

E. Zusammenfassung

Keller, C.: *In vitro* Untersuchungen der Wirkungen von Glykosaminoglykanen auf das membranständige Adenylatcyclasesystem aus Rattenlebern

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkungen verschiedener Glykosaminoglykane auf das Adenylatcyclasesystem der Leber in einem *in vitro* Untersuchungssystem.

Als Untersuchungsmodell wurde das Adenylatcyclasesystem in Membranfragmenten aus Rattenlebern isoliert. Sowohl die Präparation der Membranfragmente, als auch die Zusammensetzung des Inkubationsansatzes wurden auf eine möglichst hohe spezifische Aktivität der Adenylatcyclase bei Stimulierung durch GppNHp hin optimiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 10 min mit 0,2 g/l Membranprotein.

Um Kreuzreaktionen mit den Glykosaminoglykanen ausschließen zu können und eine unbeeinflusste cAMP-Synthese zu gewährleisten, wurde der Inkubationsansatz aus möglichst wenigen Komponenten aufgebaut und bezüglich der cAMP-Synthese optimiert. Eine konstante cAMP-Bildung konnte in Bezug auf die Inkubationszeit und die eingesetzte Proteinmenge im optimierten Standardinkubationsansatz ohne Verwendung eines ATP-regenerierenden Systems erreicht werden.

Als Nebenbefund der Versuche wurden deutliche Hinweise dafür gefunden, daß die Aktivität des Adenylatcyclasesystems in der Leber jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt.

Dem beschriebenen Standardinkubationsansatz wurden Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatan-sulfat, Hyaluronsäure, Heparansulfat und Keratan-sulfat in Konzentrationen von 10 bis 600 mg/l zugesetzt. Die Wirkungen der Glykos-

aminoglykane (GAGs) auf die Aktivität des Adenylatcyclasesystems wurden vergleichend zu Kontrollansätzen, denen keine GAGs zugefügt wurden, untersucht. Die cAMP-Synthese wurde in den Versuchsansätzen durch GppNHp oder Forskolin stimuliert.

Die GAGs hatten unterschiedlich starke inhibitorische Wirkungen auf die cAMP-Synthese. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß Dermatansulfat und Heparansulfat die GppNHp-stimulierte cAMP-Synthese stärker inhibieren, als die durch Forskolin induzierte Aktivität. Heparansulfat hemmte bei niedrigen Konzentrationen die GppNHp-stimulierte Aktivität der Adenylatcyclase stärker als Dermatansulfat. Hyaluronsäure hatte dagegen eine stärkere Wirkung auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Synthese.

Durch Kombinationsversuche und Versuche mit variierenden Konzentrationen der Stimuli konnten unspezifische Interaktionen der GAGs mit den Stimuli bzw. dem Substrat der Reaktion ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten ferner auf eine nicht kompetitive Inhibierung der GppNHp- und Forskolin-Stimulierung durch Dermatansulfat hin. Verschiedene Wirkungsmechanismen für die beobachteten Effekte werden diskutiert.

Die GAGs haben differenziertere und komplexere Wirkungen auf das Adenylatcyclasesystem, als dies bisher bekannt war. Da die GAGs distinktive Wirkungen auf das Adenylatcyclasesystem ausüben, sind sie vermutlich wichtige Regulatormoleküle für die durch das Adenylatcyclasesystem vermittelte Signalübertragung und dürften somit für die Physiologie und Pathologie der Zelle eine bedeutende Rolle spielen.

F. Summary

Keller, C.: *In vitro* examination of the effects of glycosaminoglycans on the adenylate cyclase system in rat liver plasma membranes

This paper investigates the effects of different glycosaminoglycans on the adenylate cyclase system in liver plasma membranes in an *in vitro* system.

The model used for the investigation was the adenylate cyclase system in rat liver plasma membrane fragments. The preparation of the membrane fragments as well as the composition of the incubation set-up was optimised for a specific activity of adenylate cyclase which was as high as possible by stimulating with GppNHp. Incubation was carried out at 37 °C for 10 minutes with 0,2 g/l of membrane protein.

In order to exclude cross-over reactions with glycosaminoglycans and to guarantee a cAMP synthesis which was unaffected, the incubation set-up was generated using as few components as possible and optimised with regard to cAMP synthesis. Constant cAMP generation with regard to the incubation period and the amount of protein used was achieved in the optimised standard incubation set-up without the use of an ATP-regenerating system.

As a secondary result of the experiment significant indications have been found that the activity of the adenylate cyclase system in the liver is subject to seasonal fluctuations.

Chondroitin-4-sulphate, chondroitin-6-sulphate, dermatan sulphate, hyaluronic acid, heparan sulphate and keratan sulphate at concentrations between 10 and

600 mg/l were added to the above described standard incubation set-up. The effects of the glycosaminoglycans (GAGs) on the activity of the adenylate cyclase system were compared with control set-ups which had not had GAGs added to them.

In the experimental set-ups, cAMP synthesis was stimulated with GppNHp or forskolin.

The GAGs had different inhibitory effects on cAMP synthesis. In addition, it was found that dermatan sulphate and heparan sulphate inhibited cAMP synthesis which had been stimulated with GppNHp to a greater extent than the activity induced by forskolin. At low concentrations, heparan sulphate inhibited GppNHp stimulated activity of adenylate cyclase to a greater extent than dermatan sulphate. In contrast, hyaluronic acid had a greater effect on the forskolin stimulated cAMP synthesis.

Combination experiments and experiments with varying concentrations of stimuli, enabled non-specific interactions of the GAGs with the stimuli or the substrate of the reaction to be excluded. The results of these experiments also indicate a non-competitive inhibition of GppNHp and forskolin stimulation by dermatan sulphate. Different working mechanisms for the effects observed are being discussed.

The GAGs have more differentiated and more complex effects on the adenylate cyclase system than had been assumed so far. As the GAGs have distinctive effects on the adenylate cyclase system they probably are important regulation molecules for the signal transduction mediated by the adenylate cyclase system and therefore it is likely that they play an important role in the physiology and pathology of the cell.