren Proteinmoleküls. Das Phosphat wird mit seinen Sauerstoffen vom Ser206 sowohl über die Seitenkette (2,7 Å), als auch dem Amidstickstoff (2,7 Å) durch

Wasserstoffbrücken positioniert. Die Purinbase bildet am N6-Stickstoff zu den Carbonylsauerstoffen von Ile202 (2,7 Å) und Arg199 (2,4 Å) Wasserstoffbrücken aus. Der Adeninrest wird des Weiteren an N1-Position durch ein Wassermolekül (2,6 Å) und an N7-Position durch das Glu203 (3,5 Å) koordiniert (Abb. 4.17A).

Im aktiven Zentrum wird das cAMP durch insgesamt vier Wasserstoffbrücken zum Protein koordiniert (Abb. 4.17B). Das Arg416 koordiniert den 5'-Sauerstoff (2,6 Å) und das Asn412 den Ringsauerstoff der Ribose (3,2 Å). Die Aminogruppe an N6 wird durch das Thr405 (3,2 Å) sowie dem Carbonylsauerstoff des Val406 (2,5 Å) positioniert (Abb. 4.17B). Auffällig ist, dass die Besetzung des cAMP-Bindestelle im aktiven Zentrum mit etwa 80 % schlechter ist als die der zweite artifizielle Bindestelle des Liganden (100 %) im Kristallkontakt. Das Asn412 weist außerdem eine doppelte Konformation auf, dies kann im Zusammenhang mit der schlechten Besetzung des Liganden stehen. Das gesamte aktive Zentrum zeigt die substratgebundene aktive Konformation, die im Substratkomplex beobachtet wurde, mit einer vollständig ausgebildeten Ionenbindestelle B, welche jedoch nicht besetzt ist.

4.5.3 cAMP- und Pyrophosphat-Komplex

Ein Ligandenkomplex, der sowohl cAMP als auch Pyrophosphat enthält, konnte durch Inkubieren der *apo*-Kristalle mit 200 mM cAMP, 50 mM Pyrophosphat und 50 mM MgCl₂ (Tab. 2 Anhang) erhalten werden.

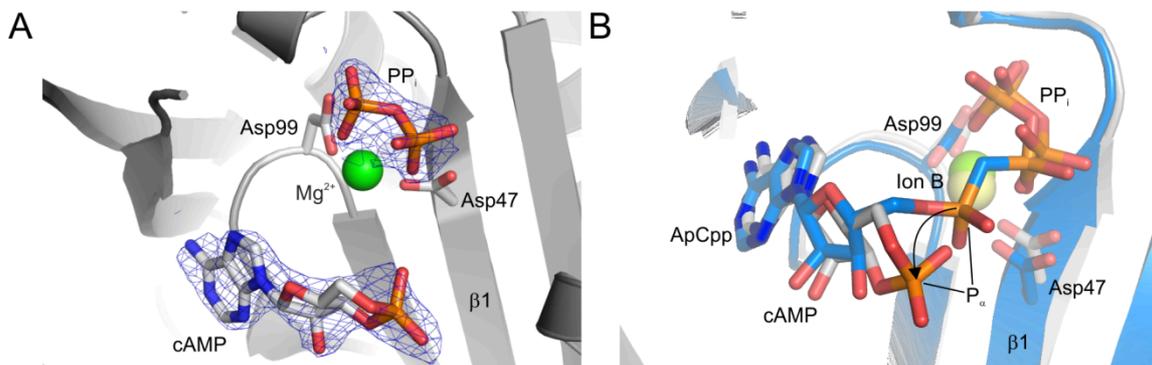


Abbildung 4.18: Produktkomplexe mit cAMP und PP_i. **A** Produktkomplex überlagert mit der 2F_o-F_c-Dichte in blau bei einem σ -Level von 1. **B** Vergleich der ApCpp-Struktur (blau) und des Produktkomplexes mit cAMP und PP_i (grau) mit Fokus auf der Positionsänderung des α -Phosphates. Mg²⁺ (grün) und Ca²⁺ (gelb) in Kugeldarstellung gekennzeichnet als Ion B. Aminosäuren und Liganden in *Stick*-Darstellung.

Die Struktur hat eine Auflösung von 1,95 Å (Tab. 1 Anhang) und enthält beide Produkte. Die Liganden sind durch die 2F_o-F_c-Dichte gut beschrieben (Abb. 4.18A). Die Besetzung des cAMP Liganden im aktiven Zentrum der Struktur ist, bei gleichen Bedingungen und Konzentration verbessert, wenn gleichzeitig mit Pyrophosphat *gsoaked* wurde. Die zweite

artifizielle cAMP-Bindestelle im Kristallkontakt ist weiterhin mit einem cAMP-Molekül besetzt. Die Liganden werden von den gleichen Aminosäuren koordiniert, wie dies auch im cAMP-Komplex oder Pyrophosphat-Komplex der Fall ist. Die Veränderung, die im C2 β 2- β 3 *Loop* im PP_i -*in-situ*-Komplex (Abb. 4.18B) zu beobachten ist, ist auch in dieser Struktur gegeben. Es müssen offenbar beide Produkte anwesend sein, beziehungsweise gewesen sein, um diese Änderung auszulösen. In den Strukturen, die nur cAMP, PP_i oder das Substratanalogon enthalten, ist die Position des C2 β 2- β 3 *Loop* vergleichbar zur *apo*-Struktur. Ein Vergleich des Produktkomplexes mit cAMP und Pyrophosphat und des ApCpp-Komplexes zeigt deutlich, dass β - und γ -Phosphat sich nicht bewegen. Die Position des α -Phosphates ändert sich um 3,8 Å im Vergleich zur ApCpp-Struktur (Abb. 4.18B), beziehungsweise um 4,6 Å im Vergleich zum ATP-Struktur, in Richtung der 3'-Hydroxylgruppe der Ribose, um das Produkt bilden zu können. Dadurch koordiniert das Arg416 nun nicht mehr das α -Phosphat sondern nur noch den 5'-Sauerstoff des cAMP (2,8 Å). Das Arg176 interagiert weiterhin mit den 2'- und 3'-OH der Ribose.

4.6 Aktivierung der humanen löslichen AC

4.6.1 Bicarbonat

Eine Aktivierung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase durch Bicarbonat ($\text{EC}_{50} \sim 11 \text{ mM}$) wurde erstmals in Spermien gezeigt.^[45] Die Erhöhung der intrazellulären HCO_3^- -Konzentration führt zu einer Steigerung der hsAC Aktivität sowie zum Ausbleiben des autoinhibitorischen ATP Effekts.^[45,68,85,86]

Die Bicarbonatbindestelle (BBS) konnte in einem Komplex mit HCO_3^- (Auflösung 1,7 Å, Tab. 1 Anhang) identifiziert werden (Abb. 4.19A). Hierzu wurden *apo*-Kristalle mit 50 mM Bicarbonat inkubiert (Tab. 2 Anhang). Bicarbonat konnte in der regulatorischen vorhergesagten Bindestelle in einer sehr guten F_0 - F_c Elektronendifferenzdichte identifiziert werden. Dabei weist diese Differenzdichte eine vollkommend planare und trigonale Form auf (Abb. 4.19B).

Das HCO_3^- -Ion wird durch Lys95 (2,7 Å) und Arg176 (2,9 Å) über eine Wasserstoffbrücke und ionische Interaktionen koordiniert. Die Guanidiniumgruppe des Arginins interagiert hierbei fast coplanar mit den Sauerstoffen des Bicarbonats (Abb. 4.19C). Die weitere hydrophobe Umgebung bilden zwei Valine 167 (3,7 Å) und 172 (3,5 Å) sowie ein Leucin 166 (3,6 Å). Es kommt zur Ausbildung weiterer Wasserstoffbrücken mit dem Peptidrückgrat des

Val167 (2,6 Å Carbonylsauerstoff und 2,9 Å Amidstickstoff) und des Met337 (3,0 Å Amidstickstoff).

A

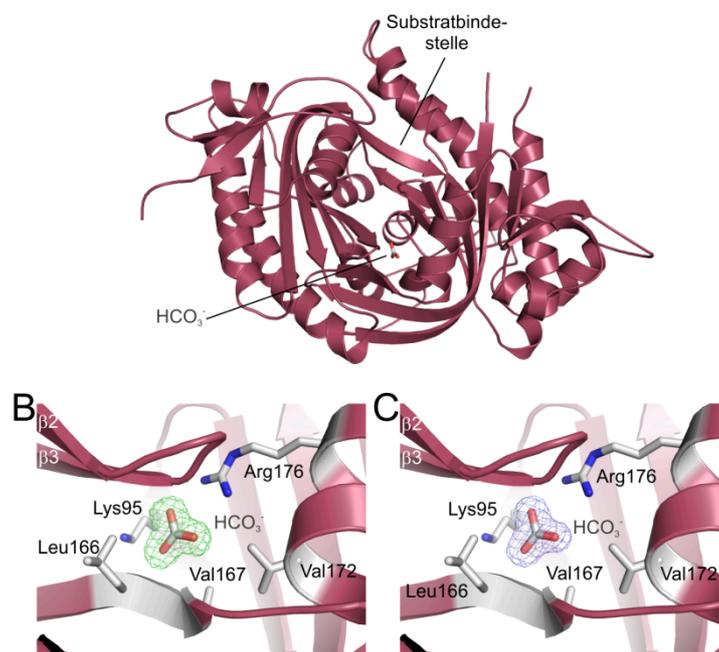


Abbildung 4.19: HCO_3^- -Komplexstruktur von hsAC_{cat} . **A** Darstellung der Gesamttopologie der HCO_3^- -Komplexstruktur mit HCO_3^- in *Stick*-Darstellung. **B** Bindestelle von Bicarbonat in hsAC_{cat} mit koordinierenden Aminosäuren und HCO_3^- in *Stick*-Darstellung, sowie die Überlagerung der *omit* F_0 - F_c -Differenzdichte (grün) bei einem σ -Level von 3. **C** Bicarbonat (*Stick*-Darstellung) in der BBS gebunden überlagert mit der $2F_0$ - F_c -Dichte in blau bei einem σ -Wert von 1. Aminosäuren in *Stick*-Darstellung.

Um die Bindestelle des Bicarbonats zu validieren wurden *apo*-Kristalle mit strukturell ähnlichen Ionen wie Biselenit (2,05 Å) und Bisulfit (1,80 Å) inkubiert (Tab. 1 und 2 Anhang). Hier konnte das anomale Signal des Selen beziehungsweise des Schwefels zur eindeutigen Identifizierung der Position in der BBS verwendet werden.

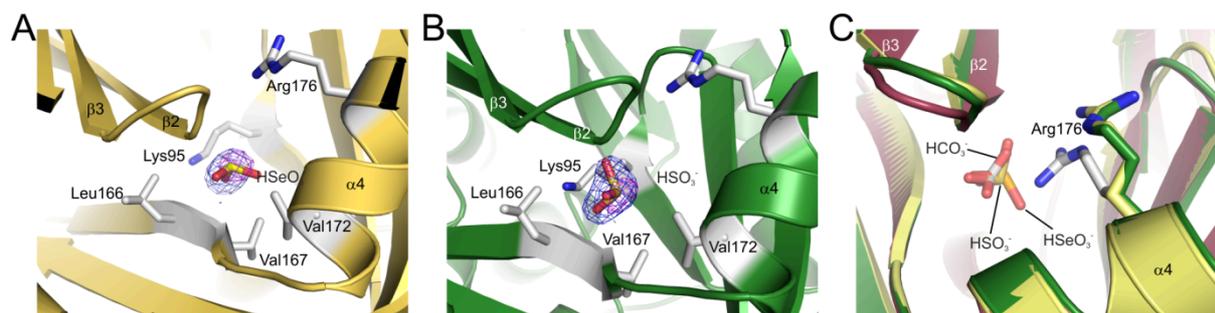


Abbildung 4.20: Validierung der BBS durch HSeO_3^- und HSO_3^- . **A** Komplexstruktur von hsAC mit Biselenit. Koordinierende Aminosäuren und Ligand in *Stick*-Darstellung. HSeO_3^- mit $2F_0$ - F_c -Dichte in blau bei einem σ -Level von 1 und der anomalen Dichte in pink bei einem σ -Wert von 3 überlagert. **B** Struktur der löslichen AC mit Bisulfit in der BBS. Aminosäuren sowie HSO_3^- in *Stick*-Darstellung. Der Ligand ist mit $2F_0$ - F_c -Dichte in blau bei einem σ -Level von 1 und der anomalen Dichte in pink bei einem σ -Wert von 3 überlagert. **C** Vergleich der Bicarbonatstruktur (rot), Biselenitstruktur (gelb) und der Bisulfitstruktur (grün). Arg176 und Liganden in *Stick*-Darstellung. Kohlenstoffatome der HCO_3^- -Struktur (Arg176) in grau dargestellt.

Biselenit und Bisulfit binden an der gleichen Position wie Bicarbonat, werden aber auf Grund ihrer unterschiedlichen Geometrie anders koordiniert. Das Biselenit-Ion (Abb. 4.20A) sitzt in einer Tasche, die von Leu102 (2,8 Å) und 166 (3,8 Å) sowie Val167 (2,9 Å) gebildet wird. Zusätzlich bildet HSeO_3^- eine Salzbrücke mit Lys95 (2,8 Å). Das Bisulfit-Ion (Abb. 4.20B) wird, neben der Salzbrücke, die das Lys95 (2,7 Å) ausbildet, hauptsächlich durch das Peptidrückgrat des Val167 und Met337 koordiniert. Die Seitengruppen des Val167 (3,7 Å) und Leu166 (3,8 Å) sind darüber hinaus in räumlicher Nähe zum HSO_3^- .

Die Gesamttopologie der drei Komplexe ist unverändert (RMSD 1,1-1,3 Å für 456 C_α -Atome), jedoch sind in der Bicarbonatstruktur verschiedene kleine Änderungen zu beobachten. Im Gegensatz zu den HSeO_3^- - und HSO_3^- -Komplexstrukturen ist die Position des Arg176 stark verändert (Abb. 4.20C). Die Salzbrücke zum Asp99 ist nicht mehr vorhanden und die Guanidiniumgruppe des Arg176 hat sich um 4 Å in Richtung Bicarbonat gedreht um das Ion zu koordinieren (Abb. 4.21A). Diese Freisetzung des Asp99 setzt sich in einer Bewegung des C1 β 2- β 3 Loops fort. Das Asp99 bewegt sich dabei in Richtung der Ionenbindestelle B, erreicht jedoch die Endposition, vergleichbar zur Position in der ApCcp-Struktur nicht. (Abb. 4.21A).

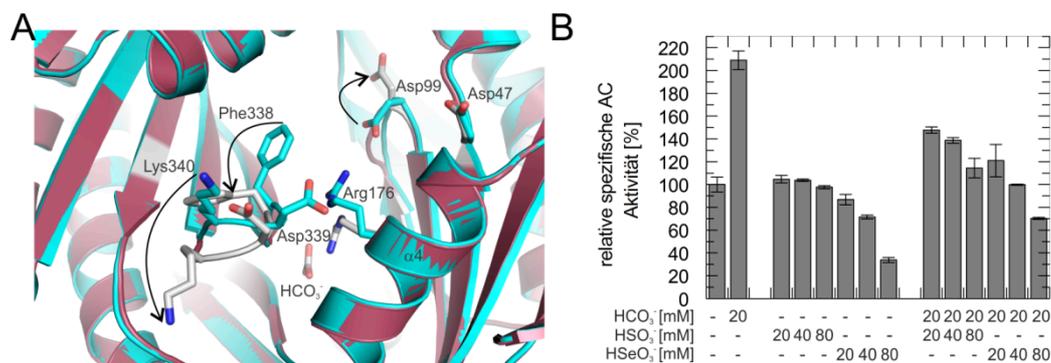


Abbildung 4.21: Einfluss von Bicarbonat, Biselenit und Bisulfit auf hsAC_{cat} . **A** Überlagerung der apo-Struktur (cyan) mit der HCO_3^- -Struktur (rot). Seitenketten und Ligand in Stick-Darstellung (Kohlenstoffe der Bicarbonatstruktur in grau). Bewegung der Seitenketten ausgelöst durch die Bindung des Bicarbonations mit Pfeilen hervorgehoben. **B** Einfluss von Bicarbonat, Biselenit und Bisulfit auf die hsAC Cyclaseaktivität.

Das Phe338, welches etwa 4 Å neben dem Arg176 positioniert war, bildet in der Bicarbonatstruktur nicht mehr die hydrophobe Tasche mit Phe296 und 336, sondern schiebt sich zwischen Asn298 und Met300. Um dies zu ermöglichen bewegen sich auch Asp339 und Lys340 auf die Außenseite des Proteins (Abb. 4.21A).

Bisulfit und Biselenit sind in der Lage in die BBS zu binden, jedoch können sie hsAC_{cat} nicht aktivieren. In Aktivitätsmessungen konnte ein leichter inhibitorischer Effekt von HSO_3^- und HSeO_3^- nachgewiesen werden. Eine Konzentration von 20 mM Bicarbonat aktiviert das

Enzym, dabei steigt die Aktivität auf etwa 200 %. Dieser aktivierende Effekt durch HCO_3^- kann durch Bisulfit oder Biselenit verringert werden (Abb. 4.21B).

In der Bicarbonatbindestelle konnte in anderen Strukturen weitere Ionen lokalisiert werden. In der *apo*-Struktur bindet ein Acetation, welches durch Lys95 (2,8 Å), Leu166 (3,2 Å), den Carbonylsauerstoff des Val167 und einem Wassermolekül positioniert wird (Abb. 4.22A). In der ApCpp-Struktur oder PP_i -Strukturen besetzt ein Chloridion die Aktivatorbindestelle (Abb. 2.22B). Das Ion wird durch das Lys95 (2,8 Å) koordiniert. Darüber hinaus bilden zwei Wassermoleküle (3,2 Å und 3,7 Å), Val166 (4,1 Å) und der Amidstickstoff des Val167 (3,3 Å) die direkte Umgebung des Chloridions. Das Chloridion und das Acetation stammen aus der jeweiligen Kristallisationsbedingung. Cl^- wurde aber auch durch *Soaken*, in Form von MgCl_2 oder CaCl_2 , in den Kristall eingebracht.

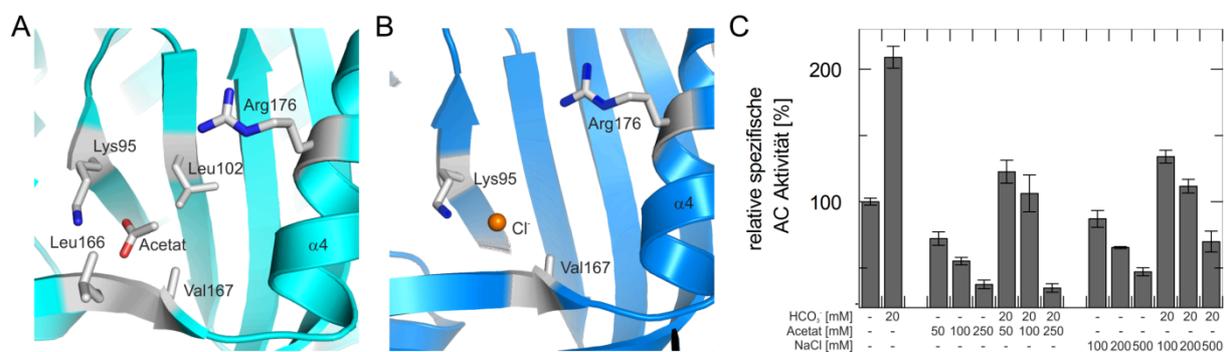


Abbildung 4.22: Einfluss von Ionen auf das hsAC_{cat}-Protein. **A** Dargestellt ist die BBS der *apo*-Struktur, die mit einem Acetation besetzt ist. Wichtige Aminosäuren sowie der Ligand sind in *Stick*-Darstellung hervorgehoben. **B** Regulatorische Bindestelle in der ApCpp-Struktur mit einem Chloridion (orangefarbene Kugeldarstellung) besetzt. Aminosäuren in *Stick*-Darstellung. **C** Einfluss von Acetat und Chlorid auf die spezifische Cyclaseaktivität der humanen löslichen AC.

In Aktivitätsmessungen zeigten hohe Konzentration an Acetat oder Chloridionen ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die lösliche Adenylyl-Cyclase. Dieser inhibitorische Effekt kompetitiert mit dem aktivierenden Effekt durch Bicarbonat (Abb. 4.22C).

Keines der getesteten Ionen konnte einen aktivierenden Effekt, der vergleichbar zu Bicarbonat ist, hervorrufen (Abb. 4.21). Außerdem zeigte das Arg176 lediglich in der HCO_3^- -Struktur in Richtung BBS um das Ion (HCO_3^-) dort zu komplexieren (Abb. 4.19C).

Biochemische Untersuchungen zeigen, dass Bicarbonat eine Erhöhung der maximalen Geschwindigkeit bedingt und den autoinhibitorischen Effekt durch ATP aufhebt. Die strukturellen Effekte, die Bicarbonat im Enzym hervorruft, können den Aktivierungsmechanismus noch nicht vollständig aufklären. Um einen möglichen Einfluss auf die Freisetzung der Produkte zu untersuchen, wurden die Affinitäten des Substrates als auch der Produkte cAMP und Pyrophosphat in Anwesenheit von 50 mM Bicarbonat gemessen

(Abb. 4.23). Bicarbonat kann die Affinität zum Substrat ATP auf 0,9 mM im Vergleich zur Affinität ohne Aktivator (Abb. 4.15B) verdoppeln. Das entstehende Produkt Pyrophosphat ist in Anwesenheit von Bicarbonat mit 30,7 mM nur noch halb so affin (Abb. 4.10B). Darüber hinaus erhöht sich die Affinität von cAMP auf 18,6 mM (Abb. 4.23 und 4.10B), was der Affinität von Pyrophosphat ohne Bicarbonat entspricht. Sowohl die Affinität von cAMP als auch von PP_i sind lediglich Abschätzungen, da hier kaum Messwerte in der Sättigung vorhanden sind.

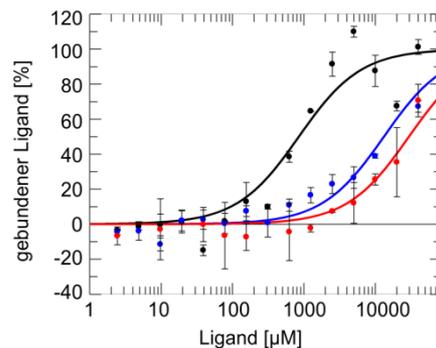


Abbildung 4.23: Einfluss von Bicarbonat auf Substrat- und Produktaffinität. **A** Affinität von ATP (K_d $0,9 \pm 0,1$ mM schwarz) und cAMP (K_d $18,6 \pm 6,1$ mM, blau) und für PP_i (K_d $30,7 \pm 12,1$ mM, rot) in Anwesenheit von 50 mM Bicarbonat.

4.6.2 Komplexstruktur mit Aktivator und Substrat

Der Einfluss auf das *apo*-Protein, sowie die Validierung der BBS konnten bereits geklärt werden. Um jedoch den gesamten Mechanismus der Bicarbonataktivierung strukturell aufzuklären, wurde versucht Strukturen mit Aktivator und Substrat oder Produkt zu untersuchen.

Um eine Struktur mit Aktivator und Substratanalogon der hsAC zu erhalten wurden kokristallisierte ApCpp-Kristalle mit 40-50 mM Bicarbonat inkubiert (Tab. 2 Anhang). Die resultierende Struktur enthält jedoch lediglich das Substratanalogon. Ein gleichzeitiges Inkubieren von Substratanalogon und 50 mM Bicarbonat führte zu sehr schlecht aufgelösten Strukturen (Tab. 2 Anhang). Die Auflösung reduzierte sich auf 3,2 Å und die Struktur enthält lediglich das Substratanalogon (Tab. 1 Anhang). Wurden die Kristalle nacheinander, zunächst mit Substratanalogon oder Substrat und anschließend mit Bicarbonat *gesoaked* so zerbrachen sie. Alternativ wurde in der zweiten Inkubationsbedingung die Konzentration des Substrates beziehungsweise des Substratanalogon beibehalten (Tab. 2 Anhang). Dies führte wiederum zur Strukturen, die ausschließlich das Substratanalogon enthalten.

Es wurde weiterhin versucht eine Produkt-Aktivator-Struktur zu erhalten. Hier wurden die Kristalle mit einem oder beiden Produkten cAMP und Pyrophosphat sowie Bicarbonat

inkubiert (Tab. 2 Anhang). In den Strukturen befinden sich lediglich die Produkte. Auch ein sequenzielles *Soaken* führte nicht zum Erfolg.

Darüber hinaus war es möglich kokristallisierte ApCcp-Kristalle mit Bisulfit zu inkubieren (Tab. 2 Anhang) und eine Bisulfit-ApCcp Struktur zu erhalten (Auflösung 2,15 Å, Tab. 1 Anhang).

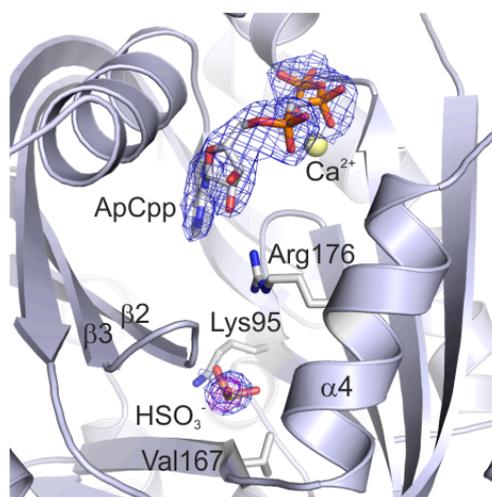


Abbildung 4.24: Komplexstruktur mit Substratanalogon und Bisulfit. Liganden und wichtige Aminosäuren in *Stick*-Darstellung. Das Ca^{2+} -Ion ist in Kugeldarstellung (gelb) hervorgehoben. Überlagerung der $2F_o-F_c$ -Dichte in blau mit einem σ -Wert von 1 für ApCcp und HSO_3^- sowie der anomalen Dichte in pink mit einem σ -Wert von 3) des Schwefelatoms.

Die Position des Bisulfit konnte über das anomale Schwefelsignal genau lokalisiert werden. Das HSO_3^- ist in der Bisulfit-ApCcp-Struktur und der Bisulfit-Struktur identisch koordiniert und das Arg176 ist weiterhin in Richtung Substratanalogon positioniert (Abb. 4.24). Es gibt außerdem keine nennenswerte Unterschiede zwischen dem ApCcp-Komplex in An- oder Abwesenheit von Bisulfit.

4.6.3 Einfluss des pHs

Durch den Einstrom von Bicarbonat in Zellen kommt es gleichzeitig zu einer Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes.^[68] In der Literatur sind widersprüchliche Aussagen bezüglich des Einfluss von pH-Werten auf die humane lösliche Adenylyl-Cyclase zu finden.^[68,76,80] Daher wurde die Aktivität bei verschiedenen pH-Werten überprüft.

Die Messungen zeigten einen klaren Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität des hsAC_{cat} -Proteins. Mit steigendem pH-Wert nimmt bei einem Unterschied von zwei pH-Einheiten auch die Aktivität um das 10-fache zu (Abb. 4.25). Das pH-Optimum des hsAC_{cat} -Proteins liegt weit im alkalischen Bereich.

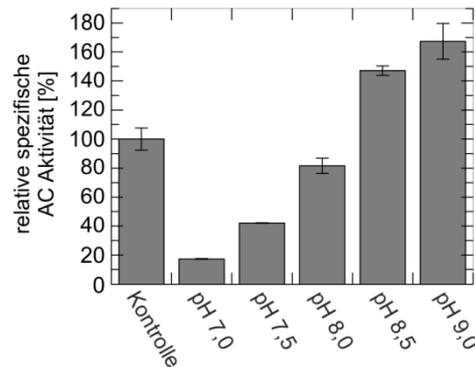


Abbildung 4.25: pH-Optimum der hsAC_{cat}. Einfluss der verschiedenen pH-Werte auf die relative spezifische Aktivität des hsAC_{cat}-Proteins.

Diese Beobachtung wird durch die Tatsache, dass die Zugabe von etwa 40 mM Bicarbonat zur Reaktionsbedingung bereits eine Steigerung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich (etwa 0,8 pH-Einheiten) auslösen kann, interessant. Der eingesetzte Puffer (Tris 50 mM) kann diese Änderung nicht abpuffern. Eine nachträgliche pH-Einstellung wird notwendig. Alternativ kann der pH auch in der Bicarbonatstammlösung eingestellt werden. Beide Varianten den pH-Wert einzustellen, sorgen für eine Gleichgewichtsverschiebung von Bicarbonat zu CO₂, welches entweder in der Lösung verbleibt oder abdampft.

4.7 Inhibitoren

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase gilt als potentiell therapeutisches Zielprotein.^[106] Die spezifische lösliche Adenylyl-Cyclaseaktivität pharmakologisch zu modifizieren hätte verschiedene Anwendungsmöglichkeiten wie beispielsweise die Entwicklung eines männlichen Kontrazeptivums.^[101]

4.7.1 Untersuchung des Inhibitors KH7

Der einzig bekannte Inhibitor KH7 (Abb. 4.25A) neben natürlich vorkommendem Catecholestrogen und 1VE, der selektiv nur die lösliche Adenylyl-Cyclase inhibiert, wurde untersucht.^[72,105,110,145] Der inhibitorische Effekt von KH7 konnte in Aktivitätsmessungen bestätigt werden (Abb. 4.26B). Bei einer Konzentration von 1 µM wird die Aktivität um etwa 50 % herabgesetzt. Die Affinität des Inhibitors liegt mit 4,3 µM im niedrigen mikromolaren Bereich (Abb. 4.26C).

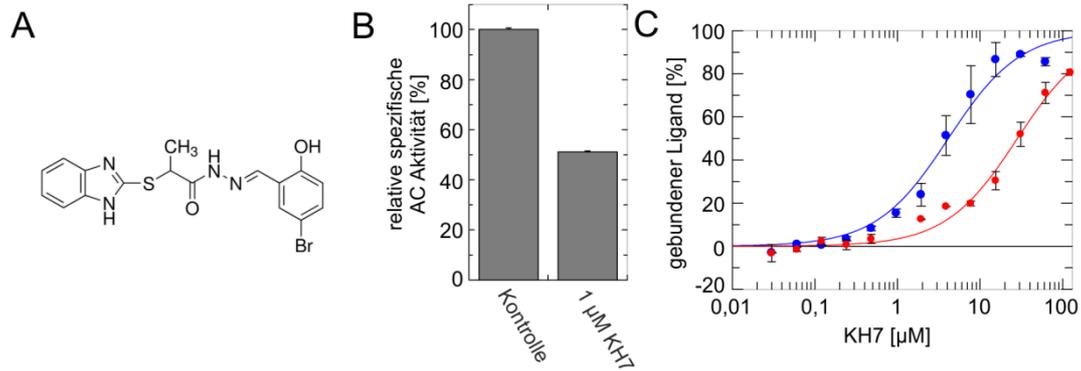


Abbildung 4.26: Charakterisierung von KH7 als sAC-Inhibitor. **A** Chemische Struktur des Inhibitors KH7. **B** Reduzierung der $hsAC_{cat}$ -Aktivität bei 1 μM KH7 auf $51,1 \pm 0,4$ % Restaktivität. **C** Bestimmung der Affinität (K_d) des Inhibitors KH7 zum $hsAC_{cat}$ -Protein sowohl ohne Substrat ($K_d = 4,3 \pm 1,3$ μM , blau), als auch in Anwesenheit von 10 mM ATP ($K_d = 28,9 \pm 4,9$ μM , rot).

Des Weiteren wurde untersucht, ob KH7 kompetitiv oder nicht-kompetitiv mit dem Substrat an das Enzym bindet. Hierzu wurde die Affinität des Inhibitors in Anwesenheit von 10 mM ATP und 15 mM $CaCl_2$ bestimmt. Die Affinität von KH7 verringert sich dabei um das 7-fache auf $K_d = 28,9$ μM (Abb. 4.26C). Die Bindung des Inhibitors wurde auch strukturell untersucht. Hierbei wurden *apo*-Kristalle mit verschiedenen Konzentrationen KH7 *gessoaked* (Tab 2 Anhang).

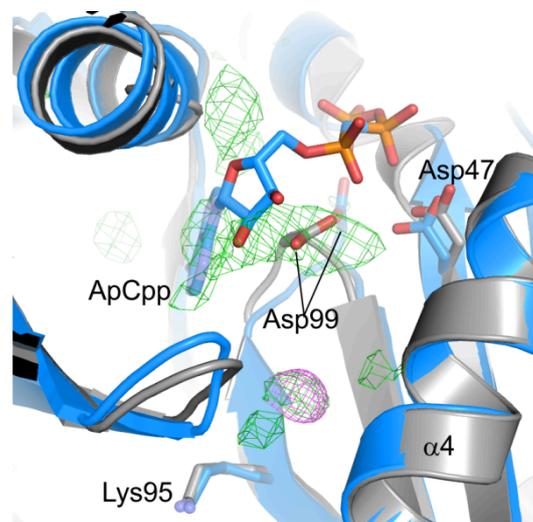


Abbildung 4.27: Anomales Br-Signal von KH7. Vergleich der ApCpp-Struktur (cyan) und der KH7-Struktur (grau) überlagert mit der anomalen Dichte des Broms in pink bei einem σ -Level von 5 und der positiven *omit* $F_o - F_c$ -Differenzdichte in grün bei einem σ -Level 3). Der Ligand ApCpp in *Stick*-Darstellung.

Das anomale Signal des Bromatoms, das in KH7 vorhanden ist, sollte zusätzlich zur Bestimmung der Lage des Inhibitors verwendet werden. Die Ligandenstrukturen hatten eine Auflösung von 2,2-3,0 \AA und zeigten ein schwaches anomales Signal für das Bromatom (Abb. 4.27). Das anomale Signal ist zwischen BBS und Substratbindestelle lokalisiert. Es ist nicht möglich das KH7-Molekül in die zusätzliche $F_o - F_c$ Differenzdichte zu modellieren.

4.7.2 Inhibition durch Stilbene

1,2-Diphenylethene, auch als Stilbene bezeichnet, sind derivatisierte Phenyle, die über eine Ethenbindung in *cis* oder *trans* Stellung miteinander verbunden sind. Zu den bekanntesten Stilben-Derivaten gehört das Resveratrol (Abb. 4.28A), welches im Rotwein vorkommt und Entzündungen durch Induktion eines cAMP Signalweges abmildern kann.^[146,147] Andere Derivate, wie beispielsweise 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS, Abb. 4.28A), sind als spezifische Inhibitoren gegen Anionentransporter bekannt.^[148] Das Stilben-Derivat DIDS kann den zellulären pH-Wert sowie den Bicarbonateinstrom durch Blockade des Bicarbonattransports beeinflussen.^[149,150] Als indirektes Messsignal für diese Untersuchungen wurde die Verringerung der AC-Aktivität der löslichen Adenylyl-Cyclase, welche HCO_3^- -sensitiv ist, verwendet.^[74] Im Folgenden wird der direkte Einfluss, den DIDS auf die lösliche Cyclase ausübt, genauer beleuchtet.

Es wurden die drei Stilbene Resveratrol, Piceatannol (Abb. 4.28A) und DIDS *in vitro* auf ihre inhibitorischen Effekte gegenüber hsAC_{cat} untersucht (Abb. 4.28B). Im Vergleich zu Resveratrol zeigte Piceatannol einen stärkeren inhibitorischen Effekt. Den deutlichsten inhibitorischen Effekt zeigte DIDS (Abb. 4.28B) mit einer Restaktivität von etwa 40 %.

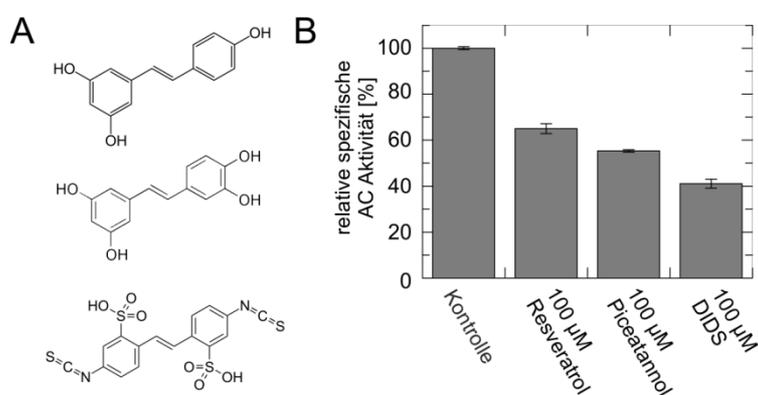


Abbildung 4.28: Stilbene als Inhibitoren. **A** Strukturformel von Resveratrol, Piceatannol und DIDS. **B** Inhibitorischer Effekt von Stilbenen auf die relative spezifische hsAC Aktivität. Gezeigt sind Restaktivitäten bei Zugabe von je 100 µM Resveratrol (65,1 ± 2,2 %), Piceatannol (55,3 ± 0,5 %) und DIDS (41,1 ± 1,9 %)

Um Komplexstrukturen mit den Inhibitoren DIDS und Piceatannol zu erhalten wurden *apo*-Kristalle mit je 20 mM Inhibitorlösung *soaked* (Tab 2 Anhang). Für Piceatannol konnte keine Komplexstruktur erhalten werden. Die *Soaking*experimente mit DIDS führten zu einer Komplexstruktur (Auflösung 1,90 Å, Tab. 1 Anhang), die drei zusätzliche Differenzdichten enthält (Abb. 4.29). In alle drei Differenzdichten konnte je ein DIDS-Molekül modelliert werden.

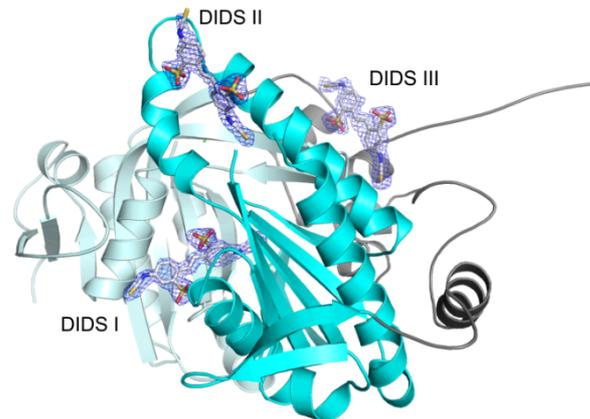


Abbildung 4.29: DIDS-Komplexstruktur. Komplexstruktur mit drei DIDS-Molekülen (*Stick*-Darstellung). Überlagerung der Liganden mit der $2F_o - F_c$ -Dichte in mit einem σ -Level von 1. Die katalytische Domäne C1 ist in hellem Cyan und die C2 Domäne in dunklem Cyan eingefärbt. Linker und N-Terminus sind in grau hervorgehoben.

Das DIDS I Molekül ist im Bereich des aktiven Zentrums lokalisiert (Abb. 4.29). Das zweite DIDS-Molekül bindet am N-Terminus in einem Bereich, der von His19 und His402 gebildet wird (Abb. 4.30A). Diese Vertiefung ist mit Wasser gefüllt, welches mit den Sulfonsäuregruppen Wasserstoffbrücken ausbildet (2,8-3,1 Å). Eine weitere H-Brücke bildet sich zwischen Gln276 und dem Sauerstoff der Sulfonsäuregruppe aus (2,9 Å). Die zweite Sulfonsäuregruppe wird nur durch Asp10 (3,3 Å) und zwei Wassermoleküle (2,7-2,9 Å) koordiniert. Der Stickstoff der Cyanidgruppe bildet eine polare Wechselwirkung mit Asn279 (3,5 Å) und eine elektrostatische Wechselwirkungen mit Arg15 (4,2 Å) aus (Abb. 4.30A).

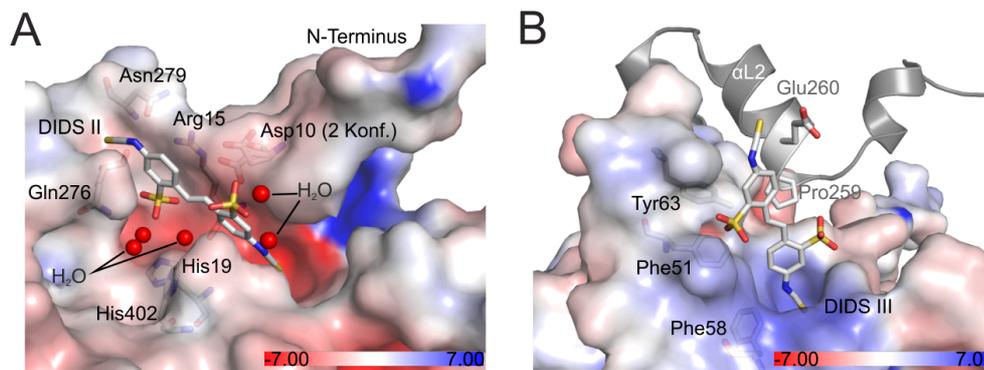


Abbildung 4.30: Detaillierte DIDS II und III Bindestellen. **A** Detailansicht der DIDS II Bindestelle überlagert mit der elektrostatischen Oberfläche des Proteins. Wassermoleküle in Kugeldarstellung (rot) und Aminosäuren sowie Ligand in *Stick*-Darstellung. **B** Bindestelle des DIDS III Moleküls im Kristallkontakt überlagert mit der elektrostatischen Oberfläche des Proteins. Aminosäuren und Ligand in *Stick*-Darstellung. Symmetriemolekül der Einheitszelle in grau dargestellt.

Das dritte DIDS-Molekül interagiert mit dem 4-Helixbündel, welches sich aus N-Terminus und *Linker*-Region zusammensetzt (Abb. 4.30B). Das DIDS-Molekül wird hier außerdem von Aminosäuren der α L2-Helix eines weiteren symmetrieverwandten hsAC Moleküls

komplexiert (Abb. 30B). Phe51 und 58 sowie das Pro259 des symmetrieverwandten Moleküls bilden eine hydrophobe Tasche. Lediglich das Tyr63 (2,7 Å) sowie das Glu260 des Symmetriemoleküls (3,0 Å) bilden Wasserstoffbrücken aus. Diese dritte Ligandenbindestelle im Kristallkontakt war bei *Soaking*versuchen mit niedrigeren Inhibitorkonzentrationen unbesetzt und ist vermutlich nicht relevant für den inhibitorischen Effekt in Lösung.

Das DIDS I Molekül bindet vorwiegend in die hydrophobe Tasche des Adenosins, die von Phe 296, 336, 338, Ala415, Leu345 und Val411 von der einen Seite und Phe45, Ala97, 100 und Leu102 von der anderen Seite, gebildet wird (Abb. 4.31A). Die leichte Verzerrung der planaren aromatischen Ringe weist auf eine gespannte Bindung des DIDS-Moleküls hin. Die Sulfonsäuregruppen werden vorwiegend über elektrostatische Interaktionen koordiniert. Die Sulfonsäuregruppe, die in der Nähe der Ionenbindestelle B positioniert ist, wird schwach durch die ionenbindenden Aminosäuren Asp99 (4,9 Å) und Asp47 (4,3 Å) koordiniert. Die andere Sulfonsäuregruppe interagiert schwach mit Arg416 (4,8 Å), Asn180 (3,6 Å) und Arg176 (3,8 Å), sowie über eine Wasserstoffbrücke mit dem Asp339 (2,9 Å) (Abb. 4.31A).

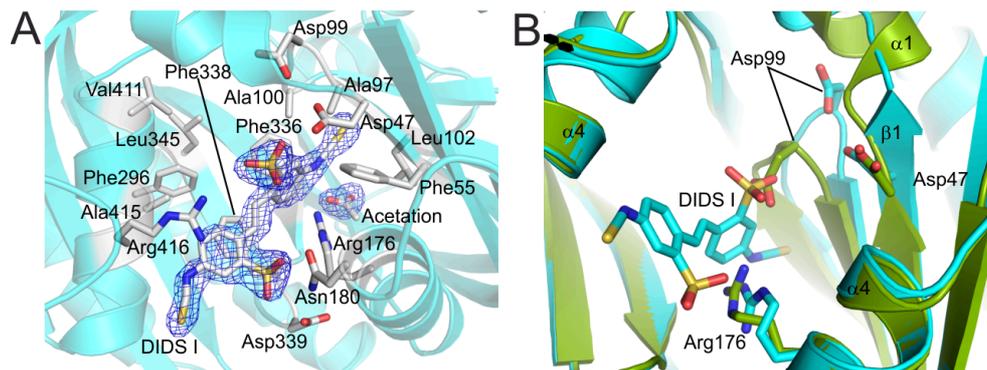


Abbildung 4.31: Bindestelle von DIDS I. **A** Detaillierte Ansicht der DIDS-Bindestelle, sowie koordinierende Aminosäuren (*Stick*-Darstellung). Ligand (*Stick*-Darstellung) überlagert mit $2F_o-F_c$ -Dichte in blau bei einem σ -Wert von 1. **B** Vergleich der DIDS-Struktur (cyan) und der *apo*-Struktur (grün). Gezeigt ist die Bindestelle von DIDS, die durch die Bewegung des $\beta 2$ - $\beta 3$ Loops erst möglich wird. Aminosäuren und Ligand in *Stick*-Darstellung.

Die Gesamttopologie des Proteins bleibt im Vergleich zur *apo*-Struktur weitgehend unverändert. Lediglich der C1 $\beta 2$ - $\beta 3$ Loop sowie die Aminosäuren 49-54 verändern ihre Position. Die resultierende Konformation ist mit der ApC_{pp}-Struktur identisch. Die konformelle Änderung des Proteins, die durch die Bindung mit DIDS induziert wird, lässt sich auf die Positionsänderung des Asp99 zurückführen. Der gesamte $\beta 2$ - $\beta 3$ Loop muss sich in die offene Konformation bewegen, damit eine Bindung des DIDS-Moleküls möglich ist. Dadurch kommt es am Anfang der $\alpha 1$ -Helix zur Entwindung, sowie zur Elongation des $\beta 1$ -Faltblattes. Es bildet sich dabei die Ionenbindestelle B vollständig aus (Abb. 4.31A).

Um die verschiedenen Bindestellen für DIDS weiter zu charakterisieren wurde die Affinität von DIDS an das *apo*-Enzym bestimmt.

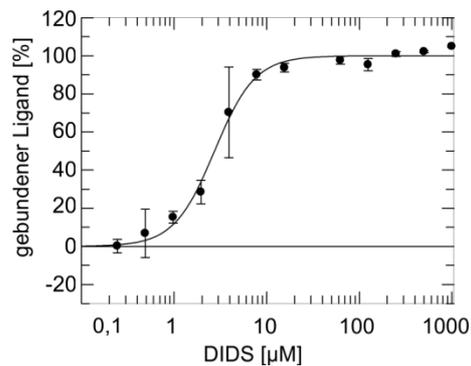


Abbildung 4.32: Bindung von DIDS. Affinitätsmessung von DIDS an die *apo*-Form der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase. ($EC_{50} = 2,73 \pm 0,18 \mu\text{M}$, Hill-Koeffizient $n = 1,99 \pm 0,23$).

Die Bindungskurve zeigt hierbei einen sigmoidalen Verlauf, was auf eine kooperative Bindung hindeutet. Der Hill-Koeffizient n beträgt zwei und gibt Hinweise auf eine positive Kooperativität für die Bindung von DIDS-Molekülen an die lösliche Adenylyl-Cyclase. Das deutet an, dass die Bindung eines Inhibitormoleküls an das $hsAC_{cat}$ -Protein die Affinität für weitere DIDS-Moleküle erhöht. Die Affinität zum *apo*-Enzym kann als EC_{50} von $2,7 \mu\text{M}$ (Abb. 4.32) beschrieben werden. Fraglich bleibt, um welchen Inhibitionsmechanismus es sich handelt. Hierzu wurden zunächst ein genauer Vergleich des DIDS-Komplexes mit dem ApCcpp-Komplex durchgeführt. Dieser zeigt, dass eine gleichzeitige Bindung von Substrat und DIDS nicht möglich ist (Abb. 4.33A).

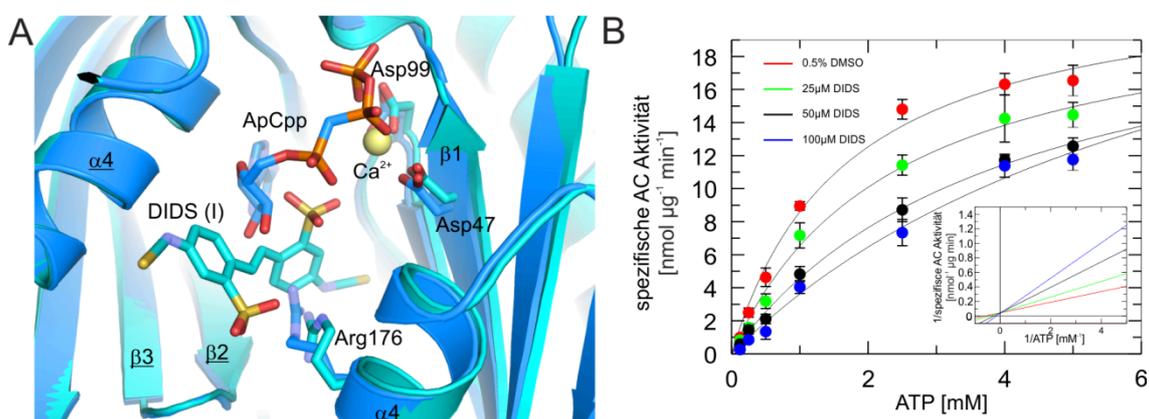


Abbildung 4.33: Kompetitive Bindung des DIDS I Moleküls mit ApCcpp. **A** Überlagerung der DIDS-Struktur (cyan) und der ApCcpp-Struktur (blau). Detaillierte Ansicht der Bindestellen beider Liganden. Aminosäuren und Liganden in *Stick*-Darstellung. **B** Einfluss von DIDS auf die Aktivität der löslichen Adenylyl-Cyclase. Michaelis-Menten-Kinetik bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. K_m bei $0 \mu\text{M}$ DIDS $1,7 \pm 0,3 \text{ mM}$ (rot), $25 \mu\text{M}$ DIDS $2,4 \pm 0,4 \text{ mM}$ (grün), $50 \mu\text{M}$ DIDS $4,1 \pm 0,5 \text{ mM}$ (schwarz), $100 \mu\text{M}$ DIDS $7,3 \pm 2,7 \text{ mM}$ (blau). V_{max} konstant bei $24,6 \pm 3,7 \text{ nmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Entsprechende Line-Weaver-Burk Auftragung in klein.

In weiteren kinetischen Untersuchungen, konnte eine kompetitiven Effekt von DIDS auf das Substrat ATP in Lösung gezeigt werden. Durch die Erhöhung der Inhibitorkonzentration

kommt es zu einer Zunahme des K_m -Wertes für ATP von 1,7 mM ohne Inhibitor bis auf 7,3 mM mit 100 μ M DIDS. V_{max} bleibt dabei konstant bei 24,6 nmol μ g⁻¹ min⁻¹ (Abb. 4.33B). DIDS bindet an die humane lösliche Adenylyl-Cyclase in kooperativer Weise und inhibiert das Enzym dabei kompetitiv.

4.7.3 Initiale Untersuchungen von verschiedenen zellulären Botenstoffen

Es wurden weitere zelluläre Botenstoffe oder Effektoren, welche eine Ähnlichkeit zum Substrat oder zu bereits getesteten Inhibitoren aufweisen, auf ihren Einfluss gegenüber der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase getestet. Zum einen wurde Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) beziehungsweise Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADH), die eine gewisse Analogie zum substratverwandten ADP haben, auf ihre aktivierenden oder inhibierenden Effekte bezüglich der Cyclaseaktivität getestet. Inositol-3'-Phosphat (IP₃), wurde aufgrund seiner anionische Eigenschaften ausgewählt, die eventuell eine Bindung in der DIDS-Bindestelle ermöglichen. Ziel war es weitere physiologische Modulatoren der verkürzten Isoform zu identifizieren.

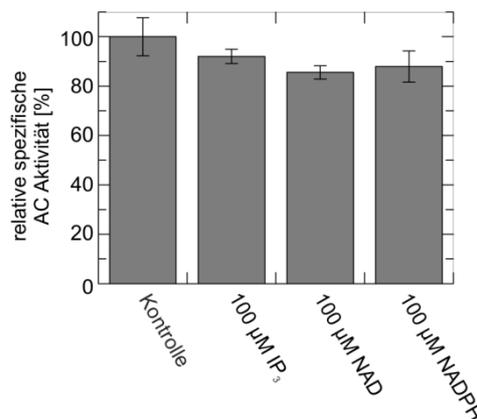


Abbildung 4.34: Einfluss verschiedener zellulärer Effektoren auf die hsAC Aktivität.

Die Botenstoffe IP₃ sowie die Coenzyme NAD und NADPH zeigten leichte inhibitorische Effekte. Keine der drei getesteten physiologischen Substanzen hatte jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Cyclaseaktivität der humane lösliche Adenylyl-Cyclase (Abb. 4.34).

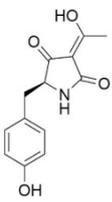
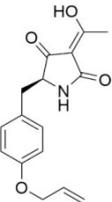
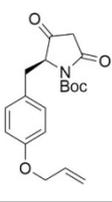
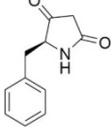
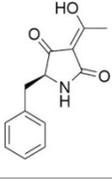
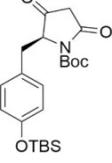
4.7.4 Effekte von Tetransäuren

Tetransäuren sind für ihre Eigenschaft bekannt, Phosphatbindestellen besetzen zu können.^[151,152] Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass

verschieden Phosphatasen durch Bindung von Tetramsäuren in die Phosphatbindestelle bereits bei geringen Konzentrationen (niedriger mikromolarer Bereich) inhibiert werden konnten.^[151,152]

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Organische Chemie I von Prof. Schobert wurden insgesamt 14 verschiedene Tetramsäuren (Tab. 4.6) auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber der Cyclaseaktivität der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase getestet.

Tabelle 4.8: Einfluss von Tetramsäuren auf die hsAC. Alle 14 getesteten Tetramsäuren mit Name, dazugehöriger Struktur, Molekulargewicht und Restaktivität der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase bei Zugabe von je 100 μ M Substanz.

Nr.	Name	Struktur	MW [Da]	rel. spez. AC Aktivität [%]
1	(5 <i>S</i>)-3-Acetyl-5-(4-(hydroxy)benzyl)-pyrrolidin-2,4-dion		247	76,6 \pm 11,6
2	(5 <i>S</i>)-3-Acetyl-5-(4-(allyloxy)benzyl)-pyrrolidin-2,4-dion		287	78,1 \pm 9,1
3	(5 <i>S</i>)-3-Acetyl-5-(4-(allyloxy)benzyl)-1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-pyrrolidin-2,4-dion		345	68,5 \pm 2,2
4	(5 <i>S</i>)-5'-(Benzyl)-pyrrolidin-2,4-dion		189	85,1 \pm 7,6
5	(5 <i>S</i>)-3-Acetyl-5-benzyl-pyrrolidin-2,4-dion		231	66,4 \pm 1,0
6	(5 <i>S</i>)-1-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-5-((4- <i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)benzyl)-pyrrolidin-2,4-dion		419	64,1 \pm 2,2

Nr.	Name	Struktur	MW [Da]	rel. spez. AC Aktivität [%]
7	(5 <i>S</i>)-5-(4-(Allyloxy)benzyl)-3-(6-bromo-1-hexanoyl)pyrrolidin-2,4-dione		521	72,3±3,4
8	(5 <i>S</i>)-1-(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)-5-((4- <i>tert</i> -butyldimethylsilyloxy)benzyl)-3-(1-hydroxy-2-(triphenylphosphanyliden)ethyliden)-pyrrolidin-2,4-dion		722	48,2±3,8
9	(2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-5- <i>sec</i> -Butyl-2-oxo-2,5-dihydro-4-pyrrolyl-(2-(methylamino)benzoate)		288	50,6±18,9
10	(5 <i>S</i>)-10-Hydroxy-4-oxa-3(2,4)-pyrrolidina-5(1,4)-benzenacyclodecaphan-1 ³ ,1 ⁵ -dion		301	74,9±10,5
11	Difluoroborylkomplex von (5 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-3-(2-Methyloctanoyl)-1,5-dimethylpyrrolidin-2,4-dion		315	69,6±6,4
12	(5 <i>S</i>)-5-(Aminopropyl)-4-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-1-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-pyrrolidin-2,4-dion		356	71,7±1,1
13	<i>E,E</i> -(1 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3-(2,8-decadienoyl)-5-(1-hydroxyethyl)-1-methylpyrrolidin-2,4-dion		307	84,1±4,2
14	(5 <i>S</i>)-3-Acetyl-5-((1 <i>H</i> -indol-3-yl)methyl)-pyrrolidin-2,4-dion		270	79,9±1,8

Die verwendeten Tetransäuren sind teilweise Zwischenprodukte einer Totalsynthese und daher noch mit Schutzgruppen versehen. Die initialen Aktivitätstest wurden mit jeweils 100 μM der jeweiligen Tetransäure durchgeführt.

Die meisten Tetransäuren zeigen inhibitorische Effekte mit 80 % Restaktivität (Tab. 4.6). Lediglich Verbindung 8 zeigt einen deutlicheren Effekt. Ausgewählte Tetransäuren (Nr. 8 und 11) wurden mit *apo*-Kristallen inkubiert (Tab. 2 Anhang), jedoch enthält keine der erhaltenen Strukturen zusätzliche Differenzdichte für einen Liganden.

5 Diskussion

Neben neun transmembranen Adenylyl-Cyclasen, ist die humane lösliche Adenylyl-Cyclase die einzige lösliche Form dieser Enzymunterklasse im Menschen.^[16] In Säugern kommt neben der Vollängenvariante der hsAC noch eine zweite, C-terminal verkürzte Isoform vor, die lediglich die katalytischen Domänen enthält.^[54] Die Adenylyl-Cyclaseaktivität der hsAC wird in den katalytischen Domänen C1 und C2 sowohl durch Bicarbonat, Ca^{2+} , pH-Änderung als auch durch die intrazelluläre ATP-Konzentration moduliert.^[45,81,94,99] Die verkürzte humane Isoform wurde im Rahmen dieser Arbeit exprimiert, gereinigt und strukturell sowie biochemisch untersucht.

5.1 Expression verschiedener hsAC Konstrukte

Die Expression und Reinigung der verkürzten Isoform war nur in Insektenzellen erfolgreich. Proteinkonstrukte, die in *E. coli* exprimiert wurden und beide katalytischen Domänen enthielten, waren weder durch Coexpression der einzelnen katalytischen Domänen noch durch Fusion mit einem Löslichkeitstag nach Reinigung in aktiver löslicher Form zu erhalten. Die verwendeten Konstrukte der einzelnen katalytischen Domänen (hsAC1-GST und hsAC2-His) wurden bereits vor dieser Arbeit basierend auf Sequenzvergleichen hergestellt.^[140] Eine Betrachtung der Domänengrenzen nach Bestimmung der Proteinstruktur zeigt deutlich, dass das C1-Konstrukt mitten im 4-Helixbündel und damit in der Linkerregion endet. Dies könnte zur Unlöslichkeit des Proteinkonstrukts trotz Coexpression beigetragen haben. Die Struktur enthält keinerlei Hinweise auf posttranslationale Modifikationen durch den Expressionsorganismus (Insektenzelle), die weiterhin erklären würden, warum eine Expression von löslichem hsAC-Protein in *E. coli* nicht möglich war.

5.2 Allgemeiner struktureller Vergleich der hsAC

Eine bisher nicht bekannte Subdomäne der hsAC bildet der N-Terminus mit der *Linkerregion* aus. Dieses 4-Helixbündel weist einen außergewöhnlich niedrigen B-Faktor auf. Das geht gewöhnlich mit der Stabilität solcher Domänen einher und scheint auch im Falle des hsAC_{cat}-Konstrukts eine stabilisierende Wirkung auf das pseudo-Heterodimer zu haben.^[153]

Ein Vergleich der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase, im Besonderen der beiden katalytischen Domänen C1 und C2 untereinander, aber auch in Bezug auf andere Cyclasen, gibt weiteren Aufschluss über die Funktionsweise der einzelnen Enzyme. Im Vergleich zu

bereits strukturell charakterisierten heterodimeren Cyclasestrukturen wird bei der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase strukturell der Grund für nur ein einziges katalytisches Zentrum deutlich (Abb. 5.1). Ein zweites aktives Zentrum kann sich durch die fehlende $\alpha 1$ -Helix in der C2-Domäne nicht ausbilden (Abb. 5.1). Des Weiteren fehlen, wie bei allen heterodimeren Cyclasen, die jeweiligen katalytischen Aminosäuren in einer der beiden Domäne.^[16] Die ionenkoordinierende Aminosäuren in der C2-Domäne und das katalytische Arginin in der C1-Domäne.

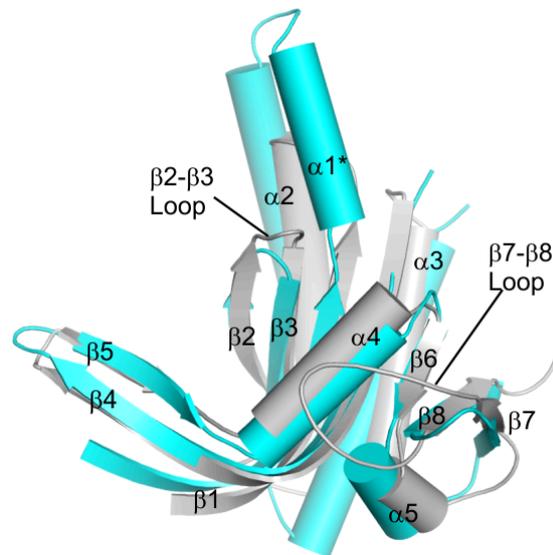


Abbildung 5.1: Vergleich der beiden katalytischen Domänen C1 und C2 der hsAC. Direkter Vergleich der katalytischen Domäne C1 (cyan) und C2 (helles cyan) der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase in *Cartoon*-Darstellung. * $\alpha 1$ -Helix nur in der C1-Domäne vorhanden.

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase ist damit die erste heterodimere Cyclase, für die nur eine $\alpha 1$ -Helix gefunden wurde. Die Tatsache, dass sich nur ein katalytisches Zentrum ausbilden kann, wird durch den extrem verkürzte *Loop* zwischen $\beta 7$ und $\beta 8$ in der C1-Domäne (Abb. 5.1) strukturell bestätigt. Durch den fehlenden *Loop* kann es ebenfalls nicht zur Ausbildung eines zweiten katalytischen und geschlossenen Zentrums kommen. Diese strukturellen Unterschiede zwischen der C1- und C2-Domäne sind auf Sequenzebene nicht zu erkennen. Weitere Vergleiche (*Alignments*) der katalytischen Domänen innerhalb einer einzelnen heterodimeren Cyclase oder zwischen verschiedenen Cyclasen basierend auf Sequenzinformationen sind bei den kaum konservierten Aminosäuresequenzen ebenfalls schwierig und fehlerhaft.^[16] Zusätzliche strukturelle Information verbessern diese *Alignments* und können damit zuverlässiger konservierte Aminosäuren und Motive aufzeigen (Abb. 5.2). Die Verwendung aller bisher gelösten Cyclasestrukturen ergibt ein strukturbasiertes *Alignment* bestehend aus zwölf Proteinen. Um Homo- und Heterodimere ausreichend

vergleichen zu können, wurden die einzelnen katalytischen Domänen miteinander verglichen (Abb. 5.2).

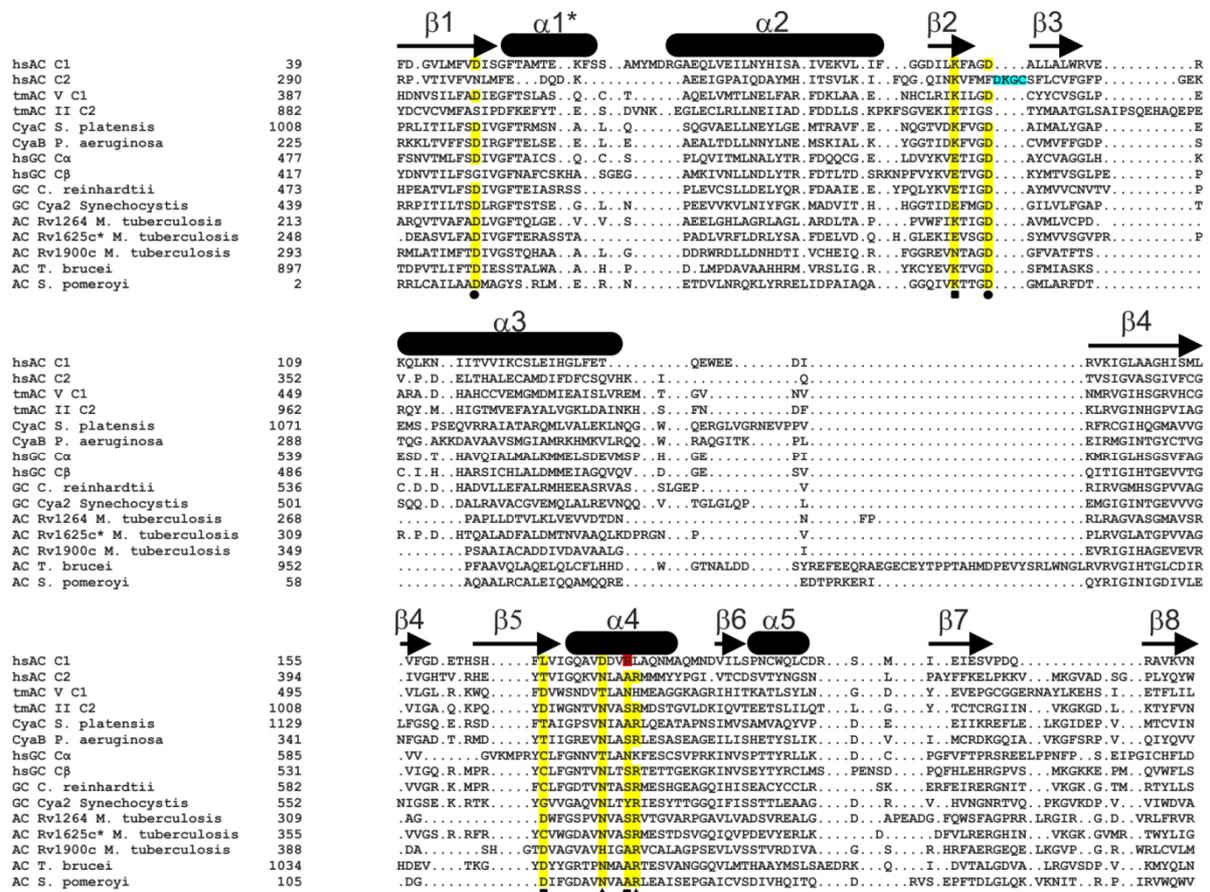


Abbildung 5.2: Strukturbasiertes Sequenzalignment der Cyclasen. Für dieses Alignment wurden alle strukturelle charakterisierten Klasse III Cyclasen verwendet. Die jeweiligen Sekundärstrukturelemente sind oberhalb der Sequenz eingblendet (* $\alpha 1$ in C2 nicht vorhanden) und basieren auf der C1-Domäne der ApCpp-Struktur. Gelb hinterlegt sind wichtige konservierte Aminosäuren, die für die Bildung der Ionenbindestelle (●), die Komplexierung des Nukleosinrestes (■) und die katalytische Reaktion (▲) notwendig sind. In rot hinterlegt ist das Arg176 der löslichen hsAC, welches für die Bicarbonataktivierung nötig ist. Die Insertion im Bereich des C2 $\beta 2$ - $\beta 3$ Loops ist in türkis hinterlegt. AC Rv1625c* aus *M. tuberculosis* ist durch eingeführte Mutationen zu einer G-Cyclase modifiziert worden.

Gut sichtbar wird dabei auf Sequenzebene eine Insertion im C2 $\beta 2$ - $\beta 3$ Loop der löslichen Adenylyl-Cyclase, die zwar bereits erkannt wurde, jedoch um zwei Aminosäurepositionen verschoben war.^[41] Diese Insertion ist spezifisch für die C2-Domäne der hsAC. (Abb. 5.2). Des Weiteren wird der verkürzte $\beta 7$ - $\beta 8$ Loopbereich der C1-Domäne der löslichen Adenylyl-Cyclase deutlich sichtbar (Abb. 5.2). In früheren Alignments wurde dieser Bereich nicht korrekt verglichen, wodurch die Domänengrenzen der C1-Domäne falsch abgeschätzt wurden.^[16,41] Ähnliches kann bei der C2-Domäne beobachtet werden. Aufgrund des sequenzbasierten Vergleichs werden Teile der Linkers der C2-Domäne zugerechnet. Ein Fehlen der C2 $\alpha 1$ -Helix fällt so nicht auf. Einige nicht humane Cyclasen, wie beispielsweise

die AC aus *T. brucei* oder auch CyaC aus *S. platensis*, weisen außerdem zwischen der α 3-Helix und dem β 4-Faltblatt einen Einschub von Aminosäuren auf. Dieser reicht von einer stark verlängerten α 3-Helix bis zu einer zusätzlichen α -Helix (Abb. 5.2).^[41,154]

Trotz der geringen Konservierung auf Sequenzebene wird bei einem strukturellen Vergleich die einheitliche Anordnung der Sekundärstrukturen, bestehend aus je acht zentralen β -Stränge und mindestens fünf α -Helices (im Falle der hsAC C1-Domäne nur vier α -Helices) pro katalytischer Domäne, deutlich. Die Ionenbindestelle wird bei allen Cyclasen einheitlich durch zwei Aspartate gebildet (Abb. 5.2). Die Aminosäuren, die bei Adenylyl- und Guanylyl-Cyclasen für die Erkennung und Bindung des Substrats verantwortlich sind (Abb. 5.2), variieren und beeinflussen so die Substrataffinitäten und Spezifität. Das Arginin (Arg416 in hsAC), welches für den katalytischen Mechanismus essentiell ist, ist auch bei einem strukturellen *Alignment* vollständig konserviert. Dies gilt neben der Substratbindestelle auch teilweise für die Bicarbonatbindestelle. Die hsAC-Domänen sowie bicarbonatabhängige bakterielle homdimere Adenylyl-Cyclasen besitzen in jeder Untereinheit ein konserviertes Lysin, welches in der Substratbindestelle für die Erkennung der Purinbase zuständig ist. In der BBS wird vermutlich auch in homodimeren Cyclasen das Bicarbonat durch dieses Lysin komplexiert. Das Arginin hingegen ist in der C2-Domäne um eine Aminosäureposition verschoben. Es ist bislang unklar, ob bakterielle Vertreter das katalytische Arginin für die Bindung des Bicarbonats verwenden. Falls das katalytische Arginin das Bicarbonat während der Reaktion komplexiert, hätte das in Homodimeren eine Halbseitenaktivität des Enzyms zur Folge. Ob bakterielle Vertreter durch Bicarbonat aktiviert werden können oder nicht, ist durch ein konservierte Threonin ersichtlich. Beispiele dafür sind CyaC oder CyaB, die eine deutliche Bicarbonatabhängigkeit aufweisen und Rv1264, welches nicht durch HCO_3^- aktiviert wird.^[41,93,155] Bicarbonatabhängige Enzyme haben alle ein konserviertes Threonin (Thr405 in hsAC), welches normalerweise für die Komplexierung des N6-Stickstoffs der Purinbase zuständig ist. Alle Cyclasen, die nicht durch Bicarbonat aktiviert werden, haben an dieser Position ein Aspartat (Abb. 5.2). An Hand einer Thr/Asp-Mutation für die Cyclase CyaB1 aus *Anabaena* konnte der Zusammenhang zwischen Threonin und Bicarbonatabhängigkeit gezeigt werden.^[93] Bisher wurde angenommen, dass die Bicarbonataktivierung teilweise auf einer besseren Rekrutierung des Ions A beruht. Hierbei würde HCO_3^- , die beiden Wassermoleküle ersetzen, die am Ion A koordinieren. Aspartat wäre auf Grund seiner negativen Ladung im Gegensatz zu Threonin nicht in der Lage, den Aktivator zu koordinieren. Diese Argumente sind jedoch durch Lokalisation der BBS nicht mehr haltbar, da diese zwischen 10 Å und 12 Å vom Ion A entfernt ist (Abb. 5.3).

Viel wahrscheinlicher ist, dass das Threonin das Bicarbonat koordiniert und damit den in hsAC an vergleichbarer Position lokalisierten Carbonylsauerstoff des Val167 ersetzt (Abb. 5.3). In der CyaC-Struktur würde der Abstand von Thr1139 zum Bicarbonat etwa 2,3 Å, im Vergleich zu 2,6 Å für den Carbonylsauerstoff des Val167, betragen.

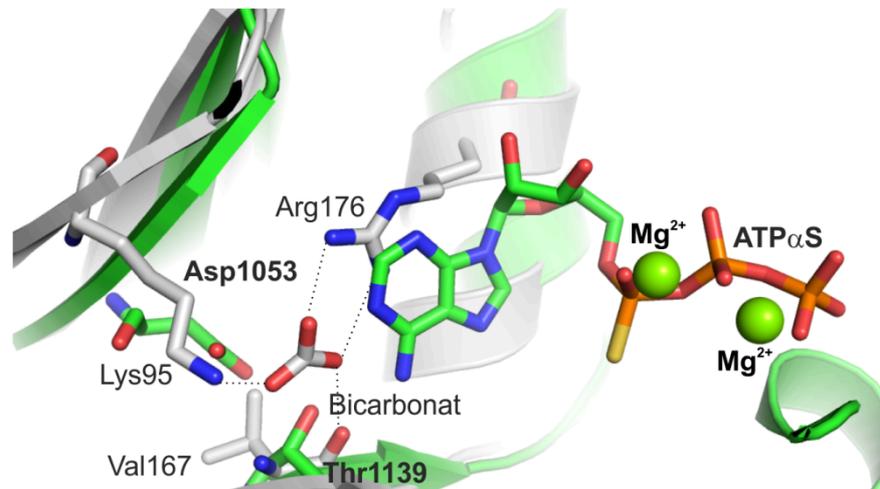


Abbildung 5.3: Überlagerung der Bicarbonatbindestelle von hsAC mit CyaC. Identifizierung der potentiellen BBS in CyaC durch Überlagerung der HCO_3^- -Struktur der hsAC (grau) mit der CyaC ATP α S-Struktur (grün) in *Cartoon*-Darstellung. Ligand und Aminosäuren in *Stick*-Darstellung. Beschriftung der Aminosäuren sowie der Liganden von CyaC in fett. PDB-Code: 1WC1.

In direkter Umgebung zum Bicarbonat und direkt neben Thr1139 befindet sich ein Aspartat (Asp1053 2,5 Å), welches ebenfalls für die Komplexierung des Bicarbonats verantwortlich sein könnte. Dieses Aspartat könnte jedoch nur über das Wasserstoffatom von HCO_3^- eine H-Brücke ausbilden. Ein Vergleich bakterieller bicarbonatsensitiver Cyclasen zeigt, dass das Aspartat auch durch ein Asparagin austauschbar zu sein scheint.^[156] Dies müsste durch weitere Versuche jedoch noch experimentell bestätigt werden. Im Vergleich zu nicht-bicarbonataktivierten Cyclasen ist in der Sequenz das Thr1139 durch ein Aspartat und das Asp1053 durch ein Valin oder Isoleucin ersetzt. Die Kombination aus Aspartat und einer hydrophober Aminosäure an diesen Positionen scheinen eine Bicarbonataktivierung in bakteriellen Cyclasen zu unterbinden.

Das Sequenzalignment zeigt grundsätzliche Unterschiede, Gemeinsamkeiten und konservierte Aminosäuren auf, kann jedoch nicht die verschiedenen Zustände von Cyclasen wiedergeben. Um detaillierte funktionelle Aussagen treffen zu können, müssen die Komplexstrukturen der verschiedenen Zustände jeweils direkt verglichen werden.

5.3 Substratbindestelle

5.3.1 Ausbildung der Substratbindestelle

Ein Vergleich des aktiven Zentrums der *apo*-Struktur mit den substratgebundenen hsAC-Strukturen sowie mit bekannten Ligandenkomplexen mit nicht-hydrolysierbarem Substratanalogan (beispielsweise CyaC aus *Spirulina platensis*), zeigt, dass ohne Konformationsänderung eine Substratbindung in hsAC nicht möglich ist.^[40,41] Auffällig ist dabei, dass das Asp99, welches für die Koordination des Ion B zuständig ist, in der *apo*-Konformation eine Salzbrücke mit Arg176 bildet. Dadurch ist der gesamte β 2- β 3 Loop der C1-Domäne weggedreht und wird in einer inaktiven Position gehalten. Außerdem blockieren die Aminosäuren 48-52 der α 1-Helix der C1-Domäne die potentielle Bindestelle von ATP oder ApCpp, was eine Substratbindung unmöglich macht. Ähnliche inaktive Konformationen mit einer offenen, noch nicht gebildeten Ionenbindestelle konnte bereits bei Strukturen von Guanylyl-Cyclasen beobachtet werden (Abb. 5.4). Sowohl die bakterielle GC Cya2, als auch die humane lösliche GC zeigen eine offene Ionenbindestelle.^[42,157] Das Asp492 (entspricht Asp99), welches ein Teil der Ionenbindestelle bildet, ist bei der GC Cya2 lediglich gedreht (Abb. 5.4).^[42] Bei der humanen sGC hingegen ist der gesamte β 2- β 3 Loop vollständig in Richtung Purinbindestelle weggedreht (Abb. 5.4).^[157] Eine solch außergewöhnlich offene Ionenbindestelle ist bei der hsAC nicht zu beobachten, obwohl hier eine geöffnete Ionenbindestelle in Richtung Arg176 in der *apo*-Struktur zu erkennen ist (Abb. 5.4).

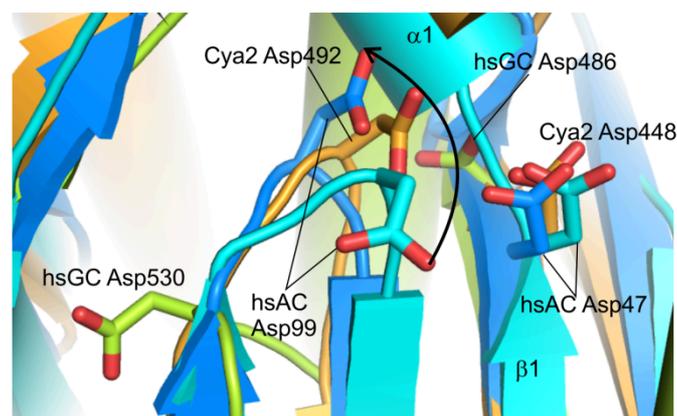


Abbildung 5.4: Darstellung der offenen Ionenbindestelle. Vergleich der offenen Ionenbindestelle von hsAC (cyan), hsGC (hellgrün) und Cya2 (orange) mit der geschlossenen Ionenbindestelle in der hsAC ApCpp-Struktur (blau) in *Cartoon*-Darstellung. Aspartate in *Stick*-Darstellung. PDB-Code 4NI2 und 2W01.

Um die Ionenbindestelle ausbilden zu können bewegt sich der gesamten Loop um etwa 4 Å (Abb. 5.4), wodurch die Salzbrücke zwischen Asp99 und Arg176 gelöst wird. Darüber hinaus vollzieht Asp47 eine minimale Positionsänderung in Richtung der Ionenbindestelle, bei der es

zur Freisetzung des Peptidrückgrats des Ser49 kommt. Hierbei schwingen die Aminosäurereste 48 bis 52 nach außen und es bildet sich die Substratbindestelle aus. Diese Elongation des β 1-Faltblattes setzt sich schließlich in der Entwindung der α 1-Helix fort. Die Ausbildung der Substratbindestelle konnte erstmals bei der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase beobachtet werden, da für Guanylyl-Cyclasen bisher nur *apo*-Formen bekannt sind und die verschiedenen Adenylyl-Cyclasen entweder nur als Komplex oder nur in *apo*-Form vorliegen. Es handelt sich daher bei der *apo*-Form der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase entweder um einen artifiziellen Zustand, der so aufgrund des allgegenwärtigen ATPs intrazellulär nicht vorkommt oder um eine neu entdeckte stabile Konformation, die das Enzym bei sehr geringen Substratkonzentrationen einnehmen könnte.

Die Substratbindestelle als auch der Zugang zur Substratbindestelle sind, bei Betrachtung der elektrostatischen Oberfläche, auffällig positiv geladen. Das Substrat ATP, welches negativ geladen und als Komplex mit divalenten Ionen in Lösung vorliegt, könnte so leicht zu seiner Bindestelle geleitet werden, was bedingt durch die niedrige ATP-Affinität sinnvoll erscheint.

5.3.2 Substrataffinität

Die apparente Substrataffinität der verschiedenen Cyclasen variiert sehr stark von 0,01 mM für transmembrane ACs bis zu etwa 11 mM für die human sAC.^[16,45] Entscheidend für die verschiedenen Affinitäten scheint im Besonderen die Erkennung der Ribose zu sein.^[16] In tmACs und sGCs ist ein Serin, in der GC Cya2 ein Tyrosin für die Erkennung des Ringsauerstoffs der Ribose verantwortlich.^[35,40] Dieses Serin/Tyrosin ist in der hsAC durch ein Alanin (Ala415) ersetzt und kann daher nicht mit dem Ringsauerstoff der Ribose interagieren, was vermutlich zur geringeren Substrataffinität der hsAC beiträgt.

Die Affinität des Substrats kann im Falle der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase durch Zugabe von Calciumionen ($EC_{50} = 750 \mu\text{M}$) erhöht werden. Hierbei kommt es zu einer Verbesserung der apparenten Affinität um etwa das 10-fache.^[45] Calcium ist aufgrund seiner Komplexgeometrie in der Lage die Phosphatsauerstoffe in der Ionenbindestelle B besser abzusättigen. Die Affinität von ATP zum Protein in Anwesenheit von ausschließlich Calciumionen beträgt $K_d \sim 2 \text{ mM}$ und bestätigt damit unabhängig von der Aktivität den beschriebenen Calciumeffekt auf die hsAC. Die verringerte ATP-Affinität im Vergleich zu tmACs korreliert daher mit der intrazellulären ATP-Konzentration (2-8 mM).^[158] Die Messung der Affinität zum echten Substrat ATP in Gegenwart von ausschließlich Ca^{2+} ist möglich, da die spezifische Cyclaseaktivität der hsAC vernachlässigbar gering ist. Eine

Messung der Affinitäten in Anwesenheit von Mg^{2+} mit oder ohne Ca^{2+} ist aufgrund der signifikant hohen Cyclaseaktivität nicht möglich.

Auch strukturelle Untersuchungen zeigen eine Besetzung der Ionenbindestelle B in den hsAC-Komplexen. Im ApCpp-Komplex ist das Ion B im Vergleich zu den Pyrophosphatkomplexen am höchsten koordiniert (6-fach). Die Umgebung des Ions in der ApCpp-Struktur ähnelt der Koordination des Ca^{2+} -Ions (7-fach koordiniert) in der ApCpp-Struktur von CyaC. In der CyaC Struktur bildet sich jedoch eine bidendatische Bindung zwischen Asp1017 (entspricht Asp47 in der hsAC) und dem Calciumion aus. Dies ist in der ApCpp-Struktur der hsAC nicht möglich, da das Asp47 leicht gedreht ist. Beide Asparate koordinieren während der Reaktion jedoch nicht nur das Ion B, sondern auch das Ion A. Daher ist eine oktaedrische Koordination des Ions B sehr wahrscheinlich. Ein Vergleich der Ionenbindestelle B aller hsAC-Komplexstrukturen soll weiteren Aufschluss über die Identität des Ions B in der ApCpp-Struktur geben, da für die ApCpp-Komplexstrukturen beide Ionen in der Kristallisations- oder *Soaking*lösung zur Verfügung standen.

Tabelle: 5.1: Vergleich der Abstände von Ion B zu den Koordinationspartnern. Alle Abstände bis 3,2 Å aufgelistet. *Koordination zum Carbonylsauerstoff. Mittlerer Koordinatenfehler basierend auf dem Luzatti-Plot.^[159] Für den ApCpp-Komplex wurden die Abstände aus beiden Strukturen (*Soaking* und Cokristallisation) aufgeführt, die Abstände der *gesoakten* ApCpp-Struktur in Klammern.

	ApCpp (Soak)	ATP	<i>in-situ</i> - PP _i /Ca ²⁺ ATP	<i>in-situ</i> - PP _i /Mg ²⁺ ATP	PP _i /Mg ²⁺	cAMP/ PP _i /Mg ²⁺	<i>in-situ</i> - PP _i /Mg ²⁺ GTP	CyaC ApCpp
Ile48* [Å]	2,8 (2,6)	-	-	-	-	-	-	2,4
Asp47 [Å]	2,5 (2,4)	2,5	2,9	2,6	2,6	2,4	2,6	2,8/ 2,4
Asp99 [Å]	2,3 (2,4)	2,4	2,6	2,3	2,3	2,2	2,2	2,6
P _γ [Å]	2,4 (2,4)	2,1	2,6	2,9	3,0	2,1	2,3	2,6
P _β [Å]	2,5 (2,5)	2,3	2,9	2,8	3,0	2,7	2,8	2,0
H ₂ O [Å]	3,0 (2,5)	2,0	-	3,2	-	-	-	2,3
B-Faktor aller H ₂ O [Å ²]	33,2 (42,5)	38,9	42,8	35,8	33,6	27,5	38,8	-
B-Faktor Ion B [Å ²]	79,1 (52,1)	49,2	79,5	56,2	55,3	40,4	55,7	-
Koordinaten- Fehler [Å]	0,26	0,24	0,24	0,21	0,22	0,22	0,23	0,35
Koordinations- zahl	6	5	4	5	4	4	4	7
Ion B	Ca ²⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺

Ein Vergleich der Atomabstände zum Ion B in allen hsAC-Strukturen unter Berücksichtigung des mittleren Koordinatenfehlers weist für die ApC_{pp} eher auf ein Mg²⁺-Ion als Ion B hin. Koordiniert wird das Ion in den ApC_{pp}-Strukturen oktaedrisch, durch die Aspartate und Sauerstoffe des Phosphats sowie einem Wassermolekül und dem Carbonylsauerstoff des Isoleucin senkrecht dazu. Die Abstände des Ions B in der *gesoakten* und cokristallisierten Struktur sind vergleichbar. Eine oktaedrische Koordination kommt sowohl für Ca²⁺-Ionen als auch für Mg²⁺-Ionen in Proteinstrukturen gleichermaßen vor.^[143] Der B-Faktor verbessert sich leicht für ein modelliertes Magnesiumionen im Vergleich zu einem modellierten Calciumionen in die Differenzdichte der Ionenbindestelle B. Die Verwendung eines Validierungsservers (CheckmyMetal), der die Umgebung des Metallions vergleicht, erbrachte keine weiteren Hinweise, dass es sich nicht um ein Calciumion handeln könnte, was biologisch für die Besetzung der Ionenbindestelle B am wahrscheinlichsten erscheint.^[160] Daher wurde in ApC_{pp}-Strukturen als Ion B ein Calcium angenommen. Die Cyclisierungsreaktion scheint in Kristallen sowohl in Anwesenheit von Magnesium- als auch Calciumionen stark bevorzugt zu sein, wengleich die Reaktion mit Ca²⁺ in Lösung etwa 7000-fach verlangsamt ist, bezogen auf Reaktionsbedingungen mit Mg²⁺ und Ca²⁺. Calciumionen binden zwar bevorzugt in die Ionenbindestelle B, sind aber auch in der Lage in die Ionenbindestelle A zu binden und die Cyclisierungsreaktion zu katalysieren.

Die Koordination und Abstände eines Magnesiumions scheinen über alle PP_i-Strukturen relativ identisch zu sein. Die Abstände zwischen Mg²⁺ und den Koordinationspartnern sind jedoch verhältnismäßig lang.^[143,144,161] Besonders auffällig ist die Reduzierung der Koordination (4-fach), wenn lediglich PP_i in der Substratbindestelle verbleibt.^[162] Dies könnte ein Einfluss auf die Freisetzung des Pyrophosphats haben, dass durch die geringere Koordination erleichtert sein könnte.

Die ATP-Komplexstruktur konnte nur durch *soaken* mit ATP allein erhalten werden, da die Zugabe von zweiwertigen Ionen immer zur Umsetzung des Substrats führte. Für die Besetzung in der Ionenbindestelle B wurde ein Natriumion angenommen, da keine divalenten Ionen verwendet wurden. Das Natrium stammt wahrscheinlich aus dem verwendeten Puffer. Der Validierungsserver schlägt sowohl ein Natriumion als auch ein Calciumion vor. Der B-Faktor beträgt für ein modelliertes Na⁺-Ion 49,2 Å² und für ein Ca²⁺-Ion 70,5 Å². Da in den Kristallen keine Umsetzung stattfand und keine Calciumionen zugesetzt wurden, kann unter Berücksichtigung aller Informationen davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein Na⁺-Ion handelt. Die Besetzung der Ionenbindestelle B mit einem Wassermolekül (B-Faktor 35,0) wäre aufgrund der negativen Ladung sehr ungewöhnlich. Die Verwendung von

anormalen Signalen für die Identifikation der Ionen ist kaum möglich, da Ca^{2+} , Na^{+} bzw. Mg^{2+} kaum anomale Dispersion im Messbereich aufweisen.

Um Komplexstrukturen zu erhalten wurden die Kristalle mit extrem hohen Ligandenkonzentration inkubiert oder alternativ kokristallisiert. Auffällig ist hierbei, dass der gesamte Phosphatteil in den Substrat(analog)komplexen meist sehr gut definiert ist. In der ATP-Struktur hingegen ist die Ribose schwach und die Base sehr schwach definiert. Dies weist auf eine hohe Flexibilität des Liganden in diesem Bereich hin. Eine der möglichen Bindungspositionen der Base (*syn*-Konformation) ist im Vergleich zur ApCcp-Bindung (*anti*-Konformation) um 180° um die frei drehbare *N*-glykosidische Bindung verdreht und könnte zu einer initialen Substratbindungskonformation gehören. Beide Konformationen der Purinbase sind durch Wasserstoffbrücken vergleichbar schwach koordiniert, was die geringe Substrataffinität zusätzlich erklären könnte. Das Thr405 kann sowohl in der *syn*- als auch in der *anti*-Konformation eine Wasserstoffbrücke zur N6-Aminogruppe ausbilden (Abb. 5.5). In anderen Cyclasen mit höheren Substrataffinitäten ist das Threonin, das sowohl Donor als auch Akzeptoreigenschaften zur Ausbildung von H-Brücken besitzt, oft durch ein Aspartat ersetzt, das in Proteinen meist deprotoniert und damit als reiner Akzeptor fungiert (Abb. 5.5).

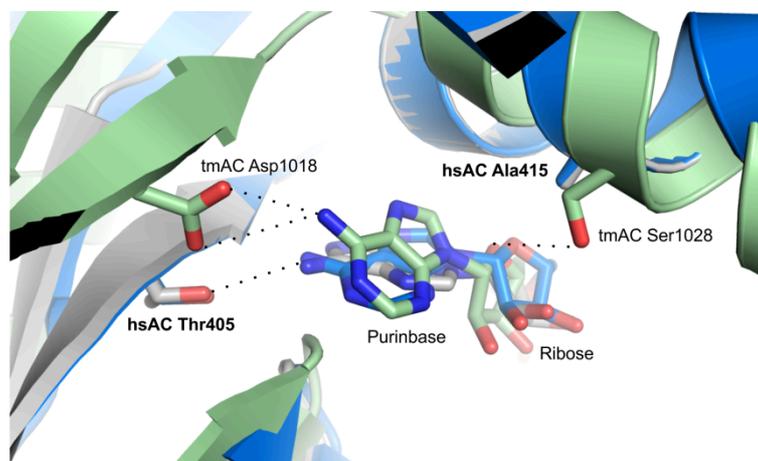


Abbildung 5.5: Überlagerung verschiedener Substratkomplexe von Adenylyl-Cyclasen. Die hsAC (blau ApCcp und grau ATP) und die tmAC (grün) unterscheiden sich in ihrer Substrataffinität vor allem bei der Koordination des Adenosinrestes durch verschiedene Aminosäuren (*Stick*-Darstellung). Die Überlagerung der Strukturen in *Cartoon*-Darstellung erfolgte auf Grund der Substratposition (RMSD der Substrate 2,4-2,5 Å). PDB-Code 1CJK.

Trotz der vergleichbar schwachen Koordination der Base ist das gesamte Substratanalogon ApCcp im Vergleich zu ATP in den erhaltenen Strukturen wesentlich eindeutiger durch die Elektronendichte definiert. Grund dafür könnte die Bindung des Calciumions anstatt des Natriumions in der Ionenbindestelle B sein. Es kommt dadurch zu einer besseren Fixierung, was sich auf den gesamten Liganden auswirkt.

Die Ionenbindestelle A ist in keiner der ApCpp- oder ATP-Komplexe der hsAC besetzt. Diese Beobachtung geht konform zu bereits bekannten ApCpp-Komplexstrukturen von CyaC oder der tmAC.^[40,105,163] Hier ist die Ionenbindestelle A nur in ATP α S-Komplexen oder im Falle der tmAC im inhibierten ATP-Komplex in der Struktur mit einem divalenten Kation besetzt (Abb. 5.6).^[40,41] Das Ion B ist in ATP α S-Komplexen, im Vergleich zur Bindung in der hsAC ApCpp-Struktur, weit in Richtung γ -Phosphat verschoben (Abb. 5.6). Die Bindestelle des Ions A liegt etwa zwischen α - und β -Phosphat. Bereits postuliert ist die Zuordnung der beobachteten Komplexstrukturen (ApCpp und ATP α S) zu den entsprechenden Zuständen während der Cyclisierungsreaktion. ApCpp-Strukturen werden einem Substratkomplex und ATP α S-Strukturen eher einem Produktkomplex zugeordnet.^[41]

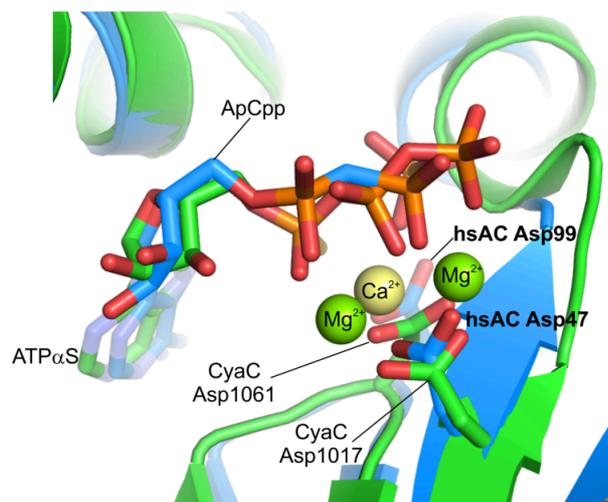


Abbildung 5.6: Vergleich der Ionenbindestellen. Vergleich der Ionenbindestelle in der ApCpp-Struktur (blau, fett beschriftet) in *Cartoon*-Darstellung mit einem Calciumion in der Ionenbindestelle B und der CyaC-Struktur (grün) in *Cartoon*-Darstellung bei der ein ATP α S durch zwei Magnesiumionen (grüne Kugeldarstellung) als Ion A und B in der Struktur gebunden sind. (RMSD der Substrate 2,1-5,3 Å). PDB-Code 1WC1.

Die Verwendung von ATP α S als Substratanalogon ergab jedoch im Falle der hsAC weder durch *Soaken* noch durch Cokristallisation eine Komplexstruktur. Die Komplexstruktur mit ATP konnte im Falle der hsAC nur durch *Soaken* ohne divalente Ionen erhalten werden. Eine Cokristallisation von ATP wurde nicht versucht. Der Einfluss von divalenten Ionen auf die Ionenbindestelle A konnte daher strukturell nicht untersucht werden.

5.3.3 Substraterkennung

Die Erkennung des Substrates erfolgt bei allen Adenylyl-Cyclasen durch ein Lysin (in hsAC Lys334) über den N1-Stickstoff der Base durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke.^[16,41] Das Lysin agiert hier als Wasserstoffbrückendonator. Im Falle der Guanylyl-Cyclasen erkennt ein Glutamat den Guaninrest am N2-Amin und wirkt als H-Brückenakzeptor.^[164] In allen

erhaltenen hsAC-Komplexstrukturen konnte jedoch keine direkte Interaktion des Lys334 mit dem Adenosinrest beobachtet werden. Die Interaktion erfolgt in den erhaltenen Strukturen jeweils über ein Wassermolekül. In anderen Substratanalogstrukturen von CyaC oder der tmAC ist eine direkte Interaktion deutlich zu erkennen.^[40,41] Der N6-Stickstoff der Purinbase wird in hsAC und CyaC über eine schwache Wasserstoffbrücke von etwa 3 Å von einem Threonin koordiniert und festigt so die Bindung des Substrats ATP. Die Erkennung des Adeninrestes durch das Lysin ist essentiell für die ablaufende Adenylyl-Cyclisierungsreaktion, wie bereits in Mutationsstudien mit anderen Klasse III Enzymen bestätigt werden konnte.^[28] Da die Reaktion auch in den hsAC-Kristallen abläuft scheint eine intermediäre Erkennung der Purinbase durch das Lysin zu erfolgen.

GTP und ATP binden mit äquivalenten Affinitäten an die humane lösliche Adenylyl-Cyclase. Die Bindung von GTP resultiert in einem inhibitorischen Effekt ($K_i = 1 \text{ mM}$) der A-Cyclaseaktivität durch Blockade der Substratbindestelle. Zusätzlich kann die humane lösliche Adenylyl-Cyclase dieses gebundenen GTP aber auch mit einer relativen Aktivität von etwa 7,5 %, bezogen auf die A-Cyclaseaktivität, umsetzen. Dies sind Hinweise darauf, dass die tatsächliche Erkennung durch das Lys334 erst nach der Bindung des Substrats geschieht. Es kommt zu einer signifikanten Nebenaktivität, die bereits bei anderen Cyclasen bekannt ist.^[106,165]

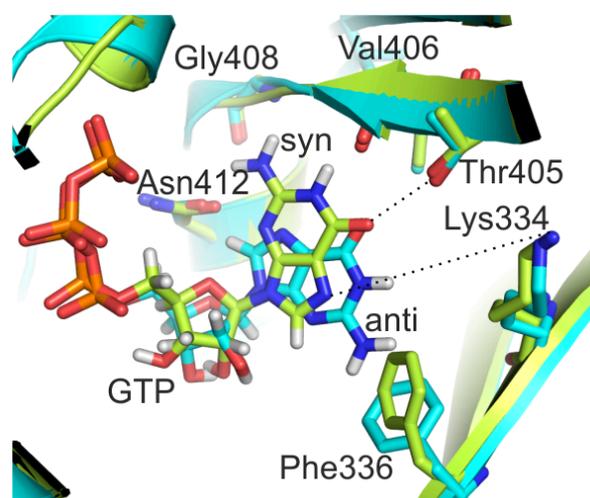


Abbildung 5.7: Syn- und anti-Konformation von GTP in hsAC modelliert. Das Purinderivat GTP in syn- (grün) und anti-Konformation (cyan). Koordinierende Aminosäuren in *Stick*-Darstellung und Proteindarstellung in *Cartoon*.

Der Grund hierfür könnte die lose Bindung der Purinbase sein, die sich in einer beobachteten syn- und anti-Konformation widerspiegelt. Da auf Grund der hohen Aktivitäten im Kristall keine Struktur mit GTP erhalten wurde, wurde die GTP-Bindung in syn- und anti-Konformation in die jeweilige Struktur modelliert (Abb. 5.7). Dabei ergeben sich, ähnlich wie

für ATP, vergleichbare Koordinationsmuster für beide Konformationen. Auffällig ist hierbei, dass in der anti-Konformation keine H-Brücke zwischen Lysin und dem Wasserstoffatom am N1-Stickstoff entstehen kann, da sowohl die Aminosäure als auch der Stickstoff in diesem Fall als H-Brückendonator agieren. In der syn-Konformation würde das Lysin jedoch den N7-Stickstoff erkennen und mit ihm über eine H-Brücke interagieren. Die Bindung von GTP in der syn-Konformation könnte die G-Cyclaseaktivität der hsAC erklären. Vermutlich ist diese Bindung jedoch nicht optimal bezüglich der Riboseposition, was die geringe Aktivität belegen würde. Das Thr405 könnte eine weitere Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoff an der N6-Position ausbilden (Abb. 5.7). Thr405 würde bei Bindung eines GTPs als Donor, im Falle eines ATPs als Akzeptor agieren. Adenylyl-Cyclasen, die an dieser Sequenzposition ein Aspartat aufweisen, das meist nur als Akzeptor agiert, weisen eine geringere bis keine G-Cyclasenebenaktivität auf.^[164,166] Guanylyl-Cyclasen haben an dieser Position ein Cystein zur Erkennung des N6-Sauerstoffs in ihrer Sequenz und können ebenfalls eine hohe Nebenaktivität, wie im Falle der sGC in Säugern, aufweisen.^[166] Mit Hilfe von Mutationsexperimenten konnten die Substratspezifität zu Adenin oder Guanin als Purinbase bereits modifiziert werden.^[167] Intrazellulär ist die durchschnittliche GTP-Konzentration mit etwa 0,7 mM im Vergleich zur ATP-Konzentration (2-8 mM je nach Zellen) gering, so dass intrazellulär die G-Cyclaseaktivität der hsAC kaum eine Rolle spielen sollte.^[158,168]

5.4 Ablauf der Cyclisierungsreaktion

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase katalysiert die Cyclisierungsreaktion von ATP zum *second messenger* cAMP. Die Bindung des Substrates induziert eine Bildung der Ionenbindestelle bestehend aus den zwei konservierten Aspartaten 47 und 99. Die Phosphatgruppen positionieren sich dabei in Richtung der Ionenbindestelle. Strukturelle Experimente zeigen, dass die Purinbase des ATPs in einer Variation von Orientierung (syn- und anti-Konformation, sowie die Übergangskonformationen) in die hydrophobe Tasche der Substratbindestelle initial binden könnte (Abb. 5.8).

Die Komplexierung der Phosphatgruppen wird durch das divalente Ion B optimiert und die Purinbase kann dann in der anti-Konformation positioniert werden, wie in der ApCpP Komplexstruktur zu erkennen ist. Erfolgt die Komplexierung durch ein Calciumion, so erhöht sich dadurch die Affinität für das Substrat aufgrund der erhöhten Koordination.^[45] Die Erkennung des Substrates erfolgt dann über das Lys334, welches den Adeninrest nur in der anti-Konformation am N1-Stickstoff erkennen kann (Abb. 5.8). Die Interaktion mit Lys334

verbessert wahrscheinlich die Koordination für die Base weiter und sorgt für eine Streckung der Substrats.

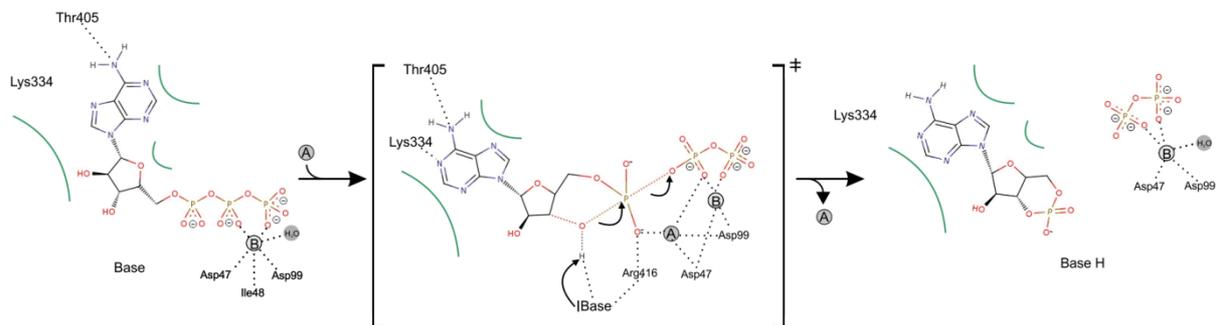


Abbildung 5.8: Vorgeschlagener Cyclisierungsmechanismus der hsAC. Zunächst bindet das Substrat in einer losen Konformation, die durch die Erkennung des Lys334 gefestigt wird. Anschließend kommt es zur Bindung des Ions A, welches den trigonal-bipyramidalen Übergangszustand während der Reaktion stabilisiert. Die konzertierte S_N2 -Reaktion läuft über einen gleichzeitigen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe, welche durch Abstraktion eines Protons aktiviert wird, und der Abspaltung des Pyrophosphats ab.

Im Falle der hsAC konnte keine Schließung des katalytischen Zentrums beobachtet werden, wie das bei CyaC oder auch der tmAC der Fall ist.^[40,41] Der $\beta7$ - $\beta8$ Loop, der bei Substratbindung und bei der Cyclisierungsreaktion scheinbar in einen geschlossenen Zustand übergeht, ist bereits in der *apo*-Struktur in einer geschlossenen Konformation. Dieser vollkommen geschlossene Zustand ist bisher nur bei der hsAC zu beobachten (Abb. 5.9).

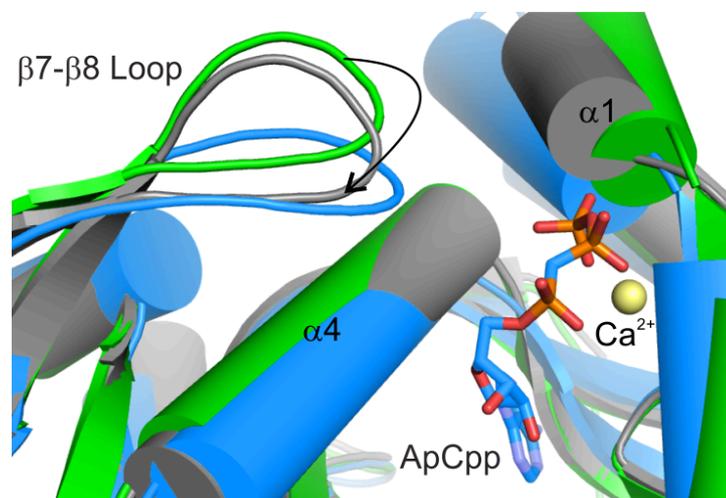


Abbildung 5.9: Bewegung des $\beta7$ - $\beta8$ Loops. Vergleich der zwei unterschiedlichen Konformation des $\beta7$ - $\beta8$ Loops, die mit einem offenen (grün) und einem geschlossenen (grau) Zustand bei CyaC korrelieren. In hsAC mit gebundenem ApCpp (blau) ist nur ein Zustand zu beobachten, der einem noch geschlosseneren Zustand entspricht. PDB-Code 1WC0 und 1WC1.

Frühere Ergebnisse, die eine offene (ApCpp-Komplex) und geschlossene (ATP α S-Komplex) Konformation bei Cyclasen beobachten konnten, werden so in ein neues Licht gerückt.^[41] Zwei unterschiedliche publizierte Modelle erklären die Schließung des Aktivzentrums mit

verschiedenen Zeitpunkten der Katalyse. Das eine Modell schlägt eine Schließung des Aktivzentrums bei Substratbindung als Teil der Katalyse vor.^[35,40,169] Das andere Modell hingegen schlägt ein geöffnetes Enzym vor, welches das Substrat binden kann. Die Bindung des Ions A sowie die Katalyse selbst sorgen für eine Schließung des Aktivzentrums, welche dann das Substrat streckt und die entstehenden Produkte cAMP und PP_i voneinander separieren kann. Dabei wird das β - und γ -Pyrophosphat Richtung Ausgang des Aktivzentrums verbracht.^[41] Eine Schließung des Aktivzentrums bei Substratbindung wie im ersten Modell vorgeschlagen, kann daher nicht bestätigt werden. Grundsätzlich kann eine weitere Schließung der Substratbindestelle während der Katalyse für die hsAC nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch weder mit Substrat noch mit beiden Produkten eine derartiger Zustand beobachtet wurde, findet eine stärkere Schließung entweder gar nicht oder nur intermediär während des Übergangszustandes statt und entspricht somit eher dem zweiten Modell. Der β 7- β 8 *Loop*bereich weist einen relativ hohen B-Faktor auf, was die hohe Flexibilität sowie die dynamische Funktion des *Loops* widerspiegelt und eine weitere Schließung möglich machen würde.

Eine Bindung des Ions A ist in keiner der hsAC Strukturen zu erkennen, weder in einer substratgebundenen noch in einer produktgebundenen Struktur. Vermutlich bindet das Ion A nur intermediär während der Reaktion, stabilisiert den trigonal-bipyramidalen Übergangszustand und diffundiert nach der Reaktion sofort ab (Abb. 5.8). Biochemische Untersuchungen legen nahe, dass es sich bei einer optimalen Besetzung der Ionenbindestellen A um ein Magnesiumion handelt.^[45] Die Reaktion im Kristall ist sowohl mit Magnesiumionen als auch Calciumionen zu schnell um den pentavalenten Übergangszustand zu analysieren. Die Strukturen enthalten lediglich das Produkt Pyrophosphat. Der Grund dafür scheint die stark geschlossene Konformation des Enzyms im Kristall zu sein, die möglicherweise einem aktiven Zustand entspricht. Hierdurch scheint die Reaktion, im Vergleich zum Verhalten in Lösung, stark beschleunigt zu sein. Lys334 könnte trotz der substratabgewandten Konformation durch Drehung der Seitenkette intermediär die Base erkennen, verbleibt aber in der Struktur nach der Reaktion unverändert. Das Substrat wird bei der konzertierten Reaktion vermutlich weiter auseinandergezogen, was die Bindung zwischen α -Phosphat und dem benachbarten Sauerstoff schwächt. Aktiviert wird die angreifende 3'-OH-Gruppe direkt oder indirekt durch ein Wasser oder Hydroxidion, welches als Base fungiert. Das konservierte Arg 416, welches sich in relativer Nähe zum 3'-OH befindet, positioniert und deprotoniert vermutlich diese Base (Abb. 5.8). Das Arg416 kann aufgrund seiner Nähe zum α -Phosphat zusätzlich die negativen Ladungen des

Übergangszustands stabilisieren. Der Angriff der 3'-Hydroxylgruppe der Ribose am P_α Atom geht mit der gleichzeitigen Bildung des Pyrophosphats einher. Das Calciumion als Ion B stabilisiert nun das entstehenden Produkt PP_i, welches in der gleichen Position vergleichbar zur β/γ-Phosphatbindung des ATPs verbleibt. Das Arg176 ist sowohl im Substrat als auch im Produktkomplex in relativer Nähe zur 2'-Hydroxylgruppe, jedoch ist die genaue Funktion während der Cyclisierungsreaktion noch unklar.

5.4.1 Freisetzung der Produkte

Die Ribose, die kaum durch umgebene Aminosäuren koordiniert wird, besetzt sowohl in den Substratkomplexen als auch im Komplex mit beiden Produkten cAMP und PP_i etwa die gleiche Position. Die Lage der Purinbase in anti-Konformation sowie des Pyrophosphats ist sowohl im Produktkomplex, als auch im Substratanalogkomplex gleich. Die Position des α-Phosphats verschiebt sich in Richtung Ribose nachdem die Bindung zwischen α- und β-Phosphat gespalten wurde. Die Beobachtung, dass die β/γ-Phosphate beziehungsweise das entstehende Pyrophosphat in der gleichen Position vorliegen, ist auf eine ähnliche Koordination der Liganden zurückzuführen und lässt sie wie ein Anker wirken. Das Lys144 interagiert zusätzlich mit dem Produkt PP_i und kann als weiterer Interaktionspartner dienen. Das schwächer transient durch Ion A koordinierte α-Phosphat hat die Möglichkeit in Richtung Ribose zu klappen. Durch die Spaltung der Bindung wird die Streckung des Moleküls aufgehoben, das Lys334 interagiert im Produktkomplex nicht mehr mit der Purinbase und cAMP diffundiert aufgrund der geringeren Affinität ab. Dies konnte in *in situ* hergestellten Produktkomplex festgestellt werden, da sich kein cAMP mehr in der Struktur befindet.

Ob das gesamte ATP *in situ* umgesetzt wird oder der Umsatz lediglich einmal stattfindet, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Das verbleibende Pyrophosphat im Kristall kann darauf hindeuten, dass das Enzym in der Kristallstruktur sterisch gehindert ist und dadurch das PP_i nicht freigesetzt werden kann. Das würde für nur einen Umsatz pro Enzymmolekül sprechen. Alternativ könnte aber auch die im Vergleich zu cAMP höhere Affinitäten von Pyrophosphat, den Verbleib von PP_i in der Struktur erklären. Das bei der Reaktion entstehende cAMP diffundiert vermutlich aufgrund seiner geringeren Affinität ab. Befinden beziehungsweise befanden sich beide entstehenden Produkte im Kristall, wie das beim Produktkomplex (PP_i und cAMP) und beim *in-situ*-PP_i-Komplex (entstanden aus Inkubation von ATP/Mg²⁺ oder Ca²⁺) der Fall ist, so ändert sich der C2 β2-β3 *Loop*-Bereich um 7 Å. Das

Asp339 bewegt sich dabei weg vom Phosphat des cAMPs und könnte so die Freisetzung des cAMPs weiter beschleunigen.

Der Verbleib von PP_i in den *in-situ*- PP_i -Strukturen, der leicht inhibitorische Effekt durch PP_i sowie die Affinität von Pyrophosphat geben Hinweise darauf, dass es sich bei dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion um die Freisetzung des Produkts PP_i handeln könnte. Die Freisetzung von PP_i ist bereits als potentiell inhibitorischer Schritt beispielsweise bei tmACs bekannt.^[44]

Die bekannte Autoinhibition des Enzyms gibt weitere Hinweise, dass es bei hohen ATP-Konzentrationen die Produktfreisetzung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in Frage kommt. Hierbei liegt das Enzym wahrscheinlich vermehrt als Produkt-Komplexe und weniger als freies aktives Enzym vor.

Auffällig beim ApCcp-Komplex zu allen anderen hsAC-Komplexstrukturen ist die Beteiligung von Ile48 an der Koordination. Dies konnte bereits in tmACs und CyaC beobachtet werden. Diese Interaktion verschwindet ebenfalls in tmAC- PP_i -Strukturen.^[46] Die verringerte Koordination des Ions B, wie sie in den *in-situ*- PP_i -Komplexen zu beobachten ist, könnte eine Schwächung der Pyrophosphatbindung zur Folge haben.

5.5 Regulation der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase

5.5.1 Bicarbonatbindestelle

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase kann durch Bicarbonat aktiviert werden.^[81,86] Die Bindestelle konnte anhand der Komplexstruktur mit Bicarbonat identifiziert und mit Hilfe von Bisulfit und Biselenit validiert werden. Bicarbonat ist in der Struktur außergewöhnlich gut als trigonal planare Differenzdichte zu erkennen. Damit wird klar, dass es sich bei dem Aktivator um HCO_3^- und nicht CO_2 handelt. In wässriger Lösung besteht ein Gleichgewicht zwischen gelöstem CO_2 und den beiden Dissoziationsstufen der Kohlensäure (HCO_3^- und CO_3^{2-}). Eine Deprotonierung des Bicarbonats zu Carbonatspezies kann zwar bei dem verwendeten pH-Wert von 6 nicht ausgeschlossen werden, die Spezies ist jedoch mit einem pKs-Wert von 10,5 unterrepräsentiert. Die Struktur selbst ist jedoch nicht hoch genug aufgelöst um die mögliche Position des Wasserstoffatoms zu erkennen.

Es handelt sich bei der Bindestelle um das degenerierte Zentrum, welches im Falle der hsAC für die Regulation des Enzyms verantwortlich ist. Strukturell konnte gezeigt werden, dass der Aktivator durch insgesamt fünf Wasserstoffbrücken koordiniert wird (Abb. 5.10A). Neben den Seitengruppen des Lys95 und des Arg176 komplexieren auch die Amidstickstoffe des

Val167 sowie Met337 und der Carbonylsauerstoff des Val167 das Bicarbonat. Die Akzeptoreigenschaften des Carbonylsauerstoffs (Val167) könnten hierbei zur Diskriminierung zwischen Bicarbonat und Carbonat dienen (Abb. 5.10A).

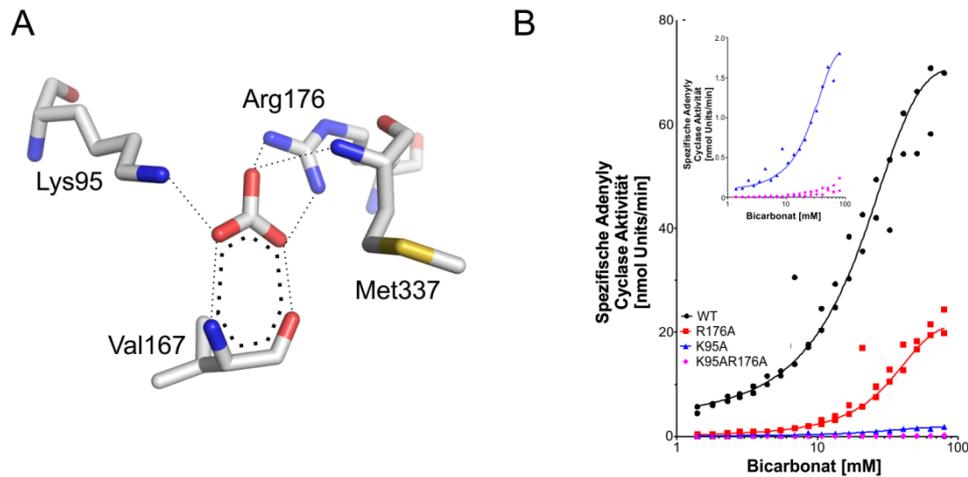


Abbildung 5.10: Lage und Einfluss von Lys95 und Arg176 auf die BBS. **A** Erkennung von Bicarbonat in der BBS. **B** Evaluierung der Regulatorbindestelle durch hsAC Mutationen durch die Abteilung Pharmakologie der Cornell Universität New York. Einfluss von Bicarbonat auf die halbmaximale Aktivierung des Wildtyps (WT) der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase (schwarz) und auf die folgenden hsAC Konstrukte mit Mutationen R176A (rot), K95A (blau) und K95A/R176A (pink).^[37]

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pharmakologie der Cornell Universität in New York konnte mit Hilfe von Mutationsstudien die essentielle Rolle von Arg176 und Lys95 bei der Komplexierung des Bicarbonats und damit beim Aktivierungsprozesse bestätigt werden (Abb. 5.10B). Eine einfache Mutation von Arg176 oder Lys95 zum Alanin senkt die Empfindlichkeit gegenüber Bicarbonat deutlich. Die Lys95Ala Mutante zeigte darüber hinaus eine sehr geringe Grundaktivität, was durch die Entfernung zum Aktivzentrum eine eher indirekte Beteiligung an der Katalyse nahelegt. Die Doppelmutante zeigt keinerlei Aktivierungseffekt gegenüber Bicarbonat (Abb. 5.10B).^[37]

Neben Biselenit und Bisulfit, die durch ihr anomales Signal zur Validierung der BBS verwendet wurden, sind in der regulatorischen Bindestelle auch andere Ionen wie Acetat und Chlorid zu finden, die jeweils aus der Kristallisationslösung oder *Soaking*bedingung stammen. Alle diese Anionen werden jedoch nicht durch Arg176 koordiniert und zeigen darüber hinaus keinen aktivierenden Effekt, sondern lediglich geringe inhibitorische Effekte sowie eine Konkurrenz mit Bicarbonat. Physiologisch gesehen sollten sowohl Acetat als auch Chlorid keine extremen Auswirkungen auf die Aktivität der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase haben, da beispielsweise die intrazelluläre Konzentration von Chlorid mit etwa 4 mM in Säugerzellen und etwa 40 mM in Spermien zu gering ist um die hsAC zu inhibieren.^[170,171]

Diese Chloridkonzentration bleibt trotz Ein- und Ausstrom von Cl^- beispielsweise bei Spermien relativ konstant.^[73]

5.5.2 Aktivierung durch Bicarbonat

Nach eindeutiger Identifikation der BBS, kann im Folgenden nun die Regulation durch Bicarbonat genauer beleuchtet werden. Das Arg176 bewegt sich bei Bindung von HCO_3^- aus der *apo*-Position, in der es eine Salzbrücke mit Asp99 bildet, um 4 Å in Richtung Regulatorbindestelle um dort mit seiner Guanidiniumgruppe das Bicarbonat planar zu koordinieren (Abb. 5.11). Durch das Freisetzen des Asp99, lokalisiert auf dem $\beta 2$ - $\beta 3$ Loop, schwingt die Aminosäure in Richtung Ionenbindestelle B, ohne jedoch diese zu erreichen. Es entsteht dabei eine vorbereitete Substratbindestelle in die das ATP im Vergleich zur *apo*-Konformation leichter binden kann. Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine verbesserte Affinität für ATP, durch Zugabe von HCO_3^- . Das Arg176 kann dabei als wichtiger *Linker* zwischen regulatorischem und aktivem Zentrum gesehen werden (Abb. 5.11). Das Lys95 verbleibt in allen hsAC Strukturen in der gleichen Position. Die Bewegung des Arg176 verbunden mit einem aktivierten Effekt kann ausschließlich bei Bindung von Bicarbonat in die BBS erfolgen. Die hohe mittlere effektive Konzentration ($\text{EC}_{50} = 11 \text{ mM}$) an HCO_3^- , die nötig ist um die hsAC zu aktivieren, geht mit den hohen physiologischen intrazellulären Konzentrationen von Bicarbonat einher.^[45]

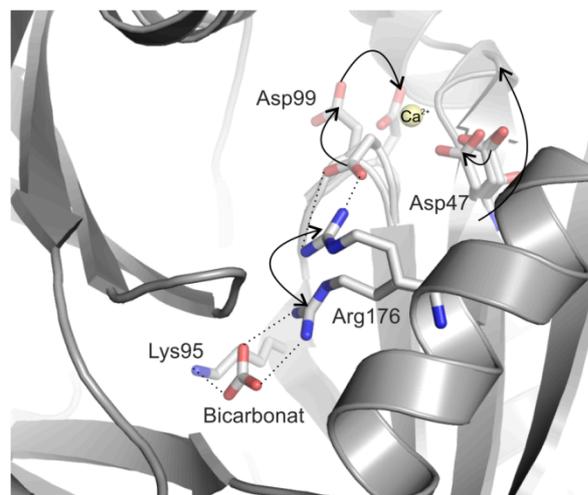


Abbildung 5.11: Änderung durch Bindung von HCO_3^- . Strukturelle Veränderung bei der Bindung von Bicarbonat. Durch Bindung des Aktivator dreht sich das Arg176 vom Asp99 weg, welches in Richtung Ionenbindestelle kippt. Die Ausbildung der Ionenbindestelle (Asp47 und Asp99) sowie der Substratbindestelle (Entwindung des $\beta 1$ -Faltblattes) wird schließlich durch Bindung des Substrates (nicht gezeigt) initiiert. Darstellung des Protein in Cartoon.

Die beobachteten strukturellen Änderungen weisen eher auf einen K_m -Effekt durch Bicarbonat hin. Bei genauerer biochemischer Betrachtung verbessert sich jedoch der K_m

durch Zugabe von Bicarbonat und CaCl_2 (0,9 mM), im Vergleich zur Zugabe von ausschließlich Ca^{2+} -Ionen (1,7-3 mM) nur gering.^[45] Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass HCO_3^- besonders die Autoinhibition durch das Substrat ATP unterbindet und darüber hinaus die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) der katalysierten Reaktion erhöht.^[45] Dies könnte auf eine Änderung der Umsatzgeschwindigkeit (k_{cat}) der Gesamtreaktion durch HCO_3^- zurückzuführen sein oder alternativ könnte Bicarbonat ein Großteil des Proteins in einem aktiven Zustand halten und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beschleunigen. Daher könnte neben der Bindung an das *apo*-Enzym, was einen leichten K_m -Effekt zur Folge haben könnte, eine weitere intermediäre Bindung von Bicarbonat in Frage kommen. Um die bekannten biochemischen Effekte erklären zu können wäre eine intermediäre Bindung bei der Katalyse, vergleichbar zum Ion A, die den Umsatz oder auch die Produktfreisetzung fördern könnte, denkbar.

Um die gleichzeitige Bindung von Aktivator und Substrat(analog) weiter aufzuklären wurden Kristalle mit beiden Liganden inkubiert. Die Kristalle erlitten jedoch bei Inkubation mit Bicarbonat und ApCpp einen Verlust der Diffraktionsqualität und hatten lediglich den Liganden ApCpp gebunden. Dies könnte auf eine neue Konformation hinweisen, die nicht mit der bestehenden Kristallpackung vereinbar ist. Es kann sich aber auch um einen unspezifischen Effekt handeln. Die Tatsache, dass ein Komplex mit Bicarbonat und ApCpp nicht erhalten werden konnte, könnte darauf hinweisen, dass Bicarbonat und Substrat nicht gleichzeitig an das Enzym binden können. Die Bindung von HCO_3^- könnte die Substratbindestelle auf eine ATP-Bindung vorbereitet und wieder abdiffundiert. Anschließend findet die Cyclisierungsreaktion statt und es könnte erneut zur Bindung von Bicarbonat kommen. Der Grund für keine dauerhafte Besetzung der Aktivatorbindestelle könnte die mögliche Beteiligung von Arg176 während der Katalyse sein, die nur möglich ist, wenn kein Bicarbonat in der BBS gebunden ist. Eine schwache Interaktion zwischen Arg176 und der Ribose konnte in Substratkomplexen beobachtet werden. Die Substratbindung würde damit die gleichzeitige dauerhafte Bicarbonatbindung ausschließen. Falls Arg176 an der Reaktion beteiligt wäre, könnte es nach der Cyclisierung das Bicarbonat erneut komplexieren. Ein direkter Effekt auf die Cyclisierungsreaktion ist daher unwahrscheinlich.

Die Beteiligung an der Produktfreisetzung wäre demnach naheliegend. Hinweise darauf liefert auch die fehlende Substratinhibition bei Zugabe von Bicarbonat. Die Substratinhibition bei hohen ATP-Konzentrationen könnte auf die gehemmte Produktfreisetzung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, wie sie vor allem in den *in-vitro*- PP_i -Komplexen zu beobachten war, zurückzuführen sein. Dies würde zur vermehrten Population von Enzym-

Produkt-Komplexen führen und für die Reaktion würde nur wenig freies aktives Enzym zur Verfügung stehen. Bicarbonat könnte daher bei der Freisetzung der Produkte eine Rolle spielen.^[45] Unterstützt wird diese Vermutung durch die Verringerung der PP_i -Affinität in Anwesenheit von Bicarbonat. Zusätzlich konnte bei Bicarbonatbindung in der Ligandenstruktur beobachtet werden, dass das Phe338 in eine Tasche aus Met300 und 419 verschoben wird und damit den Eingang zum aktiven Zentrum weitert. Dies verbessert sowohl den Zugang für das Substrat zur Bindestelle als auch die Freisetzung des entstehenden cAMPs. Das geht mit einer verbesserten Affinität des Substrats ATP und cAMP einher. Die verbesserte Affinität von cAMP ist mit der PP_i Affinität ohne Aktivator vergleichbar. Darüber hinaus würde die erneute Bindung von Bicarbonat das Arg176 wieder aus der Substratbindestelle drehen, wodurch das 2'-OH nicht mehr durch das Arginin über eine Salzbrücke komplexiert wird und damit zur Freisetzung beiträgt.

Keine der verschiedenen Kombinationen mit Substraten, Produkten oder ApCpP führte in Anwesenheit von Bicarbonat zu einer Komplexstruktur. Um auszuschließen, dass die Cl^- -Ionen der verwendeten Chloridsalze ($MgCl_2$ oder $CaCl_2$) mit dem Bicarbonat kompetitieren, wurden die Konzentrationen bis auf ein Minimum (1 mM) reduziert. Dies führte ebenfalls nicht zu einer Komplexstruktur, in der sowohl die Substrat- als auch die Aktivatorbindestelle besetzt ist. Entweder ist eine gemeinsame Bindung nur transient oder gar nicht möglich.

Darüber hinaus lösen sich die Kristalle bei sequenziellen *Soaking*versuchen mit zwei Liganden auf, wenn in der zweiten Soakinglösung die Konzentration des ersten Liganden auf null gesetzt wird. Dies könnte auch darauf hinweisen, dass es eine weitere Konformation des hsAC Proteins gibt, die nicht mit dem gegebenen Kristallgitter vereinbar ist oder dass die Substratkonformation ohne Substrat oder Produkt nicht stabil ist.

Die beschleunigte Schließung des aktiven Zentrums durch Bicarbonat, wie bei CyaC vorgeschlagen, konnte für die humane lösliche Adenylyl-Cyclase nicht beobachtet werden. Das Aktivzentrum liegt in allen erhaltenen Strukturen im Vergleich zu CyaC bereits geschlossen vor.^[41]

Da es grundsätzlich möglich ist, in Anwesenheit von Substratanalogen verschiedene Moleküle in die Regulatorbindestelle zu *soaken* zeigt vor allem der HSO_3^- -ApCpP-Komplex. Er liefert darüber hinaus jedoch keine weiteren Erkenntnisse bezüglich der Aktivierung.

Die Identifikation der BBS in bakteriellen bicarbonataktivierten Cyclasen, die als Homodimer funktionieren, kann durch strukturellen Vergleich mit der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase erfolgen. In CyaC beispielsweise ist das Lysin der potentiellen BBS (Lys1057) in der Sequenz konserviert und entspricht aufgrund der Symmetrie damit der HCO_3^- -bindenden

Aminosäure (Lys95 in hsAC) als auch dem adeninerkennenden Lysin (Lys334 in hsAC) in Cyclasen.^[41] Das Arg176 der BBS in der hsAC entspricht jedoch in CyaC (Arg1150) dem katalytischen Arg416 in der hsAC und ist daher um eine Position verschoben. In CyaC könnte diese Aminosäure kaum beide Funktionen zu übernehmen, da die Entfernung des Arginin mit etwa 13 Å zu BBS relativ groß ist. In allen bicarbonataktivierten Cyclasen ist wie bereits beschrieben ein Threonin konserviert (5.5.2), welches vermutlich das HCO_3^- -Ion komplexiert. Bicarbonat würde demnach in die Purinbindetasche binden. Ein Aspartat (Asp1056 in CyaC) ist ebenfalls in der Nähe der BBS und könnte durch seine Akzeptoreigenschaften für die Differenzierung von Bicarbonat und Carbonat sorgen. Eine Bindung von Substrat und Bicarbonat wäre theoretisch gleichzeitig möglich und die Purinbase könnte ebenfalls das Bicarbonat komplexieren. Jedoch wäre auch eine Halbseitenaktivität, wie sie bereits in ACs aus Mycobakterien beobachtet werden konnte, denkbar.^[25,165] Hierbei würde möglicherweise abwechselnd ein Aktivzentrum zur Regulation und das andere für die Cyclisierungsreaktion verwendet. Falls das katalytische Arginin auch in bakteriellen Adenylyl-Cyclasen für die Aktivierung durch Bicarbonat verantwortlich sein sollte und eine gleichzeitige Bindung von Substrat und Aktivator erfolgt, müsste ebenfalls Halbseitenaktivität eintreten. Da jedoch bei einer Mutation in Position Arg1150 sowohl die Empfindlichkeit gegenüber Bicarbonat als auch die Gesamtaktivität stark verringert wird, kann diese These nicht eindeutig bestätigt werden.^[93]

In anderen Klasse III heterodimeren Cyclasen, die nicht durch Bicarbonat aktiviert werden, ist das Arginin durch ein Asparagin in der C2 Untereinheit ersetzt. Dies macht beispielsweise GCs unempfindlich gegenüber Bicarbonat.

In transmembranen Adenylyl-Cyclasen ist ebenfalls an der entsprechenden Position ein Asparagin zu finden und das Lysin ist durch ein Leucin blockiert. Dadurch kommt es nicht zur Ausbildung einer hydrophilen Bindestelle, die vergleichbar zur Regulatorbindestelle der hsAC ist. In transmembrane ACs kann in das degenerierte Zentrum ein Forskolin binden, das ausschließlich tmACs aktiviert (Abb. 5.12).^[35,53]

Das Diterpen bindet in der Dimergrenzfläche des Heterodimers und sorgt dabei für eine Ausrichtung des aktiven Zentrums sowie eine Verbesserung der apparenten Affinität der C1- und C2-Domäne.^[35,53] Die Verlängerung des β 2- β 3 *Loop* durch Insertion von vier Aminosäuren in die C2-Domäne der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase erklärt im Gegenzug die strukturelle Unempfindlichkeit der hsAC gegenüber Forskolin (Abb. 5.12). Darüber hinaus verengt das Arg176 den Eingangsbereich zur potentiellen Forskolinbindestelle.

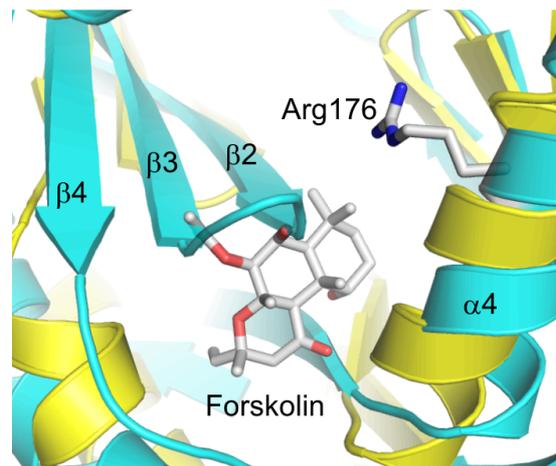


Abbildung 5.12: Die Regulatorbindestelle von tmACs und hsAC im Vergleich. Vergleich der Forskolin-Bindestelle der transmembranen AC (gelb) mit der hsAC apo-Struktur (cyan) in *Cartoon*-Darstellung. Das Forskolin Molekül (*Stick*-Darstellung) überschneidet sich bei einer Überlagerung mit dem $\beta 2 \beta 3$ Loops der humanen lösliche Adenylyl-Cyclase. PDB-Code 1AZS.

5.5.3 Einfluss des pH-Wertes

Die Verwendung verschiedener pH-Werte zeigt, dass das Aktivitätsmaximum der hsAC im alkalischen Bereich bei pH 9 liegt. In Spermien konnte bei der Hyperpolarisation, welche die Kapazitation (physiologische Reifungsprozess) zur Folge hat, ein geringer Anstieg des pH-Wertes um 0,4 pH-Einheiten gemessen werden.^[172–174] Da die Zugabe von Bicarbonat in *in vitro* Experimenten trotz Puffer zu einem leichten Anstieg führte, könnte auch *in vivo* der Einstrom von Bicarbonationen mit einer gleichzeitigen lokalen pH-Erhöhung einhergehen.^[175] Eine strukturelle Begründung für die erhöhte Aktivität, die ausschließlich auf einen Anstieg des pH-Wertes zurückzuführen ist, konnte nicht gefunden werden. Es konnte jedoch bereits mehrfach gezeigt und in dieser Arbeit bestätigt werden, dass zwischen dem pH-Effekt und den Bicarbonateffekt klar differenziert werden kann.^[41,45] Bei Erhöhung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich erhöht sich jedoch der HCO_3^- -Anteil im Vergleich zu gelöstem CO_2 nachweislich. Beide Effekte, der direkte Einfluss des pH-Wertes als auch die damit verbundene Erhöhung des Bicarbonatanteils, können daher synergistisch auf die Aktivität der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase wirken.

5.5.4 Potentielle Regulatorbindestelle

Die Aktivität von Enzyme wird intrazellulär auch durch andere Proteine reguliert. Im Falle der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase ist ebenfalls eine weitere Regulation durch Protein-Protein-Interaktionen denkbar. Hinweise für eine Protein-Protein-Interaktionsfläche gibt ein stark hydrophober Bereich der kristallisierten verkürzte Isoform der humanen löslichen

Adenylyl-Cyclase (Abb. 5.11). Proteinbereiche, die aus einer Anhäufung von hydrophoben Aminosäuren, wie Prolin oder Phenylalanin, bestehen, dienen häufig als Proteinbindestellen.^[176,177] Unterstützt wird diese Möglichkeit durch den 12-Aminosäure langen unstrukturierten N-terminalen Bereich eines symmetrieverwandten Monomers, der im Kristall mit diesem hydrophoben Bereich interagiert (Abb. 5.13). Die Freiheiten dieses variablen N-terminalen Bereichs werden durch diese Interaktion vermutlich stark eingeschränkt, so dass der N-Terminus in der Struktur durch die Elektronendichte gut definiert ist.

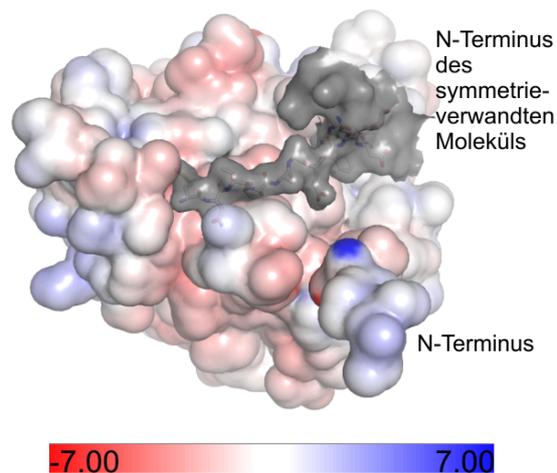


Abbildung 5.13: Potentielle Protein-Protein-Interaktionsstelle der hsAC. Elektrostatische Oberfläche der hsAC-Struktur mit möglicher Interaktionsfläche für Protein-Protein-Wechselwirkungen. In der Kristallstruktur interagiert der N-Terminus eines symmetrieverwandten hsAC Moleküls (graue Oberflächendarstellung mit Aminosäuren in *Stick*-Darstellung hinterlegt) mit diesem hydrophoben Proteinbereich.

Die verkürzte Isoform der hsAC könnte also zusätzlich zum Bicarbonat durch andere Proteine reguliert werden. Im Falle des Volllänge Proteins könnten auch interne C-terminale hsAC-Domänen in diesem Bereich interagieren.

5.6 Inhibierung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase

Modulatoren für die humane lösliche Adenylyl-Cyclase, die als mögliches therapeutisches *Target* gilt, hätten eine weitreichende pharmakologische Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene physiologische Substanzen, die eine gewisse Ähnlichkeit zu ATP oder DIDS bezüglich ihrer funktionellen Gruppen und Ladungen haben, auf ihre Wirkung gegenüber der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase untersucht. Es konnte dabei kein neuer potenterer Modulator für die verkürzte Isoform gefunden werden. Auch die Verbindungen aus der Klasse der Tetransäuren, die ihr inhibitorisches Potential durch Nachahmung von

Phosphatresten entfaltet, zeigt lediglich einen geringen inhibitorischen Effekt auf die humane lösliche Adenylyl-Cyclase.^[152]

Eine Überlagerung des bereits bekannten Inhibitors 2-Hydroxyestradiol (2-CE) und der ApCpp Struktur zeigt, dass eine Bindung des Inhibitors auch in der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase möglich wäre und bestätigt damit bereits existierende biochemische Daten (Abb. 5.14).^[105] Es kommt wahrscheinlich zu einem ähnlichen inhibitorischen Effekt wie bei CyaC, dem Homolog aus Cyanobakterien.

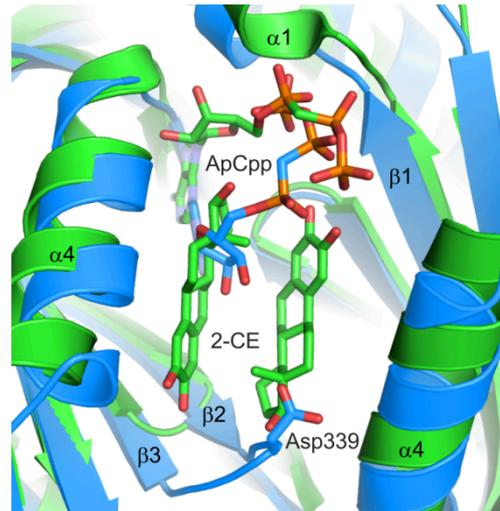


Abbildung 5.14: Überlagerung der 2-CE gebundenen CyaC Struktur mit der ApCpp-Struktur der hsAC. Um die mögliche Bindungsstelle von 2-Hydroxyestradiol im hsAC Protein zu betrachten wurde die ApCpp-Struktur (blau) und die CyaC-Struktur mit 2-CE (grün) in *Cartoon*-Darstellung überlagert. Die Substrate ApCpp und die Inhibitormoleküle, sowie das Asp339, welches möglicherweise eine zweite 2-CE Bindung verhindert, sind in *Stick*-Präsentation dargestellt. PDB-Code 2BW7.

Die Bindung erfolgt in der Dimergrenzfläche, was eine nicht-produktive Konformation des Substrats im Enzyms stabilisiert und die Position des Ions A verschiebt.^[105] Die Bindung von 2-CE-Molekülen an die hsAC würde wahrscheinlich die Substratbindung, besonders im Bereich der Ribose und der Phosphate wie bei CyaC, verändern. Die Insertion im C2 β 2- β 3 *Loop*, die bereits die Bindung von Forskolin verhindert hat, überlagert mit einem der beiden 2-CE Moleküle (Abb. 5.14). Für eine Bindung beider Inhibitormoleküle müsste sich der C2 β 2- β 3 *Loop* (Asp339 und Phe338) und das flexible Arg176 aus den potentiellen Bindestellen drehen. Die Interaktion des Inhibitors mit dem Ion A, wie sie in CyaC gezeigt wurde, legt nahe, dass bereits ein 2-CE-Molekül für den inhibitorischen Effekt bei heterodimeren Adenylyl-Cyclasen ausreicht. Ob dies für den humane lösliche Adenylyl-Cyclase zutrifft kann letztlich nur eine Komplexstruktur zeigen. Der Vergleich beider Strukturen zeigt deutlich, dass CyaC als Modell für die humane lösliche Adenylyl-Cyclase grundsätzlich funktionieren kann. Die weitere Aufklärung von Inhibitionsmechanismen bereits bekannter Inhibitoren

würde die zukünftige Weiterentwicklung von pharmakologischen inhibitorischen Substanzen erleichtern.

5.6.1 KH7

Der bekannteste spezifische Inhibitor der löslichen Adenylyl-Cyclase ist KH7. Er inhibiert die hsAC mit einem IC_{50} von etwa $1 \mu\text{M}$. Die Affinität des Inhibitors liegt mit $4,3 \mu\text{M}$ im niedrigen mikromolaren Bereich. In Anwesenheit des Substrats verringert sich die Affinität um das 7-fache, was auf eine kompetitive Bindung von ATP und KH7 hinweist und damit dem postulierten nichtkompetitiven Mechanismus widersprechen würde.^[72] Die Lokalisation der Inhibitorbindestelle ist jedoch trotz Verwendung des anomalen Signals der Bromgruppe schwierig, da kaum interpretierbare Differenzdichte in der Struktur zu erkennen ist. Die *apo*-Kristalle wurde bei verschiedenen Konzentrationen KH7 bis zu einer maximalen Konzentration von 25 mM inkubiert. Vermutlich ist die Bindung von KH7 in dieser Kristallpackung nicht optimal, weshalb die Besetzung und damit sowohl das Br-Signal als auch die Differenzdichte äußerst schwach und nicht zu interpretieren sind. Die Überlagerung von Strukturen mit ähnlichen Inhibitoren, wie 1VE ((4-Azanyl-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-[3-(1H-benzimidazol-2-ylmethoxy)phenyl]methanon), die wie KH7 einen Benzimidazolrest besitzen, ergab keine weiteren Hinweise auf eine mögliche bevorzugte Bindungsposition der Benzimidazolgruppe von KH7. Der Benzimidazolrest bindet in der 1VE-Komplexstruktur hauptsächlich in der hydrophoben Umgebung von Phe336 und Phe296 und bildet nur schwache Interaktionen zum Protein aus. Der Abstand zwischen anomalem Br-Signal und potentieller Benzimidazolbindestelle ist zu gering um KH7 ähnlich wie 1VE zu positionieren.^[110] Darüber hinaus besetzt 1VE die BBS, was bei KH7 aufgrund des Br-Signals nicht der Fall zu sein scheint. Um eine Komplexstruktur mit KH7 zu erhalten, müsste eine neue Kristallisationsbedingung gefunden werden bei der das hsAC_{cat}-Konstrukt und KH7 kokristallisiert sind.

Neben KH7 sind aber auch Liganden wie 1VE und deren Inhibitionsmechanismus, die eine sehr guten inhibitorischen Effekt gegenüber der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase aufweisen, für die Entwicklung weiterer Inhibitoren interessant.^[110] Von besonderem Interesse ist die Bindung in die BBS, die möglicherweise auch zur Entwicklung eines Aktivators führen könnte.

5.6.2 DIDS

Die Unterschiede zwischen transmembranen und der löslichen Cyclase besonders im Bezug auf ihre Regulatorbindestelle machen die hsAC zu einem pharmakologisch interessanten *Target*. Besonders interessant sind Inhibitoren, die sowohl einen inhibitorischen Effekt auf das Enzym an sich, als auch auf die Aktivierung durch Bicarbonat haben. Für den Inhibitor DIDS konnte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pharmakologie der Cornell Universität in New York sowohl der IC_{50} ($43 \mu\text{M}$ bei einer Substratkonzentration von 5 mM ATP) bestimmt werden, also auch eine Kompetition des Inhibitors mit Bicarbonat nachgewiesen werden (Abb. 5.15).

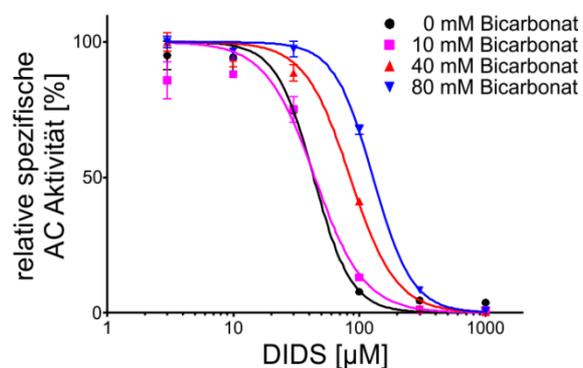


Abbildung 5.15: Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration von DIDS. Der IC_{50} wurde durch den Kooperationspartner in New York bei verschiedenen Bicarbonatkonzentrationen bestimmt. DIDS IC_{50} bei 0 mM HCO_3^- ($43 \mu\text{M}$, schwarz), bei 10 mM HCO_3^- ($44 \mu\text{M}$, pink), bei 40 mM HCO_3^- ($85 \mu\text{M}$, rot), bei 80 mM HCO_3^- ($130 \mu\text{M}$, blau).^[37]

Strukturell gesehen wird zwar die BBS nicht durch das DIDS-Molekül besetzt, jedoch blockiert der Inhibitor aufgrund seiner Lage den Zugang zur BBS (Abb. 5.16).

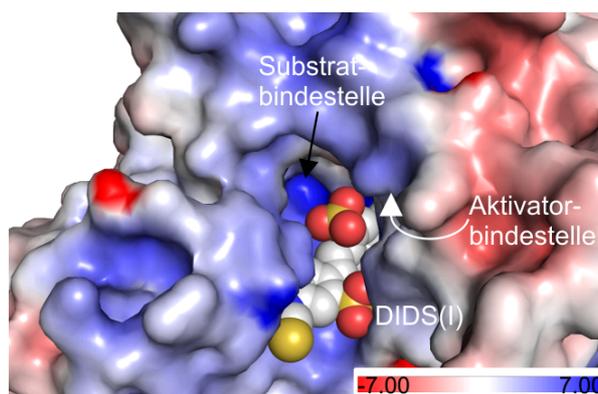


Abbildung 5.16: DIDS-Bindestelle. DIDS (Sphären-Darstellung) blockiert sowohl Teile der Substratbindestelle, als auch den Zugang zur Bicarbonatbindestelle, die im Kristall mit Acetat (Sphären-Darstellung) besetzt ist. Die Enzymstruktur ist mit der berechneten elektrostatischen Oberfläche überlagert.

Dabei verdrängt das DIDS-Molekül zusätzlich das Arg176, welches essentiell für die Aktivierung zu sein scheint, von seiner Position. Außerdem kommt es bei der Bindestelle von Substrat und Inhibitor zu geringfügigen Überschneidungen. Eine derartige neue Bindestelle,

die sowohl die regulatorische als auch die Substratbindestelle umschließt, ist neu und wahrscheinlich einzigartig für die humane löslichen Adenylyl-Cyclase.

Der inhibitorische Mechanismus konnte durch Konkurrenzexperimente mit dem Substrat ATP aufgeklärt werden. Neben dem DIDS-Molekül (DIDS I), welches offensichtlich für diesen Inhibitionsmechanismus verantwortlich ist, sind jedoch zwei weitere DIDS-Moleküle in der Komplexstruktur zu finden. Das DIDS III Molekül bindet in einer Tasche, die sich im Kristallkontakt zweier symmetrieverwandten hsAC Molekülen ausbildet. Diese Bindungstasche sollte in Lösung nicht gegeben sein. Durch Reduzierung der InhibitorKonzentration bei den *Soaking*experimenten sowie Vergleich der B-Faktoren konnte die Bindung des DIDS III-Moleküls zusätzlich als artifiziell ausgeschlossen werden.

Die Rolle des DIDS II, welches den niedrigsten B-Faktor aufweist, konnte jedoch mit Hilfe von Affinitätsmessungen weiter untersucht werden. Hinweise auf die Bindung von zwei DIDS-Molekülen gibt die Bindungskurve, die eher sigmoidal als hyperbolisch verläuft. Der Hill-Koeffizient ($n=2$) weist auf eine positive kooperative Bindung hin. Wahrscheinlich beeinflusst die Bindung von DIDS II die weitere Bindung von DIDS I positiv. Die beiden gebundenen Inhibitoren liegen in der Struktur etwa 18 Å auseinander. Strukturell betrachtet kommt es durch die Bindung des DIDS II Moleküls zu keiner auffälligen Veränderung in der Struktur, die eine Kooperativität erklären könnte. Ausgenommen davon ist die veränderte Lage der β -Mercaptoethanol-Modifikation, die durch das DIDS II Molekül verdrängt wird.

Der kompetitive Inhibitor (DIDS I) könnte durch rationales Design weiter verbessert werden um weitere und stärkere Interaktionen ausbilden zu können und dadurch noch bessere kompetitive Effekte zu erzielen. Der Zugang zum aktiven Zentrum bietet sich darüber hinaus als pharmakologische Inhibitorbindestelle für hydrophobe beziehungsweise anionische Inhibitoren, die spezifisch an die humane lösliche Adenylyl-Cyclase binden, an. Darüber hinaus sollte die Kooperativität beziehungsweise die Bindestelle des DIDS II Moleküls weiter untersucht werden. Die Bindung eines Liganden in diese Bindestelle könnte auch die Bindung des Substrates verändern.

6 Zusammenfassung

Cyclisches-3'-5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert als evolutionär konservierter sekundärer Botenstoff ubiquitär verschiedene zelluläre Funktionen. In Säugern wird cAMP von neun transmembranen Adenylyl-Cyclasen (tmACs), aber nur eine lösliche Cyclase (sAC), synthetisiert. Ausschließlich die lösliche Adenylyl-Cyclase wird dabei durch Bicarbonat aktiviert und wirkt daher als zellulärer Sensor für Bicarbonat. Darüber hinaus reagiert die löslichen Adenylyl-Cyclase auf Änderungen der zellulären ATP Substratkonzentration, der Calciumkonzentrationen und des pH-Wertes.

Die humane lösliche Adenylyl-Cyclase ist bereits biochemisch gut charakterisiert, jedoch konnten bisher nur bakterielle Homologe oder transmembrane Adenylyl-Cyclasen strukturell untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Strukturen des katalytischen Zentrums der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase in der *apo*-Form sowie in Komplex mit verschiedenen Liganden wie Substrat, Substratanalogon, Produkt oder Aktivator aufgeklärt.

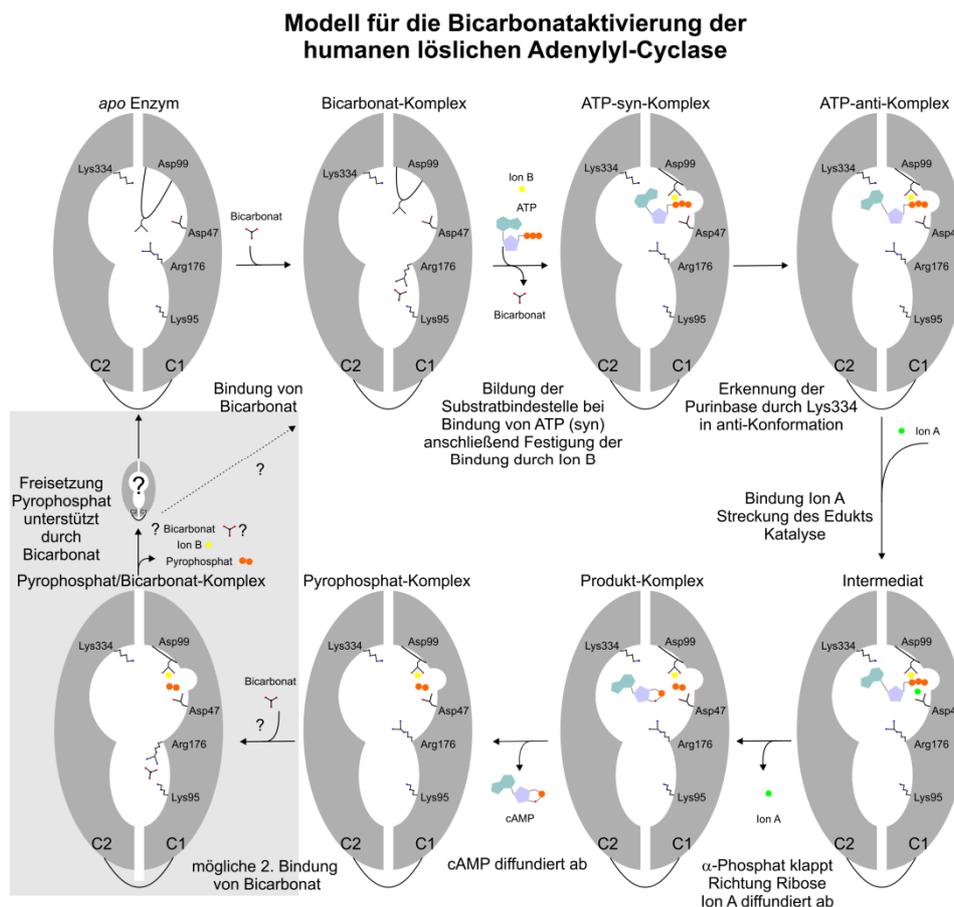


Abbildung 6.1: Vorgeschlagenes Modell für die Bicarbonataktivierung der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase. Das Modell basiert auf den bisherigen vorliegenden Daten. Die Bindung von HCO_3^- sorgt für eine vorbereitete Ionenbindestelle. Die ATP-Bindung erfolgt zunächst in einer Vororientierung, diese wird durch divalente Kationen und die Erkennung des Lys334 gefestigt. Anschließend erfolgt die Katalyse durch intermediäre Bindung des Ions A. Die gebildeten Produkte diffundieren ab. Zunächst cAMP und anschließend eventuell unterstützt durch Bicarbonat das Pyrophosphat (grau hinterlegt da noch nicht eindeutig geklärt).

Die Bindung des Substrats erfolgt im ersten Schritt in einer losen ATP-Koordination in syn-Konformation, die durch divalente Ionen wie Calcium verbessert wird. Anschließend kommt es am N1-Stickstoff zur Erkennung der Purinbase durch das Lys334 in anti-Konformation des Nukleotids (Abb. 6.1). Die Möglichkeit für das Substrat zunächst in der syn-Konformation zu binden könnte die hohe Nebenaktivität erklären, da das Enzym hierbei auch GTP anstatt ATP erkennen kann. Die geringe Affinität des Substrats ATP zu hsAC im Vergleich zu transmembranen Adenylyl- oder Guanylyl-Cyclasen liegt in der unterschiedlichen Koordination des Ringsauerstoffs der Ribose begründet. Cyclasen mit einer hohen Substrataffinität interagieren über ein Serin oder Tyrosin mit dem Ringsauerstoff. In der hsAC hingegen ist diese Aminosäureposition durch ein Alanin (Ala415) ersetzt, welches den Ringsauerstoff nicht komplexieren kann. Die Affinität für ATP kann jedoch durch die Bindung von Ca^{2+} in der Ionenbindestelle B durch bessere Koordination der Phosphate erhöht werden. Das Arg416 ist für die Katalyse aufgrund seiner Position essentiell und übernimmt wahrscheinlich die Funktion der katalytischen Base zu aktivieren. Bei der Katalyse bewegt sich das α -Phosphat in Richtung der Ribose. Die Freisetzung des Produkts Pyrophosphat (PP_i) scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse zu sein. Dies geht sowohl aus strukturellen Beobachtungen, als auch Affinitätsvergleichen hervor.

Bicarbonat ist der bisher einzig bekannte physiologische Aktivator der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase. Der Aktivator kann die hsAC durch direkte Bindung stimulieren und wird dabei durch Lys95 und Arg176 komplexiert. HCO_3^- initiiert durch Freigabe des Asp99 die Bildung der katalytischen Ionenbindestelle (Abb. 6.1). Darüber hinaus könnte Bicarbonat durch Bindung an den Produktkomplex eine Rolle bei der Produktfreisetzung spielen, da HCO_3^- die Affinität für PP_i reduziert. Das Arg176 verbrückt dabei das regulatorische und das aktive Zentrum miteinander (Abb. 6.1).

Verschiedene pharmakologische Inhibitoren wurden auf ihre Wirkungsweise untersucht. Der hsAC selektive Inhibitor KH7 bindet kompetitiv zum Substrat an das Enzym, die genaue Bindestelle bleibt jedoch weiterhin unbekannt. 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (DIDS) hingegen inhibiert die hsAC durch Bindung im Zugang zum aktiven Zentrum und verhindert damit auch eine Aktivierung durch Bicarbonat. Zusätzlich wird das Arg176 blockiert, welches essentiell für die Bicarbonataktivierung ist.

Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse einen strukturellen Einblick in den molekularen Mechanismus der Katalyse sowie Erkenntnisse zur Regulation durch HCO_3^- und pharmakologischen Inhibitoren. Diese Informationen können nun für die weitere Entwicklung von isoformspezifischen Inhibitoren oder Aktivatoren genutzt werden.

7 Abstract

The ubiquitous evolutionary conserved second messenger 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is regulating various cell functions. In mammalian cAMP is synthesized by nine transmembrane but only by one soluble adenylyl cyclase (sAC). Exclusively sAC is directly activated by bicarbonate, and is therefore a cellular sensor for bicarbonate. Furthermore, it is sensitive for changes in substrate concentrations (ATP), Calcium and pH.

Formerly the human soluble adenylyl cyclase was characterized biochemically but only bacterial homologs or the transmembrane adenylyl cyclases were structurally investigated. In this thesis the first structure of the catalytic core of human soluble adenylyl cyclase was solved in apo form and in complex with different ligands like substrate, substrate analog, products or activator.

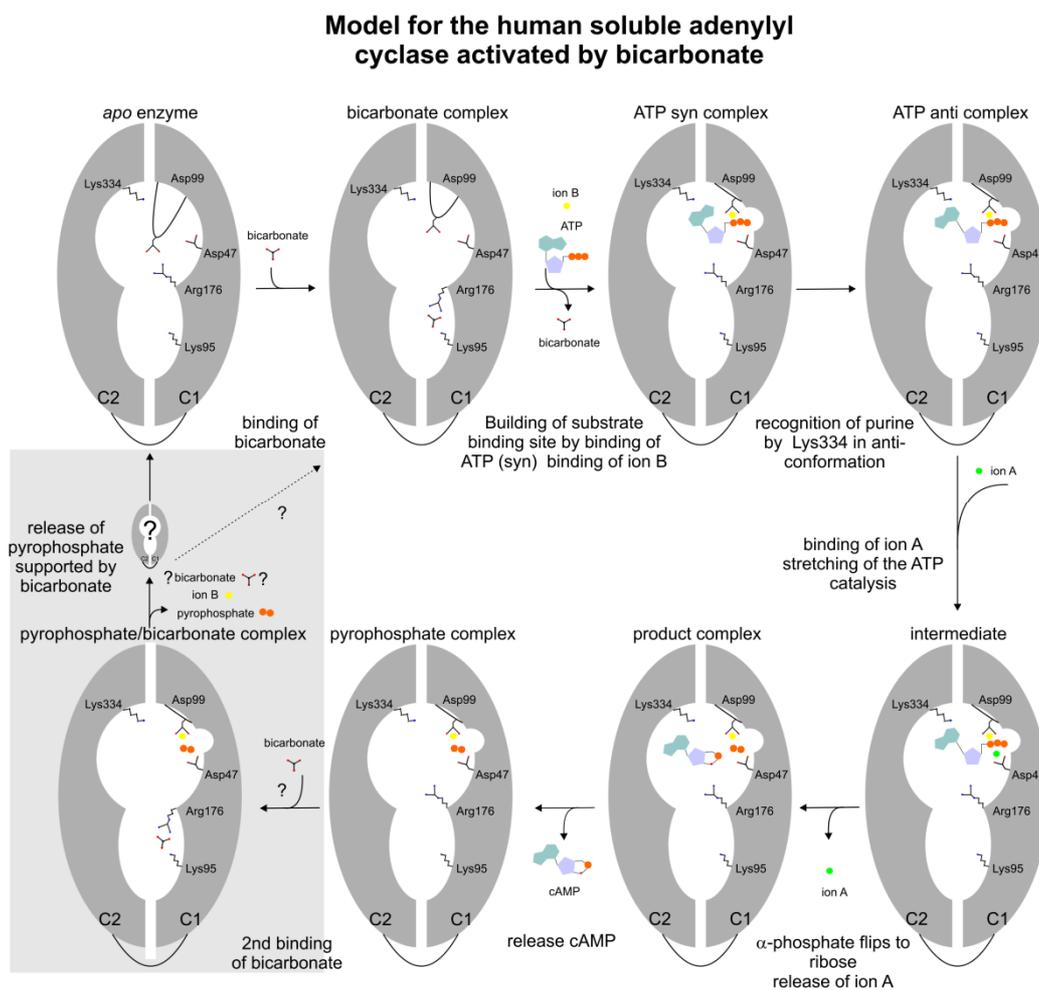


Abbildung 7.1: Proposed model of human soluble adenylyl cyclase activated by bicarbonate. The model is based on the previous results. Binding of HCO_3^- prepares the ion binding site for the cations and ATP. Next ATP can bind in a preorientation. The substrate is fixed by divalent ion B and recognized by Lys334. Binding of Ion A initiates the reaction. The products are finally released., first the cAMP and then the pyrophosphate. The PP_i -release might be facilitated by bicarbonate, which is not yet completely proven (underlaid with grey).

The binding mechanism of the substrate was investigated suggesting a preorientation in syn conformation of the substrate, which will be enhanced by a divalent ion like Ca^{2+} in an anti-conformation. Later the N1 nitrogen of the purine residue in anti conformation will be recognized by Lys334 to produce the reactive conformation. Observing such a preorientation of the substrate might explain the high side activity of hsAC by erroneously recognizing GTP instead of ATP. The low affinity for the substrate ATP in contrast to transmembrane adenylyl or guanylyl cyclases can be explained by binding of the ring oxygen of the ribose. Cyclases with high substrate affinity interact with the ribose via serine or tyrosine residue, but hsAC has an alanine at the corresponding position, which is not able to interact. The affinity for ATP could be increased by a Calcium ion, which preferably binds to the ion site B. Due to the position of the structurally conserved Arg416 in the structure, it might be the essential residue for the catalysis acting as a base activator. The formation of the product leads to a flipping of the α -phosphate to the ribose. Both affinity measurements and structural results suggest the pyrophosphate-release (PP_i) being the rate limiting step during the reaction.

Bicarbonate (HCO_3^-) is the only known physiological activator of the human soluble adenylyl cyclase, which binds directly to the enzyme. The activator HCO_3^- is complexed by Lys95 and Arg176. HCO_3^- binding induces a movement of the Arg176, which enables the formation of the catalytic cation sites by releasing Asp99. Arg176 is bridging the regulatory and the active site. A decrease of affinity for PP_i in presence of bicarbonate suggests a binding of HCO_3^- to the product complex of hsAC, which facilitates the release of the pyrophosphate.

Various pharmacological inhibitors were investigated. KH7, a specific hsAC inhibitor, binds in a competitive manner to the enzyme in a yet unknown mode. Another compound, 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS), inhibits hsAC by binding to the active site entrance, blocking the bicarbonate activation by steric hindrance and trapping the Arg176. These results provide a structural insight into the catalytic mechanism for hsAC catalysis and the way the enzyme is regulated by HCO_3^- or other pharmacological modulators. This information could be used as a basis for the development of drugs targeting this signaling system.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Masse/Volumen
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µS	Mikrosievert
1VE	(4-Azanyl-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-[3-(1H-benzimidazol-2-ylmethoxy)phenyl]methanon)
2',5'-ddAdo	2',5'-Didesoxyadenosin
2',5'-ddATP	2',5'-Didesoxy-3'-ATP
2-CE	2-Hydroxyestradiol
2F ₀ -F _c	Elektronendichtekarte
4-CE	4-Hydroxyestradiol
Å	Ångström
AC	Adenylyl-Cyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APBS	<i>Adaptive Poission-Boltzmann Solver</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	Bicarbonatbindestelle
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
BL	Beamline
bp	Basenpaare
C1	Katalytische Domäne 1
C2	Katalytische Domäne 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	<i>Catabolite activator protein</i>
cAPK	cAMP-abhängige Proteinkinase
CE	Catechol estrogen
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CNG	<i>Cyclic nucleotide-gated</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CO ₃ ²⁻	Carbonat
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTFR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CyaC	<i>Cyanobacterial adenylyl cyclase</i>

C_{α}	α -Kohlenstoffatome
d	Tag
Da	Dalton
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DSSP	<i>Define secondary structure of protein</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPAC	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
EtOH	Ethanol
F _o -F _c	Differenzdichtekarte
FOM	<i>Figure of merit</i>
FPLC	<i>Fast pressure liquid chromatography</i>
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GAF	<i>cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA</i>
GC	Guanylyl-Cyclase
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
hsAC	Humane lösliche Adenylyl-Cyclase
hsAC _{fl}	Volllänge hsAC Protein
hsAC _t	Verkürzte Isoform des hsAC Protein
HSeO ₃ ⁻	Biselenit
HSO ₃ ⁻	Bisulfit
HZB	Helmholzzentrum Berlin
HZI	Helmholzzentrum für Infektionsforschung Braunschweig
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
kbp	Kilobasenpaare
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KH7	(E)-2-(1H-Benzo[d]imidazol-2-ylthio)-N'-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene)propanehydrazide
K _m	Michaeliskonstante
l	Liter

LB	<i>Luria-Bertani</i>
MAD	<i>Multi-wavelength anomalous dispersion</i>
MBP	Maltrosebindeprotein
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
mM	Milimolar
MPD	2-Methyl-2, 4-pentandiol
MR	Molekularer Ersatz
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
NCS 270718	1,2,3,4,5,6,7,8,13,13,14,14-Dodecachloro- 1,4,4a,4b,5,8,8a,12b-octahydro-11-sulfo-1,4:5,8- dimethanotriphenylen-10-carbonsäure
ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NTA	Nitrilotriessigsäure
omit	Ungewichtet
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PMC-6	1R,4R-3-(6-Aminopurin-9-yl)-cyclopentan-carbonsäure- hydroxyamid
pmol	Picomol
PP _i	Pyrophosphat
P _α	α-Phosphat
P _β	β-Phosphat
P _γ	γ-Phosphat
Rap	<i>Ras-related protein</i>
R _{free}	Freier R-Wert
R _{meas}	R-Faktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
R _{work}	R-Faktor
s	Sekunde
sAC	<i>Soluble adenylyl cyclase</i>
SAD	<i>Single-wavelength anomalous dispersion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i>
SIR	<i>Single isomorph replacement</i>
SIRAS	<i>Single isomorph replacement and anomalous dispersion</i>
SLC	<i>solute carrier family</i>
SLS	<i>Swiss light source</i>

TB	<i>Terrific broth</i>
TIPS	<i>Titerless infected-cells preservation and scale-up</i>
tmAC	Transmembrane Adenylyl-Cyclase
tmGC	Transmembrane Guanylyl-Cyclase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
V_{\max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
σ	Sigma

Aminosäuren:

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

9 Literaturverzeichnis

- [1] M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 11–21.
- [2] R. F. Irvine, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 580–585.
- [3] J. F. Kerwin, J. R. Lancaster, P. L. Feldman, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4343–4362.
- [4] J. M. Gancedo, *Biol. Rev.* **2013**, *88*, 645–668.
- [5] J. A. Beavo, L. L. Brunton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 710–718.
- [6] S. E., Berthet J. Rall TW, *J. Biol. Chem.* **1957**, 463–475.
- [7] E. W. Sutherland, T. W. Rall, *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1077–91.
- [8] R. Kopperud, C. Krakstad, F. Selheim, S. O. Døskeland, *Signal Transduct. Spec. Issue* **2003**, *546*, 121–126.
- [9] X. Cheng, Z. Ji, T. Tsalkova, F. Mei, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2008**, *40*, 651–662.
- [10] T. C. Rich, *J. Gen. Physiol.* **2000**, *116*, 147–162.
- [11] U. B. Kaupp, R. Seifert, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 769–824.
- [12] A. T. Bender, *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 488–520.
- [13] M. Conti, J. Beavo, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 481–511.
- [14] M. Gross-Langenhoff, K. Hofbauer, J. Weber, A. Schultz, J. E. Schultz, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2841–6.
- [15] J. Tellez-Sosa, N. Soberon, A. Vega-Segura, M. E. Torres-Marquez, M. A. Cevallos, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 3560–8.
- [16] M. Kamenetsky, S. Middelhaufe, E. M. Bank, L. R. Levin, J. Buck, C. Steegborn, *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 623–639.
- [17] A. Danchin, *Adv Second Messenger Phosphoprot. Res.* **1993**, *27*, 109–62.
- [18] J. U. Linder, *Biochem. J.* **2008**.
- [19] A. Kolb, S. Busby, I. I. Buc, S. Garges, S. Adhya, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 749–797.
- [20] Q. Guo, Y. Shen, Y. S. Lee, C. S. Gibbs, M. Mrksich, W. J. Tang, *Embo J.* **2005**, *24*, 3190–201.
- [21] D. T. Gallagher, N. N. Smith, S. K. Kim, A. Heroux, H. Robinson, P. T. Reddy, *J. Mol. Biol.* **2006**, *362*, 114–22.
- [22] M. A. Cotta, T. R. Whitehead, M. B. Wheeler, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *164*, 257–60.
- [23] O. Sismeiro, P. Trotot, F. Biville, C. Vivares, A. Danchin, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 3339–44.
- [24] D. A. Baker, J. M. Kelly, *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 1229–42.
- [25] S. C. Sinha, S. R. Sprang, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2006**, *157*, 105–40.
- [26] S. Middelhaufe, M. Leipelt, L. R. Levin, J. Buck, C. Steegborn, *Biosci. Rep.* **2012**, *32*, 491–9.
- [27] J. U. Linder, J. E. Schultz, *Cell Signal* **2003**, *15*, 1081–9.
- [28] A. R. Shenroy, S. S. Visweswariah, *FEBS Lett.* **2004**, *561*, 11–21.
- [29] E. S. Underbakke, A. T. Iavarone, M. A. Marletta, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 6777–6782.
- [30] R. K. Sunahara, R. Taussig, *Mol. Interv.* **2002**, *2*, 168–84.
- [31] W. J. Tang, J. H. Hurley, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 231–40.
- [32] J. H. Hurley, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7599–7602.
- [33] L. R. Potter, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2005**, *10*, 1205–1220.
- [34] C. K. Allerton, F. von Delft, O. Gileadi, *PLoS One* **2013**, *8*, e57644.
- [35] J. J. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science* **1997**, *278*, 1907–16.
- [36] W. Geng, *AJP Cell Physiol.* **2005**, *288*, C1305–C1316.

- [37] S. Kleinboelting, A. Diaz, S. Moniot, J. van den Heuvel, M. Weyand, L. R. Levin, J. Buck, C. Steegborn, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 3727–3732.
- [38] G. Zimmermann, D. Zhou, R. Taussig, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19650–5.
- [39] F. Eckstein, P. J. Romaniuk, W. Heideman, D. R. Storm, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 9118–20.
- [40] J. J. Tesmer, R. K. Sunahara, R. A. Johnson, G. Gosselin, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science* **1999**, *285*, 756–60.
- [41] C. Steegborn, T. N. Litvin, L. R. Levin, J. Buck, H. Wu, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 32–7.
- [42] A. Rauch, M. Leipelt, M. Russwurm, C. Steegborn, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 15720–5.
- [43] J. J. Tesmer, C. W. Dessauer, R. K. Sunahara, L. D. Murray, R. A. Johnson, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14464–71.
- [44] C. W. Dessauer, A. G. Gilman, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 27787–95.
- [45] T. N. Litvin, M. Kamenetsky, A. Zarifyan, J. Buck, L. R. Levin, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15922–15926.
- [46] T. C. Mou, A. Gille, D. A. Fancy, R. Seifert, S. R. Sprang, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7253–61.
- [47] J. L. Guillou, H. Nakata, D. M. Cooper, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35539–45.
- [48] J. O. Gordeladze, T. Abyholm, L. Cusan, O. P. Clausen, V. Hansson, *Arch. Androl.* **1982**, *8*, 199–204.
- [49] R. K. Sunahara, C. W. Dessauer, R. E. Whisnant, C. Kleuss, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22265–71.
- [50] P. A. Insel, R. S. Ostrom, *Cell. Mol. Neurobiol.* **2003**, *23*, 305–314.
- [51] K. B. Seamon, J. W. Daly, *Adv. Cycl. Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **1986**, *20*, 1–150.
- [52] L. R. Forte, D. B. Bylund, W. L. Zahler, *Mol Pharmacol* **1983**, *24*, 42–7.
- [53] C. W. Dessauer, T. T. Scully, A. G. Gilman, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 22272–7.
- [54] S. M. L., Schapal L., Cann M. J., and Levin L. R. Buck J., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 79–84.
- [55] B. S. Jaiswal, M. Conti, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31698–708.
- [56] B. S. Jaiswal, M. Conti, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 10676–81.
- [57] J. A. Chaloupka, S. A. Bullock, V. Iourgenko, L. R. Levin, J. Buck, *Mol. Reprod. Dev.* **2006**, *73*, 361–8.
- [58] M. S., Buck J. Levin L. R. Wuttke, *J. Pancreas* **2001**, 154–158.
- [59] A. M. Stessin, J. H. Zippin, M. Kamenetsky, K. C. Hess, J. Buck, L. R. Levin, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17253–17258.
- [60] K. Y. Wu, J. H. Zippin, D. R. Huron, M. Kamenetsky, U. Hengst, J. Buck, L. R. Levin, S. R. Jaffrey, *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 1257–64.
- [61] J. J. Young, A. Mehdi, L. L. Stohl, L. R. Levin, J. Buck, J. A. Wagner, A. M. Stessin, *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 118–124.
- [62] J. P. Flacke, H. Flacke, A. Appukuttan, R. J. Palisaar, J. Noldus, B. D. Robinson, H. P. Reusch, J. H. Zippin, Y. Ladilov, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 3126–35.
- [63] J. H. Zippin, Y. Chen, P. Nahirney, M. Kamenetsky, M. S. Wuttke, D. A. Fischman, L. R. Levin, J. Buck, *Faseb J.* **2003**, *17*, 82–4.
- [64] M. Tresguerres, L. R. Levin, J. Buck, *Kidney Int.* **2011**, *79*, 1277–88.
- [65] F. Valsecchi, L. S. Ramos-Espiritu, J. Buck, L. R. Levin, G. Manfredi, *Physiology* **2013**, *28*, 199–209.
- [66] G. W., Kobayashi K. Mittag TW, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **1993**, 1060–1064.

- [67] M. L. Sinclair, X. Y. Wang, M. Mattia, M. Conti, J. Buck, D. J. Wolgemuth, L. R. Levin, *Mol. Reprod Dev.* **2000**, *56*, 6–11.
- [68] Y. Chen, M. J. Cann, T. N. Litvin, V. Iourgenko, M. L. Sinclair, L. R. Levin, J. Buck, *Science* **2000**, *289*, 625–8.
- [69] Breitbart H., *Cell. Mol. Biol.* **2003**, 321–327.
- [70] A. Abou-haila, D. R. P. Tulsiani, *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *485*, 72–81.
- [71] J. L. Bailey, *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2010**, *56*, 334–348.
- [72] K. C. Hess, B. H. Jones, B. Marquez, Y. Chen, T. S. Ord, M. Kamenetsky, C. Miyamoto, J. H. Zippin, G. S. Kopf, S. S. Suarez, et al., *Dev. Cell* **2005**, *9*, 249–259.
- [73] J. C. Chavez, E. O. Hernandez-Gonzalez, E. Wertheimer, P. E. Visconti, A. Darszon, C. L. Trevino, *Biol. Reprod.* **2012**, *86*, 1–14.
- [74] W. Y. Chen, W. M. Xu, Z. H. Chen, Y. Ni, Y. Y. Yuan, S. C. Zhou, W. W. Zhou, L. L. Tsang, Y. W. Chung, P. Hogle, *Biol. Reprod.* **2008**, *80*, 115–123.
- [75] M. A. Nolan, D. F. Babcock, G. Wennemuth, W. Brown, K. A. Burton, G. S. McKnight, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 13483–13488.
- [76] F. Xie, M. A. Garcia, A. E. Carlson, S. M. Schuh, D. F. Babcock, B. S. Jaiswal, J. A. Gossen, G. Esposito, M. van Duin, M. Conti, *Dev. Biol.* **2006**, *296*, 353–362.
- [77] G. Esposito, B. S. Jaiswal, F. Xie, M. A. Krajnc-Franken, T. J. Robben, A. M. Strik, C. Kuil, R. L. Philipsen, M. van Duin, M. Conti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 2993–8.
- [78] H. A. B. Choi, G. A. R. J. Gordon, N. Zhou, C. Tai, R. L. Rungta, J. Martinez, T. A. Milner, J. K. Ryu, J. G. McLarnon, M. Tresguerres, et al., *Neuron* **2012**, *75*, 1094–1104.
- [79] Y. S. Lee, M. Tresguerres, K. Hess, L. Y. Marmorstein, L. R. Levin, J. Buck, A. D. Marmorstein, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 41353–41358.
- [80] M. Tresguerres, S. K. Parks, E. Salazar, L. R. Levin, G. G. Goss, J. Buck, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 442–447.
- [81] N. Pastor-Soler, V. Beaulieu, T. N. Litvin, N. Da Silva, Y. Chen, D. Brown, J. Buck, L. R. Levin, S. Breton, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49523–9.
- [82] A. Appukuttan, S. A. Kasseckert, M. Micoogullari, J. P. Flacke, S. Kumar, A. Woste, Y. Abdallah, L. Pott, H. P. Reusch, Y. Ladilov, *Cardiovasc. Res.* **2012**, *93*, 340–9.
- [83] S. Kumar, S. Kostin, J.-P. Flacke, H. P. Reusch, Y. Ladilov, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 14760–14768.
- [84] B. Schmitz, J. Nedele, K. Guske, M. Maase, M. Lenders, M. Schelleckes, K. Kusche-Vihrog, S.-M. Brand, E. Brand, *Hypertension* **2014**, *63*, 753–761.
- [85] J. H. Zippin, L. R. Levin, J. Buck, *Trends Endocrinol. Metab.* **2001**, *12*, 366–70.
- [86] J. Buck, L. Levin, *Sensors* **2011**, *11*, 2112–2128.
- [87] A. Schmid, Z. Sutto, M.-C. Nlend, G. Horvath, N. Schmid, J. Buck, L. R. Levin, G. E. Conner, N. Fregien, M. Salathe, *J. Gen. Physiol.* **2007**, *130*, 99–109.
- [88] J. W. Karpen, *Science* **2001**, *293*, 2204–2205.
- [89] M. Zaccolo, T. Pozzan, *Science* **2002**, *295*, 1711–5.
- [90] R. A. Bunday, P. A. Insel, *Sci STKE* **2004**, *2004*, pe19.
- [91] A. Friebe, *Circ. Res.* **2003**, *93*, 96–105.
- [92] D. P. Ballou, Y. Zhao, P. E. Brandish, M. A. Marletta, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 12097–12101.
- [93] M. J. Cann, A. Hammer, J. Zhou, T. Kanacher, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35033–8.
- [94] U. B. Kaupp, I. Weyand, *Science* **2000**, *289*, 559–560.
- [95] J. J. Cali, J. C. Zwaagstra, N. Mons, D. M. Cooper, J. Krupinski, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12190–12195.
- [96] A. E. Carlson, B. Hille, D. F. Babcock, *Dev. Biol.* **2007**, *312*, 183–192.

- [97] C. T. Supuran, *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 603–614.
- [98] M. Tresguerres, J. Buck, L. R. Levin, *Pflugers Arch.* **2010**, *460*, 953–64.
- [99] J. H. Zippin, Y. Chen, S. G. Straub, K. C. Hess, A. Diaz, D. Lee, P. Tso, G. G. Holz, G. W. Sharp, L. R. Levin, et al., *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 33283–33291.
- [100] B. Pavan, C. Biondi, A. Dalpiaz, *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 982–991.
- [101] S. Pierre, T. Eschenhagen, G. Geisslinger, K. Scholich, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 321–35.
- [102] J. L. Bitterman, L. Ramos-Espiritu, A. Diaz, L. R. Levin, J. Buck, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *347*, 589–98.
- [103] C. W. Dessauer, J. J. Tesmer, S. R. Sprang, A. G. Gilman, *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 205–10.
- [104] M. Bushfield, I. Shoshani, R. A. Johnson, *Mol. Pharmacol.* **1990**, *38*, 848–853.
- [105] C. Steegborn, T. N. Litvin, K. C. Hess, A. B. Capper, R. Taussig, J. Buck, L. R. Levin, H. Wu, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31754–9.
- [106] C. Schlicker, A. Rauch, K. C. Hess, B. Kachholz, L. R. Levin, J. Buck, C. Steegborn, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4456–64.
- [107] J., Levin, L. R. & Muehschlegel, F. A. Buck, *Chemical Inhibitors of Soluble Adenylyl Cyclase (sAC)*, **2005**.
- [108] C. F., Buck, J., Levin, L. R. & Han, H. Nathan, *Novel Chemical Inhibitors of Neutrophil Activation through the sAC-dependent Pathway*, **2006**.
- [109] K. Iwatsubo, S. Minamisawa, T. Tsunematsu, M. Nakagome, Y. Toya, J. E. Tomlinson, S. Umemura, R. M. Scarborough, D. E. Levy, Y. Ishikawa, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40938–45.
- [110] S. M. Saalau-Bethell, V. Berdini, A. Cleasby, M. Congreve, J. E. Coyle, V. Lock, C. W. Murray, M. A. O'Brien, S. J. Rich, T. Sambrook, et al., *ChemMedChem* **2014**, *4*, 823–32.
- [111] D. J. Wasilko, S. E. Lee, K. J. Stutzman-Engwall, B. A. Reitz, T. L. Emmons, K. J. Mathis, M. J. Bienkowski, A. G. Tomasselli, H. D. Fischer, *Protein Expr. Purif.* **2009**, *65*, 122–32.
- [112] L. Ornstein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, *121*, 321–349.
- [113] B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, *121*, 404–427.
- [114] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [115] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, *ASSAY Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 342–353.
- [116] D. Schluesener, F. Fischer, J. Kruip, M. Rögner, A. Poetsch, *Proteomics* **2005**, *5*, 1317–1330.
- [117] U. Mueller, N. Darowski, M. R. Fuchs, R. Forster, M. Hellmig, K. S. Paithankar, S. Puhlinger, M. Steffien, G. Zocher, M. S. Weiss, *J. Synchrotron. Radiat.* **2012**, *19*, 442–9.
- [118] W. Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 133–144.
- [119] W. Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 125–32.
- [120] W. Kabsch, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795–800.
- [121] K. Diederichs, P. A. Karplus, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 1215–1222.
- [122] K. Diederichs, P. A. Karplus, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 269–275.
- [123] E. Garman, J. W. Murray, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2003**, *59*, 1903–1913.
- [124] P. H. Zwart, P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, L.-W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, E. McKee, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, *Struct. Proteomics*, **2008**, 419–435.

- [125] T. C. Terwilliger, P. D. Adams, R. J. Read, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, P. H. Zwart, L.-W. Hung, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 582–601.
- [126] R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 1966–1973.
- [127] T. C. Terwilliger, J. Berendzen, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1999**, *55*, 849–861.
- [128] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- [129] T. C. Terwilliger, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 965–972.
- [130] T. C. Terwilliger, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 38–44.
- [131] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
- [132] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.
- [133] G. N. Murshudov, P. Skubák, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, A. A. Vagin, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355–367.
- [134] M. D. Winn, G. N. Murshudov, M. Z. Papiz, *Methods Enzym.* **2003**, *374*, 300–21.
- [135] A. T. Brünger, *Nature* **1992**, *355*, 472–475.
- [136] A. W. Schüttelkopf, D. M. F. van Aalten, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1355–1363.
- [137] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 10037–41.
- [138] C. Gille, W. Birgit, A. Gille, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 121–122.
- [139] I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Protein Eng.* **1998**, *11*, 739–747.
- [140] Sabine Middelhaufe, Untersuchungen Zur Domänenarchitektur Und Regulation Der Humanen Löslichen Adenylylzyklase Und Der Humanen Phosphodiesterase H-Prune: M Institut Für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität, **2008**.
- [141] Katherine A. Kantardjieff1 and Bernhard Rupp, *Protein Sci.* **2003**, *9*, 1865–1871.
- [142] W. Kabsch, C. Sander, *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577–2637.
- [143] I. Dokmanic, M. Sikic, S. Tomic, **2008**, *64*, 257–263.
- [144] H. Zheng, M. Chruszcz, P. Lasota, L. Lebioda, W. Minor, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1765–1776.
- [145] T. Braun, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1990**, *194*, 58–63.
- [146] L. Frémont, *Life Sci.* **2000**, *66*, 663–673.
- [147] M.-L. Chen, L. Yi, X. Jin, X.-Y. Liang, Y. Zhou, T. Zhang, Q. Xie, X. Zhou, H. Chang, Y.-J. Fu, et al., *Autophagy* **2013**, *9*, 2033–2045.
- [148] F. Jessen, C. Sjöholm, E. K. Hoffmann, *J. Membr. Biol.* **1986**, *92*, 195–205.
- [149] M. Lane, J. M. Baltz, B. D. Bavister, *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 452–457.
- [150] Y. Tajima, N. Okamura, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1034*, 326–332.
- [151] M. Sodeoka, R. Sampe, S. Kojima, Y. Baba, T. Usui, K. Ueda, H. Osada, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3216–3222.
- [152] S. Peukert, Y. Sun, R. Zhang, B. Hurley, M. Sabio, X. Shen, C. Gray, J. Dzink-Fox, J. Tao, R. Cebula, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1840–1844.
- [153] C. R. Robinson, S. G. Sligar, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1993**, *2*, 826–837.
- [154] B. Bieger, L. O. Essen, *Embo J* **2001**, *20*, 433–45.
- [155] H. Topal, N. B. Fulcher, J. Bitterman, E. Salazar, J. Buck, L. R. Levin, M. J. Cann, M. C. Wolfgang, C. Steegborn, *J. Mol. Biol.* **2012**, *416*, 271–286.
- [156] Y. Matsuda, K. Nakajima, M. Tachibana, *Photosynth. Res.* **2011**, *109*, 191–203.

- [157] F. Seeger, R. Quintyn, A. Tanimoto, G. J. Williams, J. A. Tainer, V. H. Wysocki, E. D. Garcin, *Biochemistry* **2014**, *53*, 2153–2165.
- [158] E. E. Bittar, *Cell Chemistry and Physiology: Part II. Principles of Medical Biology, Principles of Medical Biology*, Elsevier Science & Technology, Greenwich, Conn., **1996**.
- [159] V. Luzzati, *Acta Crystallogr.* **1952**, *5*, 802–810.
- [160] H. Zheng, M. D. Chordia, D. R. Cooper, M. Chruszcz, P. Müller, G. M. Sheldrick, W. Minor, *Nat. Protoc.* **2013**, *9*, 156–170.
- [161] M. M. Harding, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 678–682.
- [162] M. M. Harding, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 401–411.
- [163] T. C. Mou, N. Masada, D. M. Cooper, S. R. Sprang, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3387–97.
- [164] R. K. Sunahara, A. Beuve, J. J. Tesmer, S. R. Sprang, D. L. Garbers, A. G. Gilman, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16332–8.
- [165] S. C. Sinha, M. Wetterer, S. R. Sprang, J. E. Schultz, J. U. Linder, *Embo J.* **2005**, *24*, 663–73.
- [166] J. U. Linder, *IUBMB Life* **2005**, *57*, 797–803.
- [167] C. L. Tucker, J. H. Hurley, T. R. Miller, J. B. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 5993–7.
- [168] A. Peterkofsky, N. Gollop, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 498–505.
- [169] J. J. Tesmer, S. R. Sprang, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 713–9.
- [170] H. F. Lodish, Ed., *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman, New York, **2000**.
- [171] M. A. Garcia, S. Meizel, *J. Androl.* **1999**, *20*, 88–93.
- [172] Y. Zeng, J. A. Oberdorf, H. M. Florman, *Dev. Biol.* **1996**, *173*, 510–520.
- [173] J. J. Parrish, *Biol. Reprod.* **1989**, *41*, 683–699.
- [174] I. A. Demarco, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7001–7009.
- [175] Y. Chen, M. J. Cann, T. N. Litvin, V. Iourgenko, M. L. Sinclair, L. R. Levin, J. Buck, *Science* **2000**, *289*, 625–8.
- [176] S. Jones, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *747*, 42–54.
- [177] K. Saksela, P. Permi, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2609–14.

10 Anhang

Tabelle 1 Anhang: Integration der Diffraktionsdaten und Verfeinerung.

	<i>apo</i> -hsAC	ApCpp-cokristallisiert
Pdb-Code	4clf	4clk
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 99,7 c = 97,9 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$	a, b = 100,3 c = 97,5 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$
Wellenlänge [Å]	0,97626	0,918409
Auflösung [Å]	44,45-1,70 (1,75-1,70)	48,77-2,20 (2,15-2,20)
Anzahl der Reflexe	308465 (25534)	163501 (10984)
Anzahl der unigenen Reflexe	60638 (6045)	28304 (1852)
Vollständigkeit	100 (100)	100 (100)
Multiplizität	5,1 (5,9)	5,8 (5,9)
R _{meas} [%]	7,4 (94,3)	10,6 (1,7)
Signal/Rausch-Verhältnis I/σ(I)	14,9 (1,9)	17,0 (117,9)
CC _{1/2}	99,9 (62,3)	99,5 (61,1)
Auflösung Verfeinerung [Å]	1,70	2,20
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	57557	26864
Anzahl Proteinatome	3740	3662
Anzahl Lösemittelatome	286	168
Anzahl Ligandenatome	10	53
RMSD		
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019
Bindungswinkel [°]	2,0	2,0 °
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	29,0	35,0
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	16,5 / 20,5	17,6 / 23,6

	<i>ApCpp-Soak</i>	<i>ATP/Mg²⁺-Soak</i>
Pdb-Code	-	4clu
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 100,8 c = 96,8 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$	a, b = 100,7 c = 97,2 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$
Wellenlänge [Å]	0,918409	0,917050
Auflösung [Å]	64,83-1,95 (2,00-1,95)	87,21-1,90 (1,95-1,90)
Anzahl der Reflexe	281959 (20941)	252820 (18696)
Anzahl der unigen Reflexe	40732 (2961)	44046 (3269)
Vollständigkeit	100 (100)	100 (100)
Multiplizität	6,9 (7,1)	5,7 (5,7)
R _{meas} [%]	9,1 (100,0)	9,0 (75,7)
Signal/Rausch-Verhältnis I/ σ (I)	14,2 (1,8)	13,4 (2,5)
CC _{1/2}	99,9 (71,7)	99,8 (76,8)
Auflösung Verfeinerung [Å]	1,95	1,90
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	38816	41832
Anzahl Proteinatome	3715	3684
Anzahl Lösemittelatome	191	202
Anzahl Ligandenatome	61	39
RMSD		
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019
Bindungswinkel [°]	2,0	2,0
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	32,9	34,6
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	16,0 / 21,3	16,1 / 20,5

	ATP/Ca ²⁺ -Soak	ATP-Soak
Pdb-Code	-	-
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 100,9 c = 97,2 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$	a, b = 101,1 c = 96,8 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$
Wellenlänge [Å]	0,917050	0,917050
Auflösung [Å]	87,36-2,00 (2,05-2,00)	87,55-2,05 (2,10-2,05)
Anzahl der Reflexe	240330 (17450)	201338 (13686)
Anzahl der unigen Reflexe	37919 (2681)	35253 (2448)
Vollständigkeit	100 (100)	100 (100)
Multiplizität	6,3 (6,5)	5,7 (5,6)
R _{meas} [%]	7,4 (86,5)	10,9 (99,9)
Signal/Rausch-Verhältnis I/ σ (I)	18,1 (2,20)	13,3 (1,8)
CC _{1/2}	99,9 (75,7)	99,8 (63,9)
Auflösung Verfeinerung [Å]	2,00	2,05
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	35990	33478
Anzahl Proteinatome	3652	3671
Anzahl Lösemittelatome	185	200
Anzahl Ligandenatome	28	50
RMSD		
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019
Bindungswinkel [°]	2,0	2,0
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	35,6	30,4
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	16,1 / 20,9	16,5 / 20,4

	GTP/Mg ²⁺ -Soak	PP _i -Soak
Pdb-Code	-	4cls
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 100,3 c = 97,4 α, β = 90 γ = 120	a, b = 100,1 c = 97,8 α, β = 90 γ = 120
Wellenlänge [Å]	0,918409	0,918409
Auflösung [Å]	86,90-1,90 (1,95-1,90)	86,68-1,85 (1,90-1,85)
Anzahl der Reflexe	176362 (12545)	191377 (14999)
Anzahl der unigenen Reflexe	43826 (3281)	47452 (3628)
Vollständigkeit	100 (100)	100 (100)
Multiplizität	4,0 (3,8)	4,0 (4,1)
R _{meas} [%]	8,1 (71,8)	10,4 (88,7)
Signal/Rausch-Verhältnis I/σ(I)	11,4 (1,9)	9,0 (1,6)
CC _{1/2}	99,8 (68,3)	99,6 (61,2)
Auflösung Verfeinerung [Å]	1,90	1,85
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	41625	45014
Anzahl Proteinatome	3667	3665
Anzahl Lösemittelatome	208	162
Anzahl Ligandenatome	15	29
RMSD		
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019
Bindungswinkel [°]	2,0	2,0
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	30,0	35,6
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	16,5 / 20,4	17,4 / 21,4

	<i>cAMP-Soak</i>	<i>PP_i/cAMP-Soak</i>
Pdb-Code	4clp	4clt
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 100,6 c = 97,1 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$	a, b = 99,8 c = 98,1 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$
Wellenlänge [Å]	0,917050	0,918409
Auflösung [Å]	87,11-1,90 (1,95-1,90)	87,44-1,95 (2,00-1,95)
Anzahl der Reflexe	252834 (17589)	164904 (12134)
Anzahl der unigen Reflexe	43929 (3242)	40997 (2970)
Vollständigkeit	100 (100)	100 (100)
Multiplizität	5,8 (5,4)	4,0 (4,1)
R _{meas} [%]	9,6 (89,8)	10,3 (72,2)
Signal/Rausch-Verhältnis I/ σ (I)	13,5 (2,0)	11,3 (2,1)
CC _{1/2}	99,9 (72,5)	99,7 (70,5)
Auflösung Verfeinerung [Å]	1,90	1,95
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	41710	38932
Anzahl Proteinatome	3678	3673
Anzahl Lösemittelatome	209	106
Anzahl Ligandenatome	92	60
RMSD		
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019
Bindungswinkel [°]	1,7	2,0
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	35,6	31,8
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	16,1 / 20,7	17,3 / 22,0

	HCO ₃ ⁻ -Soak	HSeO ₃ ⁻ -Soak
Pdb-Code	4c1l	4c1y
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b =99,8 c = 98,1 α, β = 90 γ = 120	a, b = 100,2 c = 97,5 α, β = 90 γ = 120
Wellenlänge [Å]	0,918408	0,97626
Auflösung [Å]	49,03-1,70 (1,75-1,70)	48,79-2,05 (2,10-2,05)
Anzahl der Reflexe	349470 (28660)	584832 (110391)
Anzahl der unigen Reflexe	60918 (5089)	68658 (13047)
Vollständigkeit	100 (100)	100 (100)
Multiplizität	5,7 (5,6)	8,5 (8,5)
R _{meas} [%]	10,8 (69,1)	9,0 (58,6)
Signal/Rausch-Verhältnis I/σ(I)	10,8 (2,4)	18,4 (4,2)
CC _{1/2}	99,7 (72,5)	99,9 (89,8)
Anomale Korrelation	-	50 (bis 10 Å)
SigAno	-	1,24(bis 10 Å)
Auflösung Verfeinerung [Å]	1,70	2,05
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	57822	33106
Anzahl Proteinatome	3751	3714
Anzahl Lösemittelatome	319	263
Anzahl Ligandenatome	72	29
RMSD		
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019
Bindungswinkel [°]	1,7	2,0
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	23,5	38,6
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	16,2 / 19,8	15,7 / 19,7

	HSO ₃ ⁻ -Soak	ApCpp/HSO ₃ ⁻ -Soak
Pdb-Code	4cm2	4clw
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 100,2 c = 97,7 α, β = 90 γ = 120	a, b = 100,6 c = 97,2 α, β = 90 γ = 120
Wellenlänge [Å]	1,600013	1,600013
Auflösung [Å]	86,73-1,80 (1,85-1,80)	87,10-2,15 (2,20-2,15)
Anzahl der Reflexe	604980 (40125)	604980 (40125)
Anzahl der unigen Reflexe	58807 (3829)	58807 (3829)
Vollständigkeit	97 (98)	100 (100)
Multiplizität	10,2 (6,1)	10,3 (10,5)
R _{meas} [%]	7,8 (75,5)	7,2 (50,8)
Signal/Rausch-Verhältnis I/σ(I)	19,7 (2,5)	20,3 (4,7)
CC _{1/2}	99,9 (74,1)	99,9 (93,3)
Anomale Korrelation	52 (bis 6 Å)	61 (bis 6 Å)
SigAno	1,37 (bis 6 Å)	1,44 (bis 6 Å)
Auflösung Verfeinerung [Å]	1,80	2,15
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	48894	28395
Anzahl Proteinatome	3757	3638
Anzahl Lösemittelatome	244	147
Anzahl Ligandenatome	31	66
RMSD		
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019
Bindungswinkel [°]	2,0	2,0
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	30,0	48,4
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	16,2 / 20,5	16,2 / 20,3

	ApCpp/HCO ₃ ⁻ -Soak	KH7-Soak
Pdb-Code	4cm0	-
Raumgruppe	P6 ₃ (173)	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 102,2 c = 95,3 α, β = 90 γ = 120	a, b = 100,3 c = 97,5 α, β = 90 γ = 120
Wellenlänge [Å]	0,918409	0,91840
Auflösung [Å]	88,50-3,20 (3,25-3,20)	48,80-2,45 (2,50-2,45)
Anzahl der Reflexe	80169 (3753)	113624 (6666)
Anzahl der unigen Reflexe	9419 (431)	39986 (2365)
Vollständigkeit	100 (100)	99 (99)
Multiplizität	8,5 (8,7)	2,8 (2,8)
R _{meas} [%]	12,1 (87,2)	7,4 (51,0)
Signal/Rausch-Verhältnis I/σ(I)	17,0 (2,7)	13,6 (2,6)
CC _{1/2}	99,9 (89,8)	99,8 (78,1)
Anomale Korrelation	-	20 (bis 10 Å)
SigAno	-	0,99 (bis 10 Å)
Auflösung Verfeinerung [Å]	3,20	2,45
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	8952	19475
Anzahl Proteinatome	3613	3391
Anzahl Lösemittelatome	-	58
Anzahl Ligandenatome	33	11
RMSD		
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019
Bindungswinkel [°]	2,0	2,0
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	61,7	38,7
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	25,0 / 29,0	18,5 / 24,8

	DIDS- <i>Soak</i>
Pdb-Code	4clz
Raumgruppe	P6 ₃ (173)
Einheitszelle [Å]	a, b = 100,5 c = 97,4 $\alpha, \beta = 90 \gamma = 120$
Wellenlänge [Å]	1,60001
Auflösung [Å]	87,04-1,90 (1,95-1,90)
Anzahl der Reflexe	427513 (28872)
Anzahl der unigen Reflexe	85010 (6250)
Vollständigkeit	100 (100)
Multiplizität	5,0 (4,6)
R _{meas} [%]	8,8 (73,8)
Signal/Rausch-Verhältnis I/ σ (I)	13,6 (2,4)
CC _{1/2}	99,7 (74,1)
Anomale Korrelation	59 (bis 10 Å)
SigAno	1,21 (bis 10 Å)
<hr/>	
Auflösung Verfeinerung [Å]	1,90
Anzahl Reflexe für Verfeinerung	41806
Anzahl Proteinatome	3692
Anzahl Lösemittelatome	283
Anzahl Ligandenatome	141
RMSD	
Bindungslänge [Å]	0,019
Bindungswinkel [°]	2,0
Durchschnittlicher B-Faktor [Å ²]	32,8
R-Faktor / R _{free} -Faktor [%]	16,1 / 20,0

Tabelle 2 Anhang: Kristallisations- und *Soaking*bedingungen.

<i>apo</i> -hsAC	0,1 mM Natriumacetat pH 4,8 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin	-
ApCcpp-cokristallisiert	0,1 mM Natriumphosphatcitrat pH 4,2 0,2 mM NaCl 24 % (v/v) PEG 8000 7,5 mM ApCcpp 7,5 mM MgCl ₂ 7,5 mM CaCl ₂	-
ApCcpp- <i>Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 150 mM ATP 75 mM MgCl ₂ 75 mM CaCl ₂	1 d
ATP/Mg ²⁺ - <i>Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 180 mM ATP 180 mM MgCl ₂	4 h / 5 d
ATP/Ca ²⁺ - <i>Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 100 mM ATP 100 mM CaCl ₂	4 h / 1 d
ATP- <i>Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 200 mM ATP	4 h / 5 d

<i>GTP/Mg²⁺-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 200 mM GTP 200 mM MgCl ₂	1 d
<i>PP_i-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 50 mM PP _i 50 mM MgCl ₂	1 d
<i>cAMP-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 200 mM cAMP	4 h / 1 d
<i>cAMP/PP_i-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 200 mM cAMP 50 mM PP _i 50 mM MgCl ₂	1 d
<i>HCO₃⁻-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 50 mM Natriumbicarbonat	3 h
<i>HSeO₃⁻-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 60 mM Natriumbiselenit	4 h

HSO_3^- -Soak	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 50 mM Natriumbisulfit	4 h
ApCpp/ HSO_3^- -Soak	0,1 mM Natriumphosphatcitrat pH 4,2 19 % (v/v) PEG 8000 18 % Glycerin 50 mM Natriumbisulfit	3 h
ApCpp/ HCO_3^- -Soak	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-atriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 50 mM Natriumbicarbonat 150 mM ApCpp 5 mM MgCl_2 5 mM CaCl_2	1 d
ApCpp/ HCO_3^- -Soak Sequenziell 1	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-atriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 150 mM ApCpp 5 mM MgCl_2 5 mM CaCl_2	je 4 h
	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-atriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 50 mM Natriumbicarbonat	
PP_i / HCO_3^- -Soak	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 15 % (v/v) PEG 4000 10 % (v/v) Glycerin 50 mM PP_i 1-50 mM MgCl_2 50 mM Natriumbicarbonat	1 d

ApC _{pp} /HCO ₃ ⁻ -Soak Sequenziell 2	0,1 mM Natriumacetat	je 4 h
	0,2 mM Tri-Natriumcitrat	
	15 % (v/v) PEG 4000	
	10 % (v/v) Glycerin	
	150 mM ApC _{pp}	
	5 mM MgCl ₂	
	5 mM CaCl ₂	
	0,1 mM Natriumacetat	
	0,2 mM Tri-Natriumcitrat	
	15 % (v/v) PEG 4000	
	10 % (v/v) Glycerin	
	50 mM Natriumbicarbonat	
	150 mM ApC _{pp}	
	5 mM MgCl ₂	
	5 mM CaCl ₂	
cAMP/ HCO ₃ ⁻ -Soak	0,1 mM Natriumacetat	1 d
	0,2 mM Tri-Natriumcitrat	
	15 % (v/v) PEG 4000	
	10 % (v/v) Glycerin	
	200 mM cAMP	
	50 mM Natriumbicarbonat	
PP _i /cAMP/HCO ₃ ⁻ -Soak	0,1 mM Natriumacetat	1 d
	0,2 mM Tri-Natriumcitrat	
	15 % (v/v) PEG 4000	
	10 % (v/v) Glycerin	
	50 mM PP _i	
	50 mM MgCl ₂	
	50 mM HCO ₃ ⁻	
KH7-Soak	0,1 mM Natriumacetat	4 h bis 5 d
	0,2 mM Tri-Natriumcitrat	
	18 % PEG 4000	
	20 % Glycerin	
	0,1-23 mM KH7	
DIDS-Soak	0,1 mM Natriumacetat	10 min bis 1 d
	0,2 mM Tri-Natriumcitrat	
	18 % (v/v) PEG 4000	
	20 % (v/v) Glycerin	
	5-25 mM DIDS	

<i>Tetramsäure 3-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 18 % (v/v) PEG 4000 20 % (v/v) Glycerin 10 mM Tetramsäure 3	4 h
<i>Tetramsäure 11-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 18 % (v/v) PEG 4000 20 % (v/v) Glycerin 10 mM Tetramsäure 11	4 h
<i>Piceatannol-Soak</i>	0,1 mM Natriumacetat 0,2 mM Tri-Natriumcitrat 18 % (v/v) PEG 4000 20 % (v/v) Glycerin 20 mM Picetannol	4 h

Tabelle 3 Anhang: 14 initiale Cokristallisationsbedingungen für hsAC und ApCp.

A2	0,1 M tri-Natriumcitrat pH 5,5 20 %(w/v) PEG 3000
A10	0,2 M Kaliumformiat 20 %(w/v) PEG 3350
B2	0,2 M Natriumthiocyanat 20 %(w/v) PEG 3350
B4	0,1 M HEPES pH 7,5 10 %(w/v) PEG 8000 8 %(v/v) Ethylenglycol
C1	0,2 M Natriumchlorid 0,1 M Natriumphosphatecitrat pH 4,2 20 %(w/v) PEG 8000
C3	0,2 M Ammoniumnitrat 20 %(w/v) PEG 3350
G6	0,24 M Natriummalonat pH 7,0 20 %(w/v) PEG 3350
G7	0,1 M Bernsteinsäure pH 7,0 15 %(w/v) PEG 3350
G8	0,15 M DL-Äpfelsäure pH 7,0 20 %(w/v) PEG 3350
H4	0,2 M Calciumchlorid 0,1 M BIS-TRIS pH 5,5 45 %(v/v) MPD
H6	0,1 M Ammoniumacetat 0,1 M BIS-TRIS pH 5,5 17 %(w/v) PEG 10,000
H8	0,2 M Natriumchlorid 0,1 M BIS-TRIS pH 5,5 25 %(w/v) PEG 3350

- H9 0,2 M Lithiumsulfat
 0,1 M BIS-TRIS pH 5,5
 25 %(w/v) PEG 3350
- H10 0,2 M Ammoniumacetat
 0,1 M BIS-TRIS pH 5,5
 25 %(w/v) PEG 3350

Sequenz des verwendeten Konstrukts der humanen löslichen Adenylyl-Cyclase sowie proteinspezifische Parameter.

Aminosäuresequenz des hsAC_{cat}-Konstrukts:

MNTPKEEFQDWP IVRIAAHLPDLIVYGHFSPERPFMDYFDGVLMFVDISGFTAMTEKFSS
AMYMDRGAEQLVEILNYHISAIVEKVLIFGGDILKFAGDALLALWRVERKQLKNIITVVI
KCSLEIHGLFETQEWEEGLDIRVKIGLAAGHISMLVFGDETHSHFLVIGQAVDDVRLAQN
MAQMNDVILSPNCWQLCDRSMIEIESVPDQRAVKVNFLKPPPNFNFEFFTKCTTFMHYY
PSGEHKNLLRLACTLKPDPPELEMSLQKYVMESILKQIDNKQLQGYLSELRPVTIVFNLM
FEDQDKAEEIGPAIQDAYMHITSVLKIFQGQINKVFMFDKGCFLCVFGFPGEKVPDELT
HALECAMDIFDFCSQVHKIQTVSIGVASGIVFCGIVGHTVRHEYTVIGQKVNLAARMMMY
YPGIVTCDSVTYNGSNLPAYFFKELPKKVMKGVADSGPLYQYWGRTKVVHHHHH

Molekulargewicht:	54131,7 Da
Theoretischer pI:	5,66
Exinktionskoeffizient für reduktive Bedingungen	51340 L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹

11 Danksagung

Prof. Dr. Steegborn möchte ich für das Thema und die Einführung in die Cyclasewelt danken. Darüber hinaus möchte ich mich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Hilfestellung während dieser Arbeit bedanken und für die wissenschaftlichen Freiheiten die ich genießen durfte.

Im Besonderen möchte ich meinem Freund Bastl danken, ohne Dich und deine Unterstützung wäre diese Arbeit sicherlich nicht zu dem geworden, was sie jetzt ist. Du bist meine Motivation aber auch kritischer Betrachter meiner Arbeit. Danke.

Ich möchte auch meinen Eltern danken, die mich in meinem gesamten Studium und während der Doktorarbeit in allem unterstützt haben und immer hinter mir standen.

Ein ganz großer Dank geht selbstverständlich an meine Arbeitsgruppe, im Besonderen an Martin und Sébastian für die regen wissenschaftlichen Diskussionen und Kaffeerunden in der Küche. Weiter möchte ich auch Frank, Melanie und Michael danken, die mir den Anfang in Bayreuth sehr einfach gemacht haben. Außerdem geht ein spezieller Dank an Edith, Susanne, Lisa und Norbert für die vielen hilfreichen Kleinigkeiten im Laboralltag.

Auch beiden Sekretärinnen möchte ich danken, die mir immer hilfsbereit zur Seite stand.

Vielen lieben Dank auch an die AG-Blankenfeldt, im Besonderen an meine ehemalige Bürokollegin Allegra, mit der ich mehr als eine gute wissenschaftliche Diskussion führen durfte.

Ein großer Dank geht an alle Korrekturleser und Fehlersucher dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Arbeitsgruppe von Prof. Schobert für die nette Zusammenarbeit im Bereich der Tetransäuren.

Darüber hinaus möchte ich unserem New Yorker Kooperationspartner für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

12 Lebenslauf

Silke Kleinbölting

Contact

Meranierring 81, D-95445 Bayreuth, Germany
 Tel.: ++49-921-16861026
 Mobile: ++49-171-4208134
 E-mail: silke.kleinboelting@uni-bayreuth.de

Date of Birth

17.08.1984 Bad Mergentheim

Nationality

German

Summary

Master of Science / Structural biology and protein
 biochemistry
 cooperative, reliable and sociable
 highly motivated and quick learner

Education

09/2010 – present

University Bayreuth – Prof. Steegborn
 Dissertation: Structural and biochemical investigations of the
 human soluble adenylyl cyclase

12/2009 – 2/2010

University Auckland – Prof. Baker
 Research experience in structural biology: purification and
 crystallization of proteins from *M. tuberculosis* for structural
 analysis and drug design

10/2007 – 9/2009

Ruhr-University Bochum
 Master of Science – Biochemistry
 Focus: Structural Biology – protein biochemistry
 Master thesis – Prof. Wittinghofer

10/2004 – 9/2007

MPI of Molecular Physiology Dortmund
 Ruhr-University Bochum
 Bachelor of Science – Biochemistry
 Focus: Protein biochemistry
 Bachelor-Thesis – Prof. Wittinghofer
 MPI of Molecular Physiology Dortmund

Languages

German (native speaker)
 English (fluent)
 French (basic)

Publications

Kleinboelting S, Van den Heuvel J, Kambach C, Weyand M,
 Leipelt M & Steegborn C (2014) Expression, purification,
 crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of a
 mammalian type 10 adenylyl cyclase. *Acta Crystallogr F* 70,
 467–469.

Kleinboelting S, Diaz A, Moniot S, van den Heuvel J, Weyand M, Levin LR, Buck J & Steegborn C (2014) Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 3727–3732.

Kleinboelting S, van den Heuvel J, & Steegborn C. Structural analysis of soluble adenylyl cyclase and crystal structures of its complexes with nucleotides. (2014). *FEBS Journal.* . 281, 4151-4164.

Bashiri G, Johnston J M, Evans G L, Bulloch E M M, Goldstone D C, **Kleinboelting S**, Castell A, Manos-Turvey A, Payne R J, Baker E N and Lott S J (2014) Structure, function and inhibition of the anthranilate synthase complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* Submitted.

Skills/Activities

Practical Skills

Protein cloning, expression in bacteria and insect cells, protein purification, fluorescence spectroscopy, western-blot, metal-assay, ELISA and enzyme kits, HPLC, affinity measurements, crystallization, data collection, structure determination Windows 2000/XP/7, Microsoft Office, CorelDraw, Grafit, Origin, Blast, Pymol, CCP4, Coot, Phenix

Activities

2009

Member of the GBM

2007-2009

Working and experimentalize with highly skilled children “Institut für das begabte Kind”, Bochum

2007-2008

Tutor in organic chemistry at Ruhr-University

Conferences

23.06-25.06.2011

Rabensteiner Kolleg 2011 – Pottenstein
Adenylyl cyclase - a structural stranger

13.10-14.10.2011

Doktorandensymposium 2011 - Selb

07.06-09.06.2012

Purification of human Guanylatecyclase A - influence of tags
Rabensteiner Kolleg 2012 – Pottenstein

15.04-19.04.2013

Characterisation of human transmembrane Guanylate cyclase A
EMBO Course Computational structural biology - from data to structure to function - Hamburg

09.09-12.09.2013

Development of inhibitors for sAC-like Adenylyl-Cyclases
10th Horizons in Molecular Biology - Göttingen

10.09-13.09.2014

Characterisation of human transmembrane guanylyl cyclase A
5th Murnau Conference on Structural Biology - Murnau
Structural and biochemical investigations of human soluble adenylyl cyclase

Funding

02-04/2013

Feuerwehrfonds University Bayreuth

13 Publikationen und Tagungsbeiträge im Rahmen der Dissertation

Publikationen:

Kleinboelting S, Van den Heuvel J, Kambach C, Weyand M, Leipelt M & Steegborn C (2014) Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of a mammalian type 10 adenylyl cyclase. *Acta Crystallogr F* 70, 467–469.

Kleinboelting S, Diaz A, Moniot S, van den Heuvel J, Weyand M, Levin LR, Buck J & Steegborn C (2014) Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 3727–3732.

Kleinboelting S, van den Heuvel J, & Steegborn C. Structural analysis of soluble adenylyl cyclase and crystal structures of its complexes with nucleotides. (2014). *FEBS Journal.* 281, 4151-4164.

Vorträge:

23.06-25.06.2011	Rabensteiner Kolleg 2011 – Pottenstein Adenylyl cyclase - a structural stranger
13.10-14.10.2011	Doktorandensymposium 2011 - Selb Purification of human Guanylatecyclase A - influence of tags
07.06-09.06.2012	Rabensteiner Kolleg 2012 – Pottenstein Characterisation of human transmembrane Guanylate cyclase A

Poster:

15.04-19.04.2013	EMBO Course Computational structural biology - from data to structure to function - Hamburg Development of inhibitors for sAC-like Adenylyl-Cyclases
09.09-12.09.2013	10 th Horizons in Molecular Biology - Göttingen Characterisation of human transmembrane guanylyl cyclase A
10.09-13.09.2014	5 th Murnau Conference on Structural Biology - Murnau Structural and biochemical investigations of human soluble adenylyl cyclase

Kurse:

15.04-19.04.2013	EMBO Course Computational structural biology - from data to structure to function – EMBL Hamburg
05.03-09.03.2012	Insect and Baculo Expression Course – HZI Braunschweig

14 Eidesstattliche Versicherung und Erklärung

§5 Nr. 4 (PromO)

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

§8 Nr. 5 (PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation und unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

§8 Nr. 7 (PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

§8 Nr. 8 (PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

§8 Nr. 9 (PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern beziehungsweise Promotionsvermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Bayreuth, 24.06.2014

Ort, Datum, Unterschrift