

Rezeptorfunktion der Membrananker von Mammalia Adenylatcyclasen?

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
M.Sc. Manuel Finkbeiner
aus Freudenstadt

Tübingen
2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	25.01.2021
Stellvertretender Dekan:	Prof. Dr. József Fortágh
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Joachim E. Schultz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Ruth

Danksagung

Für die Vergabe des überaus interessanten Themas, mit einer vielversprechenden Zukunft in Forschung, Lehre und der Pharmaindustrie, gilt mein herzlichster Dank meinem Doktorvater, Prof. Dr. Joachim E. Schultz. Ihm möchte ich auch für die kontinuierlich gute Betreuung, die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen, die auf langjähriger Erfahrung basierten Ratschläge und Ideen sowie die Unterstützung zur Teilnahme an Konferenzen und Fortbildungen meinen Dank aussprechen.

An Prof. Dr. Peter Ruth geht herzlicher Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens der Dissertation sowie für die hilfreichen Ratschläge, stetige Unterstützung während meiner Promotion und die Abnahme der Prüfung.

Prof. Dr. Andrei N. Lupas möchte ich vielmals für die stetige wissenschaftliche, soziale und finanzielle Unterstützung, die Möglichkeit der Präsentation meiner Arbeit bei Gruppenseminaren, die Teilnahme an der Graduiertenschule des Max-Planck-Instituts sowie für die Abnahme meiner Promotion danken.

Für die freundliche Bereitschaft der Abnahme meiner Promotionsprüfung und das Angebot die Aufgaben des Prüfungsvorsitzenden zu übernehmen, möchte ich Prof. Dr. Harald Groß herzlichst danken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. John R. Weir und seinen Mitarbeitern für die hervorragende Kooperation und Unterstützung bei Arbeiten in seinem Labor. Besonderer Dank geht an Frau Magdalena Firlej und Frau Dorota Rousova für die Hilfe bei der Expression der Proteine in Zeiten der Coronapandemie.

Den derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen: Herrn Sherif Elsabbagh, Frau Dr. Julia Grischin, Prof. Dr. Klaus Hantke, Frau Ursula Kurz, Frau Anita Schultz und Frau Dr. Anubha Seth möchte ich herzlich für die freundliche Aufnahme im Team, das familiäre Arbeitsklima, fachliche Diskussionen sowie die zahlreichen Hilfestellungen und Unterstützungen danken. Frau Ursula Kurz und Frau Anita Schultz danke ich zusätzlich für die Unterstützung bei der chromatographischen Aufreinigung, den Vorversuchen zur Lipidextraktion und AC Testen.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilungen Drews, Lukowski und Ruth möchte ich mich für das stets freundliche Arbeitsklima sowie die gute Kooperation bedanken.

Für Verbesserungsvorschläge und kleinere Korrekturen meiner Arbeit möchte ich mich herzlichst bei meiner ehemaligen Kollegin Frau Dr. Julia Grischin, meinem Bruder Herrn Dr. Pascal Finkbeiner sowie meiner Frau Quynh Finkbeiner bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau und unserem Kind, sowie meinen Eltern, meinem Bruder und all meinen Freunde für die soziale und emotionale Unterstützung in allen Lebenssituationen während meiner Zeit als Doktorand.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abkürzungen	IV
Zusammenfassung	V
Summary	VII
1. Einleitung	1
1.1. Mammalia Adenylatcyclasen.....	2
1.2. Regulation	3
1.3. Intrazelluläre Effektoren	4
1.4. Membrandomänen der Adenylatcyclasen	5
1.5. Das Cyclase-Transducer-Element - intramolekulare Signalweiterleitung	6
1.6. Liganden-Theorie.....	7
1.7. Bedeutung einer Rezeptorfunktion.....	7
2. Zielsetzung	9
3. Material und Methoden	10
3.1. Geräte.....	10
3.2. Chemikalien und Lösungen	11
3.3. Anionenaustausch – Flüssigchromatographie	11
3.4. Kationenaustausch – Flüssigchromatographie.....	12
3.5. Lipidextraktion.....	12
3.5.1. Butanol – Diisopropylether – Methode.....	12
3.5.2. Methyl- <i>tert</i> -butylether – Methode	13
4. Seth et al.	14
4.1. Eigenanteil.....	14
4.2. Publikation.....	15
5. Weitere Ergebnisse und Diskussion	28
5.1. Vergleich verschiedener Serumvarianten	28
5.2. Anionenaustausch	31
5.3. Kationenaustausch	37
5.4. Proteomanalyse.....	39
5.5. Lipidextraktion.....	42
5.6. Fazit	49
6. Referenzen	51

Abkürzungen

AC(n)/AC(s)	Adenylatcyclase(n) / adenylate cyclase(s)
BSA	Bovines Serumalbumin
C 1 a/b	Katalytische Domäne 1 a/b der Adenylatcyclasen
C 2 a/b	Katalytische Domäne 2 a/b der Adenylatcyclasen
CTE(s)	Cyclase-Transducer-Element(s)
delip.	delipidiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fötales Rinderserum (Fetal Bovine Serum)
FBS-dial.	dialysiertes FBS
FBS-exo	(exosome depleted) exosomenarmes FBS
FBS-hi	(heatinactivated) hitzeinaktiviertes FBS
FBS-low IgG	(ultra low IgG) Immunglobulin G armes FBS
G _i	hemmendes G-Protein
G _{iα}	hemmende α-Untereinheit des G-Proteins
GPCR(s)	G-Protein-gekoppelte(r)-Rezeptor(en)
G _s	stimulierendes G-Protein
G _{sα}	stimulierende α-Untereinheit des G-Proteins
hAC	Humane Adenylatcyclase
HS	Humanserum
PA	Phosphatidsäuren
P _i	Phosphat
PP _i	Pyrophosphat
QS	Quorum sensing
TM 1/2	Transmembrandomäne 1/2

Zusammenfassung

Der universelle intrazelluläre second messenger, cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP), wird durch die Enzymgruppe der Adenylatcyclasen (ACn) gebildet. In Mammalia liegen neun von zehn Adenylatcyclase (AC) Isoformen als membrangebundene Proteine vor. Die Regulation dieser Enzyme aufgrund extrazellulärer Signale erfolgt indirekt über eigenständige Transmembranrezeptoren, i.d.R. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). In der Vergangenheit wurde für den Membrananker der ACn, der bis zu 40 % des Proteins umfasst, trotz einer evolutionären Konservierung von mehr als 400 Millionen Jahren, bisher keine eindeutige physiologische Funktion identifiziert. Des Weiteren zeigen die hexahelikalen Membrandomänen der ACn eine strukturelle Ähnlichkeit zu hexahelikalen Rezeptordomänen bakterieller Quorum sensing (QS) Systeme. Dies deutet auf eine bisher unbekannte physiologische Funktion des Membranankers der ACn hin. Der Austausch eines bakteriellen AC-Membranankers durch die Rezeptordomäne des QS Systems zeigte eine Stimulierung der Aktivität der entstandenen Chimäre durch den Liganden und bestätigt die Übertragung eines extrazellulären Signals auf die intrazelluläre katalytische Domäne. Ein zusätzlicher stark konservierter Sequenzabschnitt der ACn, das Cyclase-Transducer-Element (CTE), ist für die erfolgreiche Signalübermittlung essenziell. Dies lässt eine Rezeptorfunktion für bisher unbekannte Liganden vermuten. Der Austausch beider hexahelikaler Membrananker der humanen AC (hAC) Isoform 2 ergab eine Regulation der $G_{s\alpha}$ induzierten Stimulation durch den QS-Liganden.

Hier zeige ich, dass sowohl Humanes Serum (HS) als auch Fötale Rinderserum (FBS) die $G_{s\alpha}$ -stimulierte Mammalia AC-Aktivität konzentrationsabhängig hemmt. Dies bestätigt i) die erfolgreiche Signaltransduktion und ii) suggeriert die Existenz bisher unbekannter AC-Liganden im Serum. Für die Charakterisierung der Liganden wurde das Serum auf unterschiedliche Stoffklassen untersucht. Verschieden aufgearbeitetes Rinderserum zeigte, dass Bestandteile des Immunsystems als mögliche Liganden nicht in Frage kommen. Eine chromatographische Auftrennung der Serumproteine und die anschließende Proteomanalyse deutete einige Proteine als potenzielle Liganden an. Eine Regulierung der AC-Aktivität durch diese Proteine blieb auch in Gegenwart von $G_{s\alpha}$ aus und zeigte, dass die Liganden keine Proteine sind. Die Extraktion des

Serums mit polaren Lösungsmitteln bei saurem pH überführte die hemmenden Komponenten in die organische Phase. Dies favorisiert stark saure Lipide als Liganden.

Die zukünftige Identifizierung von Lipiden als extrazelluläre Liganden der ACn würde eine Rezeptorfunktion der hAC Membrananker bestätigen. Damit eröffnet sich eine neue Dimension der Regulation von ACn und der Bildung des universellen second messengers cAMP, sowie der damit verbundenen Stoffwechselwege.

Summary

The universal intracellular second messenger 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is produced by the enzyme group termed adenylate cyclases (ACs). In mammals nine out of ten adenylate cyclase (AC) isoforms are membrane-bound. Regulation of these enzymes upon extracellular signals is indirect via independent transmembrane receptors generally G-protein coupled receptors (GPCRs). In the past no distinct physiological function has been identified for the AC membrane anchor which comprises up to 40 % of the protein despite an evolutionary conservation of more than 400 million years. Furthermore, the hexahelical AC membrane domains show structural similarity to hexahelical receptor domains of bacterial quorum sensing (QS) systems. This indicates a to date unknown physiological function of the AC membrane anchors. Replacement of the AC membrane anchor by the receptor domain of a QS system showed stimulation of the activity of the generated chimera upon the ligand and confirms the transfer of an extracellular signal to the intracellular catalytic domain. Additionally, a highly conserved sequence stretch termed cyclase transducer element (CTE) is essential for effective signal transmission. This supposes a receptor function for so far unknown ligands. Replacement of both hexahelical membrane anchors of the human AC (hAC) isoform 2 yielded regulation of the $G_{s\alpha}$ induced stimulation by the QS-Ligand.

Here I show that human serum (HS) as well as fetal bovine serum (FBS) impede $G_{s\alpha}$ stimulated mammalian AC activity in a concentration dependent manner. This confirms i) the successful signal transmission and ii) suggests the existence of so far unknown AC-ligands in serum. Serum was tested for specific substance classes to characterize these ligands. Differently processed bovine sera revealed that components of the immune system are out of the question as potential ligands. Chromatographic purification of serum proteins and the following proteomics indicated some proteins as potential ligands. Regulation of AC-activity by these proteins failed to appear also in presence of $G_{s\alpha}$ and showed that the ligands are not proteins. Extraction of serum with polar solvents at acidic pH transferred the inhibitory components to the organic phase. This favors strongly acidic lipids as ligands.

Identification of lipids as extracellular ligands for ACs in the future would confirm a receptor function of the hAC membrane anchors. Thereby opening a new dimension of regulation of ACs and the production of the universal second messenger cAMP as well as associated metabolic pathways.

1. Einleitung

Das Überleben, gutes Wachstum sowie die Funktionalität einer Zelle oder eines Organs bedarf der aktiven Interaktion mit der Umgebung. Eine auf äußere Einflüsse adäquat angepasste Zellreaktion setzt die Fähigkeit zur Wahrnehmung der extrazellulären Signale, deren Weiterleitung sowie daraus resultierende intrazelluläre Folgereaktionen voraus [1, 2]. Die Zellmembran bildet dabei eine semipermeable Barriere zwischen Extrazellulärraum und Zytosol, die nur von wenigen Stoffen passiert werden kann [2, 3]. Um eine Reaktion auf nicht membrangängige Signale, auch first messenger genannt (unter anderem Neurotransmitter und Hormone), zu ermöglichen, nutzen viele regulatorische Systeme sogenannte second messenger. Die Zelle besitzt membrangebundene Rezeptoren zur Bindung des extrazellulären first messengers. Das Signal wird über die Zellmembran ins Zytosol übermittelt und die Bildung des intrazellulären second messengers ausgelöst. Eine entsprechende Zellreaktion wird durch den gebildeten second messenger erreicht [2]. Ein Hauptvertreter der second messenger ist cAMP [4], welches an vielen Prozessen wie z.B. der Proliferation, Reaktionen auf den Nährstoffgradient der Umgebung oder der Zelldifferenzierung beteiligt ist [5, 6]. Die Bildung von cAMP erfolgt durch eine Zyklisierungsreaktion aus dem universellen Energieträger ATP [7] unter Abspaltung von Pyrophosphat (PPi). Dieser Prozess wird durch ACn katalysiert, welche sich in den meisten sogenannten „branches of life“ wiederfinden [8]. ACn werden derzeit anhand ihrer Sequenz und Struktur in sechs verschiedene Klassen (I-VI) eingeteilt. Für die Klassen I, II und IV-VI sind lediglich prokaryotische Proteine bekannt [6]. Neuste Hinweise auf vorhandene Nukleotidcyclaseaktivität in Pflanzen schlägt mindestens eine weitere, bisher nicht bekannte Klasse der ACn vor [8]. Die zahlenmäßig häufigsten und am weitesten verbreiteten ACn sind die der Klasse III. Sie sind sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten zu finden [6, 7]. Eine weitere Unterteilung der Klasse III ACn in die Gruppen IIIa-III d basiert auf Gemeinsamkeiten der konservierten Aminosäuren in den katalytischen Domänen [6, 8].

Alle ACn der Klasse III setzen für die enzymatische Reaktion eine Dimerisierung der katalytischen Domäne voraus, wobei beide Teile die notwendigen Komponenten für das aktive Zentrum beisteuern [9-15]. Im Vergleich zu den monomeren bakteriellen Vertretern finden sich bei den Mammalia ACn beide katalytischen Domänen in einem

einzigem Protein, daher werden diese als Pseudoheterodimere bezeichnet. Evolutionär sind die Mammalia ACn vermutlich durch eine Genduplikation entstanden.

1.1. Mammalia Adenylatcyclasen

Im Laufe der Forschung wurden zehn Isoformen der Mammalia ACn genetisch identifiziert. Neun dieser Isoformen besitzen einen Membrananker [16] und somit möglicherweise eine zusätzliche physiologische Funktion. Die in Mammalia vorkommenden membrangebundenen ACn gehören ausschließlich der Klasse IIIa an [7, 17]. Alle neun (AC 1 – 9) weisen eine identische Organisation ihrer Domänen auf. N-Terminal beginnend im Zytosol, folgt einer hexahelikalen Transmembrandomäne (TM1), die erste katalytische Domäne (C1). Letztere besteht aus der katalytischen Einheit C1a und dem Linker (C1b), welcher die Verbindung zur zweiten hexahelikalen Transmembrandomäne (TM2) bildet. Auf TM2 folgt eine zweite katalytische Domäne C2 die wie auch C1 aus einer katalytischen Einheit (C2a) sowie dem C-terminalen Rest (C2b) variabler Länge besteht [9, 16] (Abb. 1-1A). Durch Bildung des katalytischen Pseudoheterodimers aus C1a und C2a entstehen in der Berührungsebene zwei Bindetaschen. ATP kann nur von einer dieser Taschen als Substrat gebunden und zu cAMP zyklisiert werden. Dieses katalytische Zentrum beinhaltet sechs konservierte, an der enzymatischen Reaktion beteiligte Aminosäuren. Darunter fallen zwei Aspartatreste in C1a [18, 19] für die Bindung von zwei Me^{2+} als Cofaktoren, die den intramolekularen nukleophilen Angriff der 3'OH Gruppe der Ribose an der α Phosphorylgruppe des ATPs ermöglichen. Ein Lysin- und ein Aspartatrest in C2a [19, 20] für die Substratspezifität (ATP gegenüber GTP) und ein Arginin- sowie ein Asparaginrest [19, 21] für die Stabilisierung des Übergangszustandes (Abb. 1-1B). Für die zweite Bindetasche ist bisher kein physiologischer Bindungspartner bekannt [6], sie ist enzymatisch inaktiv.

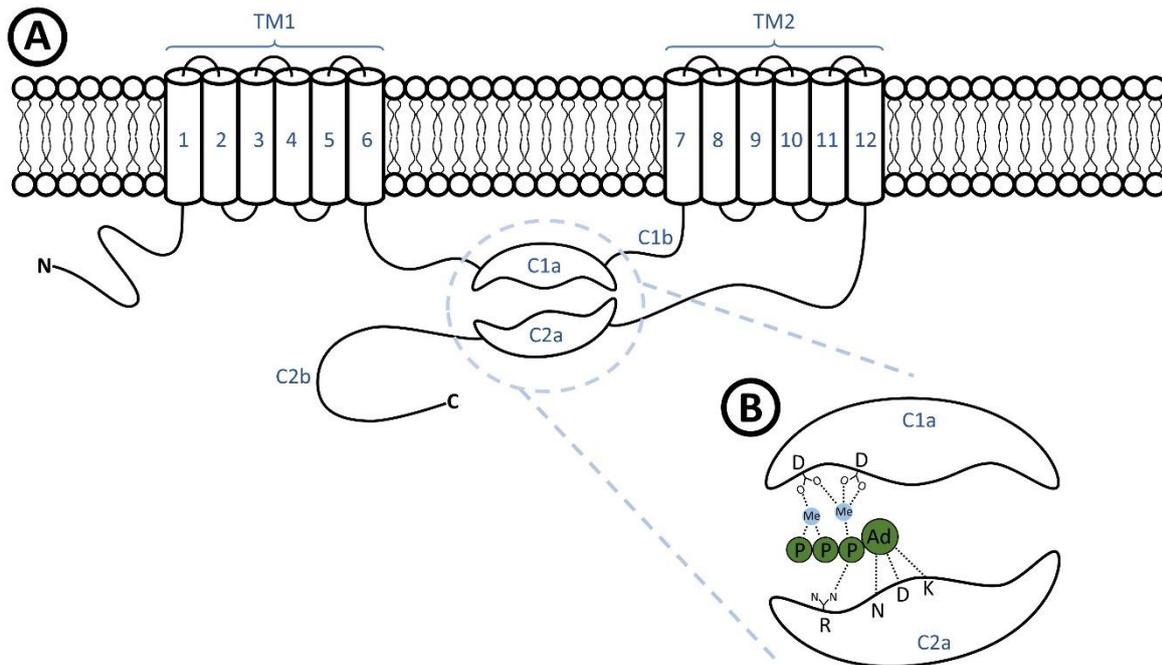


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Mammalia Adenylyl cyclasen

A) Domänenorganisation in pseudoheterodimeren Mammalia Klasse IIIa ACn; N, N-Terminus; TM1, Transmembrandomäne 1; C1a, erste katalytische Domäne; C1b, Linker; TM2, Transmembrandomäne 2; C2a, zweite katalytische Domäne; C2b, C-terminaler Rest; C, C-Terminus; 1-12, Transmembranhelices. **B)** Vergrößerte Darstellung der katalytischen Einheit aus C1a und C2a mit gebundenem Substrat; Ad, Adenosin; P, Phosphatrest; Me, Metallion; die beteiligten Aminosäuren innerhalb C1a und C2a im Einbuchstabencode: D, Aspartat; R, Arginin; N, Asparagin; K, Lysin. Adaptiert nach [6, 16]

1.2. Regulation

Allen bisher bekannten Regulationsmechanismen der Mammalia AC Isoformen ist gemein, dass extrazelluläre Signale ausschließlich indirekt übertragen werden [17, 22]. Hierbei erfolgt die Wahrnehmung des Signals über ein GPCR. Bei GPCRs handelt es sich um heptahelikale Transmembranrezeptoren, die intrazellulär ein G-Protein gebunden haben [9]. Man unterscheidet zwischen stimulierendem (G_s) und hemmendem (G_i) G-Protein. Im inaktiven Zustand liegt das G-Protein als Heterotrimer der α -, β - und γ -Untereinheiten vor [23]. Bindung des Liganden vermindert die Affinität des an der α -Untereinheit gebundenen GDP, sodass der Austausch gegen GTP

ermöglicht wird. Als Folge dieses Austausches, spaltet sich das G-Protein von der Transmembrandomäne ab und dissoziiert in die aktiven G_{α} -GTP- und $G_{\beta\gamma}$ -Einheiten [23, 24]. Die α -Untereinheiten unterscheiden sich in stimulierender ($G_{s\alpha}$) und hemmender ($G_{i\alpha}$) α -Untereinheit. Die gebildeten $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten sind identisch und binden zum Teil am katalytischen Zentrum der ACn und bewirken isoformspezifisch eine Aktivierung oder Hemmung der ACn (Abb. 1-2).

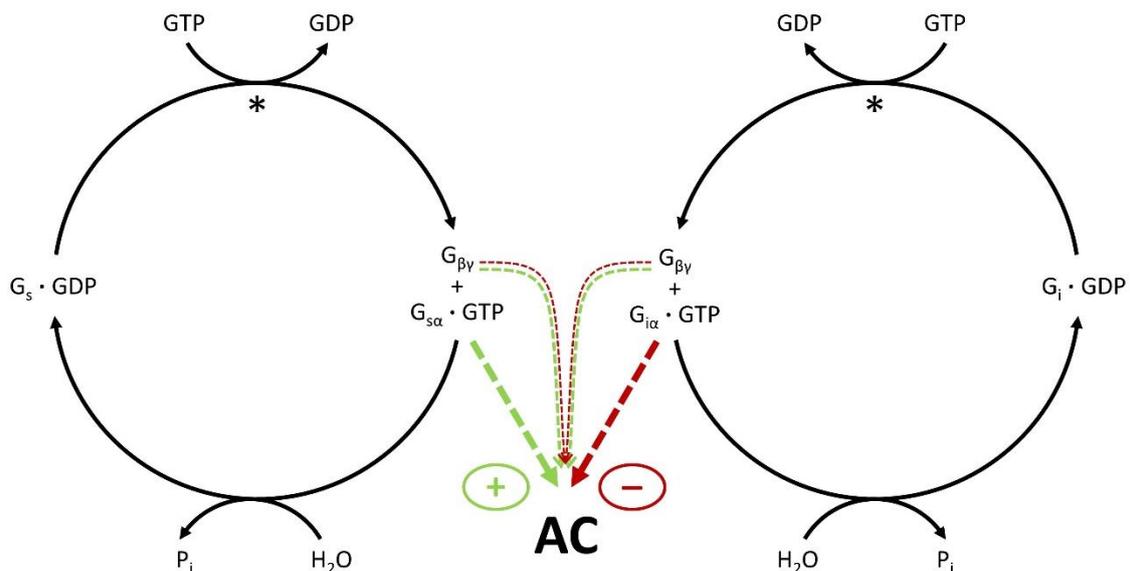


Abb. 1-2 Regulation der Mammalia Adenylatcyclasen durch die G-Protein-Untereinheiten Links ist der Zyklus des stimulierenden und rechts des hemmenden G-Proteins dargestellt. Der Stern (*) markiert die Aktivierung des GPCR, durch die der Austausch von GDP gegen GTP stattfindet. Dies führt zur Aktivierung der Untereinheiten des G-Proteins. Alle neun AC Isoformen werden durch $G_{s\alpha}$ aktiviert (grün, +). Die Hemmung (rot, -) durch $G_{i\alpha}$ findet isoformspezifisch statt. $G_{\beta\gamma}$ wirkt isoformspezifisch hemmend oder stimulierend. P_i , Phosphat. Adaptiert nach [23].

1.3. Intrazelluläre Effektoren

Experimente zur Aufklärung der Regulation zeigten, dass für die enzymatische Reaktion die Membrandomänen nicht zwingend notwendig sind [16, 25]. In der

Vergangenheit befasste sich daher ein Großteil der Forschung mit der Regulation des isolierten katalytische Dimers.

Aufgrund leichter Sequenzunterschiede der katalytischen Domänen und daraus resultierenden Eigenschaften der intrazellulären Regulation, wurden die neun Isoformen weiter in vier Untergruppen eingeteilt. Untergruppe A umfasst die durch Calcium/Calmodulin aktivierbaren Isoformen AC 1, AC 3 und AC 8. Unter die Untergruppe B fallen die Isoformen AC 2, AC 4 und AC 7, welche durch die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit aktiviert werden. Isoformen AC 5 und AC 6 werden durch Calcium sowie verschiedene $G_{i\alpha}$ Isoformen gehemmt und bilden Untergruppe C. Die verbleibende Isoform AC 9 steht als eigenständiges Protein in Untergruppe D [26, 27].

Alle AC Isoformen (AC 1 – 9) werden einheitliche durch $G_{s\alpha}$ stimuliert [11]. Für die Isoformen AC 1 – 8 ist zudem die Stimulierung durch Forskolin eindeutig experimentell nachgewiesen [28]. Forskolin ist ein pflanzliches Diterpen, welches mit der zweiten Bindetasche interagiert, jedoch in Mammalia nicht vorkommt [11, 29]. Die meisten Arbeiten beschreiben AC 9 als Forskolin unempfindlich [16, 19, 26]. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch eine Stimulierung durch das Diterpen in Anwesenheit von $G_{s\alpha}$, sowie eine indirekte $G_{i\alpha}$ Hemmung der AC 9 durch Heterodimerisierung mit der Isoform AC 5 oder AC 6 [30]. Ein möglicher Einfluss der Membrandomäne auf die Regulation der AC wurde bisher nicht erforscht.

1.4. Membrandomänen der Adenylatcyclasen

Hexahelikale Membrandomänen existieren in vielen Proteinen, meist besitzen sie kurze α -helikale Membranbereiche und kurze Verbindungsschleifen [17]. Die hexahelikalen Membrananker bakterieller ACn sind offenbar Strukturanaloga der Mammalia Transmembranbereiche. Als wahrscheinlicher evolutionärer Vorläufer gilt die bakterielle AC Rv1625c, deren Domänen genau eine Hälfte der Mammalia AC darstellt und ebenso der Klasse IIIa angehört [17, 31]. Strukturelle Ähnlichkeit der Membrandomäne der Rv1625c zum Membrananker des bakteriellen QS Rezeptors von *Vibrio* sowie *Legionella*, die erstmals eine Rezeptorfunktion einer hexahelikalen Membrandomäne dieser Form mit bekanntem Liganden zeigten, lässt eine Rezeptorfunktion für alle Klasse IIIa ACn vermuten. Die zusätzliche Eigenschaft, dass für Funktionalität eine Dimerisierung der bakteriellen Proteine notwendig ist [17], zeigt

eine weitere Ähnlichkeit zu den pseudoheterodimeren Enzymen in Mammalia. Chimären der Membranbereiche aus *Vibrio* sowie *Legionella* mit der katalytischen Domäne aus Rv1625c zeigten eine spezifische Aktivierung mittels der entsprechenden Liganden und bestätigten damit eine intramolekulare Signalweiterleitung in Klasse IIIa ACn [17, 32]. Bei diesen Untersuchungen wurde ein für die Signalweiterleitung notwendiger Bereich der katalytischen Domänen, das sogenannte CTE, identifiziert und charakterisiert [32].

1.5. Das Cyclase-Transducer-Element - intramolekulare Signalweiterleitung

Zwischen Ausgang aus der Membran und Start der katalytischen Domäne der AC befindet sich ein für eine korrekte Signalweiterleitung unverzichtbares Element mit einer Länge von 19 Aminosäuren. Dieses wird als CTE bezeichnet und stellt einen universellen Signalübermittler in ACn der Klasse IIIa dar. Eine bioinformatische Clusteranalyse von Klasse IIIa ACn zeigte bei Vertebraten eine klare Trennung der CTE-Zugehörigkeit zur C1 oder C2 Domäne, mit einer weiteren Unterteilung entsprechend den neun membrangebundenen Isoformen. Diese Unterschiede in den CTE Sequenzen besitzen wahrscheinlich eine bisher unbekannt funktionelle Bedeutung bei der Signalübertragung [32].

Die Struktur des CTE zeigt zwei Helices, die in einem Winkel von etwa 45° zueinander stehen. Die Bildung eines aktiven AC Komplexes setzt die präzise Interaktion der jeweiligen CTE aus den beiden katalytischen Domänen voraus. Im Dimer der Mammalia AC Isoform 10 bilden die beiden N-terminalen Teile aus CTE von C1 und CTE von C2 eine kurze coiled-coil Struktur. Die C-terminalen Helices stehen dabei in entgegengesetzte Richtungen. Die Ähnlichkeit des hydrophoben Registers der beiden Helices eines CTEs weist auf die Möglichkeit hin, dass eine gewinkelte oder gestreckte Anordnung eingenommen werden kann. Somit könnte die räumliche Anordnung der katalytischen Domänen zueinander beeinflusst werden [32]. Die Bindung eines Liganden am Membrananker könnte diese Modifikation regulieren.

1.6. Liganden-Theorie

Anhand von Größe und Aufbau der Membrananker wurde schon 1989 mit der erfolgreichen Sequenzierung der ersten Mammalia Adenylatcyclase eine weitere physiologische Funktion vermutet. Die damals vorgeschlagene Transporter- oder Kanalfunktion [33] konnte bis heute jedoch nicht bewiesen werden [17, 32, 34]. Bioinformatische Analysen zeigten eine hohe isoformspezifische Konservierung der Mammalia Membrananker, die weit über 400 Millionen Jahre bis zurück zum Quastenflosser reicht [17, 32]. Dieser evolutionäre Erhalt zweier hexahelikaler Membrandomänen mit ausschließlicher Ankerfunktion, bei einem Gesamtproteinanteil von fast 40 % [17, 32], erscheint nicht plausibel und deutet auf eine zusätzliche Funktion der Membrananker hin. Die strukturelle Ähnlichkeit der Mammalia Membrananker zu den bekannten QS Rezeptoren liefert einen weiteren Hinweis für diese Hypothese und favorisiert eine Rezeptorfunktion [17, 32, 35]. Der Sequenzunterschied der verschiedenen Isoformen innerhalb einer Spezies im Vergleich zur Konservierung einer Isoform zwischen unterschiedlichen Spezies liefert einen Hinweis für die Existenz isoformspezifischer Liganden [8].

1.7. Bedeutung einer Rezeptorfunktion

Für die Regulation der Mammalia ACn als Folge eines extrazellulären Signals ist bisher nur der Weg über die Erkennung des Signals von einem GPCR bekannt [17, 22]. Der Nachweis einer Rezeptorfunktion zur direkten Wahrnehmung eines extrazellulären Signals durch die ACn würde eine neue Dimension der Regulation der cAMP Biosynthese und den damit gekoppelten Stoffwechselprozessen eröffnen. Mit der Identifikation isoformspezifischer Liganden könnte die Existenz der neun membrangebundenen ACn sowie deren charakteristische Verteilung im Organismus erklärt werden. Isoformspezifische Liganden würden zudem die Möglichkeit zur Feinregulierung der AC-Aktivität ermöglichen. Anhand der Struktur identifizierter Liganden könnten in der Pharmaforschung spezifische Analoga zur gezielten Steuerung der Aktivitäten verschiedener AC Isoformen entwickelt werden. Diese hätten eine große Bedeutung bei der Therapie einer gestörten cAMP Produktion, die im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten, wie z.B. bei der familiären

Dyskinesie und fazialen Myokymie steht [36]. Untersuchungen dieser Krankheiten lassen vermuten, dass unter anderem Mutationen einzelner AC-Isoformen eine Entstehungsursache darstellen könnten. Als weiteres Beispiel werden bestimmte Polymorphismen der Isoform 5 im Zusammenhang mit der Entstehung von Diabetes Typ 2 gesehen [37].

Bisherige Pharmaka basieren auf der indirekten Steuerung der AC-Aktivität über beteiligte GPCRs [38]. Die Entwicklung neuer Medikamente mit einer direkten Steuerung der ACn würde somit die therapeutischen Möglichkeiten deutlich erweitern. Die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Daten könnten einen entscheidenden Einfluss auf die zukünftige Entwicklung von Substanzen zur direkten AC-Regulierung nehmen.

2. Zielsetzung

Aufgrund der oben beschriebenen Ausgangslage soll **in dieser Arbeit der Frage nach einer möglichen Rezeptorfunktion der Membrananker von Mammalia ACn nachgegangen werden.**

Die bioinformatische Analyse belegte eine Konservierung der ACn über mehr als 400 Millionen Jahre und deutet damit auf ebenfalls hochkonservierte Liganden hin.

Wird die Gewebeverteilung der verschiedenen AC-Isoformen betrachtet, lässt sich ein systemisches Vorhandensein von Liganden vermuten.

Es soll untersucht werden, ob Serum als systemische Flüssigkeit einen Effekt auf die AC-Aktivität hat.

Durch verschiedene Aufreinigungs- und Abtrennungsvorgänge soll in dieser Arbeit versucht werden, mögliche Liganden zu charakterisieren und zu isolieren, um so die Ligandentheorie weiter zu entwickeln.

3. Material und Methoden

Hier werden nur Materialien und Methoden beschrieben, die bei der Charakterisierung und Aufreinigung des Serums zur Anwendung kamen und nicht in der integrierten Publikation zu finden sind.

3.1. Geräte

Firma	Gerät
GE Healthcare	ÄKTA™go ÄKTA™FPLC™ (Pump P920 & Monitor UPC 900) MonoS™ FPLC™ (Kationenaustauscher) MonoQ™ FPLC™ (5482074) (Anionenaustauscher)
Thermo Fisher Scientific	Slide-A-Lyzer™ 2K MWCO G2 Dialysekassetten 5-15ml (#87719) Heraeus Megafuge 1.0R
Eppendorf	concentrator 5301 (Vakuumzentrifuge) Centrifuge 5810 R Thermomixer 5436
Bender & Hobein	Vortex Genie 2 (Reagenzglasschüttler)

3.2. Chemikalien und Lösungen

Firma	Material
Thermo Fisher Scientific	Gibco® fötales Rinderserum (FBS) Origin: South America Gibco® Exosom-armes fötales Rinderserum (FBSexo) A2720801 Gibco® fötales Rinderserum ultra-low IgG Gibco® fötales Rinderserum dialysiert
Merck	Diisopropylether n-Butanol pro analysis
Acros Organics	Methyl- <i>tert</i> -butylether
Sigma-Aldrich	Methanol HPLC gradient grade ≥99,9%
Promega	Wasser Nuklease frei (Nuclease-Free Water)
Honeywell Speciality Chemicals Seelze	Schwefelsäure 96%
Nalgene	0,22 µm Filter

3.3. Anionenaustausch – Flüssigchromatographie

Vorab wurde das exosomenarme Fötale Rinderserum (FBS-exo) durch Filtration von Schwebstoffen befreit (0,22 µm Filter; Nalgene), um das Risiko eine Trennsäulen zu verstopfen zu verringern. Um eine bessere Bindung der Proteine an das Säulenmaterial zu erzielen, wurde die Salzkonzentration verringert. Die Probe wurde mit demineralisiertem Wasser im Verhältnis 5:1 verdünnt. Für die Chromatographie in einer ÄKTA (ÄKTA™FPLC™ GE Healthcare) über eine MonoQ (1 ml) wurde die Probe in Portionen zu jeweils ca. 2,5 – 5 ml unterteilt. Als Laufmittel wurde ein 100 mM NaCl Lösung verwendet. Während des Auftrags einer Portion auf die Säule, wurde das Durchlaufvolumen aufgefangen (MQ-1x). Elution fand mit 1 M NaCl statt. Zwischen den Läufen wurde die Säule jeweils mit NaOH und Essigsäure regeneriert. Das

Durchlaufvolumen (MQ-1x) mehrerer Läufe wurde vereint und nochmals über die MonoQ (1 ml) chromatographiert. Während des Probenauftrags wurde das Durchlaufvolumen (MQ-2x) wieder aufgefangen und über Nacht gegen demineralisiertes Wasser in Slide-A-Lyzern (15 ml) mit einer Ausschlussgrenze von 2 kDa bei 4°C dialysiert. Die Proben wurden entweder direkt im AC-Test verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

3.4. Kationenaustausch – Flüssigchromatographie

Dialysiertes MQ-2x wurde als Ausgangsmaterial eingesetzt und über eine MonoS (1 ml) chromatographiert. Als Laufpuffer wurde 10 mM MOPS mit pH 8 verwendet. Elution der Säule fand mit 250 mM NaCl statt. Die Probe wurde entweder direkt im AC-Test verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

3.5. Lipidextraktion

3.5.1. Butanol – Diisopropylether – Methode

Für die Lipidextraktion wurde das Probenvolumen mit der identischen Menge an Lösungsmittel (n-Butanol/Diisopropylether [2:3, v/v]; nach [39]) versetzt. Um eine Phasentrennung während des Extraktionsvorgangs zu vermeiden, wurde auf einem Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2) für 30 min mit voller Leistung bei Raumtemperatur extrahiert. Zur anschließenden Phasentrennung wurde für 5 min bei 6000 x g (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Die untere, wässrige Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit identischem Volumen an reinem Diisopropylether versetzt (nach [40]). Erneut wurde für 2 min auf dem Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2) bei voller Leistung inkubiert. Dies diente der weitgehenden Entfernung des verbleibenden n-Butanol aus der wässrigen Phase. Für die Phasentrennung wurde 2 min bei 6000 x g (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Nach Entnahme der wässrigen Phase wurde aus dieser, durch kurzes Anlegen eines Unterdrucks mit einer Wasserstrahlpumpe, der noch vorhandene Lösungsmittelrest verringert. Ein exaktes Volumen der wässrigen Phase wurde in einer

Vakuumentrifuge (concentrator 5301) bei 60°C bis zur Trocknen eingeengt, um Lösungsmittelreste zu beseitigen. Zur Lösung des Rückstands wurde MilliQ Wasser im vorher eingesetzten Volumen verwendet. Die Probe wurde entweder direkt im AC-Test verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

3.5.2. Methyl-*tert*-butylether – Methode

Die Methyl-*tert*-butylether (MTBE) Methode wurde bei pH 1 und pH 6 nach [41] durchgeführt. Bei pH 6 wurde die dialysierte Probe der chromatographischen Aufreinigung durch MonoQ (MQ-2x dial.) direkt verwendet. Für die saure Extraktion bei pH 1, wurde die Probe durch Zugabe von Schwefelsäure angesäuert (Universal-pH-Papier). Für die Extraktion (pH 1 und pH 6) wurden 200 µl der Probe mit 1,5 ml Methanol vermengt und mit einem Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2) gemischt. Dann wurden 5 ml MTBE zugesetzt und auf einem Schüttler (Thermomixer 5436) bei mäßiger Stufe für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch Zugabe von 1,25 ml nukleasefreien Wassers und 10 min Inkubation ohne Schütteln erreicht. Bei 1000 x g (Heraeus Megafuge 1.0R) wurde für 10 min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die organische, obere Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 60 – 70°C gestellt. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde ein Unterdruck erzeugt, um die Lösungsmittel zu entfernen. Um eine vollständige Trocknung zu erreichen, wurden gegen Ende 200 µl Methanol zugegeben und nochmals im Wasserbad bei Unterdruck getrocknet. Aus der wässrigen Phase wurden, durch kurzes Anlegen eines Unterdrucks mit der Wasserstrahlpumpe, organische Lösungsmittelreste verringert. Das Wasser wurde in einer Vakuumentrifuge (concentrator 5301) bei 60°C entfernt. Die entstandenen Rückstände wurden in je 200 µl MilliQ Wasser gelöst und entweder direkt im AC-Test verwendet oder bei -20°C eingefroren.

4. Seth et al.

4.1. Eigenanteil

Cellular Signalling 68 (2020) 109538

doi:10.1016/j.cellsig.2020.109538

Gs α stimulation of mammalian adenylate cyclases regulated by their hexahelical membrane anchors

Anubha Seth^{a,b}, Manuel Finkbeiner^b, Julia Grischin^b, Joachim E. Schultz^{a,*}

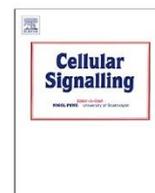
^a Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, Tübingen, Germany

^b Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Germany

Für diese Arbeit habe ich die von Genscript gekauften neun Gene der membrangebundenen humanen Adenylatcyclasen in den pLIB Vektor umklontiert und in *E.coli* XL1blue transformiert, um die DNA zu amplifizieren. Die DNA wurden von mir isoliert und *E.coli* EMBacY Zellen damit transformiert. Daraus habe ich Bacmide isoliert. Nach Transfektion der Bacmide in Sf9 Insektenzellen habe ich diese für 72 h wachsen lassen und die Insektenzellen durch Zentrifugation aus dem Medium entfernt. Der erhaltene Überstand beinhaltet die Viruskulturen, V₀ genannt. Aus damit infizierten (Titer 1:100) Sf9 Kulturen (etwa 10 ml) wurden nach 72 h die Viruskulturen V₁ nach gleicher Vorgehensweise hergestellt. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, um den Virusstock V₂ zu erhalten. Für die Expression der Proteine habe ich eine große Kultur Sf9 Zellen (200 – 800 ml) mit V₂ Viren infiziert (Titer 1:100). Zellernte und Membranpräparation der Proteine in Sf9 wurden von mir durchgeführt und durch Westernblots und Aktivitätstests verifiziert. Die molekularbiologischen Arbeiten mit der CqsS-AC2 Chimäre wurden von A. Seth durchgeführt. Von ihr wurden die G_{s α} -Dosis-Wirkungs-Kurven, der Effekt des für CqsS bekannten Liganden CAI-1 und dessen Reversibilität sowie der Effekt von FBS jeweils auf die Chimäre, der Effekt von CAI-1, Forskolin allein oder in Gegenwart von G_{s α} je auf die humane AC 2 sowie HS auf eine Membranpräparation aus Rattenhirn getestet, ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Forskolinwirkung auf den Standard wurde ebenfalls von A. Seth ermittelt. J. Grischin hat den Effekt von HS auf die AC 2, 3, 5 und 9 in Gegenwart von

$G_{s\alpha}$ getestet, ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Basalwerte für den HS Effekt auf die AC 2, 3, 5 und 9 wurden von mir getestet (Supplementary Figure 3), ausgewertet und graphisch dargestellt. Auch die FBS und HSA Messungen mit und ohne $G_{s\alpha}$ auf die AC 2 wurden von mir angefertigt (Figure 2A; Supplementary Figure 2). Gemeinschaftlich mit J. Grischin habe ich die $G_{s\alpha}$ -Dosis-Wirkungs-Kurven bei Zugabe von HS (Supplementary Figure 1) sowie den Einfluss von HS auf die Standardkurve (Supplementary Figure 5 links) getestet, ausgewertet und graphisch dargestellt.

4.2. Publikation



G α stimulation of mammalian adenylate cyclases regulated by their hexahelical membrane anchors

Anubha Seth^{a,b}, Manuel Finkbeiner^b, Julia Grischin^b, Joachim E. Schultz^{a,*}

^aPharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, Tübingen, Germany

^bMax-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

Adenylate cyclases
Cyclic AMP
Membrane anchor
Quorum-sensor
Receptor

ABSTRACT

Mammalian adenylate cyclases (ACs) are pseudoheterodimers with dissimilar hexahelical membrane-anchors, isoform-specifically conserved for more than half a billion years. We exchanged both membrane anchors of the AC isoform 2 by the quorum-sensing receptor from *Vibrio harveyi*, CqsS, which has a ligand, *Cholera*-Autoinducer-1 (CAI-1). In the chimera, AC activity was stimulated by G α , CAI-1 had no effect. Surprisingly, CAI-1 inhibited G α stimulation. We report that G α stimulation of human AC isoforms 2, 3, 5, and 9 expressed in Sf9 cells is inhibited by serum as is AC activity in membranes isolated from rat brain cortex. AC2 activation by forskolin or forskolin/G α was similarly inhibited. Obviously, serum contains as yet unidentified factors affecting AC activity. The data establish a linkage in ACs, in which the membrane anchors, as receptors, transduce extracellular signals to the cytosolic catalytic dimer. A mechanistic three state model of AC regulation is presented compatible with all known regulatory inputs into mammalian ACs. The data allow designating the membrane anchors of mammalian ACs as orphan receptors, and establish a new level of AC regulation.

1. Introduction

The first amino acid sequence of a mammalian adenylate cyclase identified two similar catalytic domains (C1 and C2) and two dissimilar hexahelical membrane anchors (TM1 and TM2) which were proposed to possess a channel or transporter-like function, properties, which were never confirmed [1]. Subsequently, nine genes for mAC isoforms were identified, indicating substantial subfunctionalization during evolution (mAC isoforms 1–9; [2,3]). Membrane-delimited ACs (mACs) are the cellular effector proteins for many hormones that signal via G-protein-coupled receptors and their regulation has received broad attention [2,3]. The catalytic center of mACs is formed at the C1/C2 dimer interface. Most biochemical studies have used the startling observation that the separately expressed C1/C2 catalytic domains are regulated by G α , i.e. the membrane anchors appear dispensable for catalysis and regulation [4]. Why then 2 \times 6 transmembrane spans, when 1 or 2 would have been sufficient for membrane-anchoring? The evolutionary conservation of the membrane domains for more than half a billion years justifies searching for a physiological function beyond membrane-anchoring [5–7].

Recently, we replaced the 6TM domain of the mycobacterial

Rv1625c AC, a monomeric progenitor of mACs, by the hexahelical quorum-sensing receptor CqsS from *Vibrio*, generating a CqsS-AC Rv1625c chimera (here and in the following, CqsS is used to denote the ligand-binding membrane domain of CqsS, not the full receptor protein [6,7]). The ligand for CqsS, *Cholera*-Auto-Inducer-1 [CAI-1; (S)-3-hydroxy-tridecan-4-one], stimulated AC activity in the chimera [6]. Subsequently, we characterized a family of conserved cyclase-transducing-elements (CTEs) which are indispensable for signal transduction [7]. They are isoform-specifically conserved in mACs, supporting the notion that the AC membrane domains may be ligand receptors [5–7]. Here, we asked whether AC regulation by CqsS is maintained in a chimera, in which the TM1 and TM2 domains in human AC2 (hAC2) are replaced by CqsS, generating a CqsS-hAC2 chimera. We report that stimulation by G α is preserved whereas the ligand CAI-1 does not, by itself, affect basal AC activity. Surprisingly, CAI-1 inhibits G α stimulation in CqsS-hAC2. We further show that the G α stimulation of the hAC2 holoenzyme is similarly inhibited by as yet unidentified factors present in human serum. Serum also inhibited G α activation of hAC isoforms 3, 5, and 9, and AC activity in rat brain cortical membranes indicating that the AC membrane domains are orphan ligand receptors.

Abbreviations: AC, adenylate cyclase; hAC, human adenylate cyclase; mAC, membrane-delimited adenylate cyclase; TM, hexahelical membrane domain; CTE, cyclase-transducing-element; CAI-1, *Cholera*-Autoinducer-1; CqsS, quorum-sensing receptor CqsS from *Vibrio*

* Corresponding author at: Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen, Germany.

E-mail address: joachim.schultz@uni-tuebingen.de (J.E. Schultz).

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109538>

Received 9 January 2020; Received in revised form 9 January 2020; Accepted 9 January 2020

Available online 10 January 2020

0898-6568/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

CqsS of *V. harveyi* (acc. # AAT86007) and hAC2 and hAC9 (acc. # Q08462 and NM_001116.3) sequences were used. Position Phe166 in CqsS was mutated to Leu (F166 L) [6]. Radiochemicals were from Hartmann Analytic and Perkin Elmer. Enzymes were from either New England Biolabs or Roche Molecular. Other chemicals were from Sigma, Merck and Roth. CAI-1 was synthesized in-house [8]. The constitutively active GsαQ227L point mutant was from Dr. C. Kleuss, Berlin [9]. It was expressed and purified as described earlier [9–11]. Human serum (catalog # 4522 from human male AB plasma), heat-inactivated human serum (i.e. inactivated complement; catalog # H3667 from human male AB plasma), and serum albumin (catalog # A3782) were from Sigma-Aldrich, fetal bovine serum was from Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Germany (catalog #: 10270; lot number: 42Q8269K).

2.2. Plasmid construct

CqsS-hAC2 was generated using standard methods. 5'-BamHI or EcoRI and 3'-HindIII sites restriction sites were used and inserted into pQE80_l (Δ XhoI; Δ NcoI). Gly-Ser and Arg-Ser were introduced for internal restriction sites. An N-terminal MRGS-hexa-His-tag was used to for Western blotting. The construct boundaries were: MRGSHis₆-GS-CqsS (F166L)₁₋₁₈₁-hAC2₂₂₁₋₆₀₃-RS-CqsS (F166L)₁₋₁₈₁-hAC2₈₃₆₋₁₀₉₁. Genes for hACs 2, 3, 5, and 9 were obtained from GenScript. For virus production, hACs were inserted into pLIB. The plasmid was amplified in *E. coli* XL1blue and transformed into *E. coli* EMBacY cells generating the bacmid for Sf9 transfection.

2.3. Protein expression

CqsS-hAC2 was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) in Luria-Bertani broth at 30 °C with 100 µg/ml ampicillin. 200 ml medium were inoculated with a preculture (to A₆₀₀ of 0.2) and grown at 30 °C with antibiotics. At A₆₀₀ 0.8 expression was induced with 500 µM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (22 °C, 4 h). Cells were harvested, washed with buffer and stored at –80 °C. Cell membranes were prepared in lysis buffer (50 mM Tris/HCl, 0.021% thioglycerol, 50 mM NaCl, pH 8) after disintegrating cells in a French press (1100 psi). After removal of cell debris (4300 × g, 30 min, 4 °C) membranes were collected (100,000 × g; 1 h, 4 °C). Membranes were suspended in buffer (40 mM Tris/HCl, 0.016% thioglycerol, 20% glycerol, pH 8). Virus-infected Sf9 cells expressing hACs were grown in Sf900 III medium, harvested after three days and membranes were isolated and stored at –80 °C. Each hAC isoform was expressed once in Sf9 cells and membranes were used in multiple assays (in triplicates). Membrane preparation from rat brain cortex was according to [12].

2.4. Adenylate cyclase assay

Activity of CqsS-hAC2 was assayed for 15 min at 30 °C–37 °C in 100 µl with 40 µg membrane protein, 50 mM Tris/HCl pH 8.3, 5 mM MnCl₂, 6 mM creatine phosphate, 230 µg/ml creatine kinase, 750 µM [α -³²P]-ATP, and 2 mM [2,8-³H]-cAMP to monitor yield during cAMP purification [13]. Substrate conversion was kept below 10%. CAI-1 was dissolved in DMSO. Incubations with DMSO were carried out as controls. Activity of hACs was determined in a volume of 10 µl using 1 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 3 mM creatine phosphate, 60 µg/ml creatine kinase, 50 mM MOPS, pH 7.5 using an Assist-Plus pipetting robot (Integra Biosciences, Germany) and a cAMP assay kit from Cisbio (Codolet, France) according to the supplier's instructions (see controls of standard curves in Supplemental fig. 5).

2.5. Western blot analysis

For Western blotting an RGS-His₄-antibody (Qiagen) and a 1:2500 dilution of the fluorophore-conjugated secondary antibody Cy3 (ECL Plex goat- α -mouse IgG-Cy3, GE Healthcare) was used. Proteolysis was not observed.

2.6. Data analysis and statistical analysis

All incubations were in duplicates (CqsS-hAC2) or triplicates (hACs). S.E.M values are given for experiments with CqsS and refer to separately expressed and analyzed proteins. S.D. values apply hACs individually expressed once in Sf9 insect cells. Data analysis was with GraphPad prism 8.1.2.

3. Results

3.1. CqsS serves as a ligand receptor for hAC2

We generated a pseudoheterodimeric chimera of hAC2 in which both 6TMs were isosterically replaced by the 6TM quorum-sensing receptor CqsS from *Vibrio* (CqsS-hAC2). The point of transition between CqsS and hAC2 was at the respective hAC2 CTEs in front of the catalytic domains C1a and C2, thus maintaining all structural features potentially required for signaling (Fig. 1 left; [6,7,14]). Two questions were obvious: a) Is such a chimera expressed in *Escherichia coli* although bacterial expression of mammalian ACs has so far proven impossible, and b) Is regulation by Gsα and the quorum-sensing ligand CAI-1 maintained? The chimera was expressed in *E. coli* and had robust basal activity indicating that native mAC-like features were maintained (Fig. 1). AC activity was stimulated by constitutively active Gsα (Q227L, below termed Gsα [10,11]) demonstrating formation of a productive C1/C2 catalytic dimer. A concentration-response curve showed a 2.3-fold increase in activity with an EC₅₀ of around 200 nM Gsα (Fig. 1). By comparison, AC2 expressed in Sf9 cells is stimulated by Gsα about 5 to 12-fold [15,16]. The quantitatively differing responses compared to AC2 may be due to the replacement of the dissimilar TM1 and TM2 domains by two identical CqsS receptors. The quorum-sensor ligand CAI-1, up to 100 µM, failed to affect AC activity. This posed two questions: a) Are the catalytic domains of mACs at all capable of operating as output domains for transmembrane signals? b) Which biochemical differences between bacterial and mammalian ACs exist, which might explain the divergent results obtained with the CqsS-Rv1625c AC chimera [6].

A crucial difference between bacterial and mammalian ACs are the dissociation constants of the catalytic domains. Bacterial catalytic domains usually have a high 'self-affinity' ($K_d \leq 10^{-7}$ M) and are active when conformationally unconstrained [5–7,17]. Similarly, the individual C1 and C2 domains of mACs have a high propensity for self-association, i.e. C1 preferentially associates with C1 and C2 with C2, as documented in the first mAC crystal structure, a C2 homodimer [18]. However, homodimers of C1 or C2 are inactive [19]. The actual affinity between the C1 and C2 catalytic domains in mACs is rather low ($K_d \geq 10^{-5}$ M [20–22]). AC stimulation by Gsα is tantamount to an increase in the apparent affinity of C1 and C2 for each other by approximately two orders of magnitude [20–23]. Therefore, a provocative interpretation for the lack of a CAI-1 effect would be that CqsS receptor activation causes conformational changes which interfere with Gsα stimulation. This was tested next.

3.2. The CqsS receptor regulates stimulation of hAC2 by Gsα

In presence of 5 or 10 µM CAI-1, Gsα activation of CqsS-hAC2 was significantly attenuated (Fig. 2A). Inhibition was instantaneous. The effect was ligand-specific and reversible as determined by re-assaying membranes which were stimulated, washed and re-isolated (Fig. 2B). In

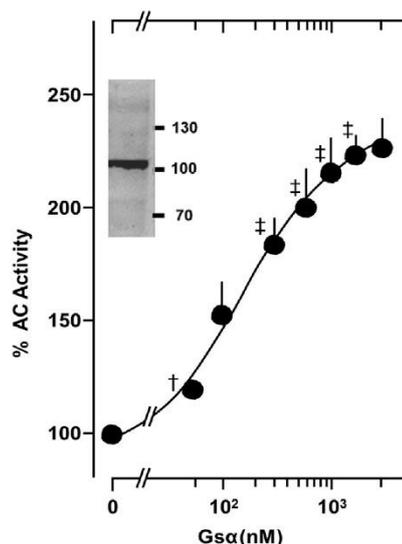
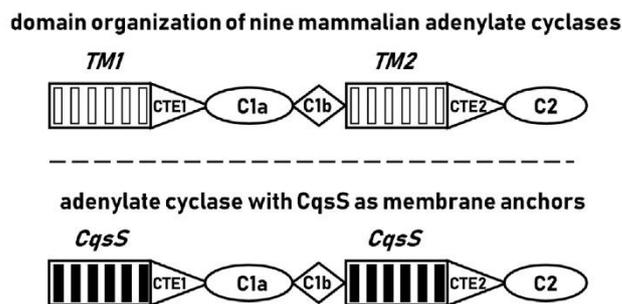


Fig. 1. Stimulation of the chimera CqsS-hAC2 by Gsα. Left: general domain organization of the membrane-delimited adenylate cyclases (top) and scheme of the chimera between CqsS as membrane anchors and hAC2 (bottom). The 6TM regions are idealized, CTE1 and CTE2 denote the cyclase-transducing-elements, indispensable for signal transduction [6,7], C1a and C2 are the respective catalytic domains, C1b connects C1a to TM2 (construct boundaries: MRGSHis₆-GS-CqsS (F166 L)₁₋₁₈₁-hAC2₂₂₁₋₆₀₃-RS-CqsS (F166 L)₁₋₁₈₁-hAC2₈₃₆₋₁₀₉₁). Right: Gsα concentration-response curve. Basal activity (100%) was 27.2 ± 2.6 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Half-maximal stimulation was around 200 nM Gsα. Error bars denote S.E.M. of 2–7 separate experiments (expressions). Significances: ‡: p < .001 compared to basal. For clarity, not all significances are marked. Insert: Western blot of the chimera with an anti-His₆-antibody indicating absence of proteolysis. MW standards are at right.

presence of 5 or 10 μM CAI-1, the EC₅₀ concentrations for Gsα were increased 1.5- and 4-fold, respectively (Fig. 2A). Concomitantly, CAI-1 at 10 μM significantly diminished the maximal Gsα response by 20% (Fig. 2A). The data supported the hypothesis that CqsS receptor activation interfered with activation by Gsα.

Next, a concentration-response curve for CAI-1 in the presence of 1 μM Gsα was carried out. At 35 μM CAI-1, activation of the CqsS-hAC2 chimera by Gsα was almost abrogated (Fig. 3A). The IC₅₀ for CAI-1 inhibition was 6.3 μM, i.e. about 15-fold higher than for the stimulatory effect of CAI-1 in the CqsS-Rv1625c AC [6]. This might be due to the fact that we went from a homodimeric CqsS-Rv1625c AC to a linked pseudoheterodimeric CqsS-hAC2 chimera. To exclude that CAI-1 might have obstructed the formation of the catalytic dimer or its interaction with Gsα, the effect of CAI-1 on Gsα stimulation of native hAC2

expressed in Sf9 cells was tested. CAI-1 neither affected basal nor Gsα-stimulated AC activity (Fig. 3B). This unequivocally demonstrated that a) CAI-1 did not interfere in formation of the catalytic dimer in the CqsS-hAC2 chimera, b) CAI-1 did not interact with Gsα and impair its function, and c) CAI-1 did not impair the interactions between the catalytic dimer and Gsα. From these data we can conclude that the effect of CAI-1 in the CqsS-hAC2 chimera was mediated via the CqsS-receptor.

3.3. Gsα stimulation of hAC2 is inhibited by human serum

The above data present a proof-of-concept experiment to demonstrate that a 2x6TM anchor domain can regulate formation of the catalytic dimer of hAC2. The data pose the questions: are mammalian

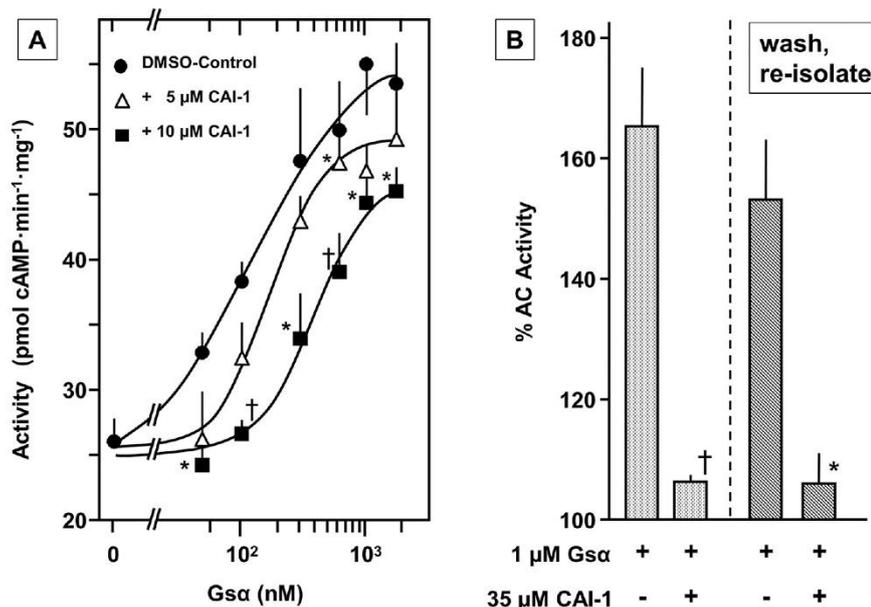


Fig. 2. A) Effect of CAI-1 on the stimulation of the chimera CqsS-hAC2 by Gsα. B) Inhibition of the Gsα response by CAI-1 is reversible. After stimulation of CqsS-hAC2 by 1 μM Gsα ± 10 μM CAI-1 for 15 min (left) membranes were washed and re-isolated by ultracentrifugation (total time required about 150 min). Re-stimulation was for 15 min. Basal activity (100%) corresponded to 48.2 ± 9.1 (primary stimulation) and 32.3 ± 5.1 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹ (washed membranes). Error bars denote S.E.M. of 5 separate experiments. Significances: *, p < .05; †, p < .01 compared to the respective Gsα stimulation.

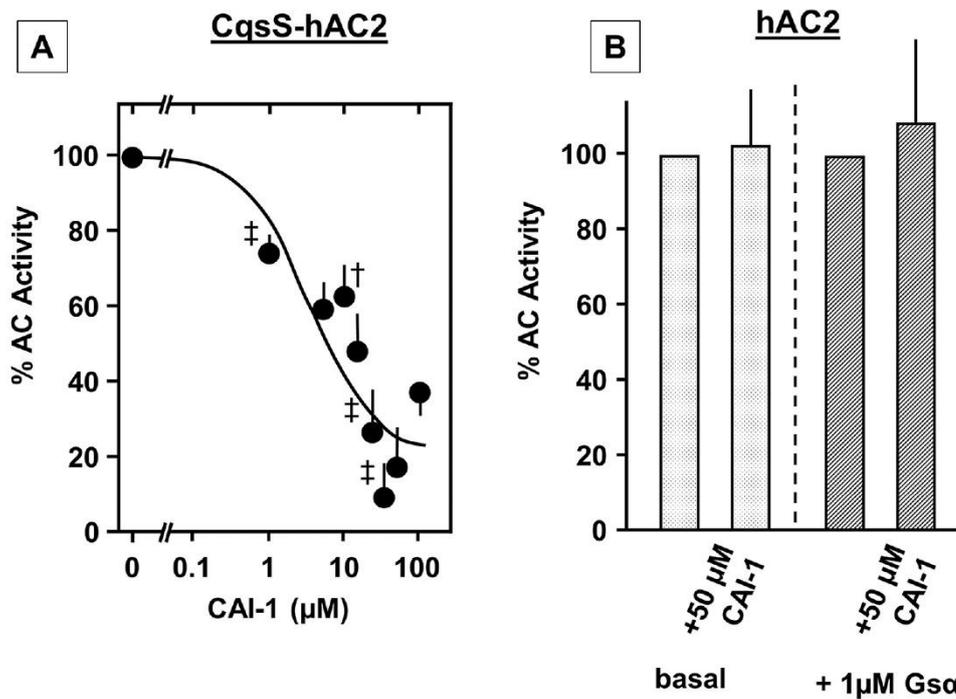


Fig. 3. A) CAI-1 concentration-response curve for the inhibition of Gsα-stimulated CqsS-hAC2. 1 μM Gsα-stimulated activity above basal (100%) was 33 ± 2.6 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. The IC₅₀ for CAI-1 was 6.3 μM. Error bars denote S.E.M. of 3–7 separate experiments. Significances: †: p < .01; ‡: p < .001 compared to Gsα-stimulated activity. For clarity, not all significances are indicated. B) CAI-1 has no effect on Gsα stimulation of hAC2. Basal (60 ± 20 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹) and 1 μM Gsα stimulated activities (2.7 ± 1.4 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹) were set at 100%, respectively; CAI-1 was dissolved in DMSO, 2% final DMSO in all assays. 5 independent assays were carried out. Error bars denote SD.

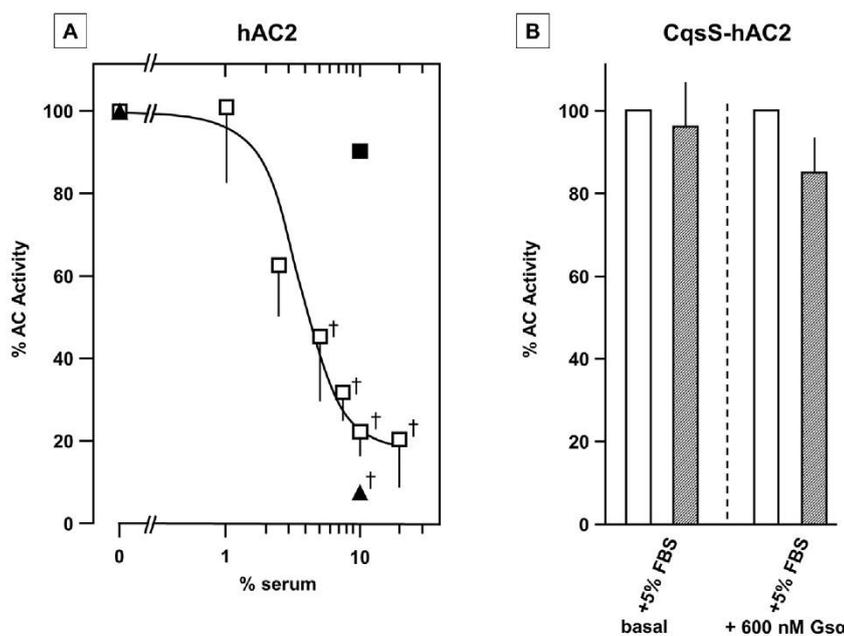


Fig. 4. A) Inhibition of Gsα stimulation (600 nM) of hAC2 by human serum (□) and FBS (▲); human serum albumin (■) at 45 μg/assay. Basal hAC2 activity was 30 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, 100% Gsα-stimulated activity was 1.6 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. Error bars represent SD of 3–5 experiments. †: p < .01 compared to control. B) Basal (open bars; 13.6 ± 2.2) and Gsα-stimulated activity (hatched bars; 27.2 ± 6.2 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹) of the CqsS-hAC2 chimera were unaffected by 5% FBS.

mACs regulated in a similar manner and what are potential ligands in mammals and where to expect them? Considering that the mAC membrane anchors are isoform-specifically conserved, prospective ligands are predicted to be similarly primordial [5,7]. Because ligands supposedly access the mACs from the extracellular solvent space, they are expected to be systemically present in the extracellular fluid system of the body. Indeed, human serum significantly inhibited stimulation of hAC2 by 600 nM Gsα (and similarly did heat-inactivated human serum in which complement is inactivated) in a concentration-dependent manner (Fig. 4A). Serum albumin had no effect (Fig. 4A). Fetal bovine serum (FBS) was even more potent indicating a higher concentration of inhibitory factors and almost excluding immunoglobulins as potential ligands because the concentration of immunoglobulins in FBS is substantially lower compared to human serum (Fig. 4 A). Although hAC2

activity with Mn²⁺-ATP was much higher than with Mg²⁺-ATP we preferred using Mg²⁺-ATP as the likely physiological substrate because serum contains 1.25 mM Mg²⁺ and 2.4 mM Ca²⁺, virtually excluding a chelating effect of divalent cations and, probably, regulatory effects of Ca²⁺ [24]. The data suggested that potential receptor ligands for hAC2 are present in serum. We also carried out concentration-response curves for Gsα stimulation of hAC2 in the absence and presence of 5 and 10% human serum (Supplemental fig. 1). In the presence of serum the efficacy of Gsα was substantially diminished, increasing the required Gsα concentrations for activation and diminishing the maximal responses (Supplemental fig. 1). This was similar to the results with the CqsS-hAC2 chimera (Fig. 2A) suggesting similar mechanisms of action for CAI-1 and specific serum factors, respectively.

Stringent controls are required to unequivocally assign the effect of

serum to the membrane anchors of hAC2: a) exclusion of a salt effect as serum contains around 120 mM NaCl, b) exclusion of an interference of serum components with the dimerization of the C1 and C2 catalytic domains, and c) exclusion of an interference in the interaction between the catalytic dimer and G α . 10 mM NaCl in the incubations, equivalent to 10% serum in the assays, did not impair hAC2 basal activity or G α stimulation. Similarly, using dialyzed serum did not abrogate inhibition of G α stimulation excluding interference by NaCl.

Basal activities of all mACs generally are rather low and difficult to determine reliably [25]. Therefore, we increased the amount of hAC2 membrane protein 27-fold and examined the effect of serum. It inhibited basal hAC2 activity in a concentration-dependent manner with a half-maximal inhibition at 4.9% serum whereas albumin did not (Supplemental fig. 2).

This created a critical issue because components of human or fetal bovine serum might either interfere with dimerization of C1 and C2 domains or with activation of the dimer by G α . This was explored using CqsS-hAC2 in which the membrane anchors are from a *Vibrio* quorum-sensor whereas the cytosolic domains are from hAC2 (scheme in Fig. 1). In the CqsS-hAC2 chimera FBS did neither interfere with basal hAC2 activity nor with G α stimulation (Fig. 4B). Thus we excluded an effect of serum on the catalytic hAC2 dimer or on G α activation of the dimer. The results demonstrated that the action of serum on basal hAC2 activity was contingent on the presence of the membrane anchor of hAC2.

3.4. Human serum inhibits G α stimulation of hAC 3, 5, 9 and in brain membranes

Are the above results restricted to the hAC2 isoform or are they indicative of a more general regulatory mechanism applicable to all mACs? Based on pronounced sequence features the nine mACs are subclassified into four subclasses, AC 1, 3 and 8, AC 2, 4, and 7, AC 5 and 6, and the standalone isoform AC9 [3,26,27]. We investigated hAC3, hAC5 and hAC9, i.e. one member of each subclass (including hAC2). Using appropriate enzyme concentrations, serum inhibited basal activities of hACs 3, 5, and 9 with hAC5 being less sensitive to inhibition compared to hAC3 and 9 (IC_{50} = 6.3% serum) indicating either different concentrations of specific inhibitory factors in serum or differences in affinity of a potentially common factor (Supplemental fig. 3). Similarly, G α stimulation of hAC isoforms 3, 5, and 9 was inhibited by human serum. The calculated IC_{50} concentrations ranged between 3

and 7% (Fig. 5A). These insignificant differences were not surprising as the commercial human serum is mixed from adult human donors, certainly presenting various physiological states while donating blood.

Next we investigated whether we might have dealt with a serum effect related to the heterologous expression of hACs in Sf9 cells. We prepared membranes from rat brain cortex which contain essentially all mAC isoforms [28]. Serum potently inhibited basal AC as well as G α stimulated activity, suggesting that the mACs in brain membranes are similarly regulated as individual AC isoforms expressed in Sf9 cells (Fig. 5B and Supplemental fig. 4).

3.5. Serum inhibits forskolin-stimulated AC activity

mACs are known to be regulated by a number of cytosolic effectors such as G $\beta\gamma$, calcium / calmodulin, or forskolin and by several secondary modifications such as phosphorylation [3]. These factors generally have divergent, isoform-specific effects, e.g. G $\beta\gamma$ is reported to enhance G α or forskolin-stimulated activities of mACs 2, 4, 5, 6, and 7, but to have no effect alone (reviewed in [26,29]). On the other hand, G $\beta\gamma$ inhibits mACs 1, 3, and 8, and is even reported to inhibit AC5 and 6 [26,30,31]. Similarly, calcium and calmodulin have isoform-specific inhibitory or activating effects [26]. In contrast, the plant diterpene forskolin uniformly activates mACs 1 to 8 and it potentiates G α activation [3]. In crystal structures of the catalytic dimer, forskolin is bound within the catalytic cleft [21,32]. Therefore, we examined whether serum affects the action of forskolin on hAC2, either alone or in conjunction with G α . 25 μ M Forskolin stimulated hAC2 about 2.4-fold and human serum significantly inhibited activation (Fig. 6A). 25 μ M Forskolin + 300 nM G α resulted in a 6.6-fold potentiation of activation of hAC2 and serum was significantly inhibitory as well (Fig. 6B). Interestingly, also basal AC activity in rat cortical membranes was inhibited by serum in line with respective results of hACs 2, 3, 5, and 9 activities (Supplemental fig.s 2, 3 and 4). This demonstrates that regulatory processes of mACs, which are mediated via direct effects on the cytosolic catalytic dimer, are affected by action of specific inhibitory factors present in serum acting via mAC membrane domains. The data support our suggestion that we were dealing with a novel general mechanism of mAC regulation.

4. Discussion

Thus far, studies of regulation of mAC activity mostly dealt with

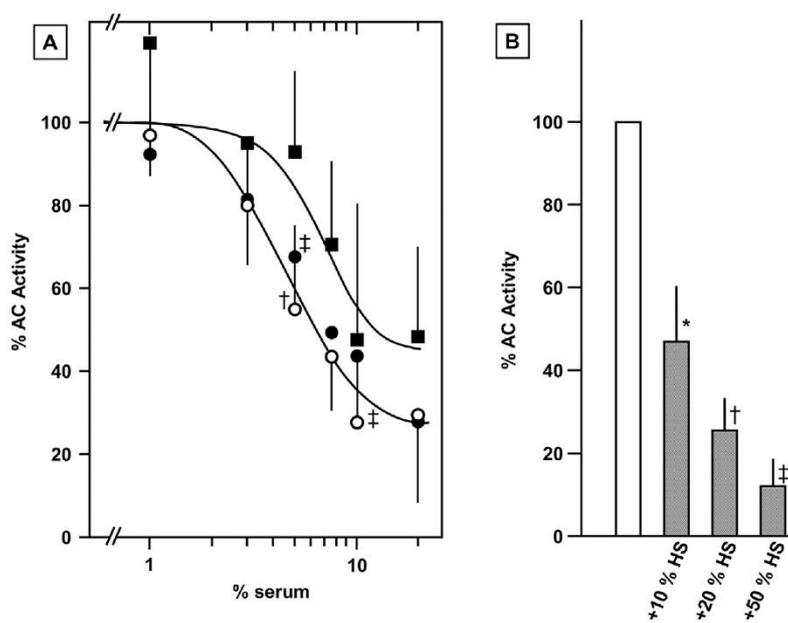


Fig. 5. A) Serum inhibition of hACs 3, 5, and 9 stimulated by 600 nM G α (○: hAC 3; ●: hAC5; ■: hAC9). To depict the data in a single graph, activities of hACs 3, 5, and 9 stimulated by 600 nM G α were taken as 100% (hAC3 = 0.7, hAC5 = 4.5, AC9 = 1.5 nmol cAMP·mg $^{-1}$ ·min $^{-1}$; for inhibition of basal AC activities see Supplemental fig. 3). B) Serum inhibition of AC activity in rat brain cortical membranes stimulated by 600 nM G α . 100% activity corresponds to 1.24 nmol cAMP·mg $^{-1}$ ·min $^{-1}$ (3.5-fold stimulation above basal; n = 3). *: p < .05; †: p < .01; ‡: p < .001. Error bars denote SD of 3–4 experiments. (for inhibition of basal activity see Supplemental fig. 4). For clarity, not all significances are indicated.

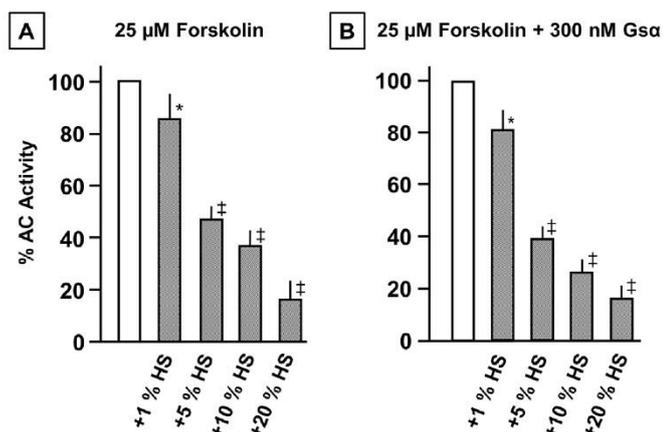


Fig. 6. Serum inhibition of hAC2 activity stimulated by forskolin and forskolin + Gsα. A) Inhibition of 25 μM forskolin stimulated hAC2 activity (100% corresponds to 0.19 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, a 2.5-fold stimulation). B) Inhibition of hAC activity stimulated by 25 μM forskolin and 300 nM Gsα (100% corresponds to 0.5 nmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹, a 6.6-fold stimulation). Error bars denote SD of 4 experiments. *: p < .05; ‡: p < .001.

regulation of the cytosolic catalytic dimer, primarily by uniformly activating Gsα and, secondarily, by variable other inputs (reviewed in [3,27]). The biochemical data emanating from these studies are usually discussed by a two-state model, an active and an inactive state. In this respect, the 2x6TM anchors were considered inert. Potential roles for the membrane anchors were assigned to localization, e.g. in membrane rafts, or as potential interaction sites for scaffolding proteins [33–36]. Our data demonstrate a new level of mAC regulation which is spatially distinct from the catalytic dimer, and, for the first time, confer a regulatory function to all mAC domains. In addition, the regulatory input via the AC membrane domains immediately suggests a possible explanation for the striking evolutionary conservation of the membrane anchors in an isoform-specific manner [5] and requires expanding the previous two-state model of mAC regulation to a three-state model.

CqsS is a hexahelical quorum-sensing receptor from *Vibrio* sensing the extracellular ligand CAI-1 [8,37]. It is isosteric to a 6TM domain of the pseudoheterodimeric mACs [6]. In the CqsS-hAC2 chimera, we observed that CAI-1 attenuated Gsα stimulation in an unequivocally receptor-mediated process (Fig. 2). CAI-1 had no such effect on Gsα-

stimulated activity of the hAC2 holoenzyme, because the hAC2 membrane anchor lacks the functionality to sense CAI-1 (Figs. 2, 3). However, stimulation of hAC2 by Gsα was inhibited by serum (Fig. 4A). The effect was dependent on the membrane domain from hAC2 because serum did not affect Gsα stimulation of CqsS-hAC2 as the CqsS receptor cannot sense signaling components present in mammalian serum (Fig. 4B). In addition, this demonstrated that serum did not affect dimerization of C1 and C2 (Fig. 4B). Serum albumin, the major protein in serum, had no effect suggesting the presence of specific, as yet unidentified inhibitory components in serum (Fig. 4A). Inhibition of Gsα stimulation by serum was further demonstrated for hAC isoforms 3, 5, and 9, thus covering one isoform from each mAC subclass (Fig. 5A). Likewise, serum inhibited basal and Gsα stimulated mAC activity present in rat brain cortical membranes (Fig. 5B and Supplemental fig. 4), virtually excluding the possibility of an artifact due to heterologous expression of hACs in Sf9 insect cells. Conceptually, a regulatory input from the extracellular space should affect all cytosolic regulatory inputs impinging upon the catalytic dimer. This was verified with forskolin which stimulates cytosolic catalytic dimer (exception mAC9). Forskolin activation of hAC2 ± Gsα was inhibited by serum (Fig. 6B).

4.1. A three-state model of adenylate cyclase regulation

Based on these data and equilibrium thermodynamic considerations we propose a novel formal concept of regulation of mACs which encompasses all available biochemical, pharmacological and structural data (Fig. 7). Three distinct basal states of mACs exist in equilibrium, state A (inactive), state B (inactive), and state C (active). States A and B differ in the conformational flexibility of their catalytic C1/C2 domains. In state A, the catalytic domains are conformationally constrained and cannot form an active dimer. In state B, the catalytic domains are conformationally unconstrained, yet because of their low affinity for each other, they only occasionally collapse into an active dimer (state C). The highly transient state ‘C’ is responsible for the very low basal activity observed in all mACs.

Constraining structural flexibility by binding of a ligand at the extracellular side shifts the equilibrium to the inactive ‘A’-state (Fig. 7, far left) attenuating basal AC as well as Gsα stimulated activities in hAC2, 3, 5, 9, and in rat brain cortical membranes (Figs. 4, 5 and Supplemental Fig.’s 2–4). Forskolin reversibly increases the apparent affinity of C1 and C2 about tenfold, i.e. it stabilizes the ‘C’-state. The ‘C’-state is further stabilized by binding of Gsα at the cytosolic dimer thus

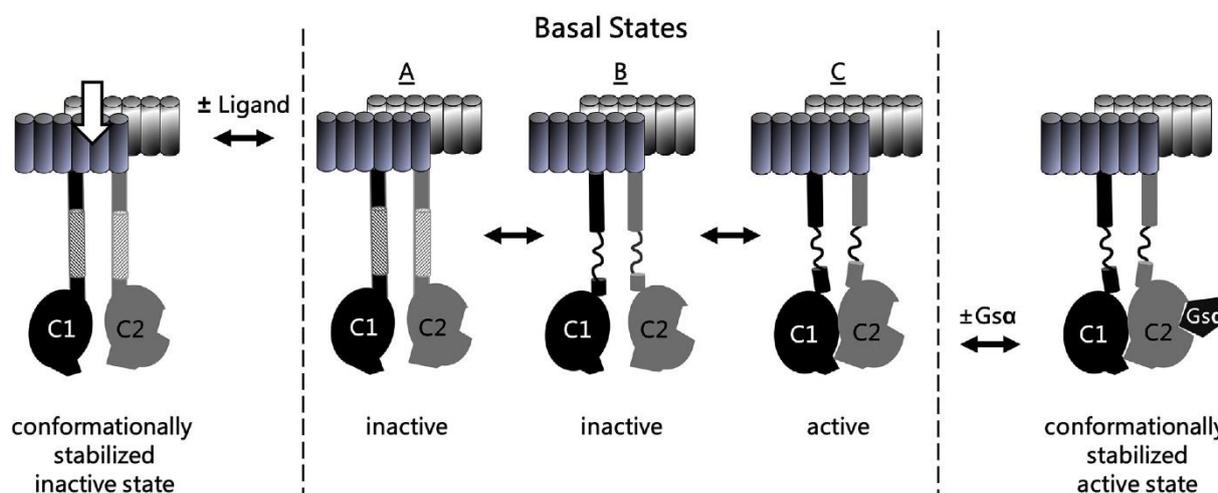


Fig. 7. Scheme of regulation of mammalian adenylate cyclases. Three basal states are in a thermodynamic equilibrium, two inactive, A and B, and one active state, C. The constant low basal enzyme activity is due to fractional formation of an active dimer as symbolized in C. Contact with Gsα in the cytosol stabilizes the active ‘C’-state (conformationally stabilized active state, at far right). Conversely, binding of as yet unknown ligands at the extracellular side of the membrane anchor stabilizes the inactive state A (conformationally stabilized inactive state; at far left).

activating mACs and potentially acting in concert with forskolin (Fig. 7, far right).

The proposed three-state model suggests the existence of an allosteric linkage in mACs, in which the membrane anchors, as receptors, transduce extracellular signals across the cell membrane to the cytosolic catalytic dimer. This way, each mAC isoform can be addressed individually by an extracellular ligand and primed for a physiologically measured GPCR/Gs α response. Such a regulatory network would explain the conundrum of why often multiple Gs α -stimulated mAC isoforms are expressed in a single cell. The model is in agreement with the recently published structure of a bovine AC9 isoform which contains features compatible with signal transduction between membrane anchor and catalytic dimer [14]. We are aware of the fact that the equilibrium of states will be subject to ambient conditions such as ion and substrate concentrations, membrane charge and membrane potential. Thus, the model is open to modifications without losing its conceptual validity. Similarly, the lack of chemically identified ligands neither impaired establishing nor does it affect the validity of the three-state model. Considering the isoform-specific conservation of AC membrane anchors nine ligands are expected. These ligands in conjunction with the respective receptors will define a regulatory system which affects GPCR/Gs α actions executed via mACs. In summary then, the AC membrane anchors can now be designated as orphan receptors.

Credit author statement

Anubha Seth, Manuel Finkbeiner, Julia Grischin: Designed, carried out and analyzed experiments; Joachim E. Schultz: Conceptualization, analyzed data and wrote manuscript with all others.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

We thank U. Kurz for a continuous supply of Gs α (Q227L), A. Schultz for help in cloning, Dr. J. Weir, Friedrich-Miescher-Laboratory, Tübingen, for help with the Sf9 cell culture and Prof. Dr. A. Lupas for continuous encouragement. Supported by institutional funds from the Max-Planck-Society.

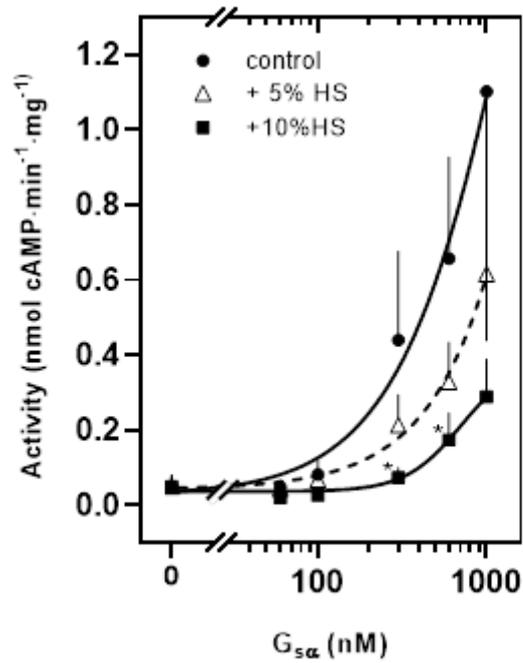
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109538>.

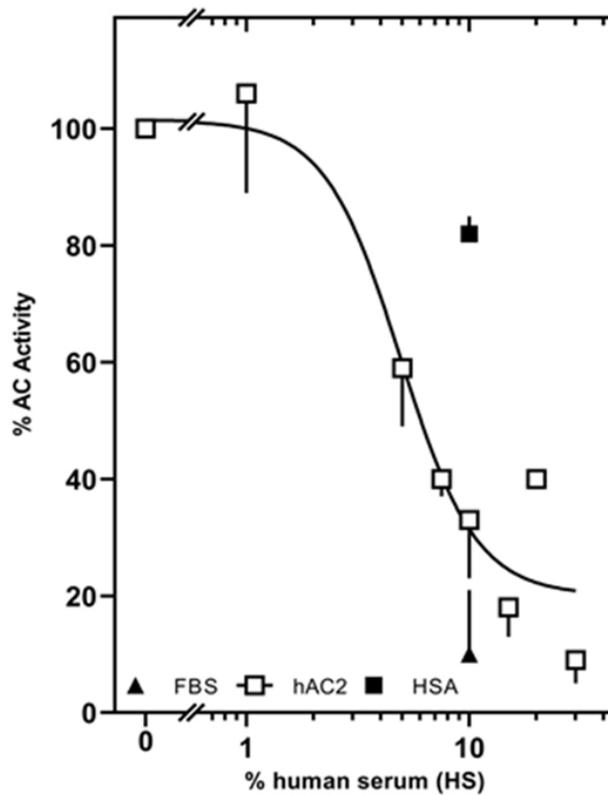
References

- J. Krupinski, F. Coussen, H.A. Bakalyar, W.J. Tang, P.G. Feinstein, K. Orth, C. Slaughter, R.R. Reed, A.G. Gilman, Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure, *Science* 244 (4912) (1989) 1558–1564.
- S.C. Sinha, S.R. Sprang, Structures, mechanism, regulation and evolution of class III nucleotidyl cyclases, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 157 (2006) 105–140.
- C.W. Dessauer, V.J. Watts, R.S. Ostrom, M. Conti, S. Dove, R. Seifert, International Union of Basic and Clinical Pharmacology, Cl. Structures and small molecule modulators of mammalian adenylyl cyclases, *Pharmacol. Rev.* 69 (2) (2017) 93–139.
- W.J. Tang, A.G. Gilman, Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin, *Science* 268 (5218) (1995) 1769–1772.
- J. Bassler, J.E. Schultz, A.N. Lupas, Adenylate cyclases: receivers, transducers, and generators of signals, *Cell Signal.* 46 (2018) 135–144.
- S. Beltz, J. Bassler, J.E. Schultz, Regulation by the quorum sensor from *Vibrio* indicates a receptor function for the membrane anchors of adenylate cyclases, *elife* 5 (2016).
- M. Ziegler, J. Bassler, S. Beltz, A. Schultz, A.N. Lupas, J.E. Schultz, A novel signal transducer element intrinsic to class IIIa and IIIb adenylate cyclases, *FEBS J.* 284 (2017) 1204–1217.
- W.L. Ng, Y. Wei, L.J. Perez, J. Cong, T. Long, M. Koch, M.F. Semmelhack, N.S. Wingreen, B.L. Bassler, Probing bacterial transmembrane histidine kinase receptor-ligand interactions with natural and synthetic molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (12) (2010) 5575–5580.
- S. Diel, K. Klass, B. Wittig, C. Kleuss, Gbetagamma activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gbetagamma, *J. Biol. Chem.* 281 (1) (2006) 288–294.
- M.P. Graziano, M. Freissmuth, A.G. Gilman, Expression of Gs alpha in *Escherichia coli*. Purification and properties of two forms of the protein, *J. Biol. Chem.* 264 (1) (1989) 409–418.
- M.P. Graziano, M. Freissmuth, A.G. Gilman, Purification of recombinant Gs alpha, *Methods Enzymol.* 195 (1991) 192–202.
- J.E. Schultz, B.H. Schmidt, Treatment of rats with thyrotropin (TSH) reduces the adrenoceptor sensitivity of adenylate cyclase from cerebral cortex, *Neurochem. Int.* 10 (2) (1987) 173–178.
- Y. Salomon, C. Londos, M. Rodbell, A highly sensitive adenylate cyclase assay, *Anal. Biochem.* 58 (2) (1974) 541–548.
- C. Qi, S. Sorrentino, O. Medalia, V.M. Korkhov, The structure of a membrane adenylyl cyclase bound to an activated stimulatory G protein, *Science* 364 (2019) 389–394.
- W.J. Tang, M. Stanzel, A.G. Gilman, Truncation and alanine-scanning mutants of type I adenylyl cyclase, *Biochemistry* 34 (44) (1995) 14563–14572.
- S. Weitmann, G. Schultz, C. Kleuss, Adenylyl cyclase type II domains involved in Gbetagamma stimulation, *Biochemistry* 40 (36) (2001) 10853–10858.
- Y.L. Guo, T. Seebacher, U. Kurz, J.U. Linder, J.E. Schultz, Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases, *EMBO J.* 20 (14) (2001) 3667–3675.
- G. Zhang, Y. Liu, A.E. Ruoho, J.H. Hurley, Structure of the adenylyl cyclase catalytic core, *Nature* 386 (6622) (1997) 247–253.
- S.Z. Yan, D. Hahn, Z.H. Huang, W.J. Tang, Two cytoplasmic domains of mammalian adenylyl cyclase form a Gs alpha- and forskolin-activated enzyme in vitro, *J. Biol. Chem.* 271 (18) (1996) 10941–10945.
- M.E. Hatley, B.K. Benton, J. Xu, J.P. Manfredi, A.G. Gilman, R.K. Sunahara, Isolation and characterization of constitutively active mutants of mammalian adenylyl cyclase, *J. Biol. Chem.* 275 (49) (2000) 38626–38632.
- J.J. Tesmer, R.K. Sunahara, A.G. Gilman, S.R. Sprang, Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gsalpha.GTPgammaS, *Science* 278 (5345) (1997) 1907–1916.
- C.W. Dessauer, M. Chen-Goodspeed, J. Chen, Mechanism of Galpha i-mediated inhibition of type V adenylyl cyclase, *J. Biol. Chem.* 277 (32) (2002) 28823–28829.
- M. Ritt, S. Sivaramakrishnan, Correlation between activity and domain complementation in adenylyl cyclase demonstrated with a novel fluorescence resonance energy transfer sensor, *Mol. Pharmacol.* 89 (4) (2016) 407–412.
- E. Csenker, P. Dioszeghy, I. Fekete, F. Mechler, Ion concentrations in serum and cerebrospinal fluid of patients with neuromuscular diseases, *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 231 (3) (1982) 251–258 1970.
- J.D. Hildebrandt, L. Birnbaumer, Inhibitory regulation of adenylyl cyclase in the absence of stimulatory regulation. Requirements and kinetics of guanine nucleotide-induced inhibition of the cyc- S49 adenylyl cyclase, *J. Biol. Chem.* 258 (21) (1983) 13141–13147.
- D. Willoughby, D.M. Cooper, Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains, *Physiol. Rev.* 87 (3) (2007) 965–1010.
- R.K. Sunahara, R. Taussig, Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling, *Mol. Interv.* 2 (3) (2002) 168–184.
- C. Sanabra, G. Mengod, Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain, *J. Chem. Neuroanat.* 41 (1) (2011) 43–54.
- C.S. Brand, R. Sadana, S. Malik, A.V. Smrcka, C.W. Dessauer, Adenylyl cyclase 5 regulation by Gbetagamma involves isoform-specific use of multiple interaction sites, *Mol. Pharmacol.* 88 (4) (2015) 758–767.
- J.J. Tesmer, S.R. Sprang, The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 (1998) 713–719.
- D. Steiner, T. Avidor-Reiss, E. Schallmach, D. Saya, Z. Vogel, Inhibition and superactivation of the calcium-stimulated isoforms of adenylyl cyclase: role of Gbetagamma dimers, *J. Mol. Neurosci.* 27 (2) (2005) 195–203.
- J.J.G. Tesmer, R.K. Sunahara, R.A. Johnson, G. Gosselin, A.G. Gilman, S.R. Sprang, Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase, *Science* 285 (1999) 756–760.
- A.J. Crossthwaite, T. Seebacher, N. Masada, A. Ciruela, K. Dufraux, J.E. Schultz, D.M. Cooper, The cytosolic domains of Ca²⁺ – sensitive adenylyl cyclases dictate their targeting to plasma membrane lipid rafts, *J. Biol. Chem.* 280 (8) (2005) 6380–6391.
- L.A. Piggott, A.L. Bauman, J.D. Scott, C.W. Dessauer, The A-kinase anchoring protein Yotiao binds and regulates adenylyl cyclase in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (37) (2008) 13835–13840.
- Y. Li, L. Chen, R.S. Kass, C.W. Dessauer, The A-kinase anchoring protein Yotiao facilitates complex formation between adenylyl cyclase type 9 and the Iks potassium channel in heart, *J. Biol. Chem.* 287 (35) (2012) 29815–29824.
- T.C. Rich, K.A. Fagan, H. Nakata, J. Schaack, D.M. Cooper, J.W. Karpen, Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion, *J. Gen. Physiol.* 116 (2) (2000) 147–161.
- W.L. Ng, L.J. Perez, Y. Wei, C. Kraml, M.F. Semmelhack, B.L. Bassler, Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems, *Mol. Microbiol.* 79 (6) (2011) 1407–1417.

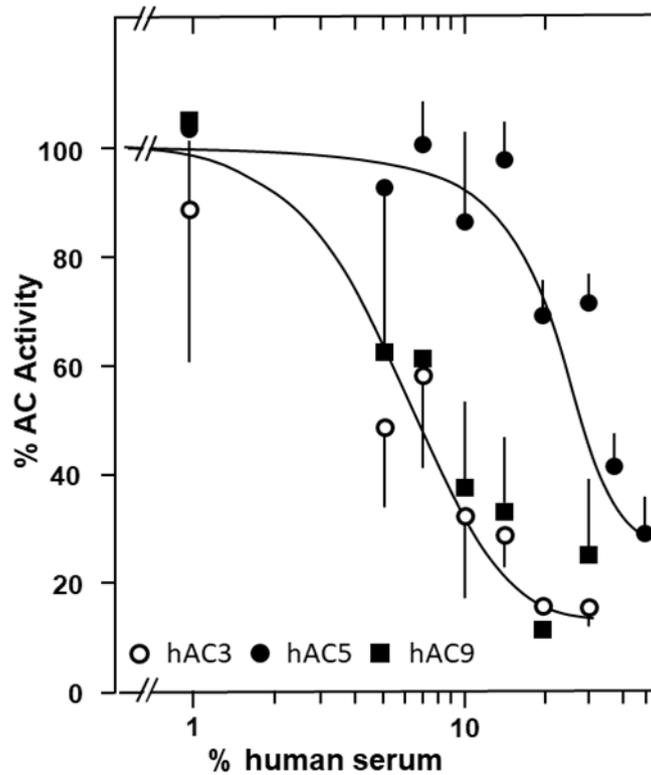
Supplementary data:



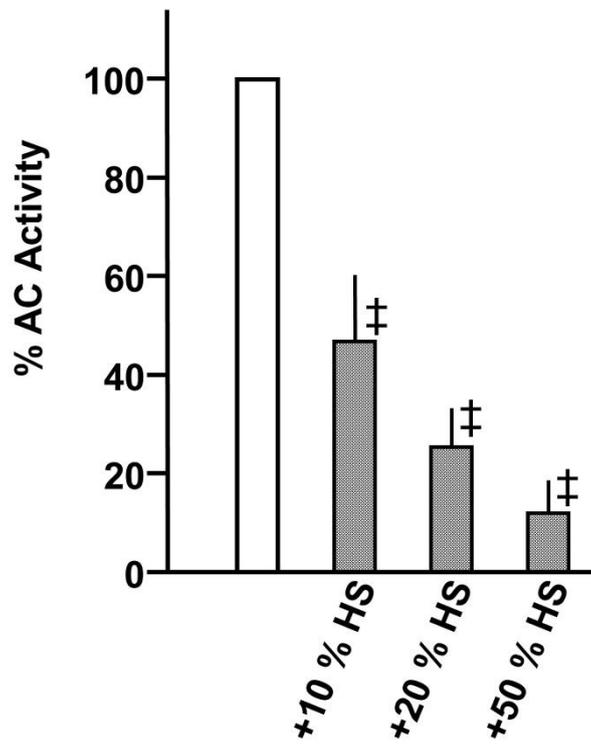
Supplementary Figure 1. G_{sα} concentration-response curve of hAC2 in presence of 5 and 10 % human serum, respectively. Significances: *: p ≤ 0.05 compared to control. Error bars denote SD of 3 experiments.



Supplementary Figure 2. Inhibition of basal activity of hAC2 by human serum. Basal activity was 0.038 ± 0.006 nmol cAMP \cdot mg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$. IC $_{50}$ concentration determined by graph-pad was: 4.9% HS. 2-5 Experiments were carried out, Error bars denote SD

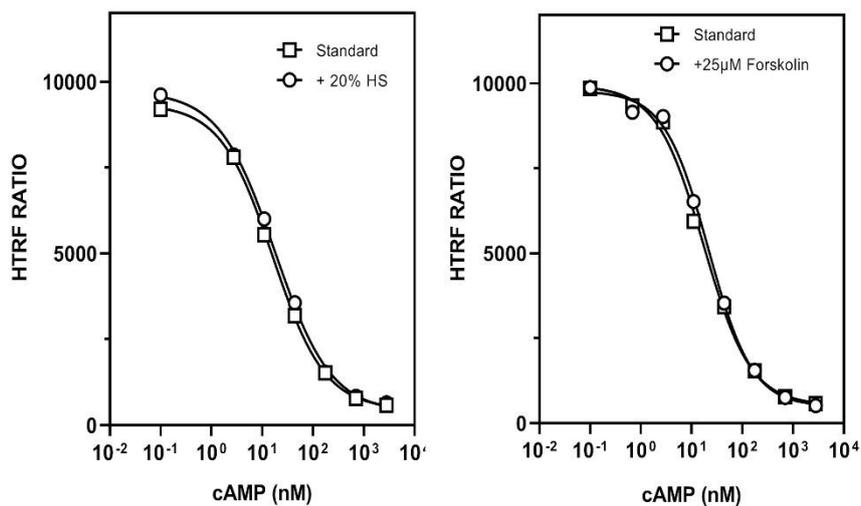


Supplementary Figure 3. Inhibition of basal activity of hACs 3, 5, and 9 by human serum. 2-5 Experiments were carried out. Error bars denote SD. Basal activities were: hAC3 0.025 ± 0.007 ; hAC5 0.049 ± 0.013 ; hAC9 0.150 ± 0.047 nmol cAMP \cdot mg $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ IC $_{50}$ concentrations determined by graph-pad were: 6.0% estimated ~40% and 5.9%, respectively



Supplementary Figure 4. Inhibition of basal AC activity in a rat brain cortical membrane preparation. Basal activity (100 %) was 325 pmol cAMP·mg⁻¹·min⁻¹. n = 3, Error bars denote SD

. Significance: ‡: p< 0.001



Supplementary Figure 5. Standard curves for cAMP determination generated with the homogenous-time-resolved fluorescence assay from Cisbio in presence of 20 % human serum or 25 μ M forskolin. No interference of serum and forskolin (and other agents used in respective AC assays such as Gs α at 1 μ M or DMSO at 2%) was observed.

5. Weitere Ergebnisse und Diskussion

In der eingebundenen Veröffentlichung (Kapitel 4.2; ref. [34]) wird die Signaltransduktion über einen bakteriellen hexahelikalen Transmembranrezeptor auf das katalytische Dimer der hAC 2 gezeigt. Die Expression der hACn in praktisch allen Geweben und die gezeigte Hemmung von Serum (HS und FBS) auf die $G_{s\alpha}$ -Stimulation der hACn rechtfertigen weitere Untersuchungen, ob auch bei den hexahelikalen Membranankern der Mammalia ACn eine Rezeptorfunktion vorliegt. Die Hemmung durch Serum deutet darauf hin, dass die Liganden in systemischen Flüssigkeiten des Organismus präsent sind. Explizit habe ich die Ergebnisse als Anhaltspunkt genutzt, um zu überlegen, um welche Verbindungsklasse es sich bei den Liganden möglicherweise handeln könnte. Basierend auf diesen Überlegungen wurde das weitere experimentelle Vorgehen für eine systematische Analyse der Problemstellung erarbeitet. Im Weiteren habe ich FBS als Ausgangsmaterial für die Experimente verwendet, da dies eine stärkere Hemmung als HS zeigte. Verschiedene Trenn- und Aufreinigungsverfahren wurden angewandt, um die chemische Zugehörigkeit (Lipid, Protein, etc.) zu ermitteln und gegebenenfalls spezifische Substanzen für unterschiedliche Isoformen zu identifizieren.

5.1. Vergleich verschiedener Serumvarianten

Zunächst wurden Varianten von Rinderserum getestet, im Einzelnen: unbehandeltes FBS (REF 10270-106), Exosomen-reduziertes FBS (FBS-exo; REF A27296-01), hitzeinaktiviertes FBS (Inaktivierung des Komplementsystems; 56°C, 30 min; FBS-hi), Immunglobulin G armes FBS (FBS-low IgG; REF A33819-01) und dialysiertes FBS (FBS-dial.; REF A33820-01). Der Effekt von 5, 10 und 20 Vol.% der Serumvarianten wurde auf die durch 300 nM $G_{s\alpha}$ stimulierte hAC 5 untersucht (Abb. 5-1). FBS-dial. bewirkte bei 5 Vol.% eine weitere Stimulierung der Aktivität auf 138 ± 20 %, welche bei 10 Vol.% auf 108 ± 17 %, d.h. nahezu auf den Ausgangswert zurückging. Ein Anteil von 20 Vol.% FBS-dial. im Test hemmte die stimulierte AC-Aktivität auf verbleibende 78 ± 13 %. Die anderen vier Varianten verringerten deutlich die $G_{s\alpha}$ -Stimulation mit einer beobachtbaren Konzentrationsabhängigkeit. Ein Serumanteil von 5 Vol.% hatte

hier bereits Hemmung von 40 - 60 % zur Folge. 10 bzw. 20 Vol.% der Proben unterschieden sich nur geringfügig und zeigten Hemmung der Aktivität von 70 - 82 %.

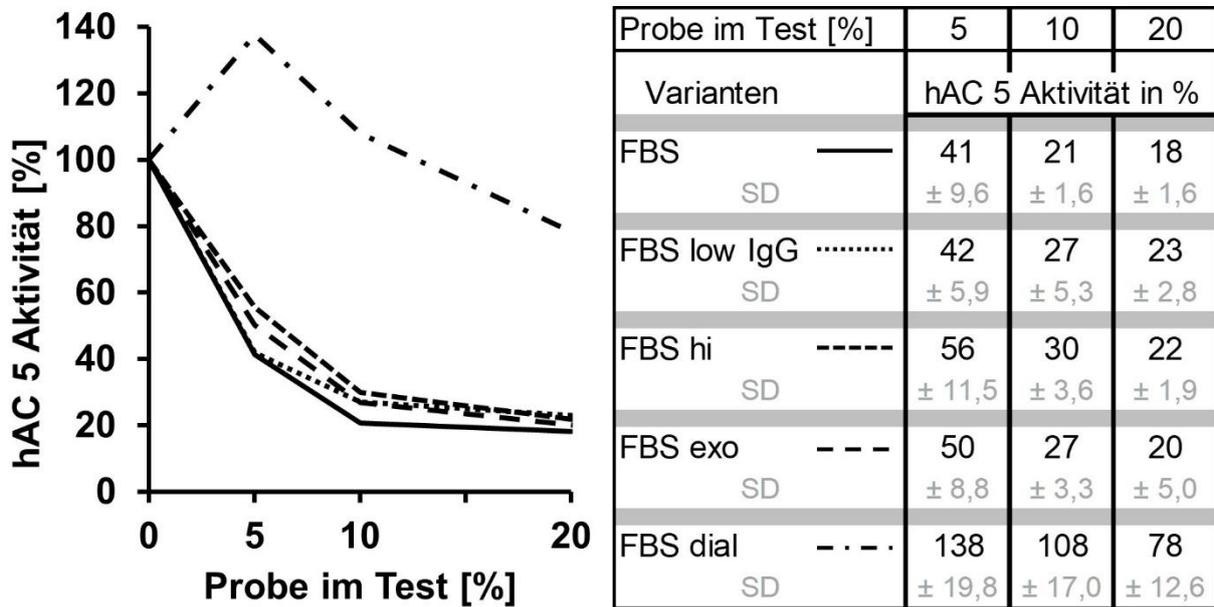


Abb. 5-1 Hemmung der G_{sa} -stimulierten hAC 5 durch FBS-Varianten. 100 % Aktivität ($3 \pm 1,2$ nmol cAMP/mg/min) entspricht einer 25-fachen Stimulierung durch 300 nM G_{sa} . Mittelwerte und SD wurden aus drei Experimenten mit jeweils Vierfachbestimmung berechnet.

Exosomen gelten als wichtiger Serumbestandteil, unter anderem wirken sie als interzelluläre Signale über weite Distanzen, sind bei der Immunantwort involviert und spielen eine Rolle als Transporter für Lipide, Proteine und Nukleinsäuren [42-44]. Es wird vermutet, dass sie sich schon sehr früh in der Evolution entwickelt haben [44]. Derzeit werden Exosomen für diagnostische Zwecke intensiv untersucht [43]. Als Komponente des systemisch vorhandenen Serums und mit der evolutionären Konservierung erfüllen Exosomen die Voraussetzungen als potenzielle Liganden der ACn. Die Daten zeigen, dass der Hemmeffekt bei Reduzierung der Exosomen nahezu identisch blieb. Exosomen oder daran gebundene Faktoren sind somit keine Liganden der ACn.

Auch IgG und das Komplementsystem, als Grundpfeiler der Immunreaktion [45], erfüllen aufgrund ihres evolutionären Entstehens Anforderungen als potenzielle Liganden. Die Inaktivierung bzw. Reduzierung im Serum zeigte keinen Einfluss auf die

stimulierte hAC 5. IgG und die Bestandteile des Komplementsystems sind damit keine Liganden der ACn.

Die ausgeprägte, geringere Hemmung des dialysierten Serums deutet an, dass die hemmenden Komponenten klein sind, da sie durch die Dialysemembran diffundieren können. Die Herstellerangaben, dass bei einer Ausschlussgrenze von 10 kDa gegen 0,15 M NaCl bis zu einer Glukosekonzentration von 50 mg/l dialysiert wurde, lässt vermuten, dass die gesuchten Komponenten kleiner als 10 kDa sind.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Instabilisierung der Komponenten durch Reduktion kleiner Moleküle während der Dialyse. Denkbar ist auch eine unspezifische Bindung der hemmenden Komponenten an die Dialysemembran. Diese Möglichkeiten wurden im Umfang dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Welche Substanzklassen im Serum kommen als Liganden in Frage?

Zunächst wurden Proteine als Liganden in Betracht gezogen. Deshalb wurde der Proteingehalt aller verwendeten FBS Varianten bestimmt (Tabelle 5-1). Im Vergleich zum unbehandelten FBS senkt ausschließlich die Reduzierung der Exosomen die Gesamtproteinmenge drastisch auf ca. ein Fünftel. Da der Hemmeffekt von FBS-exo im Vergleich zu FBS nahezu identisch ist, die Gesamtproteinmenge jedoch drastisch reduziert ist, habe ich im Weiteren FBS-exo als Ausgangssubstanz verwendet.

Tabelle 5-1: Proteinbestimmung der Serumvarianten

Serumvariante	Proteinmenge
FBS	36,1 µg/µl
IgG armes FBS	32,7 µg/µl
hitzeinaktiviertes FBS	36,9 µg/µl
dialysiertes FBS	33,7 µg/µl
Exosomen armes FBS	6,9 µg/µl

Aufgrund des identischen Verhaltens der AC Isoformen auf HS wurde vermutet, dass der Effekt von FBS-exo bei den unterschiedlichen AC Isoformen identisch ist. Deshalb

wurde die Wirkung von FBS-exo auf je einen Vertreter der vier Untergruppen A-D untersucht. Die G_{sa} aktivierten Isoformen wurden einheitlich konzentrationsabhängig durch FBS-exo gehemmt (Abb. 5-2). Dies bestätigt eine uniforme Wirkung der Seren auf die hAC-Aktivität. Im Vergleich zu den hAC Isoformen 2, 3 und 5 wurde Isoform 9 deutlich schwächer gehemmt. Dieser Unterschied wurde auch schon mit HS beobachtet. Die Ursache dieses Effekts ist unbekannt. Die uniforme Wirkung von FBS-exo auf alle vier Untergruppen der hAC ist ein Hinweis auf das Vorhandensein mehrerer isoformspezifischer Liganden im Serum.

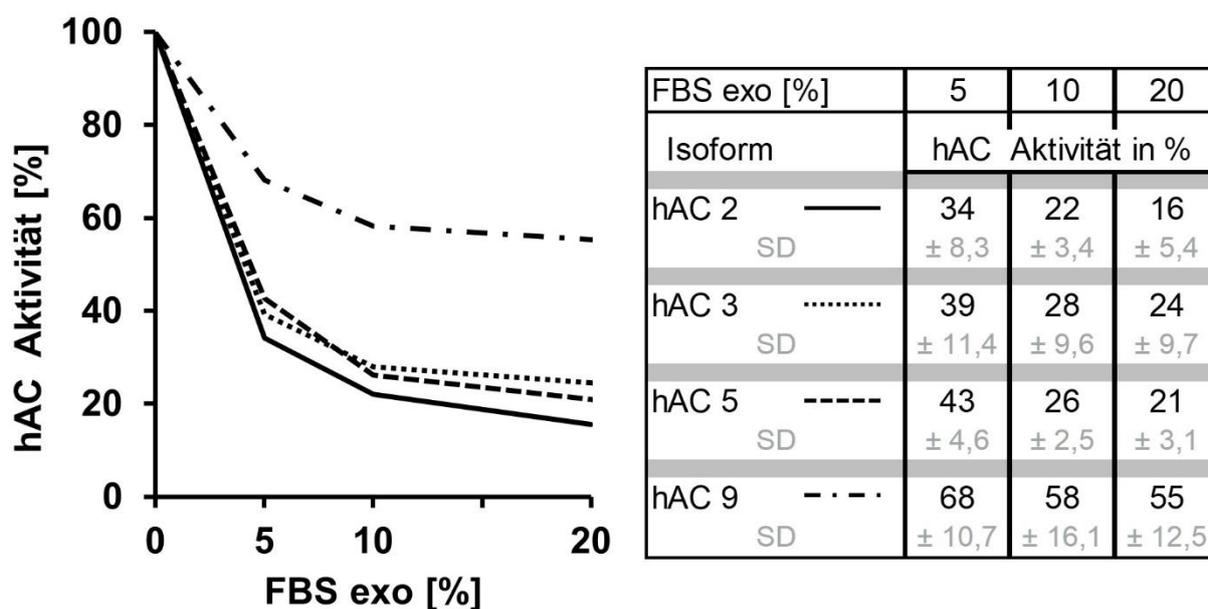


Abb. 5-2 Effekt von FBS-exo auf je einen Vertreter der vier verschiedenen hACn Untergruppen. 100% entspricht Stimulation der AC durch 300 nM G_{sa} . Mittelwerte und SD wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens Doppelbestimmung berechnet.

5.2. Anionenaustausch

Das Prinzip, ein Molekülgemisch anhand unterschiedlicher Interaktionen der Einzelbestandteile mit einem Trennmedium chromatographisch aufzutrennen, wurde von M. S. Tswett 1903 beschrieben. Mit der Entwicklung moderner Techniken wurde ein breites Repertoire an chromatographischen Methoden entwickelt [46]. Um den ACn

regulierenden Faktor charakterisieren zu können, wurde FBS-exo chromatographisch aufgearbeitet. Zunächst wurde ein Anionenaustausch über eine MonoQ Säule durchgeführt. Die geringe Proteinmenge in FBS-exo hatte den Vorteil, ein Überladen der Säule mit Proteinen zu vermeiden. Zudem wurde FBS-exo durch einen 0,22 µm Filter passiert, um Schwebstoffe zu entfernen und so das Verstopfen der Aufreinigungssäule zu unterbinden.

Die Bindung von Proteinen an ein Säulenmaterial ist von der Salzkonzentration abhängig. Oft gilt, je geringer die Salzkonzentration, desto mehr Protein kann binden. Für die Reduzierung der Exosomen verwendet Gibco unbehandeltes FBS, das nach Analysedaten eine NaCl Konzentration von ca. 120 mM aufweist [47]. Die Reduktion der Exosomen basiert auf Filtration. Diese Methode soll Exosomen um mehr als 90 % vermindern, ohne die übrige Serumzusammensetzung zu beeinflussen. Daher kann angenommen werden, dass FBS-exo die übliche NaCl Konzentration besitzt.

Für eine bessere Bindung an den Anionenaustauscher wurde FBS-exo im Verhältnis 5:1 mit Wasser verdünnt, um die NaCl Konzentration auf etwa 100 mM einzustellen. Das verdünnte FBS-exo hatte eine Leitfähigkeit von 9 mS/cm (Abb. 5-3).

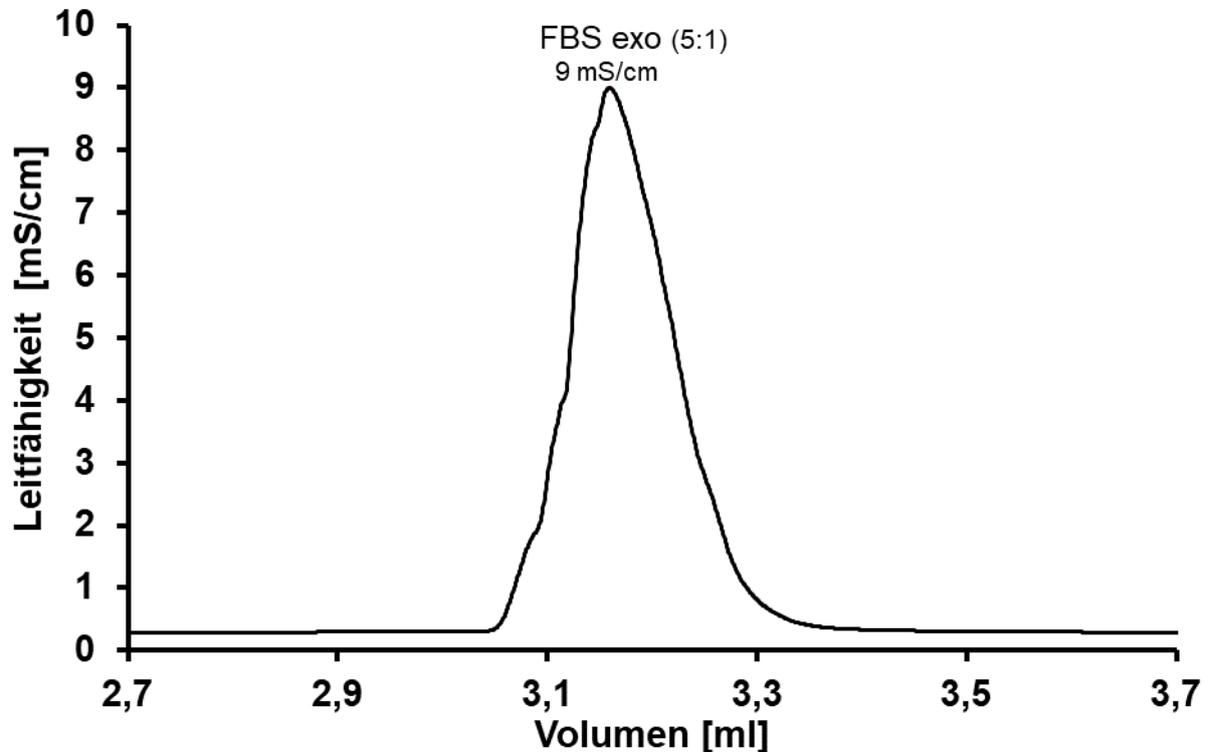


Abb. 5-3 Leitfähigkeit von verdünntem FBS-exo gemessen in der ÄKTAgO.

Anhand eines Standards von 10-1000 mM NaCl wurde die Konzentration in GraphPad Prism8 extrapoliert und ergab 93 mM NaCl, unverdünnt 111,5 mM in FBS-exo. Dies bestätigt die getroffene Annahme der NaCl Konzentration.

Der Anionenaustausch erfolgte über eine MonoQ (1 ml) Säule mit 100 mM NaCl Laufmittel (pH 7). Das Aufreinigungsprofil (Abb. 5-4; Absorption bei 280 nm) hatte im Durchlauf (Fraktionen 10 – 35), während die Probe aufgetragen und die Säule gespült wurde, deutlich Absorption. Der Durchlauf wurden in zwei Bereiche unterteilt, Fraktionen 10 – 19 (DL1) und Fraktionen 21 – 35 (DL2). Die Elution gebundener Serumbestandteile erfolgte mit einer 1 M NaCl Stufe und erzeugte einen schmalen Peak. DL1, DL2 und das Eluat (Fraktionen 47 + 48) wurden auf ihren Gesamtproteingehalt untersucht. DL1 hatte mit 0,22 mg/ml die dreifache Konzentration an Proteinen im Vergleich zu DL2 mit 0,07mg/ml. Das Eluat lag mit einer Proteinkonzentration von 17,3 mg/ml deutlich über den Durchlauf fraktionen.

DL1 und DL2 wurden auf die mit 300 nM $G_{s\alpha}$ stimulierte hAC 5 untersucht. Anteile von 5, 10 bzw. 20 Vol.% DL1 hemmten die hAC 5 entsprechend um 39, 65 bzw. 83 %. Unter Berücksichtigung der Volumenverkleinerung von 2,5 ml Startvolumen auf 1,9 ml DL1-Volumen, ergab sich entsprechend Hemmung von 30, 49 und 63 %. DL2 hemmte bei 5, 10 und 20 Vol.% um 19, 1 und 35 %. Unter Berücksichtigung der Volumenvergrößerung durch die Chromatographie von 2,5 auf 3 ml ergab sich entsprechend 23, 1 und 42 % Hemmung der hAC 5.

Ein Teil des Eluats (17,3 mg/ml) einer 4 ml MonoQ Chromatographie wurde auf die Ausgangskonzentration (4,8 mg/ml) an Protein verdünnt. Ein weiterer Teil dieser Elution (1 M NaCl; 400 μ l) wurde auf die ursprüngliche Salzkonzentration von 100 mM NaCl verdünnt. Diese Verdünnung entsprach auch der Verdünnung auf das Ausgangsvolumen (4 ml). Beide Verdünnungen wurden auf die mit 300 nM $G_{s\alpha}$ stimulierte hAC 5 untersucht. Die Rückverdünnung der Proteinkonzentration hemmte die AC-Aktivität bei 10 und 20 Vol.% entsprechend um 40 und 50 %. Die Verdünnung auf 100 mM NaCl hemmte bei 10 und 20 Vol.% entsprechend um 28 und 23 %. Die stärkere Hemmung nach Rückverdünnung der Proteinkonzentration hat wahrscheinlich die erhöhte NaCl Konzentration als Ursache, eine genauere Analyse wurde nicht durchgeführt.

Es wurde daraus geschlossen, dass der Hauptbestandteil der hemmenden Komponenten in DL1 enthalten war. Im Folgenden wurde nur die DL1 Fraktion weiterverwendet.

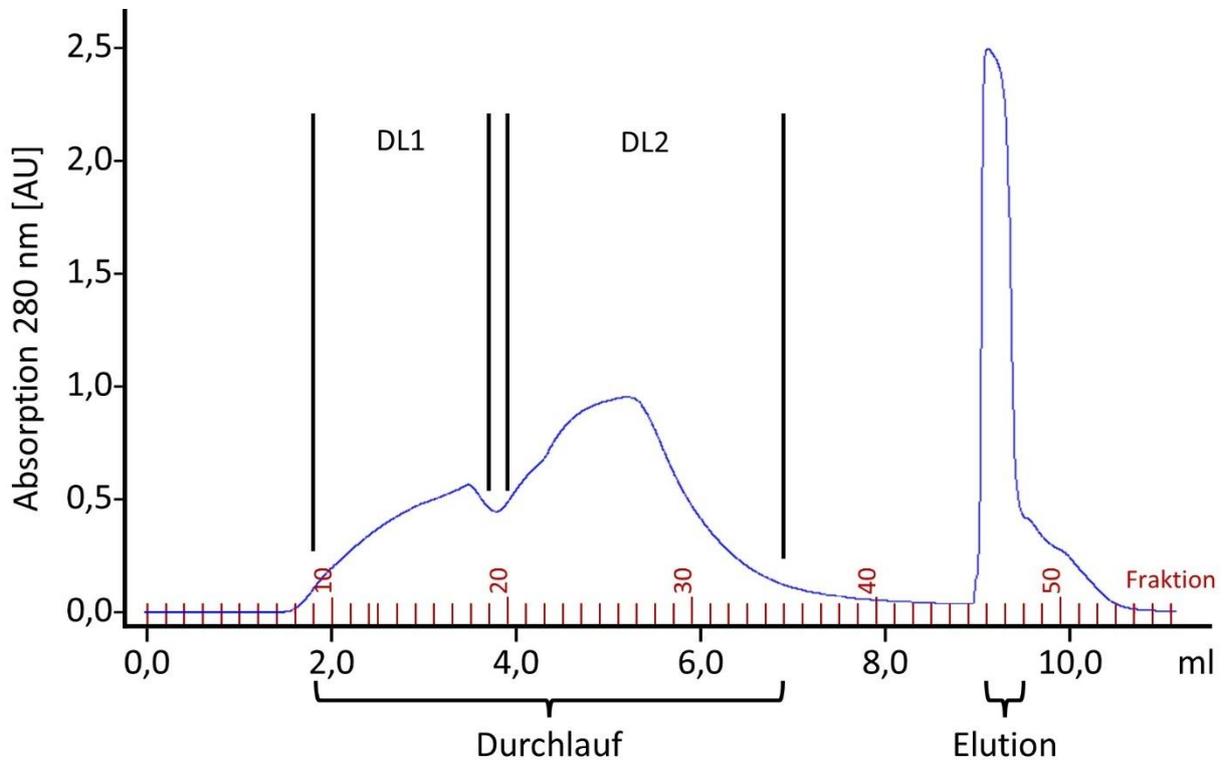


Abb. 5-4 280 nm Profil der 1 ml MonoQ Säule. Auftrag 2,5 ml FBS-exo. Laufmittel 100 mM NaCl, pH 7. Fraktionsgröße: 1 – 12 und 14 – 56: 200 µl; 13: 100 µl. Durchlauf im Bereich von etwa 1,8 – 6,5 ml (Fraktionen 10 – 35). Bereich 1, Fraktion 10 – 19 (entspricht 1,9 ml); Bereich 2, Fraktion 21 – 35 (entspricht 3 ml). Elution mit 1 M NaCl im Bereich von 9,1 – 9,5 ml (Fraktionen 47 + 48; 400 µl). AU, absorbance unit.

FBS-exo, dialysiertes FBS-exo sowie die Durchlauf- und Elutionsfraktion der MonoQ wurden mit SDS-PAGE analysiert (Abb. 5-5). Ein Vergleich der Probenspuren zeigte, dass bei der Durchlauf- und Elutionsfraktion (3) eine prominente Bande bei 66 kDa deutlich geringer ausfiel. Aufgrund der Proteingröße handelt es sich höchstwahrscheinlich um Bovines Serumalbumin (BSA).

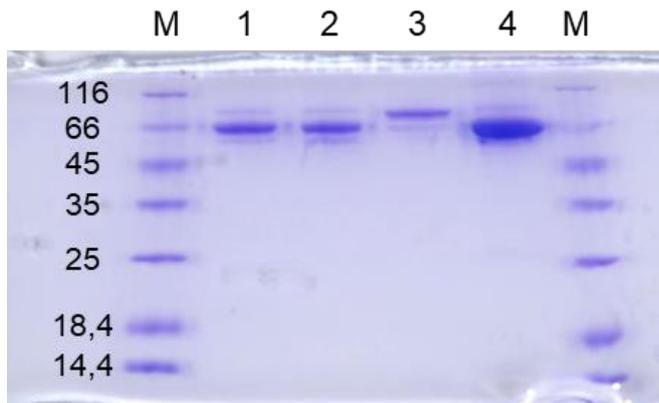


Abb. 5-5 Coomassiegefärbtes SDS-PAGE Gel (15%) Auftrag: 1, FBS-exo (1,8 µg); 2, FBS-exo dial. (1,8 µg); 3, MonoQ Durchlauf (0,7 µg); 4, MonoQ Eluat (6,2 µg). M, Interner Größenstandard 5 µl Proteinmarker I

Aus jeweils bis zu zehn MonoQ Säulenläufen wurde ein Pool der DL1 Bereiche gebildet (im Folgenden als MQ-1x bezeichnet). Um die Chromatographie zu optimieren, wurde dieser Pool nochmals auf die regenerierte MonoQ Säule aufgeladen. Das Profil (Abb. 5-6; Absorption 280 nm) aus einem Pool von sieben MonoQ Läufen hatte im Durchlauf (MQ-2x) ein einheitliches Plateau, die Elution einen scharfen Peak gleicher Amplitude. Dies zeigt eine weitere chromatographische Trennung der Probenbestandteile im zweiten Säulendurchlauf. Das Volumen der MQ-2x Fraktion wurde für die weitere Analyse der hemmenden Faktoren verwendet. Proteingehalt von MQ-2x war 0,12 mg/ml und zeigte im Vergleich zu FBS-exo (6,9 mg/ml) eine 58-fache Reduktion an Protein. Das Volumen vergrößerte sich im zweiten MonoQ Schritt von 13 auf 14,4 ml. Unter Berücksichtigung der Verdünnung 5:1 (83 %), der Aufkonzentrierung im ersten MonoQ Durchlauf (132 %) und der Volumenvergrößerung im zweiten MonoQ Schritt (90 %), entspricht MQ-2x zu 99 % dem ursprünglich eingesetzten Volumen an FBS-exo. Die Ergebnisse wurden ohne Korrekturfaktor direkt mit FBS-exo verglichen.

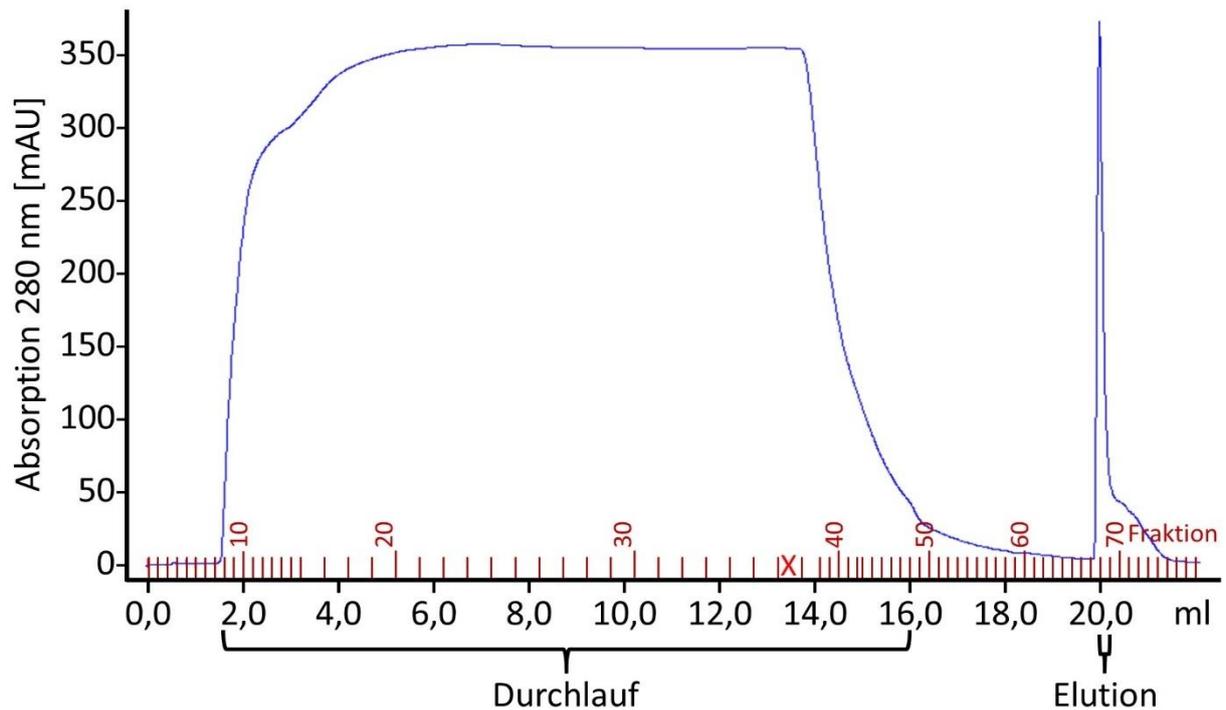


Abb. 5-6 280 nm Profil der 1 ml MonoQ Säule. Auftrag 13 ml MQ-1x. Laufmittel 100 mM NaCl, pH 5,21. Fraktionsgröße: 1 – 16, 39 – 42 und 44 – 47: 200 µl; 17 – 37: 500 µl; 38: 400 µl; 43: 100 µl. Das rote X markiert Fraktion 37, die verloren ging. Durchlauf im Bereich von etwa 1,6 – 16 ml (Fraktionen 9 – 48). Elution mit 1 M NaCl, Peak im Bereich von 20 – 20,2 ml (Fraktionen 69). mAU, milli absorbance unit.

Um den Effekt der Hemmung über den Verlauf der Aufreinigung zu erfassen, wurde von jedem Zwischenschritt eine Probe analysiert (Abb. 5-7). Die Filtration von FBS-exo durch einen Sterilfilter (0,22 µm) sowie eine 5:1 (FBS-exo/Wasser) Verdünnung zeigten bei Zugabe von 5, 10 und 20 Vol.% keinen signifikanten Unterschied. Nach Chromatographie über die MonoQ Säule (MQ-2x) war die Hemmung schwächer, bei 10 Vol.% signifikant ($p = 0,016$) und bei 5 und 20 Vol.% nicht signifikant ($p = 0,053$ und $0,212$). Wurde MQ-2x dialysiert, war eine deutliche Reduzierung des Hemmeffekts um etwa 50 % zu sehen. So erzielten 10 bzw. 20 Vol.% des dialysierten MQ-2x eine Hemmung von 53 ± 3 bzw. 67 ± 6 %, was etwa 46 ± 11 bzw. 63 ± 10 % Hemmung durch 5 bzw. 10 Vol.% vor Dialyse entspricht. Bei 5 Vol.% des dialysierten MQ-2x fiel die Hemmung auf 25 ± 11 %.

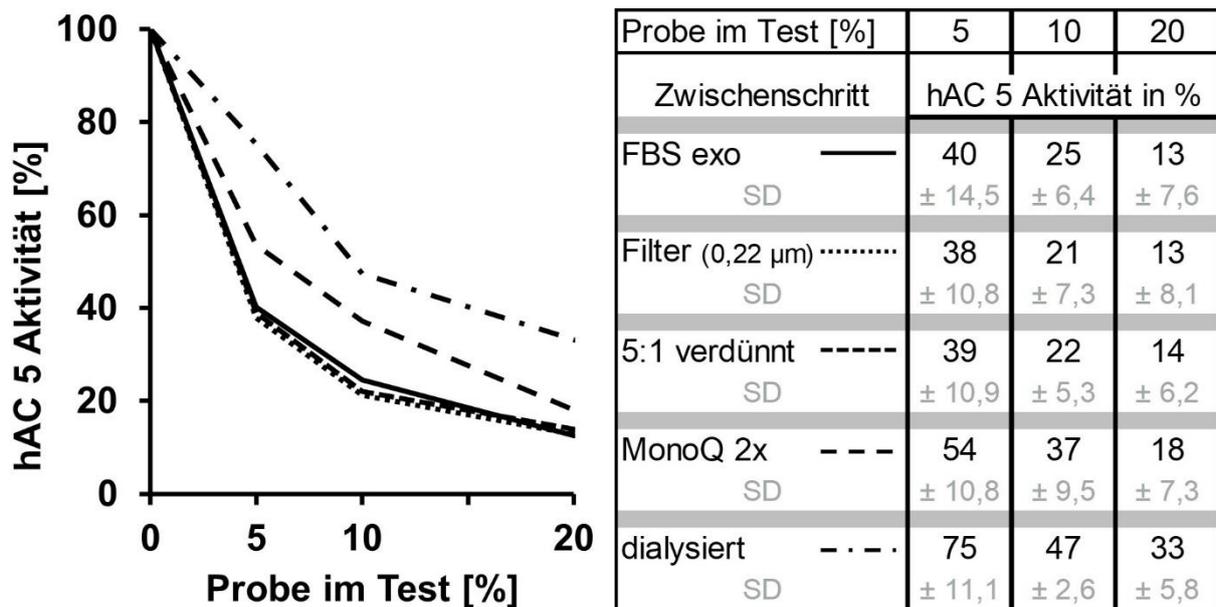


Abb. 5-7 Verlaufserfassung der Hemmwirkung auf die hAC 5 der Zwischenschritte der FBS-exo Chromatographie. 100% Aktivität entspricht der Stimulation mit 300 nM G_{sa} . Mittelwert und SD aus 4 – 9 Experimenten mit jeweils Doppelbestimmung.

Der Erhalt der Hemmung in der MQ-2x Fraktion schließt einen anionischen Charakter des Faktors aus. Die SDS-PAGE Analyse zeigte, dass BSA nicht als Ligand in Frage kommt und bestätigte die Ergebnisse aus [34]. Der Verlust des Hemmeffekts durch Dialyse kann unterschiedliche Ursachen haben, möglicherweise spielt die Reduktion der Salzkonzentration hier eine Rolle, oder die potenziellen Liganden sind kleiner der Ausschlussgrenze der Slide-A-Lyzer. Eine Leitfähigkeitsmessung des MQ-2x ergab 7,4 mS/cm, entsprechend 76 mM NaCl. Nach Dialyse 0,4 mS/cm, entsprechend 4,1 mM NaCl. Auf eine weitere Analyse wurde hier verzichtet.

5.3. Kationenaustausch

Die dialysierte MQ-2x Fraktion wurde auf eine MonoS Säule (Kationenaustauscher) aufgetragen (Abb. 5-8 A). Im Durchlauf war ein Plateau zu sehen. Das Volumen des Plateaus entsprach dem Auftragsvolumen. Nach dem Waschen der Säule mit Laufmittel bis zum Erreichen der Basisabsorption wurde mit 250 mM NaCl eluiert. Die

Vergrößerung des Profils im Elutionsbereich (Abb. 5-8 B) zeigte eine Überlagerung von zwei Peaks. Für den Test wurde das Eluat entsprechend der zwei Peaks in die Fraktionen 26 + 27 (Peak I) und Fraktionen 28 – 31 (Peak II) unterteilt.

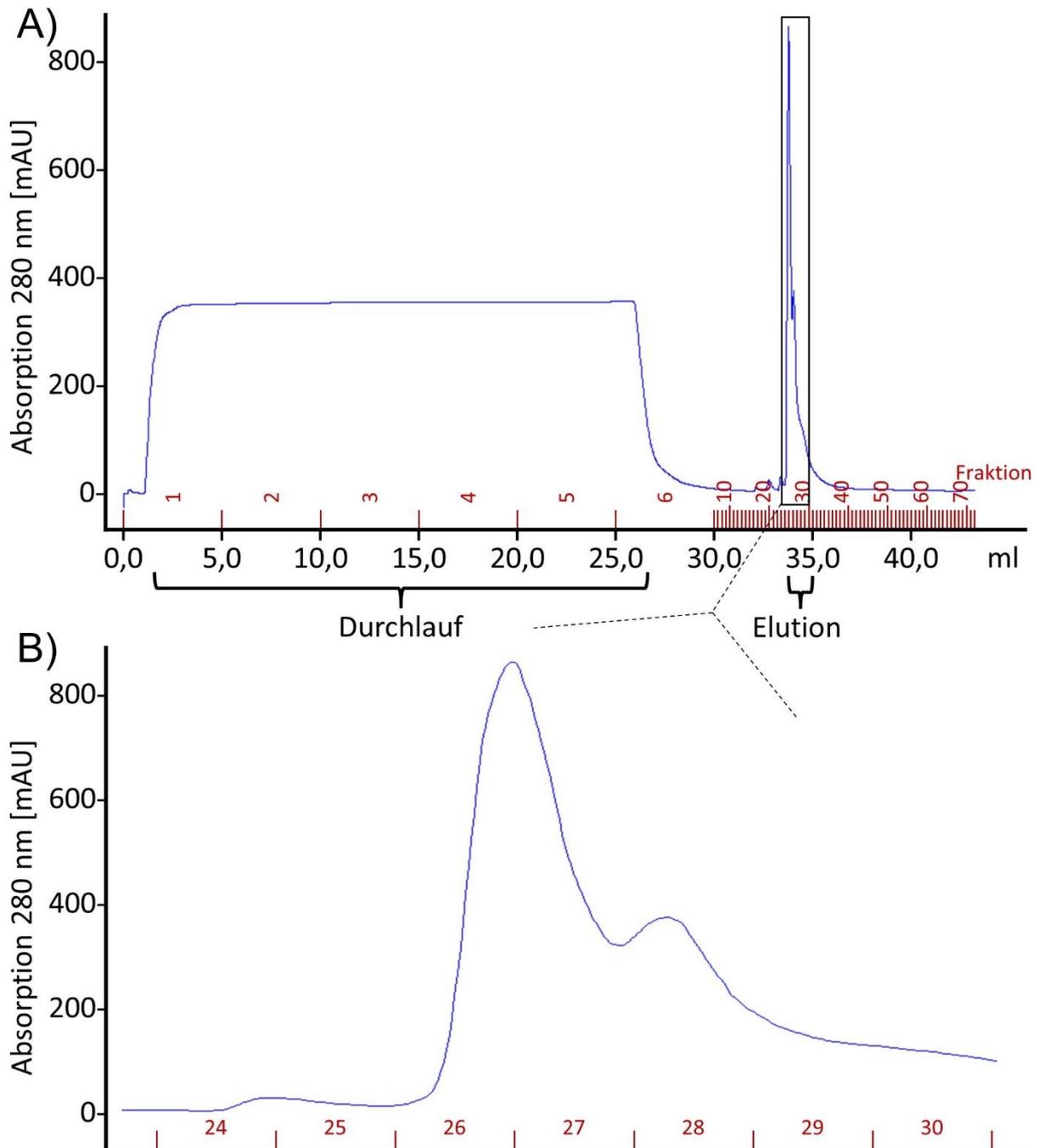


Abb. 5-8 280 nm Profil der 1 ml MonoS Säule. Auftrag 25 ml MQ-2x dialysiert. Laufpuffer 10 mM MOPS, pH 8. Fraktionsgröße: 1 – 6, 5 ml; 7 – 73: 200 µl. A) Durchlauf 0 bis 25 ml (Fraktionen 1 – 5). Elution mit 250 mM NaCl im Bereich von 33,8 – 35 ml (Fraktionen 26 – 31). B) Vergrößerung des Elutionsbereichs. mAU, milli absorbance unit.

Der Durchlauf der MonoS (MS-DL) und die beiden Elutionspeaks der MonoS wurden auf die mit 300 nM $G_{s\alpha}$ stimulierten hAC 5 Aktivität getestet. 5, 10 bzw. 20 Vol.% Durchlauf hemmten nicht (109, 101 bzw. 124 % hAC 5 Aktivität). Mit 107, 131 bzw. 106 % hAC 5 Aktivität hemmten 5, 10 bzw. 20 Vol.% des ersten Elutionspeaks (MS-E₁) ebenfalls nicht. Der zweite Peak der Elution (MS-E₂) hemmte die hAC 5 stark. 61, 76 bzw. 85 % Hemmung mit 5, 10 bzw. 20 Vol.% im Test. Dies deutet auf eine Bindung der gesuchten Komponenten an den Kationentauscher.

5.4. Proteomanalyse

Die Proteinmenge von MS-DL, MS-E₁ und MS-E₂ wurden bestimmt (Tabelle 5-2). MS-E₁ hatte entsprechend des Absorptionsprofil der Chromatographie eine etwas mehr als doppelt so hohe Proteinkonzentration wie die beiden anderen Fraktionen.

FBS-exo, MQ-1x, MQ-2x dial., MS-DL, MS-E₁ und MS-E₂ wurden mit SDS-PAGE analysiert. Auf dem Coomassie-gefärbten Gel (Abb. 5-9) war bei MS-E₂ eine schwache Bande zwischen 45 und 66 kDa deutlich sichtbar (Markierung durch Pfeil), die in allen anderen Fraktionen abwesend war. Daraufhin wurde MS-E₁ und MS-E₂ im direkten Vergleich auf ein Gel geladen und mit Silber gefärbt (Abb. 5-10). Vielleicht könnte diese Bande eine der gesuchten hemmenden Komponente enthalten.

Tabelle 5-2: Proteinbestimmung der MonoS Fraktionen

Fraktion	Proteinmenge
MS-DL	0,3 µg/µl
MS-E ₁	0,7 µg/µl
MS-E ₂	0,3 µg/µl

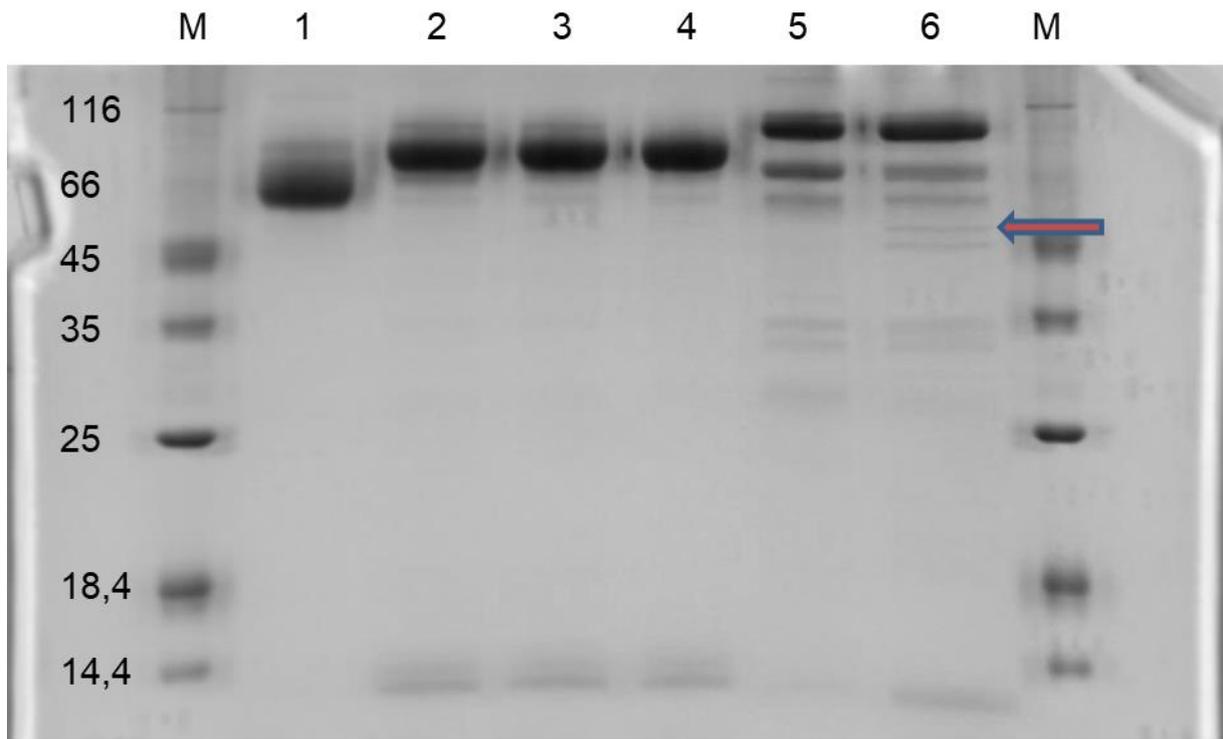


Abb. 5-9 Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel (15%), Auftrag (jeweils 3 µg): 1, FBS-exo; 2, MQ-1x; 3, MQ-2x dialysiert; 4, MS-DL; 5, MS-E₁; 6, MS-E₂. Pfeil markiert die in MS-E₂ sichtbare Bande. M, Interner Größenstandard 5 µl Proteinmarker I.

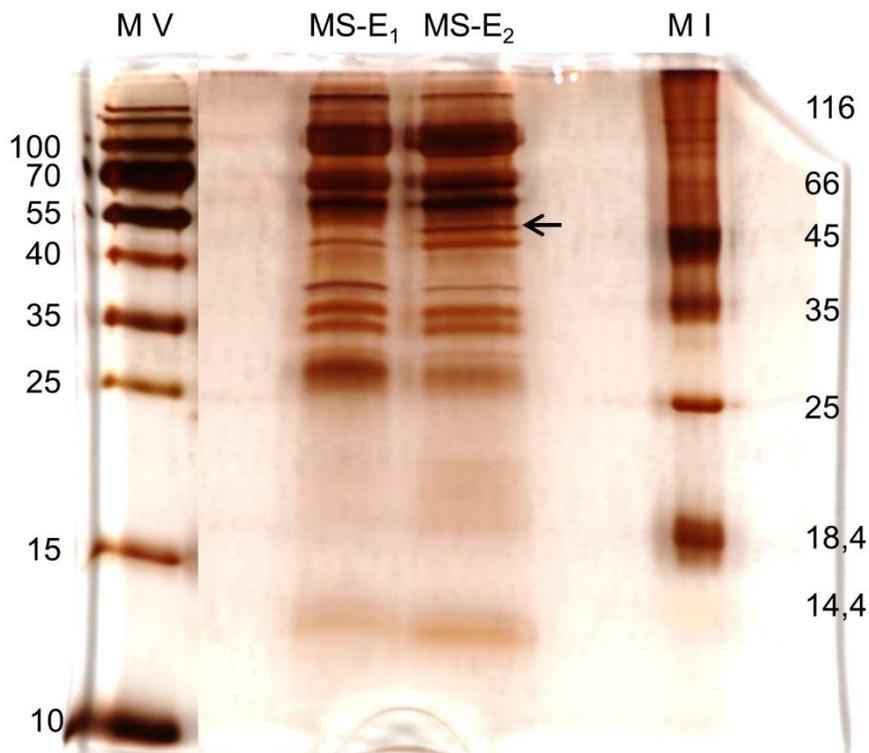


Abb. 5-10 Silber-gefärbtes SDS-PAGE Gel (15%), Auftrag jeweils 6 µg. Pfeil markiert die nur in MS-E₂ sichtbare Bande. M V, Interner Größenstandard 3 µl Proteinmarker V; M I, Interner Größenstandard 5 µl Proteinmarker I.

Eine Proteomanalyse der SDS-PAGE Spuren des MonoS Eluats (MS-E₁ und MS-E₂) wurde im Proteom Zentrum der Universität Tübingen (Prof. Dr. Boris Macek) durchgeführt. Die Analyse lieferte Hinweise auf 460 Proteine. Nach Auswahl aller Proteine, die nur im MS-E₂ nachgewiesen wurden, blieben 42 Proteine als potenzielle Liganden übrig. Darunter einige hochkonservierte Serpine.

Serpin A7, A8, A12, F1 und Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG) wurden von Frau A. Schultz mit den hACn 3, 6 und 9 getestet. Es wurde weder Hemmung noch Stimulierung der AC-Aktivitäten gefunden. Somit sind Serpine nicht die gesuchten Liganden.

Die geringe Proteinkonzentration der MQ-2x und der MS-E_{1/2} lässt vermuten, dass mit den verfügbaren Techniken eine präzisere chromatographische Auftrennung nicht realisierbar ist. Aus der Proteomanalyse vermutete Serpine als Liganden bestätigt sich nicht und deuten vielleicht darauf hin, dass die gesuchten Komponenten in einer

anderen Stoffklasse zu suchen sind. Ein Anhaltspunkt dafür sind die Liganden der QS Rezeptoren von *Vibrio* und *Legionella* [48]. Sie gehören zu den Acyloinen mit lipophilem Charakter. Daher wurden Lipide als Liganden der hACn in Betracht gezogen und die MQ-2x Probe untersucht.

5.5. Lipidextraktion

Ein wesentlicher Bestandteil von Serum sind Lipide. Es wurde gezeigt, dass ungefähr 300 Lipide aus neun Klassen etwa 98,7 % der Lipide in HS abdecken [49]. Eine Veränderung des Lipidprofils im Blut steht vermutlich mit entscheidenden Krankheiten, wie z.B. Diabetes, Alzheimer und Krebs im Zusammenhang. Daher werden Lipide heute als diagnostische Biomarker untersucht [49]. Im Gegensatz zu Proteinen sind Lipide in organischen Flüssigkeiten löslich. Erste Lipidextraktionsversuche aus FBS bei neutralem pH wurden von Dr. J. Grischin nach Hosios et al. [40] durchgeführt. Die stimulierte hAC 3 (600 nM G_{sa}) wurde bei 5 und 10 Vol.% des lipidfreien FBS um 47 und 66 % gehemmt. Durch 5 bzw. 10 Vol.% dialysiertes FBS wurde die hAC 3 um 42 bzw. 59 % gehemmt. Im Vergleich hemmen 5 und 10 Vol.% FBS um 84 bzw. 96 % (Einzelexperimente). Die Hemmung durch dialysiertes FBS lässt vermuten, dass die Ursache der geringeren Hemmung des lipidfreien FBS auf einem Dialyseeffekt beruht. Dies deutete darauf hin, dass neutrale Lipide keinen Einfluss auf die AC haben.

Eine Recherche zu verschiedenen Methoden der Lipidextraktion zeigte, dass die Extraktion unter Bedingungen von Hosios et al. [40], erst bei dreistündiger Extraktion quantitativ ist [39]. Die kurze Extraktionszeit (30 min) [40] lässt darauf schließen, dass wahrscheinlich ein Großteil der Lipide nicht aus FBS extrahiert wurde.

Weitere Lipidextraktionen aus MQ-2x dial. wurden mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen, unter anderem nach Cham und Knowles [39] und Matyash et al. [41], durchgeführt. Cham und Knowles verwendet n-Butanol und Diisopropylether im Verhältnis 3:2, Matyash et al. extrahieren mit Methyl-*tert*-butylether und Methanol im Verhältnis 10:3.

Bei der Lipidextraktion nach Cham und Knowles [39] konnte nur die wässrige Phase verwendet werden, da zur Entfernung von n-Butanol eine Temperatur von etwa 118°C benötigt wird. Ergebnisse aus Vorversuchen im Labor deuten darauf hin, dass dies die hemmenden Komponenten zerstören könnte. Die Stabilität der Hemmung durch FBS-

exo wurde durch Inkubation bei 95°C über einen Zeitraum von 15 min bei offenem Probengefäß untersucht. Ein vollständiger Verlust der Hemmwirkung war die Folge. Eine Inkubation bei geschlossenem Gefäß über eine Stunde beeinträchtigte die Hemmung von FBS-exo nicht. Dies lässt vermuten, dass die Liganden durch Oxidation inaktiviert werden könnten.

Um einen unspezifischen Effekt der Lipidextraktionsmethode nach Cham und Knowles gegebenenfalls erkennen und ausschalten zu können, wurde Wasser extrahiert und entsprechend aufgearbeitet. 10 und 20 Vol.% hemmten die mit 300 nM $G_{s\alpha}$ stimulierte hAC 5 entsprechend um 16 und 13 %. Da diese Werte etwa identisch sind, wurde der Mittelwert (15 % Hemmung) zur Korrektur herangezogen.

Die wässrigen Phasen von dialysiertem MQ-2x (MQ-2x dial.), delipidiertem MQ-2x (MQ-2x delip.) und dialysiertem delipidiertem MQ-2x (MQ-2x dial. delip.) wurden auf die mit 300 nM $G_{s\alpha}$ stimulierte hAC 5 getestet (Abb. 5-11). Ergänzend wurde eine Korrektur durch den unspezifische Extraktionseffekt hinzugefügt. Ein Vergleich der Hemmung von MQ-2x dial. zu MQ-2x dial. delip. liefert bei 10 und 20 Vol.% einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0011$ und $0,0012$), der nach Korrektur des unspezifischen Effekts stark abnahm ($p = 0,115$ bzw. $0,287$). Eine Abschwächung des Hemmeffekts durch Dialyse ist im Vergleich zwischen MQ-2x delip. und MQ-2x dial. delip. deutlich zu erkennen.

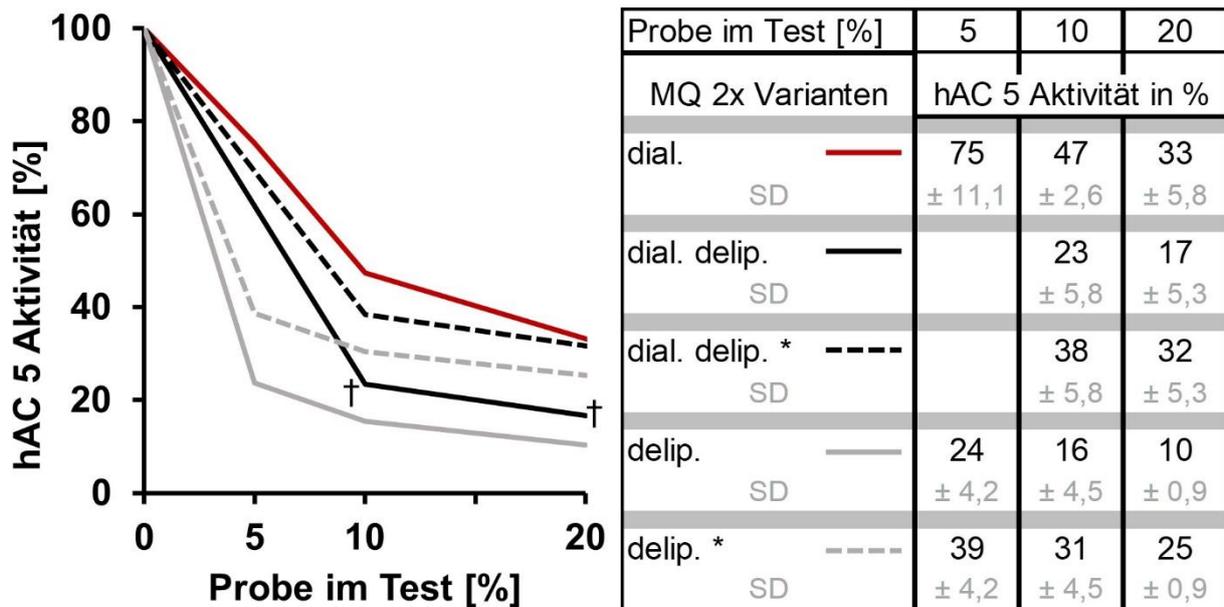


Abb. 5-11 Effekt der wässrigen Phasen nach Lipidextraktion entsprechend [39] auf die mit 300 nM G_{sa} stimulierte hAC 5. G_{sa} Stimulation der AC entspricht 100 % Aktivität. MQ-2x dial. als Referenz für die daraus erstellte lipidfreie Variante (MQ-2x dial. delip.). MQ-2x delip. als Referenz für den Verlust der Hemmung durch Dialyse. * markiert die durch den Lösungsmittelleffekt korrigierten Daten. $n = 4 - 9$; Signifikanz †: $p < 0,01$ im Vergleich zu MQ-2x dial..

Mit dieser Lipidextraktionsmethode verblieb die hemmende Komponente überwiegend in der wässrigen Phase. Die organische Phase konnte nicht untersucht werden. Es ist fraglich, ob diese Extraktion für die Analyse der hemmenden Komponente in FBS-exo optimal ist.

Als nächstes wurde in einem weiteren Vorversuch von Frau A. Schultz eine Extraktion mit Dichlormethan:Methanol (2:1) bei pH 1, 7,4 und 11 durchgeführt. FBS zu Lösungsmittel wurde im Verhältnis 5:7 eingesetzt. Nach Abzug des Lösungsmittels wurden die Rückstände der organischen Phasen in Dimethylsulfoxid (DMSO, 150 μ l) gelöst. Die organische Phase nach Extraktion bei pH 11 hatte bei 5 bzw. 10 Vol.% keine Hemmung auf die mit 600 nM G_{sa} stimulierte hAC 5 (113 bzw. 94 % Aktivität). Die organische Phase nach pH 7,4 Extraktion hatte bei 5 bzw. 10 Vol.% ähnliche Ergebnisse (97 bzw. 82 % hAC 5 Aktivität). Nach Extraktion bei pH 1 wurde die stimulierte hAC 5 Aktivität deutlich gehemmt. 5 bzw. 10 Vol.% im Test hemmten um 92 bzw. 98 %. Ein unspezifischer Effekt von DMSO auf die hAC 5 sowie die

Aufkonzentrierung (Faktor 67) durch die Lipidextraktion wurde nicht weiter berücksichtigt. Es wurde geschlossen, dass hemmende Komponenten nur bei saurem pH in die organische Phase extrahiert werden.

Um sowohl die wässrige als auch die organische Phase zu untersuchen, habe ich eine weitere Methode zur Reduzierung der Lipide mit Methyl-*tert*-butylether (MTBE) und Methanol als Lösungsmittelsystem nach [41] angewandt. Um den pH Einfluss zu untersuchen, wurde FBS-exo bei unverändertem pH (etwa pH 6, universal pH-Papier) und nach Ansäuerung mit Schwefelsäure (H₂SO₄) auf pH 1 (universal pH-Papier) eingesetzt. Nach Extraktion, Phasentrennung, Neutralisation (nur bei pH 1) und Trocknung wurden die Rückstände jeweils im eingesetzten Volumen MilliQ Wasser gelöst. Dies ermöglichte den direkten quantitativen Vergleich ohne Korrekturfaktor.

Die wässrige Phase der Extraktion bei pH 6 hatte im Test bei 5, 10 bzw. 20 Vol.% eine Hemmung der stimulierten hAC 5 Aktivität um etwa 26, 45 und 62 % (Abb. 5-12). Die Hemmung war im Vergleich zum Ausgangsmaterial MQ-2x dial. (etwa 25, 53 bzw. 67 % entsprechend für 5, 10 und 20 Vol.%) nahezu identisch. Die wässrige Phase der Extraktion bei pH 1 hemmte bei 5 % nicht (94 % der hAC 5 Aktivität). Allerdings hemmten 10 bzw. 20 Vol.% der wässrigen Phase nach pH 1 Extraktion die AC deutlich (etwa 32 bzw. 97 % Hemmung). Damit hemmt die wässrige Phase der sauren Extraktion bei 20 Vol.% deutlich stärker als 20 Vol.% des eingesetzten MQ-2x dial..

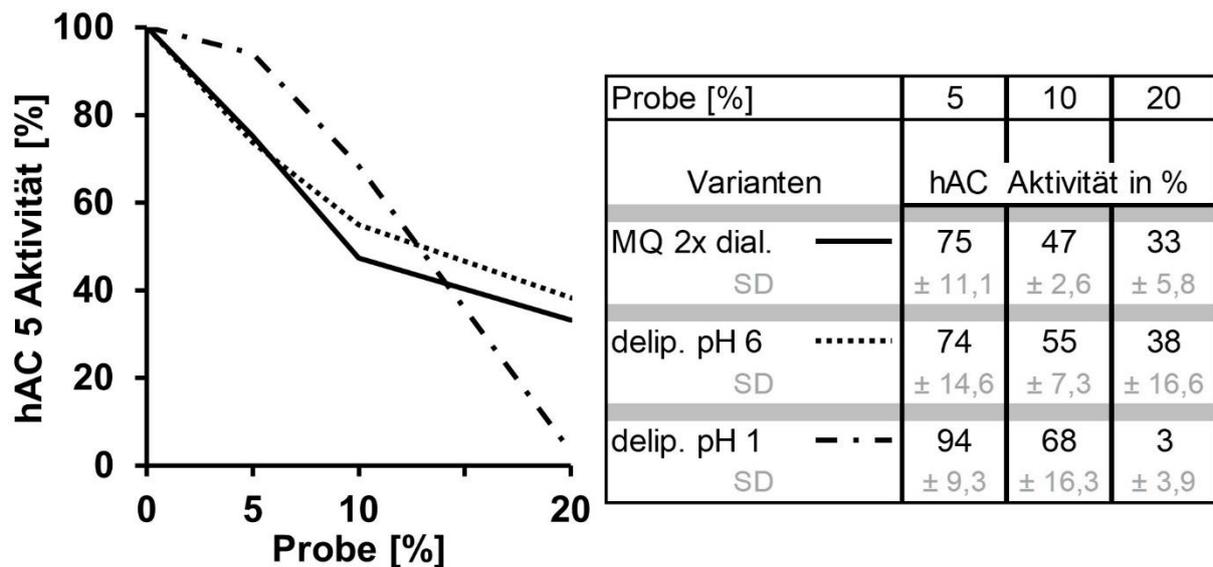


Abb. 5-12 Vergleich der wässrigen Phasen nach Extraktion mit MTBE [41] bei pH 6 und pH 1. Stimulation der hAC 5 mit 300 nM G_{sa} entspricht 100% Aktivität. Ausgangsmaterial MQ-2x dial.; $n = 2 - 9$.

Der starke Hemmeffekt der wässrigen Phase nach pH 1 Extraktion könnte durch Salze, die im Rahmen der Ansäuerung und Neutralisation entstanden sind, hervorgerufen worden sein. Die wässrige Phase wurde auf Leitfähigkeit analysiert und ein NaCl Äquivalent von 0,128 M errechnet. Als Kontrolle wurde der Effekt von 100 mM NaCl auf die stimulierte AC 5 getestet, wodurch die G_{sa} Stimulation nur um $20 \pm 10 \%$ gehemmt wurde. Bei 5, 10 bzw. 20 Vol.% wässriger pH 1 Extraktionsphase ergaben sich Äquivalentkonzentrationen von etwa 6; 13 bzw. 26 mM NaCl. Die veränderte Leitfähigkeit selbst ist daher nicht Ursache des starken Hemmeffekts.

Um den Einfluss verbleibender Lösungsmittelreste und der entstandenen Sulfate zu untersuchen, wurde MilliQ Wasser mit pH 5 und 1 mit MTBE/Methanol extrahiert und entsprechend aufgearbeitet. Mit H_2SO_4 wurde auf pH 1 angesäuert und später mit NaOH neutralisiert. Die wässrige Phase nach Extraktion bei pH 5 hatte bei 5, 10 bzw. 20 Vol.% eine Hemmung der G_{sa} stimulierten hAC 5 um etwa 17, 19 bzw. 47 % (Abb. 5-13). Dies deutet auf einen konzentrationsabhängigen Effekt von Lösungsmittelresten hin. Die wässrige Phase nach Extraktion bei pH 1 hatte bei 5, 10 bzw. 20 Vol.% eine Hemmung der hAC 5 um etwa 29, 43 bzw. 64 %. Zusätzlich zum Effekt der Lösungsmittelreste hemmten wahrscheinlich die entstandenen Sulfate die hAC-

Aktivität, im Schnitt um weitere 18 %. Ob diese Effekte direkte Wirkung auf die AC oder andere Bestandteile des Testsystems hatten, wurde nicht weiter untersucht.

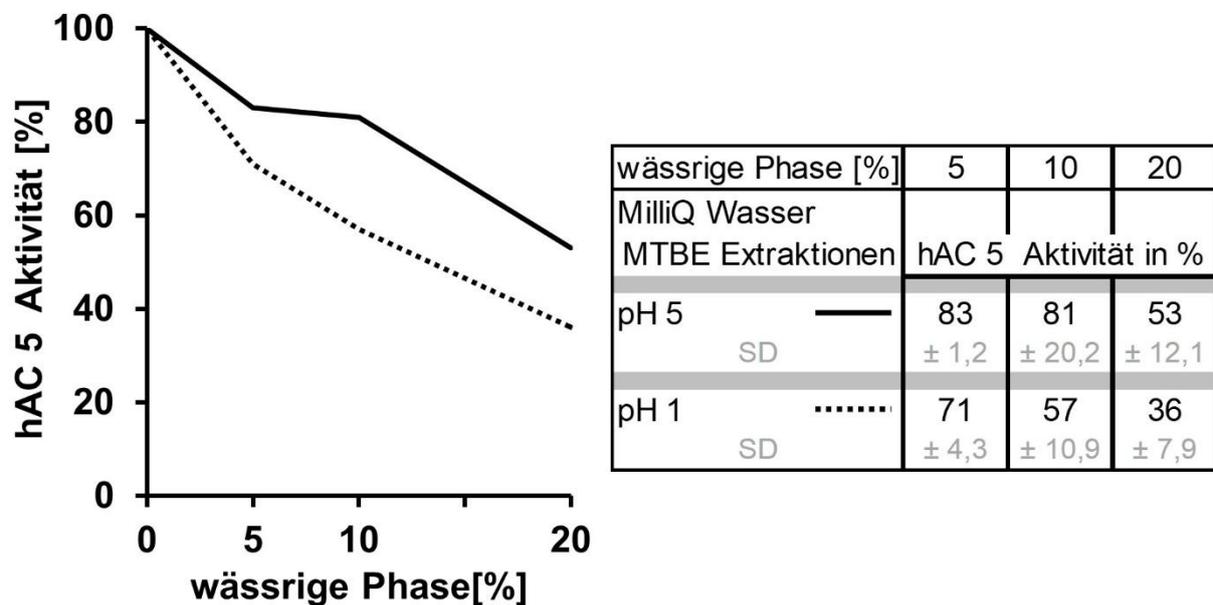


Abb. 5-13 Effekt verbleibender Lösungsmittelreste und entstandener Sulfat in den wässrigen Phasen nach Lipidextraktion aus MilliQ Wasser mit MTBE/Methanol [41] bei pH 5 und pH 1. Stimulation der hAC 5 mit 300 nM G_{sa} entspricht 100% Aktivität. Ausgangsmaterial MilliQ Wasser (pH 5); $n = 3$.

Die organische Phase aus der MQ-2x dial. Extraktion bei pH 6 entsprechend [41] hatte bei 5, 10 bzw. 20 Vol.% keine Hemmung der stimulierten hAC 5 (etwa 96, 104 bzw. 84 % Aktivität). Der „Hemmeffekt“ wurde bei pH 6 nicht in die organische Phase überführt. Dies bestätigt die bisherige Vermutung.

5, 10 und 20 Vol.% der organischen Phase nach Extraktion bei pH 1 hemmten die mit 300 nM G_{sa} stimulierte hAC 5 Aktivität um etwa 35, 44 bzw. 62 % (Abb. 5-14). Diese Unterschiede waren im Vergleich zur MQ-2x dial. vor Lipidextraktion nicht signifikant ($p = 0,13, 0,13$ und $0,18$ bei 5, 10 bzw. 20 Vol.%).

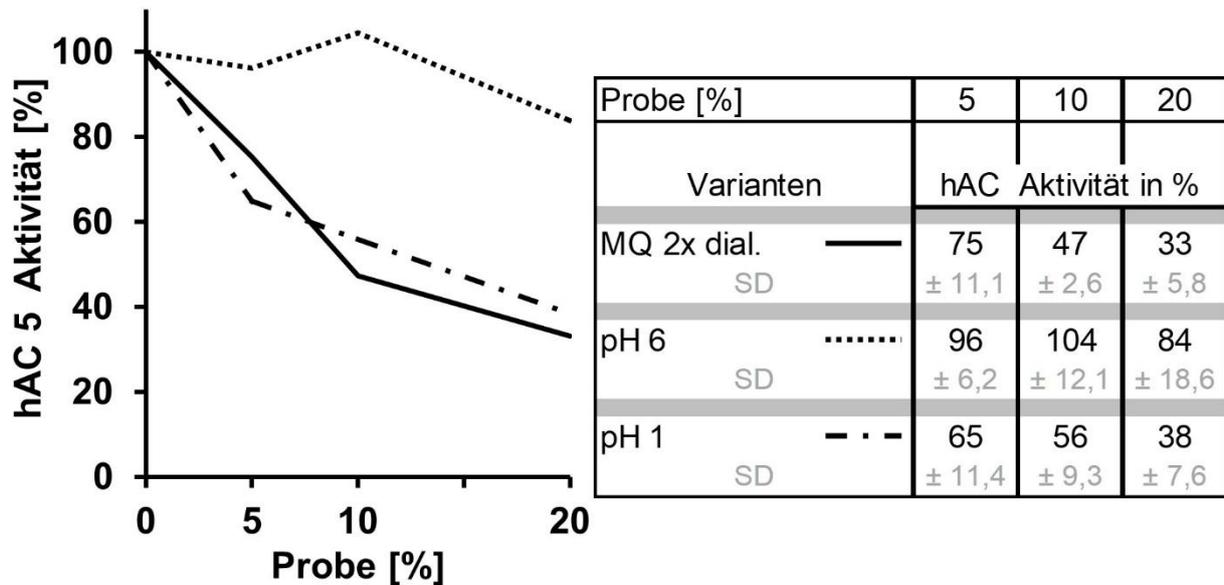


Abb. 5-14 Vergleich der organischen Phasen nach Extraktion bei pH 6 und pH 1 mit MTBE entsprechend [41]. Stimulation der hAC 5 mit 300 nM G_{sa} entspricht 100% Aktivität. Ausgangsmaterial MQ-2x dial.; $n = 3 - 9$.

Die Lipidextraktionen nach [39] und [41] bei pH 6 zeigten den Verbleib der hemmenden Komponenten in der wässrigen Phase. Das Ausbleiben einer Hemmung der organischen Phase nach Extraktion bei pH 6 mit MTBE/Methanol bestätigt, dass die gesuchten Komponenten im neutralen nicht in die organische Phase übertreten. Hemmung der organischen Phase nach pH 1 Extraktion mit MTBE/Methanol hatte einen identischen Verlauf zur Hemmung des eingesetzten MQ-2x dial. und bestätigt eine erfolgreiche Überführung in die organische Phase. Unerwartet starke Hemmung der wässrigen Phase der pH 1 Extraktion konnte überwiegend auf Restlösungsmittel und Sulfate zurückgeführt werden. Dies bestätigt nochmals die Überführung der gesuchten AC hemmenden Komponenten in die organische Phase bei pH 1 und deutet darauf hin, dass es sich bei den Liganden um Lipide handelt.

Es wird vermutet, dass der Faktor sauer ist, d.h. bei pH 1 protoniert ist und erst dann in die organische Phase überführt wird. Daher kommen Glycerophospholipide als mögliche Stoffklasse in Frage. Die einfachsten Vertreter stellen die Phosphatidsäuren dar, die bei neutralem pH eine negative Ladung tragen, welche bei pH 1 protoniert wird. Sie dienen als Vorstufen anderer Phospholipide, besitzen eine Lipid second messenger Funktion und können die Membrangestalt modulieren. Bei dieser

Modulation handelt es sich um eine Krümmung der Membran, die durch niedrige pH-Werte und die Anwesenheit von divalenten Kationen, wie z.B. Magnesium (Mg^{2+}), begünstigt wird [50].

Durch Aufnahme der Phosphatidsäuren in die Membran, könnte mit dem Membrananker der ACn eine Interaktion stattfinden und dieser in Gestalt und Flexibilität verändert werden. Die elektronenmikroskopische Aufklärung der räumlichen Struktur der AC Isoform 9 [51] legt nahe, dass sich solch eine Änderung auf die Flexibilität der katalytischen Domänen auswirkt und damit die Aktivität der AC beeinflussen könnte. Eine Lipidomanalyse der Proben würde das Vorhandensein von Phosphatidsäuren und anderen Glycerophospholipiden aufklären (in Arbeit; Dr. A. Shevchenko, Max-Planck-Institut Dresden).

Eine andere Theorie wäre, dass der Faktor zum Beispiel an ein Apolipoprotein gebunden ist, von welchem er sich bei pH 1 trennt und dann in die organische Phase übergeht. Diese Theorie würde viele Lipide, unter anderem auch Phospholipide, zu welchen auch die Glycerophospholipide gehören, umfassen. Die Ergebnisse der Proteinbestimmung der Proben zeigten jedoch nur minimale Konzentrationen an Protein nach Aufreinigung und Dialyse und stellen diese Theorie in Frage.

5.6. Fazit

Die Ergebnisse zeigen eine hemmende Wirkung von Serum (HS und FBS) auf je einen Vertreter der Gruppen A-D der Mammalia ACn. Die Tendenz der Hemmung ist bei den getesteten AC Isoformen uniform. Dies könnte auf eine systematische Wirkung eines Einzelfaktors hindeuten und eine individuelle Ligandentheorie in Frage stellen. Der Effekt des Serums könnte jedoch auch mit der gleichzeitigen Anwesenheit mehrerer Liganden begründet werden. Das Vorhandensein von über 300 verschiedenen Lipiden im Serum [49] weist auf diese Theorie hin. Die Tatsache, dass diese Lipide neun verschiedenen Klassen angehören und exakt neun membrangebundene hAC Isoformen existieren, ist eher zufällig.

Die Expression der hACn ist gewebeunspezifisch, d.h. manche Isoformen sind nahezu in allen Geweben vorhanden. Dies spricht auch für das zeitgleiche Vorhandensein aller Liganden im Serum.

Der Austausch der Membrananker durch die Rezeptordomäne der QS Enzyme, bei der die Hemmung durch Serum ausblieb, bestätigt die Notwendigkeit des Mammalia Membranankers und bekräftigt die Ligandentheorie. Angesichts der Liganden der QS Rezeptoren von *Cholera* und *Legionella*, die zu den Lipiden zählen und sich lediglich durch einen um eine Ethylengruppe verlängerten hydrophoben Teil unterscheiden, besteht auch für die Mammalia ACn die Möglichkeit, Liganden mit minimalen Unterschieden zu finden, die den Lipiden angehören. Diese Schlussfolgerung steht auch im Einklang mit der identischen Organisation der Membrandomänen der QS Rezeptoren und den ACn.

Ausschluss der Komponenten des Immunsystems und die Abtrennung des größten Teils der Serumproteine ohne Verlust des hemmenden Effekts deuten zudem darauf hin, dass es sich nicht um ein Protein handelt. Dies ist auch ein Hinweis, dass der Faktor ein Lipid sein kann. Die erfolgreiche Überführung in die organische Phase bei der Extraktion bei pH1 mit polaren Lösungsmitteln bekräftigt die Wahrscheinlichkeit den Faktor unter den Lipiden zu finden.

Bisher konnte kein Ligand für die Mammalia Membrananker identifiziert werden, jedoch wird die Ligandentheorie weiter bekräftigt und eine Basis für weitere Forschung zur Aufdeckung einer Rezeptorfunktion der Mammalia Membrananker gelegt.

Das Serum konnte durch Chromatographie und Lipidextraktion von vielen, auf die Aktivität der ACn inaktiven Stoffen befreit werden, wobei der hemmende Faktor weitgehend erhalten blieb. Der momentane Forschungsstand deutet stark auf ein oder mehrere Stoffe der Lipidklasse als Faktoren der AC-Hemmung im Serum.

Die Frage einer Rezeptorfunktion der Membrananker der Mammalia ACn konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig aufgeklärt werden. Die Sachlage deutet aber auf eine Beteiligung des Membranankers an der Hemmung durch im Serum enthaltene Faktoren und wartet auf die Identifikation dieser Faktoren und einen eindeutigen Nachweis dieser als Liganden.

Die experimentelle Tätigkeit für diese Arbeit erfolgte im Zeitraum 04/2017-09/2020.

6. Referenzen

- [1] M. Finkbeiner, J. Grischin, A. Seth, J.E. Schultz, In search of a function for the membrane anchors of class IIIa adenylate cyclases, *Int J Med Microbiol.* 309 (2019) 245–251.
- [2] H. Förster, Zyklisches Adenosinmonophosphat, *DMW.* 96 (1971) 251–256.
- [3] S. Dönitz, F. Flake, *Mensch, Körper, Krankheit für den Rettungsdienst*, Elsevier Urban & Fischer, (2015), p. 3+6.
- [4] G.A. Robison, R.W. Butcher, E.W. Sutherland, Cyclic AMP, *Annu Rev Biochem.* 37 (1968) 149–174.
- [5] M.W. Bitensky, R.E. Gorman, Cellular responses to cyclic AMP, *Prog Biophys Mol Biol.* 26 (1973) 409–461.
- [6] J.U. Linder, J.E. Schultz, The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules, *Cell Signal.* 15 (2003) 1081–1089.
- [7] O. Bârzu, A. Danchin, Adenylyl Cyclases: A Heterogeneous Class of ATP-Utilizing Enzymes, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 49 (1994) 241–283.
- [8] J. Bassler, J.E. Schultz, A.N. Lupas, Adenylate cyclases: Receivers, transducers, and generators of signals, *Cell Signal.* 46 (2018) 135–144.
- [9] W.J. Tang, A.G. Gilman, Adenylyl cyclases, *Cell* 70 (1992) 869–872.
- [10] R.E. Whisnant, A.G. Gilman, C.W. Dessauer, Interaction of the two cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase, *PNAS.* 93 (1996) 6621–6625.
- [11] J.J.G. Tesmer, R.K. Sunahara, A.G. Gilman, S.R. Sprang, Crystal structure of the Catalytic Domains of Adenylyl Cyclase in a complex with $G\alpha\bullet GTP\gamma S$, *Science* 278 (1997) 1907–1916.
- [12] G. Zhang, Y. Liu, A.E. Ruoho, J.H. Hurley, Structure of the adenylyl cyclase catalytic core, *Nature* 386 (1997) 247-253.

- [13] S.C. Sinha, M. Wetterer, S.R. Sprang, J.E. Schultz, J.U. Linder, Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c, *EMBO J.* 24 (2005) 663–673.
- [14] C. Steegborn, T.N. Litvin, L.R. Levin, J. Buck, H. Wu, Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment, *Nat Struct Mol Biol.* 12 (2005) 32–37.
- [15] I. Tews, F. Findeisen, I. Sinning, A. Schultz, J.E. Schultz, J.U. Linder, The structure of a pH-sensing *Mycobacterial* Adenylyl Cyclase Holoenzyme, *Science* 308 (2005) 1020–1023.
- [16] R.K. Sunahara, C.W. Dessauer, A.G. Gilman, Complexity and Diversity of Mammalian Adenylyl Cyclases, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36 (1996) 461–480.
- [17] S. Beltz, J. Bassler, J.E. Schultz, Regulation by the quorum sensor from *Vibrio* indicates a receptor function for the membrane anchors of adenylate cyclases, *Elife* 5 (2016) doi:10.7554/eLife.13098.
- [18] J.J.G. Tesmer, R.K. Sunahara, R.A. Johnson, G. Gosselin, A.G. Gilman, S.R. Sprang, Two-Metal-Ion Catalysis in Adenylyl Cyclase, *Science* 285 (1999) 756–760.
- [19] J.J.G. Tesmer, S.R. Sprang, The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase, *Curr Opin Struct Biol.* 8 (1998) 713–719.
- [20] R.K. Sunahara, A. Beuve, J.J.G. Tesmer, S.R. Sprang, D.L. Garbers, A.G. Gilman, Exchange of Substrate and Inhibitor Specificities between Adenylyl and Guanylyl Cyclases, *J Biol Chem.* 273 (1998) 16332–16338.
- [21] S.Z. Yan, Z.H. Huang, R.S. Shaw, W.J. Tang, The Conserved Asparagine and Arginine Are Essential for Catalysis of Mammalian Adenylyl Cyclase, *J Biol Chem.* 272 (1997) 12342–12349.
- [22] C.W. Dessauer, V.J. Watts, R.S. Ostrom, M. Conti, S. Dove, R. Seifert, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Cl. Structures and Small Molecule Modulators of Mammalian Adenylyl Cyclases, *Pharmacol Rev.* 69 (2017) 93–139.

- [23] A.G. Gilman, G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals, *Annu Rev Biochem.* 56 (1987) 615-649.
- [24] G. Vauquelin, B. von Mentzer, *G Protein-coupled Receptors*, Wiley, Trento, 2007, pp. 113-119.
- [25] W.J. Tang, A.G. Gilman, Construction of a Soluble Adenylyl Cyclase Activated by G α and Forskolin, *Science* 268 (1995) 1769–1772.
- [26] R.K. Sunahara, R. Taussig, Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling, *Mol Interv.* 2 (2002) 168–184.
- [27] A. Visel, G. Alvarez-Bolado, C. Thaller, G. Eichele, Comprehensive Analysis of the Expression Patterns of the Adenylate Cyclase Gene Family in the Developing and Adult Mouse Brain, *J Comp Neurol.* 496 (2006) 684–697.
- [28] K.B. Seamon, W. Padgett, J.W. Daly, Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells, *PNAS.* 78 (1981) 3363-3367.
- [29] S.C. Sinha, S.R. Sprang, Structures, mechanism, regulation and evolution of class III nucleotidyl cyclases, *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 157 (2006) 105–140.
- [30] T.A. Baldwin, Y. Li, C.S. Brand, V.J. Watts, C.W. Dessauer, Insights into the Regulatory Properties of Human Adenylyl Cyclase Type 9, *Mol Pharmacol.* 95 (2019) 349–360.
- [31] Y.L. Guo, T. Seebacher, U. Kurz, J.U. Linder, J.E. Schultz, Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases, *EMBO J.* 20 (2001) 3667–3675.
- [32] M. Ziegler, J. Bassler, S. Beltz, A. Schultz, A.N. Lupas, J.E. Schultz, Characterization of a novel signal transducer element intrinsic to class IIIa/b adenylate cyclases and guanylate cyclases, *FEBS J.* 284 (2017) 1204–1217.
- [33] J. Krupinski, F. Coussen, H.A. Bakalyar, W.J. Tang, P.G. Feinstein, K. Orth, C. Slaughter, R.R. Reed, A.G. Gilman, Adenylyl Cyclase Amino Acid Sequence: Possible Channel- or Transporter-Like Structure, *Science* 244 (1989) 1558–1564.

- [34] A. Seth, M. Finkbeiner, J. Grischin, J.E. Schultz, Gs α stimulation of mammalian adenylyl cyclases regulated by their hexahelical membrane anchors, *Cell Signal*. 68 (2020) doi:10.1016/j.cellsig.2020.109538.
- [35] R. Taussig, A.G. Gilman, Mammalian Membrane-bound Adenylyl Cyclases, *J Biol Chem*. 270 (1995) 1–4.
- [36] F.C.F. Chang, A. Westenberger, R.C. Dale, M. Smith, H.S. Pall, B. Perez-Dueñas, P. Grattan-Smith, R.A. Ouvrier, N. Mahant, B.C. Hanna, M. Hunter, J.A. Lawson, C. Max, R. Sachdev, E. Meyer, D. Crimmins, D. Pryor, J.G.L. Morris, A. Münchau, D. Grozeva, K.J. Carss, L. Raymond, M.A. Kurian, C. Klein, V.S.C. Fung, Phenotypic Insights Into ADCY5-Associated Disease, *Mov Disord*. 31 (2016) 1033–1040.
- [37] T.A. Dayeh, A.H. Olsson, P. Volkov, P. Almgren, T. Rönn, C. Ling, Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets, *Diabetologia* 56 (2013) 1036–1046.
- [38] S. Pierre, T. Eschenhagen, G. Geisslinger, K. Scholich, Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets, *Nat Rev Drug Discov*. 8 (2009) 321–335.
- [39] B.E. Cham, B.R. Knowles, A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation, *J Lipid Res*. 17 (1976) 176–181.
- [40] A.M. Hosios, Z. Li, E.C. Lien, M.G. Vander Heiden, Preparation of Lipid-Stripped Serum for the Study of Lipid Metabolism in Cell Culture, *Bio Protoc*. 8 (2018).
- [41] V. Matyash, G. Liebisch, T.V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke, Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics, *J Lipid Res*. 49 (2008) 1137–1146.
- [42] T. Skotland, K. Sandvig, A. Llorente, Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward, *Prog Lipid Res*. 66 (2017) 30-41.
- [43] C. Gutierrez-Millan, C. Calvo Diaz, J.M. Lanao, C.I. Colino, Advances in Exosomes-Based Drug Delivery Systems, *Macromol Biosci*. (2020) doi:10.1002/mabi.202000269.

- [44] W. Stoorvogel, M.J. Kleijmeer, H.J. Geuze, G. Raposo, The Biogenesis and Functions of Exosomes, *Traffic* 3 (2002) 321-330.
- [45] D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, J.D. Lambris, Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis, *Nat Immunol.* 11 (2010) 785–797.
- [46] L.S. Ettre, *Chromatography: The Separation Technique of the 20th Century*, *Chromatographia* 51 (2000) 7-17.
- [47] P.J. Price, E.A. Gregory, Relationship Between in Vitro Growth Promotion and Biophysical and Biochemical Properties of the Serum Supplement, *In Vitro* 18 (1982) 576–584.
- [48] A. Tiaden, H. Hilbi, α -Hydroxyketone Synthesis and Sensing by Legionella and Vibrio, *Sensors (Basel)* 12 (2012) 2899-2919.
- [49] R.M. Pellegrino, A. Di Veroli, A. Valeri, L. Goracci, G. Cruciani, LC/MS lipid profiling from human serum: a new method for global lipid extraction, *Anal Bioanal Chem.* 406 (2014) 7937-7948.
- [50] J. Zegarlińska, M. Piaścik, A.F. Sikorski, A. Czogalla, Phosphatidic acid - a simple phospholipid with multiple faces, *Acta biochim Pol.* 65 (2018) doi:10.18388/abp.2018_2592.
- [51] C. Qi, S. Sorrentino, O. Medalia, V.M. Korkhov, The structure of a membrane adenylyl cyclase bound to an activated stimulatory G protein, *Science* 364 (2019) 389–394.