

1 EINLEITUNG

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle sind multimerer Proteinkomplexe, die den kontrollierten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle ermöglichen. Sie sind damit maßgeblich an der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt, die eine Vielzahl bedeutender Regulationsmechanismen in allen Zelltypen steuert. Als Beispiele sind die Erregungs-Kontraktionskopplung im Herzmuskel, Skelettmuskel und glattem Muskel sowie die Synthese und Ausschüttung von Neurotransmittern und Hormonen zu nennen. Veränderungen in der Dichte und Funktion kardialer Ca^{2+} -Kanäle führen häufig zu zellulären Fehlfunktionen und somit zu kardiovaskulären Erkrankungen, einschließlich atrialer Fibrillation, Herzversagen und ischämischen Herzkrankheiten (Kamp 2000). Im intakten Organismus findet über eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren und Signaltransduktionswege eine dynamische Regulation der Ca^{2+} -Kanalfunktion statt. An der Regulation spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle sind u.a. Phosphorylierungs- sowie Dephosphorylierungsprozesse und Guanidinnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) maßgeblich beteiligt. Darüberhinaus stellen die Interaktionen zwischen den Kanaluntereinheiten selbst wie auch mit assoziierten Proteinen einen bedeutenden Regulationsmechanismus für die Ca^{2+} -Kanalfunktion dar. Die Kenntnis der molekularen Details dieser Interaktionen, einschließlich der zugrundeliegenden Funktionsmechanismen, der Interaktionen mit anderen Proteinen und schließlich ihrer funktionellen Relevanz in Bezug auf die Regulation komplexer zellulärer Funktionen ist eine wesentliche Voraussetzung, um die Abläufe gezielt modulieren zu können. Dies soll spezifischere und damit nebenwirkungsärmere Therapiemethoden ermöglichen.

1.1 Elektrophysiologische Eigenschaften spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle

Die Zellmembranen vieler elektrisch erregbarer Gewebe, einschließlich Herz- und Schrittmachergewebe sowie neuronalem Gewebe enthalten mehrere unterschiedliche Typen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Dies wurde mit der Anwendung der von Neher und Sakmann entwickelten Patch-Clamp-Technik (Neher & Sakmann 1976) offensichtlich, für die sie 1991 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten. Das Grundprinzip der Patch-Clamp-Methode beruht darauf, daß man die Spitze einer extrem dünnen Glaspipette dicht auf

die Zellmembran aufsetzt und damit den eingegrenzten Membranbereich (Patch) und die darin enthaltenen Ionenkanäle elektrisch von der übrigen Membran trennt. Durch elektrische Manipulationen lassen sich die Eigenschaften der isolierten Kanäle studieren (Details siehe Punkt 2.2.1).

Basierend auf unterschiedlichen biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften der jeweiligen ionenleitenden Pore des Kanals, der $\alpha 1$ -Untereinheit, sowie aus historischen Gründen erfolgte eine Einteilung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in verschiedene Klassen (Tab. 1). Neben dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (L, Long-Lasting) werden derzeit noch vier andere Typen (Tab. 1) beschrieben, die sich in ihrer Leitfähigkeit, den kinetischen Eigenschaften, der Sensitivität gegenüber Agonisten sowie Antagonisten und Toxinen voneinander abgrenzen (Catterall 2000, Ertel 2000).

Ca^{2+} -Kanaltyp	$\alpha 1$ -Isoform	Aktivation
L	$\alpha 1\text{S}$	HVA
L	$\alpha 1\text{C}$	HVA
L	$\alpha 1\text{D}$	HVA
L	$\alpha 1\text{F}$	HVA
N	$\alpha 1\text{B}$	HVA
P/Q	$\alpha 1\text{A}$	HVA
R	$\alpha 1\text{E}$	HVA
T	$\alpha 1\text{G}$	LVA
T	$\alpha 1\text{H}$	LVA
T	$\alpha 1\text{I}$	LVA

Tab. 1: Ca^{2+} -Kanaltypen (nach Catterall 2000)

HVA = High-Voltage-Activated, LVA = Low-Voltage-Activated

In dieser Arbeit wurde der bei hohem Membranpotential aktivierte (High-Voltage-Activated, HVA) L-Typ- Ca^{2+} -Kanal untersucht. Dieser Kanaltyp kommt hauptsächlich in elektrisch erregbaren Zellen, also in Muskelzellen (Herz-, glatter-, Skelettmuskel) und in neuronalen Zellen vor. Aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften zählt er zu den Dihydropyridin-sensitiven HVA-Kanälen (Striessnig 1999).

Der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal ist unter physiologischen Bedingungen in Abhängigkeit vom Membranpotential für Ca^{2+} -Ionen permeabel. Die Analyse dieses Kanals mit der Patch-Clamp-Technik erfolgt so, daß ein vorgegebenes zeitliches Muster von Depolarisationen und Repolarisationen (Spannungsprotokoll) an den Patch (isolierter Membranbereich) gelegt wird.

Daraus ergeben sich viele kurze Stromaufnahmen (Abb. 1), die das unterschiedliche Verhalten des Kanals wiedergeben.

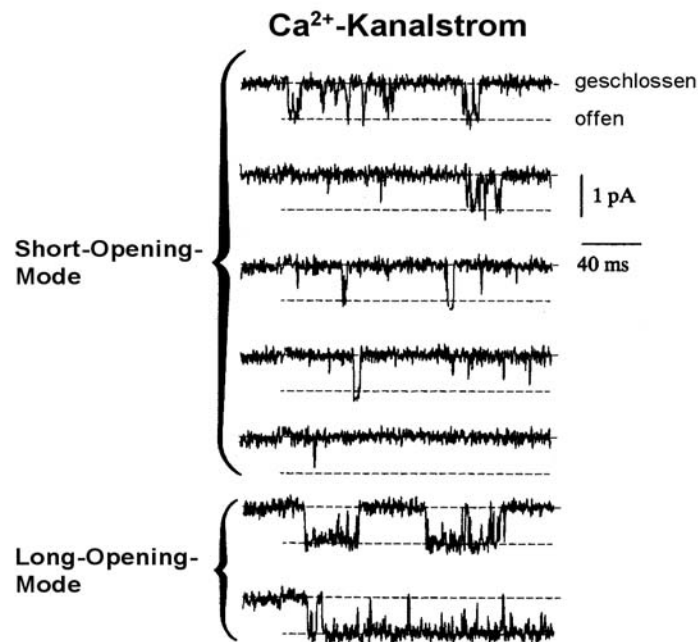


Abb. 1: Schaltverhalten von kardialen L-Typ-Ca²⁺-Kanälen. Das Membranpotential wurde für 200 ms von -60 mV (Haltepotential) auf 0 mV verstellt und dieser Spannungssprung mehrmals auf den Patch appliziert. Dabei wurden die dargestellten Membranströme gemessen. Diese zeigen unterschiedliches Einzelkanalverhalten. Im oberen Teil Mode-1-Schaltverhalten, das durch kurze Kanalöffnungen gekennzeichnet ist. Darunter typisches Mode-2-Verhalten mit sehr langen Kanalöffnungszeiten. Geschlossene und offene Kanalzustände sind durch strichlierte Linien markiert (Bean 1990).

Im kinetischen Verhalten des L-Typ-Ca²⁺-Kanals überlagert sich ein schnelles Schaltverhalten (im Millisekundenbereich) und ein langsames Schaltverhalten (im Sekundenbereich). Die Verfügbarkeit (Ps) kennzeichnet dabei das langsame Schaltverhalten zwischen sogenannten verfügbaren und nicht verfügbaren Zuständen. Erst bei ausreichender Depolarisation der Zellmembran über einen bestimmten Schwellenwert fließen Ca²⁺-Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten durch die Kanalpore in die Zelle. Unter diesem Potential

bleiben die Kanäle im geschlossenen Zustand. Der Wechsel zwischen offenen und geschlossenen Zuständen wird durch die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) als Parameter, der das schnelle Schaltverhalten beschreibt, charakterisiert. Die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) setzt sich aus der Offenzeit τ_o und der Öffnungsfrequenz f_o des Kanals zusammen. Sie ist damit ein Maß für den Anteil, den ein Kanal während einer Depolarisation im offenen Zustand verbringt.

$$P_o = \tau_o \cdot f_o$$

Unter Verfügbarkeit (P_s) eines Kanals versteht man die Wahrscheinlichkeit, mit der dieser bei einer Depolarisation vom geschlossenen in den offenen Zustand schaltet.

Für die Beschreibung des schnellen Schaltverhaltens des kardialen Ca^{2+} -Kanals wurden drei Zustände (Modi) von Hess und Mitarbeitern (1984) definiert. Im Mode 0 öffnet der Kanal nicht, im Mode 1 (Short-Opening-Mode) werden kurze Öffnungen von circa 1 ms erreicht und der Mode 2 (Long-Opening-Mode) ist durch lange Offenzeiten (5 bis 20 ms oder länger) gekennzeichnet (Abb. 1).

Der spannungsabhängige Ionenstrom I_M (Membran) ergibt sich also aus der Offenwahrscheinlichkeit (P_o), der Verfügbarkeit (P_s), der Anzahl (N) aktiver Kanäle und der Einzelkanalamplitude (i), (Campbell und Strauss 1995).

$$I_M = P_o \cdot P_s \cdot N \cdot i$$

1.1.1 Struktur von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen

Wie andere HVA-Kanäle sind L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle heterooligomere Proteinkomplexe, die aus einer ionenleitenden α_1 -Untereinheit (~240 kDa) und zwei akzessorischen Proteinen, einer β - (~60 kDa) und einer α_2/δ -Untereinheit (~175 kDa) bestehen (Abb. 2), (Hosey 1996, Striessnig 1999).

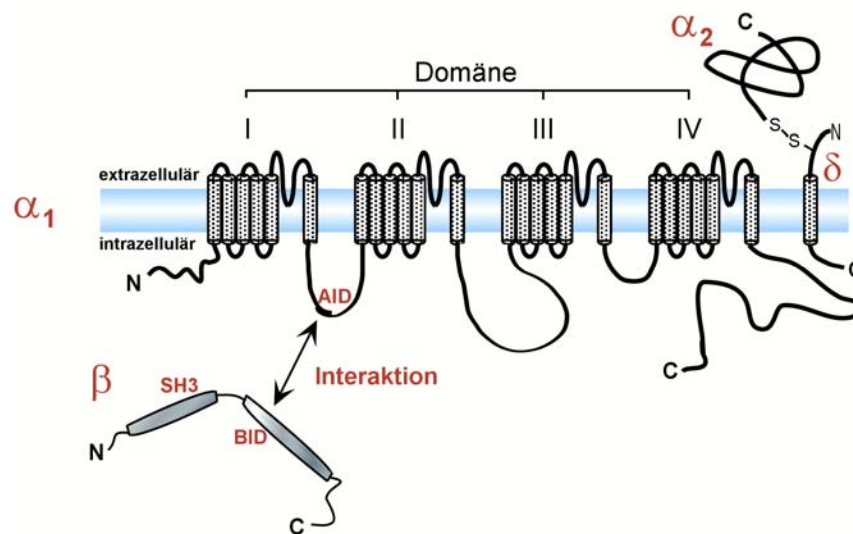


Abb. 2: Molekulare Struktur des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals. Dargestellt ist der Aufbau der ionenleitenden α_1 -Untereinheit und ihrer assoziierten Proteine, der β - und der α_2/δ -Untereinheit. α_1 - und β -Protein interagieren über konservierte Bindungsdomänen (AID und BID) miteinander. Die AID (α_1 -Interaktionsdomäne) ist in der 1. zyttoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II auf α_1 -Untereinheiten lokalisiert. Sie bindet an die BID (β -Interaktionsdomäne), die sich in der 2. konservierten Domäne aller β -Untereinheiten befindet. In der 1. konservierten Domäne von β -Untereinheiten ist eine SH3-Domäne lokalisiert.

Bisher wurden 10 gewebespezifische Gene identifiziert, die für α_1 -Untereinheiten (α_1A-I , α_1S) spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle kodieren (Tab. 1). Außerdem gibt es zahlreiche Spleißprodukte. Die α_1 -Untereinheit bestimmt primär die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des Kanals und bildet auch ohne die anderen Untereinheiten einen funktionsfähigen Ca^{2+} -Kanal. Diese aus 4 homologen Domänen (I-IV), mit jeweils 6 Transmembransegmenten (S1-S6) aufgebaute Untereinheit formt die

ionenleitende Pore des Kanals (Abb. 2). Das $\alpha 1$ -Protein übernimmt sowohl die Funktion der Ionenleitfähigkeit als auch die des Spannungssensors bei der Erregungs-Kontraktionskopplung. Vermutlich reagiert das S4-Segment jeder Domäne auf eine Membranpotentialänderung mit einer intrazellulären Verschiebung seiner positiven Ladungen, wodurch ein Wechsel in der Konformation zu einer Öffnung der Kanalpore führt (Hofmann 1999). Außerdem trägt die $\alpha 1$ -Untereinheit die Bindungsstellen für Pharmaka, z.B. für Kalziumkanalantagonisten vom Typ der Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine, die als Therapeutika bei kardiovaskulären Erkrankungen Anwendung finden (Striessnig 1999).

β -Untereinheiten enthalten keine membranspannenden Domänen, deshalb wird eine zytoplasmatische Lokalisation angenommen. Bisher wurden vier gewebespezifische Gene ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$) identifiziert (Hofmann 1999), die alle alternativem Spleißen unterliegen. β -Untereinheiten bestehen aus zwei zentral liegenden konservierten Domänen, die durch einen variablen Sequenzabschnitt verbunden sind und von einem variablen N- und C-Terminus flankiert werden (Abb. 2). Die β -Untereinheit fungiert als Regulatorprotein und beeinflusst die funktionellen und strukturellen Eigenschaften des Ca^{2+} -Kanals.

Es wurden drei $\alpha 2/\delta$ -Gene beschrieben (Klugbauer 1999). Das $\alpha 2$ -Protein ist auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert und mit dem δ - Protein über Disulfidbrücken verbunden (Abb. 2). Beide Untereinheiten sind stark glykosyliert. Die δ -Untereinheit enthält ein einzelnes hydrophobes Segment, worüber die Assoziation mit der Kanalpore erfolgt. Funktionell üben diese Untereinheiten moderate modulatorische Effekte aus. Das δ -Protein stabilisiert das Schaltverhalten der Kanäle, während das $\alpha 2$ -Protein unterstützend auf die DHP-Bindung zur $\alpha 1$ -Untereinheit wirkt (Striessnig 1999).

1.1.2 Der kardiale L-Typ- Ca^{2+} -Kanal: Aufbau und Interaktionspartner

Von den 10 bisher identifizierten $\alpha 1$ -Isoformen kodiert das $\alpha 1C$ -Gen für den kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal. In Geweben des Säugerherzens und des glatten Muskels wurden unterschiedliche Spleißformen des $\alpha 1C$ -Gens gefunden. Während im Herzmuskelgewebe die $\alpha 1C$ -a Form (Mikamia 1989) exprimiert wird, ist in Geweben des glatten Muskels das $\alpha 1C$ -b Spleißprodukt (Biel 1990) dominant. Die Spleißformen des kardialen und des glattmuskulären

Ca^{2+} -Kanals unterscheiden sich in ihren N-Termini, den hydrophoben Segmenten IS6 sowie IVS3 und in einem Insert auf der intrazellulären Schleife zwischen Domäne I und II der glattmuskulären $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit (Mikami 1989, Biel 1990). Beide Spleißprodukte bilden mit dem $\beta 2$ -Protein Ca^{2+} -Kanalkomplexe (Witcher 1995, Haase 1996, Gao 1997). Neben der $\beta 2$ ist auch die $\beta 3$ -Isoform in glatten Muskelgeweben am Aufbau von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen beteiligt (Reimer 2000). Für den Herzmuskel wurden außerdem Transkripte des $\beta 1$ -Gens (Collin 1993) und des $\beta 3$ -Gens (Hullin 1992, Witcher 1995) nachgewiesen.

Nach heutigem Kenntnisstand spielt die Interaktion zwischen der $\alpha 1\text{C}$ - und der $\beta 2$ -Untereinheit eine entscheidende Rolle in der Regulation der Ca^{2+} -Kanalaktivität, wobei die molekularen Details dieser Interaktion noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Neben der Bindung an die $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit wurde kürzlich eine weitere Interaktion der $\beta 2$ -Untereinheit mit dem hochmolekularen Phosphoprotein Ahnak beschrieben (Haase 1999), über deren funktionelle Relevanz es bisher noch keine Aussagen gibt. Außer der Interaktion mit der β -Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals selbst wurden Wechselwirkungen der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit mit anderen assoziierten Proteinen beschrieben. So interagiert die $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit mit den Ca^{2+} -bindenden Proteinen Calmodulin und Sorcin. Während Calmodulin die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung des Kanals vermittelt (Peterson 1999), spielt Sorcin bei der interzellulären Kanalkommunikation zwischen dem spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanal im Sarcolemma und dem Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Kanal des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) eine wichtige Rolle (Meyers 1998). Neben diesen Bindungen ist in neuronalen Zellen eine direkte Interaktion der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit mit Synaptotagmin, Syntaxin und SNAP-25 beschrieben worden (Wiser 1999). Diesen Proteinen sowie die V-ATPase G2-Untereinheit, die auch an die $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit bindet (Gao 2000), ist gemeinsam, daß sie in Exocytose-Prozesse involviert sind.

1.2 Regulation des L-Typ-Ca²⁺-Kanals durch die akzessorische β -Untereinheit

1.2.1 Funktionelle Modulation der α 1-Untereinheit durch das β -Protein

Ein Mechanismus für die Regulation der Kanalaktivität besteht in der Kopplung der α 1-Untereinheit an gewebespezifische β -Isoformen. Die Koexpression des β -Proteins mit der α 1-Untereinheit führt im allgemeinen zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude und zu einer Veränderung der Aktivations- und Inaktivationskinetik (Castellano 1994, De Waard und Campbell 1995, Gerster 1999). Verschiedene β -Untereinheiten (β 1, β 2, β 3, β 4) modulieren die α 1-Funktion in einer isoform-spezifischen Weise (Hullin 1992, Parent 1997, Gerster 1999). Die funktionelle Wirkung des β -Proteins erfolgt unter Bindung an eine konservierte Domäne der α 1-Untereinheit, die AID (α 1-Interaktionsdomäne; Abb. 2), (Pragnell 1994, De Waard 1994). Dieses aus 18 Aminosäuren bestehende Motiv (QQ-E--L-GY--WI---E) mit 9 konservierten Aminosäuren, ist auf der 1. zytoplasmatischen Schleife zwischen der I. und II. Domäne auf allen α 1-Untereinheiten lokalisiert (Abb. 2). Die Bedeutung der AID für die Interaktion mit der β -Untereinheit wurde durch Punktmutationen in diesem Motiv demonstriert. Diese zerstörten entweder die Bindung der β -Untereinheit an die AID, womit der komplette Verlust der β -induzierten Kanalmodulation verbunden war oder beeinflussten die Assoziation beider Proteine. Daraus resultierten veränderte Stromeigenschaften (Witcher 1995, De Waard 1996).

De Waard und Mitarbeiter zeigten (1994), daß eine konservierte 30-Aminosäuren-Domäne in β -Untereinheiten für die Interaktion mit der AID verantwortlich ist. Über diese Bindungsdomäne werden primär die modulatorischen Effekte des β -Proteins auf die ionenleitende α 1-Untereinheit übertragen. Dieses Bindungsmotiv, die BID (β -Interaktionsdomäne) ist in der 2. konservierten Domäne aller β -Untereinheiten lokalisiert (Abb. 2). Mutationen in der BID äußerten sich in vergleichbarer Weise, wie für die AID beschrieben (De Waard 1996). AID und BID stellen primäre Interaktionsstellen dar, die für die Assoziation beider Proteine und damit für die Regulation des Kanals essentiell sind (Walker 1998).

1.2.2 Rolle der β -Untereinheit beim Targeting des Kanalkomplexes zur Plasmamembran

β -Untereinheiten modulieren nicht nur die funktionellen Eigenschaften der α 1-Untereinheit, sie spielen darüberhinaus eine bedeutende strukturelle Rolle. So konnte gezeigt werden, daß ein effizienter Einbau der α 1-Untereinheit in die Plasmamembran nur dann erfolgt, wenn die β -Untereinheit koexprimiert wird (Tareilius 1997, Gao 1999, Gerster 1999). Ohne Koexpression des β -Proteins akkumuliert die α 1-Untereinheit vorrangig im Endoplasmatischen Retikulum (Gerster 1999, Bichet 2000). Demgegenüber zeigen β -Untereinheiten, wenn sie ohne α 1-Untereinheit exprimiert werden eine zytoplasmatische Lokalisation (Chien 1998, Gerster 1999). Es wird deshalb vermutet, daß die β -Untereinheit einen Chaperon-Effekt ausübt, da die Koexpression der α 1 mit jeder β -Untereinheit zur erhöhten Expression von Ca^{2+} -Kanalkomplexen in der Plasmamembran führt (Yamaguchi 1998).

Alle β -Proteine enthalten eine Src-Homologiedomäne in ihrer 1. konservierten Domäne (Abb. 2). Mutationen in dieser SH3-Domäne oder in der BID störten die Interaktion zwischen α 1- und β -Untereinheiten, wodurch das Membrantargeting des Kanalkomplexes unterbrochen wurde (Gao 1999).

1.3 Charakterisierung von Ahnak

Ahnak ist ein humanes Gen, das für ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 700-kDa kodiert. Es wurde von Shtivelman und Bishop (1992, 1993) als ein im Zellkern von Neuroblastom- und anderen Tumorzelllinien lokalisiertes Phosphoprotein beschrieben, dessen Expression in proliferierenden Zelllinien im Vergleich zu differenzierten Zellen der gleichen Zelllinie reprimiert ist. Ein ähnliches Protein mit einem Molekulargewicht von circa 680-kDa fanden Hieda und Mitarbeiter (1989) in den Desmosomen epidermaler Zellen und bezeichneten es als Desmoyokin. Dieses desmosomale Plaque-Protein wurde von Hashimoto und Mitarbeitern (1993) in Keratinozyten als Plasmamembran-assoziiertes und Ahnak-homologes Protein beschrieben. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bestätigte die Homologie beider Proteine, da die genomischen DNA's von Desmoyokin und Ahnak auf Chromosom 11q12 lokalisiert werden konnten (Kudoh 1995).

Ahnak enthält keine Introns und wird von einer 17.5 kb mRNA translatiert (Shtivelman 1992, 1993). Die Aminosäuresequenz läßt auf ein allgemeines Strukturprinzip, wie es auch bei anderen Riesenproteinen, z.B. Titin (Labeit 1990), Nebulin (Keller 1995) und Dystrophin (Hoffman 1987) vorkommt, schließen. Das humane Ahnak-Protein besteht aus 5643 Aminosäuren und setzt sich aus 3 strukturellen Hauptdomänen zusammen: Den N-terminalen 251 AS, einer großen zentralen Region von ungefähr 4300 AS mit multiplen repetitiven Motiven und den C-terminalen 1002 AS (Abb. 3). Die zentrale Ahnak-Region ist aus circa 30 repetitiven Domänen aufgebaut, die sich in der Regel aus 128 AS zusammensetzen. Diese repetitiven Domänen bestehen wiederum aus kürzeren, sich wiederholenden Sequenzen. Die Anordnung erfolgt nach dem allgemeinen Schema $\varphi \pm \varphi P \pm \varphi \pm$, wobei hydrophobe (φ) und hydrophile (\pm) Aminosäuren alternieren und in jeder 7. Position ein Prolinrest angeordnet ist (Shtivelman 1992).



Abb. 3: Schematische Darstellung von Ahnak. Gezeigt sind die drei strukturellen Hauptdomänen des Riesenproteins. Eine große mittlere Domäne mit repetitiven konservierten Sequenzen wird von einer N- und C-terminalen Region flankiert.

Weitere Untersuchungen zeigten Ahnak als ubiquitäres Protein, dessen Lokalisation sich in verschiedenen Zelltypen als unterschiedlich herausstellte (Hashimoto 1995, Haase 1999, Nie 2000). Nach heutigem Kenntnisstand kann die Frage, welche Funktion(en) Ahnak besitzt und ob es in Abhängigkeit vom Zelltyp verschiedene Funktionen ausübt, nicht beantwortet werden. Allerdings besteht offensichtlich ein charakteristisches Merkmal Ahnak's darin, Interaktionen mit verschiedenen Proteinen einzugehen. So wurde die Interaktion repetitiver Ahnak-Domänen mit Phospholipase C- γ 1 in Anwesenheit von Arachidonsäure demonstriert (Sekiya 1999). Außerdem interagierten repetitive Ahnak-Domänen und der C-Terminus mit dem Ca²⁺-bindenden Protein S100B (Gentil 2001). Neben diesen Interaktionen beschrieben Haase und Mitarbeiter (1999) Ahnak als ein Protein, das an die β 2-Untereinheit des kardialen L-Typ-Ca²⁺-Kanals bindet.

1.4 Interaktion zwischen der β 2-Untereinheit des kardialen Ca²⁺-Kanals und Ahnak

In Kopräzipitationsexperimenten mit Antikörpern gegen die β 2-Untereinheit des Ca²⁺-Kanals wurde ein 700-kDa Protein ausgefällt (Haase 1999). Die Sequenzanalyse ergab, daß es sich um das hochmolekulare Protein Ahnak handelte. Es wurde in Kardiomyozyten verschiedener Species (Mensch, Ratte, Schwein, Maus) nachgewiesen und auf der Ebene der Plasmamembran lokalisiert (Haase 1999).

Die Interaktion zwischen Ahnak und der β 2-Untereinheit des kardialen Ca²⁺-Kanals ließen Haase und Mitarbeiter (1999) über eine mögliche Rolle in der β -adrenergen Signaltransduktion spekulieren. Die Aktivität des L-Typ-Ca²⁺-Kanals wird durch β -adrenerge Stimulierung des Herzens erhöht. β -adrenerge Stimulierung des Herzens führt über die

Adenylatzyklase zu einer gesteigerten cAMP-Produktion und zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), (Trautwein 1990). Damit ist eine erhöhte Kontraktionskraft und eine erhöhte Herzfrequenz verbunden. Die β 2- und die α 1C-Untereinheit besitzen Phosphorylierungsstellen für PKA und werden sowohl *in vitro* (Hosey 1996) als auch *in vivo* (Kameyama 1996, Gao 1997, Haase 1993, 1999) durch PKA phosphoryliert. Auch kardiales Ahnak ist ein PKA-Substrat, das *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierung unterliegt (Haase 1999). Es konnte in der Plasmamembran von Kardiomyozyten lokalisiert werden. Diese Befunde und die Ergebnisse der *in vivo* Phosphorylierung sowie der Kopräzipitation von Ahnak und der β 2-Untereinheit lassen vermuten, daß Ahnak in die β -adrenerge Stimulation des kardialen Ca^{2+} -Kanals einbezogen ist.

1.5 Fragestellung

Schaltverhalten und Regulation kardialer L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle werden wesentlich durch die Interaktion zwischen der ionenleitenden $\alpha 1\text{C}$ - und der akzessorischen $\beta 2$ -Untereinheit bestimmt. Die molekularen Details dieser Interaktion sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Herzmuskel- und im glatten Muskelgewebe werden zwei Spleißformen des $\alpha 1\text{C}$ -Gens exprimiert, die beide mit der $\beta 2$ -Untereinheit funktionelle Ca^{2+} -Kanalkomplexe bilden. Während bisher ausschließlich das Einzelkanalverhalten der kardialen Spleißform, $\alpha 1\text{C-a}$, mit der $\beta 2$ -Untereinheit analysiert wurde, gab es keine Angaben darüber, wie die glattmuskuläre Spleißform, $\alpha 1\text{C-b}$, moduliert wird. Ein Anliegen dieser Arbeit bestand deshalb darin, den Einfluß der $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit auf das kinetische Verhalten der glattmuskulären $\alpha 1\text{C-b}$ -Untereinheit (Abb. 4A, oberer Teil) in einem heterologen Expressionssystem näher zu untersuchen.

Ferner sollte über die gezielte Beeinflussung der Interaktion beider Untereinheiten mittels eines synthetischen Peptides, das die $\alpha 1$ -Interaktionsdomäne (AID) auf der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit imitiert (Abb. 4A, Ausschnitt unten), ein Ansatz für die Erarbeitung eines neuen molekularen Therapiekonzeptes validiert werden. Die Wirkung des AID-Peptids sollte insbesondere unter Inside-Out-Bedingungen charakterisiert werden, wobei die Analyse der Kanalmodulation Aufschluß über die Rolle der $\alpha 1$ -Interaktionsdomäne (AID) in der funktionellen Modulation der Kanaleigenschaften geben sollte.

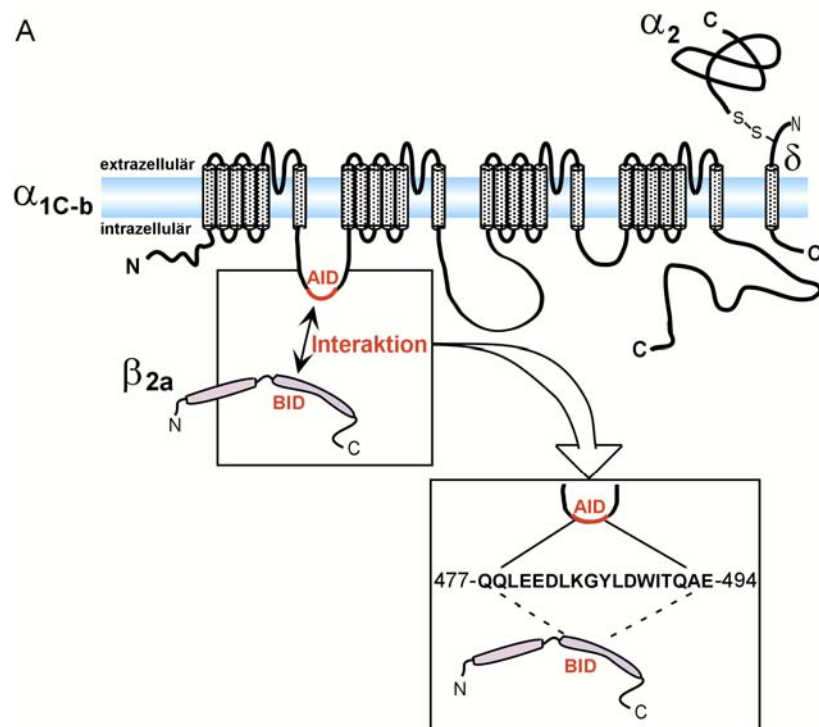


Abb. 4A: Der glattmuskuläre L-Typ- Ca^{2+} -Kanal; schematische Darstellung der Fragestellung. Folgende Fragen sollten Beantwortung finden: 1. Wie beeinflusst die β_{2a} -Untereinheit das Schaltverhalten von α_{1C-b} -Kanälen (oberer Teil)? 2. Wie beeinflusst ein synthetisches Peptid (QQLEEDLKG YLDWITQAE), das die AID auf der α_{1C-b} -Untereinheit imitiert, die Interaktion zwischen der ionenleitenden α_{1C-b} - und der β_{2a} -Untereinheit (Ausschnitt unten)?

Neben der Interaktion mit der α_{1C} -Untereinheit ist die kardiale β_{2} -Untereinheit mit dem hochmolekularen Protein Ahnak (~700 kDa) assoziiert. Dies wurde kürzlich in Kopräzipitationsexperimenten nachgewiesen (Haase 1999). Bisher gab es über die molekularen Details dieser Interaktion keinerlei Angaben. Ein grundlegendes Anliegen dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Interaktion zwischen der β_{2a} -Untereinheit und Ahnak zu definieren. Das Auffinden von Bindungsstellen zwischen den Interaktionspartnern und die Charakterisierung der Bindungseigenschaften sollte Aufschluß über die funktionelle Relevanz der Interaktion geben und den Weg für weitere, gezieltere experimentelle Ansätze ebnen (Abb. 4B). Um rekombinante Proteine für die Bindungsstudien einsetzen zu können, sollten geeignete Abschnitte der Ahnak-cDNA gemäß der strukturellen Hauptdomänen des Proteins und der β_{2a} -Untereinheit bestimmt und in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert

werden. Mit diesen Proteinen sollten dann die Interaktionsstellen zwischen Ahnak und der kardialen β_{2a} -Untereinheit identifiziert, weiter eingegrenzt und die Bindungseigenschaften charakterisiert werden.

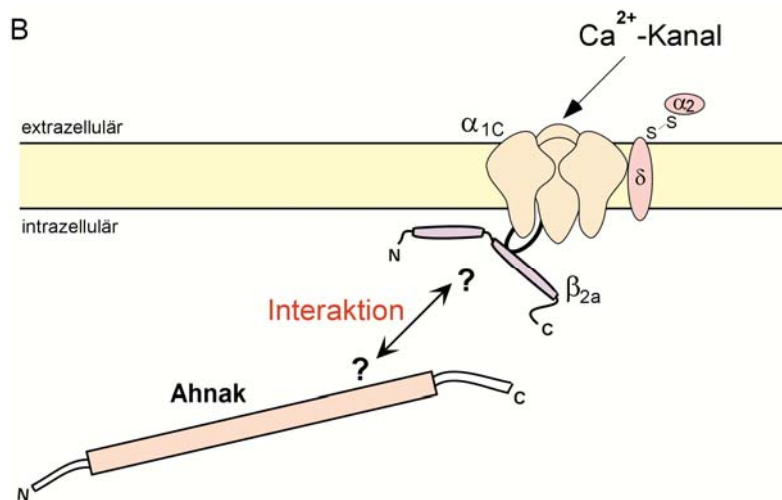


Abb. 4B: Der kardiale L-Typ- Ca^{2+} -Kanal; schematische Darstellung der Fragestellung. Folgende Fragen sollten beantwortet werden: 1. Über welche Bindungsdomänen interagieren Ahnak und die β_{2a} -Untereinheit miteinander? 2. Wie sind die Bindungseigenschaften definiert?