



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

Strukturdeterminanten der Aktivierung von L-Typ
Kalziumkanälen in den Segmenten IS6 und IIS6

Verfasserin

Mag.pharm.Michaela Kudrnac

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2009

Studienkennzahl lt.

A 091 449

Studienblatt:

Dissertationsgebiet lt.

Pharmakologie

Studienblatt:

Betreuerin / Betreuer:

Univ.Prof. Dr. Steffen Hering

Die Zeit wird kommen, wo unsere Nachkommen sich wundern, daß wir so offenbare Dinge
nicht gewußt haben.
Lucius Annaeus Seneca

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1. Entdeckung spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Ca^{2+} Kanäle) und deren physiologische Eigenschaften	2
1.1.1 Die Entdeckung der Kalziumkanäle	2
1.1.2 Klassifikation von spannungsabhängigen Kalziumkanälen	4
1.1.3 „High-Voltage-Activated“ Kalziumkanäle	5
1.1.4 „Low- Voltage-Activated“ Kalziumkanäle	5
1.2 Nomenklatur von spannungsabhängigen Kalziumkanälen	6
1.3 Untereinheiten und Funktion von „High Voltage Activated“ Kalziumkanälen	8
1.3.1 Die α_1 -Untereinheit	8
1.3.2 Die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit	9
1.3.3 Die β -Untereinheit	10
1.3.4 Die γ_1 -Untereinheit	11
1.4 Funktionelle Domänen der α_1 Untereinheit	12
1.4.1 Die Pore und Selektivitätsfilter	12
1.4.2 Besonderheiten im Schliessverhalten (kalziumabhängige Inaktivierung)	13
1.4.2.1 Spannungsabhängige Inaktivierung	13
1.4.2.2 Kalziumabhängige Inaktivierung	15
1.4.3 Strukturdeterminanten der Aktivierung von Kalium- und Natriumkanälen	17
1.4.3.1 Kristallstruktur von KcsA und $\text{Kv}1.2$	17
1.4.4 Strukturdeterminanten der Aktivierung von Kalziumkanälen	19
1.5 Kanalopathien von Kalziumkanälen	20
1.5.1 L-Typ Kalziumkanaldysfunktionen	21
1.5.1.1 Timothyssyndrom	21
1.5.1.2 Kongenitale Stationäre Nachtblindheit (CSNB2)	21
1.5.2 Ausgewählte „Non L-Type“ Kanalopathien	23
1.5.2.1 Familiäre Hemiplegie Migräne (FHM)	23
1.6 Zielstellungen	26
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Zellkultur und transiente Transfektion der tsA-201 Zellen mit Kalziumkanal-Untereinheiten	27
2.2 Elektrophysiologische Messungen mittels Patch-Clamp Technik und Datenerfassung	27
2.3 Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1 Einführung von Punktmutationen in die $\text{Ca}_v1.2$ Untereinheit	28
2.3.2 Isolierung von cDNA Fragmenten aus Agarosegelen	29

2.3.3	Klonierung von cDNA Abschnitten	30
2.3.4	Transformation von kompetenten E.Coli Zellen (DH5 α Hanahan 1983)	30
2.3.5	Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA aus Bakterien	31
2.4	Untersuchung der Membranexpression mittels konfokaler Mikroskopie	31
3. ERGEBNISSE		
3.1	Aktivierungs determinanten in Segment IIS6	32
3.1.1	Mutation I781T verschiebt die Ca _v 1.2 Kanal Aktivierung	32
3.1.2	Verschiebung der Spannungsabhängigkeit des „gatings“ durch weitere Mutationen in IIS6	33
3.1.3	I781 Substitutionen induzieren langsame Aktivierung bei hyperpolarisierten Spannungen und langsame Deaktivierung	36
3.1.4	Spezifität der Mutation in Position I781P	38
3.1.5	Modulation von Ile781 durch β -Untereinheiten	40
3.1.6	Nachweis von Membranexpression mittels konfokaler Mikroskopie	41
3.2	Aktivierungs determinanten in Segment IS6	42
3.2.1	Prolinsubstitutionen im Segment IS6	42
3.2.2	Threoninsubstitutionen von hydrophoben Aminosäuren	45
3.3.3	Substitution von L434 durch Aminosäuren unterschiedlicher Hydrophobizität	46
3.2.4	Doppelmutationen in IS6 und IIS6 die additive Verschiebungen der Aktivierungskurve verursachen	48
3.2.5	Nicht additive Verschiebungen der Aktivierungskurve durch Doppelmutationen in IS6 und II6	50
3.2.6	Korrelation zwischen den Verschiebungen der Aktivierungs- und Inaktivierungskurven	53
4. DISKUSSION		54
5. ZUSAMMENFASSUNG		62
6. LITERATURVERZEICHNIS		64
7. DANKSAGUNG		76
8. LEBENS LAUF		77

EINLEITUNG

Ionenkanäle sind membrangebundene Proteine, die den raschen passiven Flux von Ionen durch Poren biologischer Membranen ermöglichen. Initiiert wird dieser Ionenstrom (10^7 Ionen s^{-1}) entweder durch die Bindung eines Liganden an einen entsprechenden Kanalrezeptor oder durch Spannungsänderungen bzw. Depolarisation der Membran. In Folge durchlaufen die Kanäle eine Reihe von Konformationsänderungen und gehen vom geschlossenen in den offenen und somit vom nicht leitenden in den leitenden Zustand über.

Spannungsabhängige Ionenkanäle und ihre strukturellen Verwandten sind eine der größten Superfamilien von Signaltransduktionsproteinen und werden von mindestens 149 Genen des humanen Genoms codiert. Die in dieser Arbeit untersuchten Ca^{2+} -Kanäle gehören zur Familie spannungsabhängiger Kalziumkanäle (VDCCs voltage dependent calcium channels). Sie reagieren auf Änderungen des Membranpotentials mit Aktivierung (Öffnung), und einem damit verbundenen Einstrom von Kalziumionen. Das kontrollierte Öffnen und Schließen der Kanalpore wird als „gating“ bezeichnet (Jiang et al., 2003).

Kalziumkanäle sind heterooligomere Proteinkomplexe, die aus einer $\alpha 1$ -Untereinheit und drei weiteren akzessorischen Proteinen der β -, $\alpha 2\delta$ -, und in manchen Fällen einer γ -Untereinheit zusammengesetzt sind (Hosey, 1996; Striessnig, 1999).

Die $\alpha 1$ -Untereinheit, die die eigentliche Kanalpore bildet, besteht aus 4 heterologen Domänen, die sich ihrerseits aus jeweils 6 transmembranären Segmenten S1-S6 zusammensetzen, welche durch extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Catterall, 2000). VDCCs sind evolutionär mit den ebenfalls spannungsgesteuerten Na^+ und K^+ Kanälen verwandt und weisen eine ähnliche Struktur mit 6 transmembranären Segmenten (S1-S6), die eine Domäne bilden, auf (Yu and Catterall, 2004; Catterall et al., 2005).

Sogenannte Kanalerkrankungen (Channelopathies) verdeutlichen, wie durch Punktmutationen der Kalziumeinstrom verändert und dadurch die Funktion von Zellen und Organen gestört wird. Prominente Beispiele für Kalziumkanalerkrankungen sind Familiäre Hemiplegie Migräne (Opphoff et al., 1996, 1997; Terwindt et al., 1998; Pietrobon, 2007; Weiss et al., 2007; Hans et al., 1999), kongenitale stationäre Nachtblindheit (Hoda et al., 2005), und das Timothy Syndrom (Splawsky et al., 2004).

Eine große Anzahl von Kanalerkrankungen wird durch Mutationen in der Kanalpore (IS6-IVS6) und den assoziierten intrazellulären Schleifen hervorgerufen, wobei Veränderungen in der Spannungsabhängigkeit sowie in der Kinetik der Kanalaktivierung und Inaktivierung beschrieben wurden (Übersichtsarbeiten siehe: Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999;

Lorenzon and Beam, 2000; Pietrobon, 2002; Hering et al., 2008). Die strukturelle Basis für die gestörten Kalziumkanalfunktionen ist derzeit unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch den systematischen Austausch von Aminosäuren in den porenbildenden Segmenten IS6 und IIS6, zur Aufklärung der strukturellen Ursachen dieser Kanalerkrankungen beizutragen.

STAND DER FORSCHUNG

1.1 ENTDECKUNG SPANNUNGSABHÄNGIGER Ca^{2+} KANÄLE UND DEREN PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

1.1.1 DIE ENTDECKUNG DER KALZIUMKANÄLE

Den Grundstein zur biophysikalischen Analyse spannungsabhängiger Ionenkanäle legten Hodgkin und Huxley (1952, a-c). Spannungsabhängige Kalziumkanäle wurden 1953 von Paul Fatt und Bernard Katz identifiziert. Das Ca^{2+} -Kanal Protein wurde später von Curtis und Catterall (1983,1984) gereinigt, und es konnte gezeigt werden, dass der Kanal aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt ist (Borsotto et al., 1985; Flockerzi et al., 1986; Leung et al., 1988; Hille, 2001 zur Übersicht).

1987 gelang Tanabe und Mitarbeitern erstmals die Klonierung einer α_1 -Untereinheit des Skelettmuskelkanals. Untersuchungen an heterolog exprimierten Kalziumkanälen und gerichtete Mutagenese ermöglichten es, den Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Ionenselektivität, die Leitfähigkeit und das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten zu untersuchen. Aufgrund der Molekülgröße liegen derzeit keine Kristallstrukturen von spannungsabhängigen Kalziumkanälen vor. Für Struktur-Funktionsanalysen an Kalziumkanälen werden deshalb in der Regel Strukturhomologien mit Kristallstrukturen von Kaliumkanälen ((z.B. KcsA (geschlossener Zustand) oder K_v1.2 (offener Zustand)) herangezogen.

Nach Formulierung des Hodgkin-Huxley Modells und der Beschreibung des Natriumionengestragenen Aktionspotentials entdeckten Fatt und Katz (1953) bei Studien zur neuromuskulären Transmission an Muskelfaserzellen von Krabben eine Ausnahme. Der Ersatz von Na^+ Ionen durch Cholin im Medium führte zu einer Erregung ohne Natrium. Fatt und Ginsborg (1958) deuteten diese neue Art der Erregbarkeit als "Calcium Spike", d.h. ein Aktionspotential, das durch Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und nicht durch Na^+ Ionen ausgelöst wird. Weitere Untersuchungen von Fatt and Ginsborg (1958) zeigten, dass derartige Aktionspotentiale durch Ca^{2+} , Sr^{2+} oder Ba^{2+} Ionen im Medium getragen werden. Je höher die Konzentration der divalenten Kationen, desto steiler war die Aufstrichphase und desto größer

der Peak des Aktionspotentials. Am effektivsten erwies sich isotone BaCl_2 Lösung. Quarternäre Ammoniumionen wie TEA und TBA sowie Ba^{2+} und hohe Konzentrationen von Procain (1.8-18mM) blockieren K^+ -Kanäle und deren antagonistischen repolarisierenden Effekt.

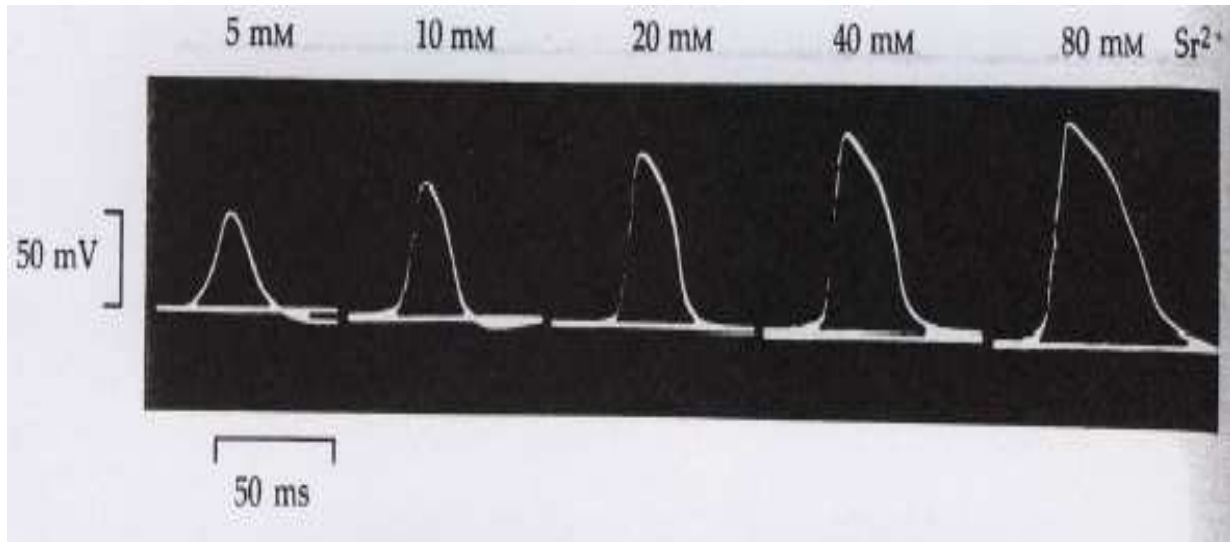


Abb. 1 Aktionspotential einer Crayfish Muskelfaser. NaCl in der Badlösung ist durch steigende Konzentrationen von SrCl ersetzt (Quelle: Hille; Fatt and Ginsborg, 1958).

Den endgültigen Beweis für die Kalzium-Hypothese erbrachten Hagiwara und Naka (1964) durch die exakte Messung des Kalziumeinstroms während eines Aktionspotentials. Hagiwara und Mitarbeiter führten in Folge intensive Untersuchungen an Arthropodenmuskeln und Seesterneiern durch und entdeckten verschiedene Typen von Kalziumkanälen. Ca^{2+} Kanäle kommen ubiquitär vor, wie zum Beispiel in Muskelzellen von Arthropoden, Mollusken, Nematoden, Tunicata und in den glatten Muskeln von Wirbeltieren. Weiters finden sie sich in sekretorischen Drüsenzellen und in synaptischen Nervenendigungen, wo sie die Sekretion regulieren (Hille, 1984 siehe auch Übersichtsarbeiten Hagiwara, 1983; Tsien et al., 1987; Perez-Reyes et al., 1998; Catterall, 2000).

Einen großen Fortschritt für elektrophysiologische Untersuchungen brachte die Entwicklung der Patch Clamp Methode. Erwin Neher und Bert Sackmann (1976) führten die erste Einzelkanalmessung an einem Acetylcholin-aktivierten Kanal durch. Die Patch-Clamp Technik ermöglichte außerdem die Untersuchungen kleiner Zellen, wie zB Säugerzellen, und Untersuchungen an Zellkulturen. Durch die Bildung eines sogenannten Gigaseals (Hamil et al., 1981) wird ein Membranbereich (Patch) elektrisch von seiner Umgebung isoliert. Einzelkanalströme können sowohl von intakten Zellen als auch von isolierten

Membranstücken (patches) abgeleitet werden, sobald sich ein Gigaseal zwischen Pipette und der Membran aufgebaut hat. Bei der „whole cell“ Konfiguration wird die Membran eines „cell attached patches“ durch Anlegen eines Unterdrucks aufgerissen, was den Austausch von Molekülen zwischen Zytoplasma und der Pipette während der Messung ermöglicht. Das Abziehen der Pipette von der Zelle im „whole cell“ führt zur Konfiguration eines „outside out patches“.

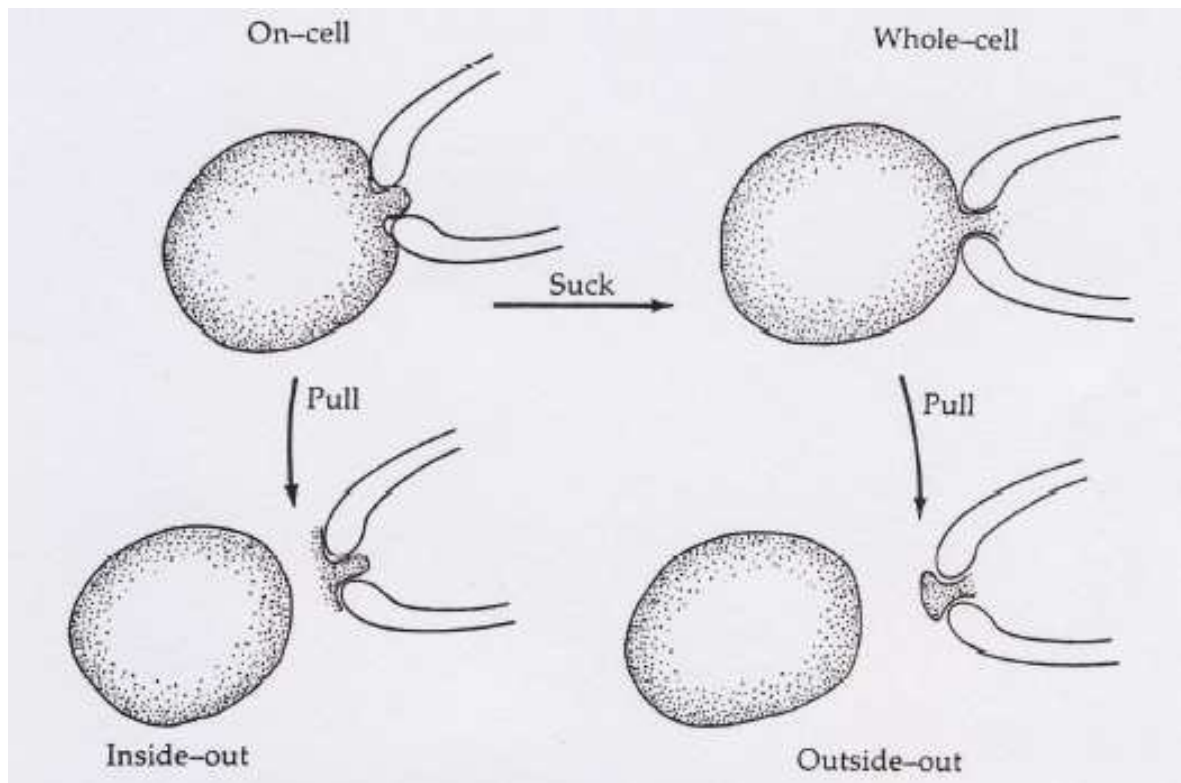


Abb. 2 Kanäle können im „cell attached mode“ (on cell), nach Abziehen der Pipette im „inside out patch“, in der Ganzzellkonfiguration („whole-cell“) oder nach Abziehen der Pipette im „outside out patch“ registriert werden. (Quelle: Hille, 1984)

1.2. KLASSEIFIKATION VON SPANNUNGSABHÄNGIGEN KALZIUMKANÄLEN

VDCCs wurden zunächst nach ihren unterschiedlichen biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften, sowie der unterschiedlichen Kinetik der gemessenen Ströme unterteilt. Es wurde eine alphabetische Nomenklatur, basierend auf der Reihenfolge ihrer Entdeckung und ihrem Vorkommen in unterschiedlichen Geweben, vorgeschlagen.

Kalziumkanäle sind nach evolutionärem Gesichtspunkt in einem sehr frühen Entwicklungsabschnitt in zwei große Unterfamilien unterteilt worden. Einige Kanäle sind bereits bei geringer Depolarisierung aktivierbar, während für andere eine große Verschiebung des Membranpotentials nötig ist (Hagiwara et al., 1975; Llinas and Yarom, 1981). Man

unterteilte die VDCCs deshalb in **HVA** (High Voltage Activated) und **LVA** (Low Voltage Activated) Kalziumkanäle (calcium channels) (Hofmann et al., 1999).

1.2.1 „HIGH-VOLTAGE-ACTIVATED“ KALZIUMKANÄLE

Das Schwellenpotential zur Aktivierung von HVA-Kanälen liegt bei einem Membranpotential positiver als -20mV . Die Amplitude ihrer Leitfähigkeit ist groß (large). Sie zeigen nur eine langsame Kinetik der Inaktivierung (long lasting) und werden als L-Typ Kalziumkanäle bezeichnet (Catterall, 2000; Ertel et al., 2000). Kanäle vom L-Typ finden sich in Herzmuskelzellen, wo sie für Erzeugung und Ausbreitung elektrischer Impulse und den Beginn der Vorhof- und Ventrikelkontraktion verantwortlich sind. In Muskelzellen initiieren sie eine Muskelkontraktion durch Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum. Pharmakologisch zeichnet die L-Typ Kanäle ihre Sensitivität gegenüber 1,4 Dihydropyridinen, Phenylalkylaminen und Benzothiazepinen aus (Hofmann et al., 1999; Striessnig, 1999; Ertel et al., 2000). In den achtziger Jahren entdeckte man noch eine Reihe weiterer, bisher unbekannter HVA-VDCCs, unempfindlich gegenüber Dihydropyridinen und mit einer Leitfähigkeit zwischen der von L-Typ und T-Typ Kanälen (siehe 1.2.2.) liegend. Da sie hauptsächlich in Neuronen exprimiert werden, bezeichnet man sie auch als N-Typ Kanäle (oder auch „Neither L Nor T“). Aufgrund unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Peptidtoxinen aus Kegelschnecken und Trichternetzspinnen unterteilte man die N-Typ Kanäle in auf ω -Conotoxin GVIA sensitive, (N-Typ) und auf ω -Agatoxin IVA sensitive (P/Q-Typ) Kanäle (P für ihr Vorkommen in Purkinje Zellen) (Ertel et al., 2000). Die erst später im Herz und Gehirn identifizierten R-Typ Kanäle werden durch diese Toxine nicht blockiert, ihr Name leitet sich von R („resistent“) ab.

1.2.2 LOW-VOLTAGE-ACTIVATED KALZIUMKANÄLE

LVA Ca^{2+} Kanäle aktivieren bereits bei einer Membranspannung positiver als -70mV . Sie besitzen nur eine geringe Leitfähigkeit; die Stromamplitude eines einzelnen Kanals ist klein („tiny“) und sie werden rasch (im Gegensatz zu HVA-VDCCs) kalziumunabhängig inaktiviert. Sie tragen daher die Bezeichnung T-Typ Kanäle („transient“). Sie sind an Schrittmacherfunktionen des Sinusknoten, an der Formierung und Fortleitung des Aktionspotentials beteiligt und kontrollieren das repetitive Feuern (Salven) von Aktionspotentialen (Chuang et al., 1998; Cribbs et al., 1998; Klugbauer et al., 1999b; Perez-Reyes et al., 1998). Wie bei den HVA-VDCCs besitzt auch das S4 Segment der α_1 -Untereinheit von LVA-VDCCs eine positive Nettoladung.

1.2.3 NOMENKLATUR VON SPANNUNGSABHÄNGIGEN KALZIUMKANÄLEN

Es sind 10 verschiedene Gene bekannt, die VDCCs der Säugetiere codieren. Mit steigender Anzahl klonierter Ca^{2+} -Kanal α_1 -Untereinheiten wuchs die Notwendigkeit einer systematischen Nomenklatur, um Verbindungen zwischen den neuen geklonten Untereinheiten und den sich aus früheren elektrophysiologischen Messungen ergebenden Klassifikationen herzustellen. 1994 wurde eine vereinheitlichte aber willkürliche Nomenklatur eingeführt, in welcher die α_1 -Untereinheiten z.B. als α_{1S} (= skeletal) für ihre Herkunft aus dem Skelettmuskel, α_{1C} (= cardiac) als Isoform aus dem Herzmuskelgewebe und alle in Folge identifizierten mit α_{1A} - α_{1E} bezeichnet wurden (Birnbaumer et al., 1994).

1999 begann ein Komitee der IUPHAR (International Union of Pharmacology) eine einheitliche rationale Nomenklatur zu entwerfen; ausgehend von der bereits vorliegenden Nomenklatur der K^+ -Kanäle (Chandy and Gutmann, 1993; Ertel et al., 2000). Diese inzwischen erweiterte und aktualisierte Nomenklatur scheint nun im umfassenden „IUPHAR Compendium of Voltage-gated Ion Channels 2005“ auf (siehe Catterall et al., 2005).

Spannungsabhängige Kalziumkanäle werden nach folgendem Schema benannt:

$$\text{Ca}_v x . y$$

Ca steht als chemisches Symbol für das vorwiegend permeierende Ion. Der physiologische Regulator (voltage) steht als Subscript. x symbolisiert die Gen-Subfamilie der α_1 -Untereinheit (1-3), und y die einzelnen Vertreter der jeweiligen Subfamilie in Reihenfolge ihrer Identifizierung (1-4). Entsprechend dieser Nomenklatur beinhaltet die Ca_v1 Subfamilie ($\text{Ca}_v1.1$ bis $\text{Ca}_v1.4$) die Untereinheiten α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} und α_{1F} , die alle L-Typ Ströme leiten. Zur Ca_v2 Subfamilie ($\text{Ca}_v2.1$ bis $\text{Ca}_v2.3$) gehören die Untereinheiten α_{1A} , α_{1B} und α_{1E} . Sie leiten Ströme vom P/Q, N- und R-Typ. Die Ca_v3 Subfamilie umfasst die Kanäle α_{1G} , α_{1H} und α_{1I} mit den dazugehörigen Strömen vom T-Typ (Catterall et al., 2005).

Die Aminosäuresequenzen der α_1 -Untereinheiten sind innerhalb einer Subfamilie zu 70% ident, die Subfamilien untereinander aber nur zu 40%. Es wird angenommen, daß die Differenzierung der Kalziumkanäle in diese drei verschiedenen Familien phylogenetisch vor sehr langer Zeit statt fand (Catterall et al., 2005).

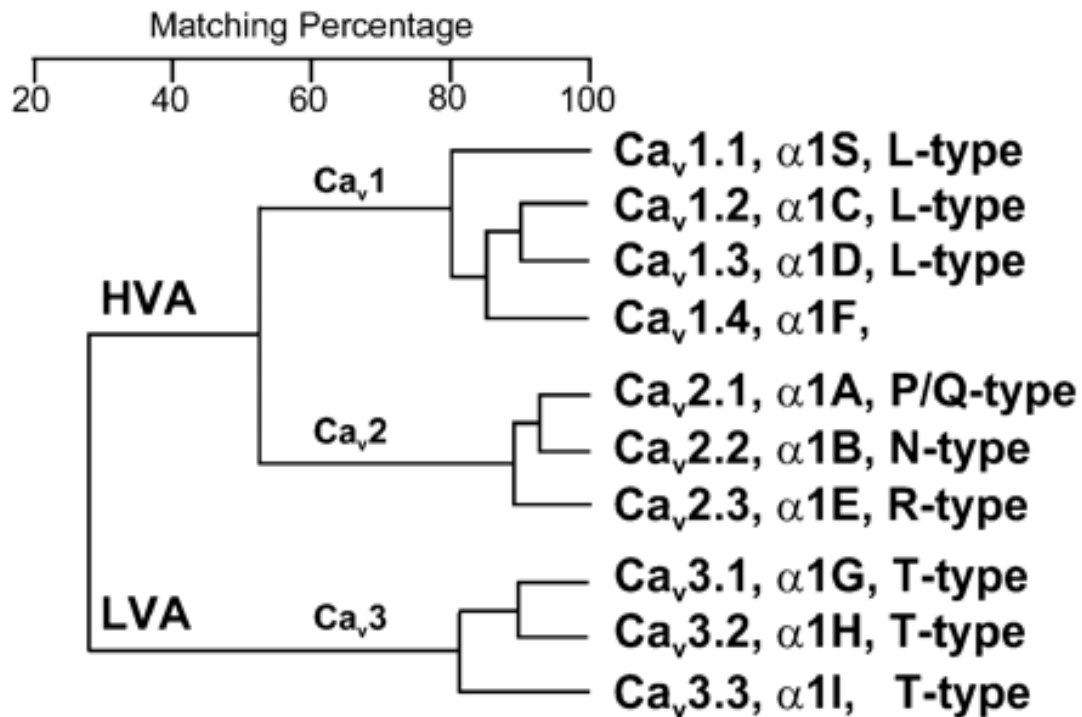


Abb.3 Evolutionsbaum von spannungsabhängigen Kalziumkanälen, basierend auf einem Alignment der putativen membranübergreifender Regionen und “Poreloops” des humanen Ca_v-Kanals. (Quelle: Perez-Reyes, 2003).

TABLE 1
Physiological function and pharmacology of calcium channels

Channel	Current	Localization	Specific Antagonists	Cellular Functions
Ca _v 1.1	L	Skeletal muscle; transverse tubules	Dihydropyridines; phenylalkylamines; benzothiazepines	Excitation-contraction coupling
Ca _v 1.2	L	Cardiac myocytes; smooth muscle myocytes; endocrine cells; neuronal cell bodies; proximal dendrites	Dihydropyridines; phenylalkylamines; benzothiazepines	Excitation-contraction coupling; hormone release; regulation of transcription; synaptic integration
Ca _v 1.3	L	Endocrine cells; neuronal cell bodies and dendrites; cardiac atrial myocytes and pacemaker cells; cochlear hair cells	Dihydropyridines; phenylalkylamines; benzothiazepines	Hormone release; regulation of transcription; synaptic regulation; cardiac pacemaking; hearing; neurotransmitter release from sensory cells
Ca _v 1.4	L	Retinal rod and bipolar cells; spinal cord; adrenal gland; mast cells	Dihydropyridines; phenylalkylamines; benzothiazepines	Neurotransmitter release from photoreceptors
Ca _v 2.1	P/Q	Nerve terminals and dendrites; neuroendocrine cells	ω-Agatoxin IVA	Neurotransmitter release; dendritic Ca ²⁺ transients; hormone release
Ca _v 2.2	N	Nerve terminals and dendrites; neuroendocrine cells	ω-Conotoxin-GVIA	Neurotransmitter release; dendritic Ca ²⁺ transients; hormone release
Ca _v 2.3	R	Neuronal cell bodies and dendrites	SNX-482	Repetitive firing; dendritic calcium transients
Ca _v 3.1	T	Neuronal cell bodies and dendrites; cardiac and smooth muscle myocytes	None	Pacemaking; repetitive firing
Ca _v 3.2	T	Neuronal cell bodies and dendrites; cardiac and smooth muscle myocytes	None	Pacemaking; repetitive firing
Ca _v 3.3	T	Neuronal cell bodies and dendrites	None	Pacemaking; repetitive firing

Tab. 1 Physiologische Funktion und Pharmakologie von Kalizumkanälen (Quelle: Catterall et al., 2005)

1.3 UNTEREINHEITEN UND FUNKTION VON „HIGH VOLTAGE ACTIVATED“ KALZIUM-KANÄLEN

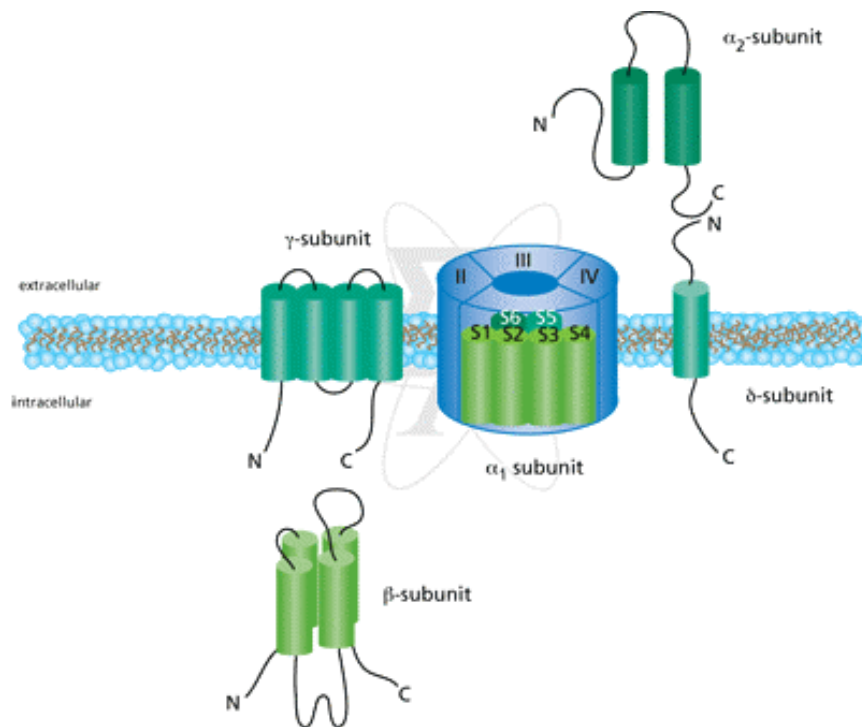


Abb.4 Spannungsabhängiger Ca_v -Kanal.

(Quelle: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Instructions/calcium_channel_structure-pore_region.Par.0001.File.tmp/calcium_channel_structure-pore_region.ppt Datum 09/03/2009)

Ca^{2+} -Kanäle sind komplexe, aus 4 bzw. 5 unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzte Proteine, die von mehreren Genen codiert werden (Catterall, 2000). Die in der Zellmembran lokalisierte α_1 -Untereinheit bildet einen funktionsfähigen Kanal.

Weitere akzessorische Untereinheiten sind die β -Untereinheit, sie liegt gänzlich intrazellulär, die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit, ein über Disulfidbrücken verbundenes Dimer und schließlich die transmembranär liegende γ -Untereinheit (Hofmann et al., 1999, Lacinova et al., 1999; Klugbauer et al., 1999a). Obwohl die unterschiedlichen akzessorischen Untereinheiten modulierend bzw. modifizierend auf die Eigenschaften des Kanalkomplexes wirken, resultiert die elektrophysiologische und pharmakologische Vielfalt primär aus strukturellen Unterschieden zwischen den α_1 -Untereinheiten.

1.3.1 DIE α_1 -UNTEREINHEIT

Mit 212-273 kDa ist sie die größte Untereinheit und für die Funktionalität des Kanals entscheidend. Sie beinhaltet die ionenleitende Pore und den Spannungssensor. Die α_1 -

Untereinheit besteht aus 1870 bis 2420 Aminosäuren. Hydrophobizitätsanalysen ergaben eine transmembranäre Topologie der 4 homologen Domänen, die sich wiederum aus je 6 transmembranären α -helikalen Segmenten (zu jeweils aus circa 20 Aminosäuren bestehend) zusammensetzen. Die S4 Segmente (Spannungssensoren) besitzen 5-6 positiv geladene Arginine bzw. Lysine und tragen dadurch eine positive Nettoladung (Lacinova, 2005).

Die α_{1C} -Untereinheit wird in Herz- und glatten Muskelzellen sowie in neuronalen und endokrinen Zellen exprimiert. Das humane Gen für die α_{1C} -Untereinheit ist in der distalen Region von Chromosom 12p13 lokalisiert (Schultz et al., 1993). Es besteht aus 44 invariablen und mehr als 6 alternativen Exons (Soldatov, 1994). Die α_1 Untereinheit des kardialen Typs (α_{1C-a}) (Mikami et al., 1989) und des glatten Muskel-Typs (α_{1C-b}) (Biel et al., 1990) haben eine zu 95% idente Aminosäuresequenz und unterscheiden sich an nur 4 Sequenzabschnitten. Alternative Spleissvarianten von Exon 8, welches für das 1S6 Segment codiert, sind teilweise für die unterschiedliche DHP Empfindlichkeit verantwortlich (Welling et al., 1997).

1.3.2 DIE $\alpha_2\delta$ -UNTEREINHEIT

Die 4 bekannten $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten ($\alpha_2\delta$ -1, $\alpha_2\delta$ -2 $\alpha_2\delta$ -3 $\alpha_2\delta$ -4) werden von 4 Genen codiert (Davies et al., 2007), wobei α_2 und δ jeweils das gemeinsame Produkt eines Gens sind, das als Pro-Protein translatiert und postranslational geschnitten wird (De Jongh et al., 1990; Jay et al., 1991). Der transmembranäre δ Anteil verankert α_2 über ein einziges putativ transmembranäres Segment an die Membran über Disulfidbrücken zwischen Cysteinen beider Proteine (Klugbauer et al., 2003). Alle $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten besitzen hydrophobe C-terminale Regionen von denen angenommen wird, dass sie die einzige transmembranären Regionen des Proteins sind. Die putativen zytoplasmatischen Reste sind nur zwischen 1 und 15 Aminosäuren lang, es sind bisher keine Funktionen dieser Sequenz im „Signaling“ bekannt. Sowohl α_2 als auch δ liegen in hoch glykosylierter Form vor. Topologie-Untersuchungen mit Antikörpern sowie trunkierten $\alpha_2\delta$ -1 Konstrukten zeigten, dass sowohl α_2 -1 als auch α_2 -2 gänzlich extrazellulär lokalisiert sind (Davies et al., 2007).

Während $\alpha_2\delta$ -1 vor allem im humanen Skelettmuskel, aber auch in vielen anderen Geweben exprimiert wird, ist die Expression der anderen $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten auf spezifische Gewebe begrenzt (Davies et al., 2007). $\alpha_2\delta$ -2 liegt vor allem im Cerebellum vor und dort vor allem in den Purkinje Zellen und in geringeren Mengen z.B im Hippocampus oder Striatum (Barclay et al., 2001; Cole et al., 2005; Brodbeck et al., 2002). Die Expression von $\alpha_2\delta$ -2 ist oft mit GABA-gesteuerten Neuronen assoziiert (Cole et al., 2005). $\alpha_2\delta$ -3 wird im Gehirn exprimiert, $\alpha_2\delta$ -3-mRNA wurde im humanen Herz- und Skelettmuskel ebenfalls identifiziert (Gong et al.,

2001). Die Verteilung von $\alpha_2\delta$ -4 ist auf einige endokrine Gewebe beschränkt und wird in spezifischen Zellen der Nebeniere und Hypophyse exprimiert (Qin et al., 2002). Strukturanalysen ergaben, dass die α_2 Domäne essentielle Elemente für die Kanalstimulation beinhaltet und δ , Regionen, die wichtig sind für die Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung, steady-state Inaktivierung sowie die Modulation der Inaktivierungskinetik (Klugbauer et al., 2003).

Der genaue Mechanismus, wie die $\alpha_2\delta$ die α_1 -Untereinheit beeinflusst, ist nicht gänzlich geklärt. Ein möglicher Weg ist der über einen effizienteren Transport der α_1 -Untereinheit an die Zellmembran (siehe z.B. Shistik et al., 1995). Alle $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten verfügen im extrazellulären Abschnitt des Proteins über eine „von Willebrand factor type A“ (VWA) Domäne. Deren Struktur besitzt ein sogenanntes MIDAS Motiv (metal ion adhesion site), das in Abhängigkeit von divalenten Kationen, Interaktionen zwischen der VWA Domäne und ihren Liganden vermittelt. Davies und Mitarbeiter (Canti et al., 2005) konnten zeigen, dass ein intaktes MIDAS Motiv essentiell für die „trafficking“ Funktion der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit ist. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass $\alpha_2\delta$ in einer Metallionen-abhängigen Art und Weise an einen Proteinliganden bindet und so das „trafficking“ der α_1 -Untereinheit fördert. Wahrscheinlich assoziiert $\alpha_2\delta$ im ER mit der α_1 -Untereinheit. Für den Transport an die Plasmamembran könnte die Interaktion des MIDAS Motivs mit einem extrazellulären loop der α_1 – Untereinheit beiteiligt sein (Davies et al., 2007).

Die Koexpression der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit führt zu einer erhöhten Ladungsbewegung während der Aktivierung des Kanals (Bangalore et al., 1996; Qin et al., 1998) und zu einer höheren maximalen Leitfähigkeit der $\text{Ca}_v1.2$ Kalziumkanäle (Bangalore et al., 1996), jedoch nicht der $\text{Ca}_v2.3$ Kanäle (Qin et al., 1998). Koexpression der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit mit den Untereinheiten α_1 und β verschiebt die Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung in hyperpolarisierte Richtung, beschleunigt die Stromkinetik und vergrößert die Stromamplitude (Singer et al., 1991; De Waard et al., 1995). Shirokov (1998) zeigte, dass $\alpha_2\delta$ den Übergang der α_{1c} Kanäle in den langsam inaktivierten Zustand beschleunigt und die Wiederkehr aus dem inaktivierten Zustand („recovery“) verlangsamt. (Siehe auch Übersichtsarbeit Lacinova, 2005).

1.3.3 DIE β -UNTEREINHEIT

Die β -Untereinheit mit 50-72 kDa liegt intrazellulär und wird von 4 gewebsspezifischen Genen (CACNB1, CACNB2, CACNB3, CACNB4) codiert, die wiederum alternativem Spleissen unterliegen (Hofmann et al., 1999). Die Primärsequenz besteht aus 3 variablen

(V1,V2,V3) und zwei konservierten (C1,C2) Domänen in folgender Anordnung: V1-C1-V2-C2-V3. Das funktionelle Kernstück („core“) bilden C1-V2-C2 (Van Petegem and Minor, 2006). $\text{Ca}_v\beta$ besitzen Strukturelemente der MAGUK (membrane-associated guanylate kinases) Proteine. Sie bilden wie diese SH3 (Src homology 3 domain) Domänen und NK (nucleotide kinase) Domänen, unterscheiden sich aber unter anderem durch deren relative Orientierung oder das Fehlen anderer essentieller MAGUK Domänen (Van Petegem and Minor, 2006).

Koexpression der β - mit der α_1 -Untereinheit erhöht die Stromamplitude (Singer et al., 1991). Es wird angenommen, dass die β -Untereinheit einen Chaperon-Effekt ausübt und somit die Expressionsdichte funktionsfähiger Kanäle an der Plasmamembran beeinflusst (Yamaguchi et al., 1998), bzw. das Öffnen der Pore erleichtert (Neely et al., 1993; Josephson and Varadi, 1996; Kamp et al., 1996). Untersuchungen haben gezeigt, dass die α_1 -Untereinheit ohne Koexpression des β -Proteins vorrangig im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert (Gerster et al., 1999; Bichet et al., 2000).

$\text{Ca}_v\beta$ Unterheiten von HVA Kanälen verschieben die Aktivierungskurve in die hyperpolarisierte Richtung (Birnbaumer et al., 1998). Mit Ausnahme von β_{2a} im Rattenhirn führt die Koexpression mit der β -Untereinheit zu einer Beschleunigung der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik sowie zu einer Verschiebung der "steady state" Inaktivierungskurve in Richtung hyperpolarisierter Membranspannung (Hofmann et al., 1999). Die Interaktionsstelle zwischen der β - und α_1 -Untereinheit bildet eine Domäne innerhalb der α_1 -Untereinheit (AID, α_1 -Interaktionsdomäne, Pragnell et al., 1994) und ist innerhalb der HVA Kanäle stark, in LVA Kanälen hingegen nur schwach konserviert (Arias et al., 2005). Dieses aus 18 (mit 9 konservierten) Aminosäuren bestehende Motiv (428QQ-E—L-GY—WI---E445) ist auf der ersten zytoplasmatischen Schleife zwischen den Domänen I und II auf den α_1 -Untereinheiten lokalisiert (Witcher et al., 1995). Die Kristallstruktur des $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ -Innenteils („core“) allein und in Komplex mit der AID zeigte, dass nicht (wie zunächst vermutet) die β -Interaktionsdomäne (BID), sondern ein konservierter hydrophober Abschnitt, die sogenannte „ α -binding pocket“ (ABP), der Interaktionspartner von Seiten der β -Untereinheit ist (Van Petegem et al., 2004).

1.3.4 DIE γ -UNTEREINHEIT

Bekannt sind 8 Gene die für die γ -Untereinheit codieren (CACNG1-CAGNG8) (Black, 2003). Die ursprünglich aus dem Kaninchenskelettmuskel isolierte γ_1 -Untereinheit besteht aus 222 Aminosäuren (Bosse et al., 1990; Jay et al., 1990). γ -Untereinheiten besitzen vier putative transmembranäre Helices mit intrazellulär lokalisierten Amino- und Carboxytermini

(Hofmann et al., 1999). γ_2 besitzt zu 25% Sequenzidentität mit der γ_1 -Untereinheit des Skelettmuskels und wird unter anderem im Cerebellum, Bulbus Olfactorius, zerebralen Kortex und Teilen des Hippocampus exprimiert (Letts et al. 1998). Die γ -Untereinheiten 2,3,4,8 sind mit AMPA Glutamaterezeptoren assoziiert (Tseng et al., 2006).

An L-Typ Kanälen hat die γ -Untereinheit einen modulierenden Effekt auf die Stromamplitude sowie auf die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik (Klugbauer et al., 2000). Koexpression der neuronalen γ -Untereinheiten mit α_{1A} induziert eine Verschiebung der "steady state" Inaktivierung in hyperpolarisierte Richtung und könnte die Verfügbarkeit der Kalziumkanäle bei einem neuronalen Ruhepotential von -70mV reduzieren (Klugbauer et al., 2000).

1.4 FUNKTIONELLE DOMÄNEN DER α_1 -UNTEREINHEIT

1.4.1 PORE UND SELEKTIVITÄTSFILTER

Ein Teil der Porenstruktur des Kalziumkanals wird durch eine Linkersequenz ("loop"), die jeweils die beiden transmembranären Segmente S5 und S6 aller vier Domänen miteinander verbindet, gebildet. Es wird angenommen, dass diese sogenannte P-Region die äußere Hälfte der Membran durchzieht und Teil des äußerern Eingangs der Pore ist. In Analogie zur Kristallstruktur von KcsA (Doyle et al., 1998), einem strukturell verwandten Kaliumkanal mit zwei transmembranären α -Helices (ähnlich den S5 und S6 Segmenten des Kalziumkanals) hat die geschlossene Pore von Ca_v wahrscheinlich die Form eines auf dem Kopf stehenden „Teepees“ (Beyl et al., 2007). Die Helices der vier S6 Segmente formen demnach die Pole dieses Teepees, die zur Membraninnenseite aufeinander zulaufen, sich in der „bundle crossing region“ kontaktieren und die Pore verschließen.

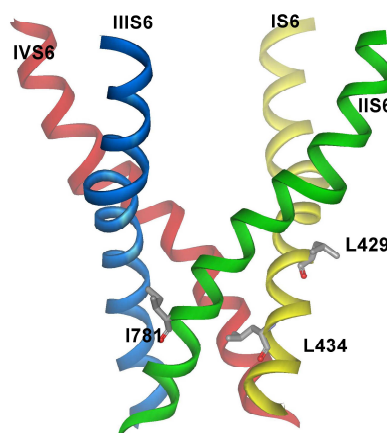


Abb.5 Seitenansicht der S6 Segmente ("ribbon representation") der geschlossenen Konformation von $\text{Ca}_v1.2$ IS6:gelb, IIS6: grün, IIS6: blau, IVS6: rot; Aminosäuren L429, L434 und I781 sind hervorgehoben (Quelle: Stary, 2007).

Mutationsanalysen an α_{1C} und α_{1A} Untereinheiten (Tang et al., 1993; Yang et al., 1993) zeigten, dass bei HVA-Kalziumkanälen vier Glutaminsäurereste (E413, E731, E1140 und E1441 (Nummerierung entsprechend der Sequenz von α_{1C-b} ; Biel et al., 1990)) in der P-Region entscheidend für die Ionenselektivität sind. Diese Reste bilden zusammen eine hochaffine Bindungsstelle für divalente Kationen, wobei sie jedoch je nach Domäne, in der sie positioniert sind, in unterschiedlichem Ausmaß zur Kalziumselektivität und Permeationsgeschwindigkeit beitragen (Tang et al., 1993; Parent and Gopalakrishnan, 1995; Ellinor et al., 1995). LVA-Kanäle besitzen Aspartate an Stelle der Glutamate in den Domänen III und IV, was wahrscheinlich für die unterschiedliche Ionenselektivität verantwortlich ist (Perez-Reyes et al., 1998; Cribbs et al., 1998; Klugbauer et al., 1999b).

1.4.2 BESONDERHEITEN IM SCHLIEßVERHALTEN (SPANNUNGSABHÄNGIGE UND KALZIUM-ABHÄNGIGE INAKTIVIERUNG)

1.4.2.1 SPANNUNGSABHÄNGIGE INAKTIVIERUNG

VDCC's können in unterschiedlichen Konformationen verweilen: geschlossen (Ruhezustand), offen (aktiviert) und in mehreren inaktivierten Zuständen (Hering et al., 2000). Der Übergang in den inaktivierten Zustand kann sowohl vom offenen als auch vom geschlossenen Zustand erfolgen (Patil et al., 1998; Sokolov et al., 2000). Kalziumkanäle können, je nach Subtyp, durch drei unterschiedliche Konformationsänderungen inaktivieren. Während die Aktivierung innerhalb von Millisekunden abläuft, inaktivieren VDCC's in einem schnellen (10-100ms) und einem langsamen (Sekunden) spannungsabhängigen Prozess (Hering et al., 2000; Sokolov et al., 2000; Shi and Soldatov, 2002). Die Inaktivierung wird durch die intrinsischen Eigenschaften der porenbildenden α_1 -Untereinheiten und deren Interaktionen mit anderen Kanaluntereinheiten bestimmt. Je nachdem wodurch die Inaktivierung ausgelöst wird, spricht man von spannungsabhängiger Inaktivierung (voltage dependent inactivation VDI) oder kalziumabhängiger Inaktivierung (calcium dependent inactivation CDI). Funktionelle Untersuchungen konnten zwei Kanalsequenzen identifizieren, die bei VDI und CDI wahrscheinlich eine Rolle spielen: eine für CDI essentielle C-terminale Bindungsstelle für Calmodulin und ein für VDI wichtiger, die Domänen I und II verbindender, „Loop“ (Cens et al., 2006).

Die schnelle Inaktivierung von Shaker K^+ Kanälen läuft über einen „ball and chain“-Mechanismus ab. Während des Öffnens dringt ein Cluster („ball“) von ~20-Aminosäuren des N-Terminus, der über eine ca 50 Reste lange Sequenz („chain“) mit S6 verbunden ist, in das innere Vestibül der Pore, verschließt diese und inaktiviert so den Kanal. Die Entfernung der

"ball"- Region führt zu einer ausgeprägten Verlangsamung der spannungsabhängigen Inaktivierung (Stotz et al., 2004). In Na^+ Kanälen fungieren intrazelluläre Linker zwischen den Domänen III und IV der α_1 Untereinheit als „hinged lid“, das die Pore blockiert und den Kanal inaktiviert (West et al., 1992). Gerichtete Mutagenese dreier hydrophober Aminosäuren (IFM-Motiv) in dieser Linkerregion zu Glutamin hebt die schnelle Inaktivierung auf (West et al., 1992). Die schnelle spannungsabhängige Inaktivierung von Kalziumkanälen ähnelt jener von Natrium- und Kaliumkanälen. Sie scheint einerseits durch ein putatives "Inaktivierungs Gate" und andererseits durch Regionen auf S6 Segmenten determiniert zu sein (Hering et al., 2000). Natürlich auftretende Mutationen (z.B. bei FHM oder Ataxie) in den Segmenten IIS6 und IVS6 (Kraus et al., 1998; 2000), die die Inaktivierungskinetik von $\text{Ca}_v2.1$ Kanälen verändern, oder künstlich eingeführte Punktmutationen in den Segmenten IIS6, IIIS6 und IVS6 (Hering et al., 1996, 1998; Berjukow et al., 2001; Stotz and Zamponi, 2001), die zu Veränderungen in der Inaktivierung führen, geben jedoch wenig Hinweise auf den molekularen Mechanismus (vergleiche Hering et al., 2000; Stotz and Zamponi, 2001). Untersuchungen zu molekularen Angriffspunkten von Kalziumkanalblockern (Hockermann et al., 1997; Striessnig et al., 1998; siehe auch Zhang et al., 1994) zeigten, dass wahrscheinlich alle vier S6 Segmente der porenbildenden α_{1C} -Untereinheit zum Inaktivierungsprozess beitragen. Hering et al. (2000) konnten zeigen, dass Substitutionen von Aminosäuren in der inneren Porenregion starken Einfluss auf die Inaktivierung haben.

Erste Hinweise auf die Involvierung einer zytoplasmatischen Schleife (Linkerregion) kamen von Bourinet et al. (1999). Die Einführung eines einzigen Valinrestes in die I-II Linkerregion verlangsamte die Inaktivierungsgeschwindigkeit und wandelte einen Q-Typ Kanal in einen P-Typ-Phänotyp um. Weitere Mutageneseuntersuchungen, die auf den Einfluß der I-II Linkerregion hinweisen (Herlitze et al., 1997; Berrou et al., 2001), sowie die Tatsache, dass die Überexpression des I-II Linkerpeptides die Inaktivierung von $\text{Ca}_v2.1$ Kanälen beschleunigt (Cens et al., 1999), stützen die Hypothese, dass diese als zytoplasmatischer "hinged lid" Gatingpartikel fungieren könnte (Stotz et al., 2004). Die S6-Segmente könnten, ähnlich wie bei Natriumkanälen (siehe McPhee et al., 1994) eine Andockstelle dafür bilden.

Soldatov et al. (1998) und Sandoz et al. (2001) zeigten, dass auch der C-Terminus der α_1 - Untereinheit, der in die kalziumabhängige Inaktivierung involviert ist, die spannungsabhängige Inaktivierung beeinflusst. Die Trunkierung der C-terminalen Region beschleunigt die Inaktivierung von $\text{Ca}_v1.2$ Kanälen (Stotz et al., 2004). Stephens et al. (2000) postulierten einen Einfluss N-terminaler Abschnitte auf die Inaktivierung.

Die akzessorische β -Untereinheit, die mit der I-II Linkerregion interagiert (Pragnell et al., 1994), ist ebenfalls ein wichtiger Regulator der spannungsabhängigen Inaktivierung von HVA Kanälen (Lacerda et al., 1991). Koexpression von HVA Kanälen mit der $\beta 2$ Untereinheit verlangsamt die Inaktivierung, gefolgt von $\beta 4$, während $\beta 1a$ - und $\beta 3$ Untereinheiten eine schnelle Inaktivierung fördern (Hering et al., 2000).

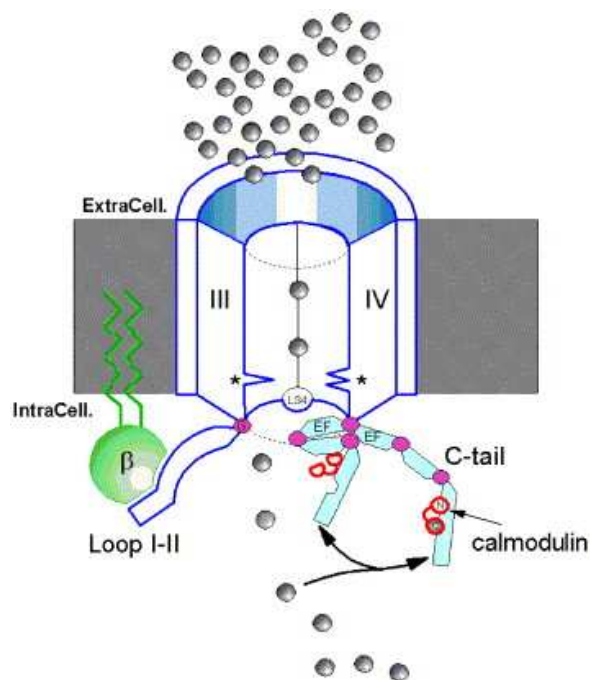


Abb. 6 Schematische Darstellung eines HVA Ca^{2+} Kanals, mit den in Ca^{2+} und spannungsabhängige Inaktivierung involvierten Sequenzen und Untereinheiten. Zu sehen sind die Domänen III und IV, die loops I-II und III-IV der C-Terminus, die $\beta 2$ Untereinheit, Apocalmodulin und Ca^{2+} -aktiviertes Calmodulin an seinem c-terminalen Lappen. Der C-Terminus ist in zwei funktionellen Zuständen dargestellt: bei einer Ruhezustand Ca^{2+} Konzentration im blockierenden oder bei hoher Ca^{2+} Konzentration VDI zulassend. * gibt die Position der in VDI oder CDI involvierten Aminosäuren der S6 Segmente am unteren Ende der Pore an (Quelle: Cens et al., 2006).

Die überwiegende Zahl der Untersuchungen zeigt, dass der Inaktivierungsmechanismus von Ca_v dem anderer spannungsabhängiger Kanäle ähnelt, die molekularen Determinanten jedoch

über das gesamte Kanalprotein verteilt sind (Hering et al., 2000). In einem von Stotz et al. (2004) postulierten Modell ändern die S6 Segmente beim Öffnen des Kanals ihre Konformation und legen dadurch Andockstellen für das "Inaktivierungs Gate", das von der I-II Linkerregion gebildet wird, offen. Es existiert jedoch eine Reihe weiterer Hypothesen zur Frage, wie strukturelle Veränderungen in den unterschiedlichen Teilen des Kanals zur Inaktivierung beitragen. Diskutiert wird, dass Störungen in der "Teepee" Struktur der vier S6 Segmente eine entscheidende Rolle spielen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass Domänenlinker (speziell der I-II Linker) in $\text{Ca}_v 1.2$ und $\text{Ca}_v 2.1$ Kanälen Teil eines separaten "Inaktiverungs Gates" darstellen und den inneren Teil der Pore verschließen (Hering et al., 2000).

1.4.2.2 KALZIUMABHÄNGIGE INAKTIVIERUNG

Brehm und Eckert (1978) stellten die Hypothese auf, dass das Schließen von Kalziumkanälen durch intrazelluläres Kalzium ausgelöst wird. Dieser Prozess wird als kalziumabhängige Inaktivierung bezeichnet. Dieser Hypothese zufolge ist der Strom von Ca^{2+} durch die Kanäle selbstlimitierend. Wenn Ca^{2+} -Kanäle lang genug öffnen, schliessen sie und bleiben refraktär. Kalziumabhängige Inaktivierung (calcium dependent inactivation CDI) ist typisch für HVA-

Kanäle. L-Typ Kanäle (mit Ausnahme von $\text{Ca}_v1.4$, Mc.Rory et al., 2004) zeigen eine beschleunigte Inaktivierungskinetik bei ansteigender intrazellulärer Kalziumkonzentration (Stotz et al., 2004). Erste Beweise für CDI wurden in Experimenten an Protozoen, Arthropodenmuskeln und Molluskenneuronen erbracht (Hille, 1984). Nach heutigem Stand sind mehrere Strukturen an der kalziumabhängigen Inaktivierung beteiligt und umfassen den C-Terminus, den N-Terminus sowie Teile der Kanalpore, den I-II Linker und den Kalziumsensor Calmodulin (siehe Übersichtsarbeit Cens et al., 2006).

L-Typ Kalziumkanäle besitzen zwei „feedback“ Mechanismen, die durch die Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin zustande kommen: kalziumabhängige Inaktivierung („calcium dependent inactivation“ CDI) und kalziumabhängige „facilitation“ („calcium dependent facilitation“ CDF) (Lian et al., 2007). CDI bestimmt die Länge des kardialen Aktionspotentials, und CDF trägt zur „positive force frequency relationship“ bei (Pitt et al., 2001). Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus trugen Arbeiten der Gruppe von David Yue (2003, 2004) bei, die zeigten, dass dieser Prozess durch die Interaktion von Calmodulin mit einer Sequenz im C-terminalen Ende des Kalziumkanals zustande kommt.

Calmodulin (CaM) ist ein ubiquitäres Adapterprotein, das von drei separaten Chromosomen transkribiert wird (Clapham, 2007) und durch die Veränderung der Aktivität zahlreicher Kanäle eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Funktionen spielt (Kasri et al., 2004). Es besteht aus einer flexiblen α -Helix, die zwei globuläre Lappen am C- und N-Terminus miteinander verbindet (Yang and Poovaiah, 2003). In jedem Lappen befinden sich EF-Hand Domänen (benannt nach den E und F Regionen von Parvalbumin) - zwei Helix-Turn-Helix Motive, in denen negativ geladene Sauerstoffatome Ca^{2+} -Ionen innerhalb einer zwölf Aminosäuren langen Schleife binden können (Clapham, 2007; Yang and Poovaiah, 2003). Diese Bindung von Ca^{2+} geht mit einer Konformationsänderung einher, bei der an beiden Lappen hydrophobe Reste exponiert werden, die die Ca^{2+} Sensoraktivität von CaM triggern und in zahlreichen Protein-Protein Interaktionen involviert sind (Clapham, 2007). Calmodulin scheint sich wie eine Kanaluntereinheit zu verhalten (Kasri et al., 2004) und ist schon vor dem Ca^{2+} Eintritt mit dem Kanal präassoziiert (Mori et al., 2004). Eine sogenannte „calmodulin tethering site“ ist verantwortlich für das Andocken von kalziumfreiem Calmodulin (Apocalmodulin, apoCaM) im inneren Teil der Kanalpore. Sie beinhaltet die Sequenzabschnitte des IQ-Motivs sowie weitere Abschnitte zwischen den IQ und EF Domänen, die in der Lage sind, Apocalmodulin zu binden. Einige davon binden an beiden Lappen von Calmodulin, andere nur am N-terminalen Lappen. Bei L-Typ Kalziumkanälen bildet das IQ-Motiv Kontakte mit beiden Lappen von Ca^{2+} CaM (Lian et al., 2007). Kontaktstellen an

apoCaM für die Bindung an den Kanal befinden sich ausschließlich auf dessen C-terminalem Lappen. Behindert man die oben beschriebenen Bindungstellen, führt dies zu einem kompletten Verlust von CDI, und es tritt rasch VDI auf (Cens et al., 2006). Im kardialen $\text{Ca}_v1.2$ Kanal wurde eine Bindung von Calmodulin auch am N-Terminus der α_1 -Untereinheit nachgewiesen. Diese findet allerdings nur bei Kalziumkonzentrationen unter $1\mu\text{M}$ statt, was darauf schließen lässt, dass der N-Terminus keine „tethering site“ für freies Calmodulin sondern vielmehr für das aktivierte kalziumgebundene Calmodulin darstellt (Ivanina et al., 2000). Ein Entfernen der Sequenz führt zur Unterbrechung von CDI und Veränderungen von VDI (Ivanina et al., 2000).

1.6 STRUKTURDETERMINANTEN DER AKTIVIERUNG VON KALIUM- UND NATRIUMKANÄLEN

1.6.1 KRISTALLSTRUKTUR VON KCSA UND $\text{K}_v1.2$

Kristallstrukturen verschiedener bakterieller Kaliumkanäle wie KcsA, MthK, K_vAP , KirBac lieferten wichtige Informationen über den molekularen Mechanismus des Gatings (Xie et al., 2005). Erste Einblicke in die Konformation einer geschlossenen Kanalpore lieferte die Kristallstruktur des prokaryotischen Kaliumkanals KcsA (Doyle et al., 1998). Er besteht aus 4 identen Untereinheiten mit jeweils zwei transmembranären Helices (TM1, TM2), die die ionenleitende Pore bilden und vergleichbar mit den Segmenten S5 und S6 spannungsabhängiger Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle sind. Die TM2-Helix verläuft von der Zellaußenseite nach Innen und kleidet einen Hohlraum innerhalb des Selektivitätsfilters und der „Gatingregion“ am inneren Ende der Pore aus (Armstrong, 2003).

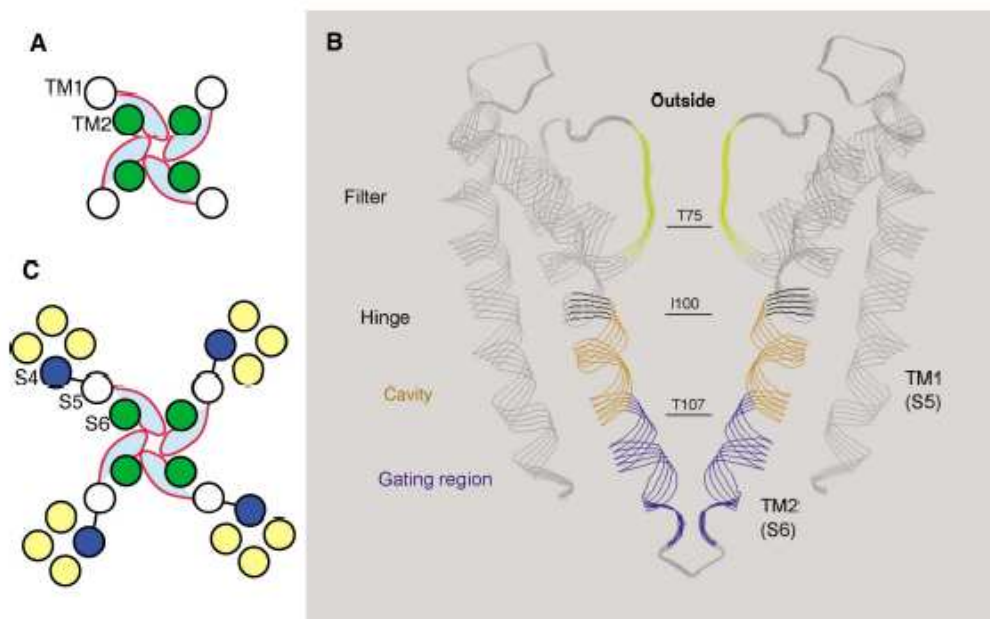


Abb. 7 KcsA Kanal. Er besteht aus vier identen Untereinheiten die um eine zentrale Pore angeordnet sind (A). Abbildung B zeigt zwei Untereinheiten (von der Röntgen-Kristallographie-Analyse, Doyle et al. 1998). Die Achse der Pore liegt in der Ebene der Seite. Jede Untereinheit besitzt zwei transmembranäre Segmente, TM1

(weisse Kreise) und TM2 (grüne Kreise). Das Selektivitätsfilter ist gelb markiert, ein als „Gating Hinge“ fungierender Glycin-Rest ist schwarz gekennzeichnet, eine große wassergefüllte Höhle ist orange und die „gating“ Region an der die TM2 Helices konvergieren ist blau dargestellt. Im komplexeren spannungsabhängigen Kanal (C) sind 6 transmembranäre Segmente zu sehen. Segmente S5 und S6 (analog zu TM1 und TM2) bilden den Kern des Kanals. Die vier zusätzlichen transmembranären Segmente S1 bis S4 vermitteln Spannungssensitivität (Quelle: Armstrong, 2003).

Ein potentiell „Gate“ wurde in einer Region nahe dem inneren Ende der Pore, an der die TM2 Segmente zusammenlaufen, identifiziert (Doyle et al., 1998). In dieser Region können drei Aminosäuren Thr107, Ala111 und Val115 „hydrophobe seals“ bilden. Hydrophobe Methylenreste dieser Aminosäuren sind hier so dicht gepackt, dass nicht einmal ein dehydriertes K^+ Ion hindurchwandern kann (Armstrong, 2003). Es ist unbekannt, ob hydrophobe Interaktionen dieser Aminosäuren zur Stabilisierung des geschlossenen Zustands von KcsA beitragen (Hering et al., 2008). Es existiert keine Kristallstruktur des offenen Zustands von KcsA, jedoch dient die Kristallstruktur eines ähnlichen 2TM Kanals - Mthk (Jiang et al., 2002) - als Modell für den offenen Zustand der Pore. Mthk besitzt am zytoplasmatischen Ende eine große Ringstruktur die Kaliumionen bindet und dabei die TM2 Helices auseinander zu ziehen scheint (Armstrong, 2003). Ein Übereinanderlegen der Kristallstrukturen beider Kanäle zeigt, dass der innere Teil des Segments während des Übergangs vom offenen in den geschlossenen Zustand an einem „Glycinhinge“ rotiert (Armstrong, 2003). Dieser Glycinrest in Position G83 in MthK und G99 in KcsA Kaliumkanälen (Jiang et al., 2002) ist in vielen Ionenkanälen konserviert (Hering et al., 2008).

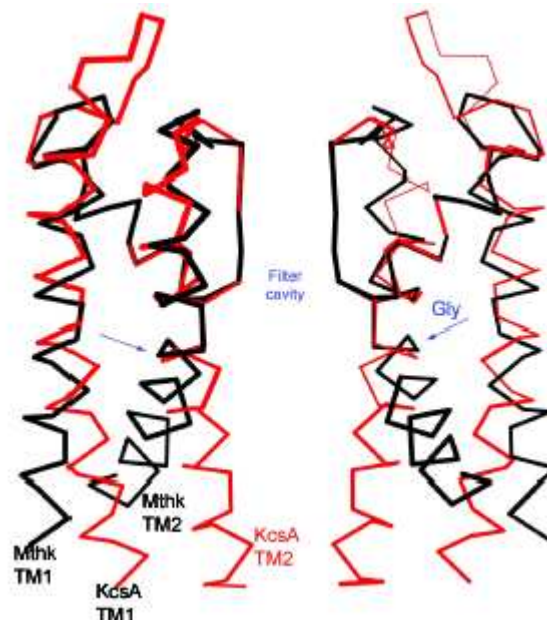


Abb. 8 Wahrscheinliche Konfiguration des offenen und geschlossenen „Gates“. Der KcsA Kanal (rot), er dient als Modell für den geschlossenen Zustand und der Mthk Kanal (schwarz), ein Modell für den offenen Zustand, sind übereinandergelegt zu sehen. (Quelle: Armstrong, 2003)

Zhao et al. (2004) untersuchten, ob der für Kaliumkanäle beschriebene Helix-Knick-Mechanismus auch bei der Aktivierung des 6TM spannungsabhängigen Natriumkanals von *Bacillus Halodurans* (NaChBac; Ren et al., 2001) eine Rolle spielt. Die Substitution des Glycinrestes in Position 219 (entsprechend Gly83 in MthK) durch Prolin verschiebt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung um ~50mV in negativer Richtung und verlangsamt gleichzeitig die Deaktivierung um das 2000-fache. Zhao et al. (2004a) nehmen ein „Helix bending“ an dieser Position und eine Stabilisierung der Konformation des offenen Zustands durch Einführung des Prolinrestes an. Man geht davon aus, dass alle vier S6 Segmente in einem gemeinsamen Schritt durch diesen Knick in den offenen Zustand übergehen und dieser Mechanismus elementar für 2TM- und die meisten 6TM Ionenkanäle ist (Zhao et al., 2004a). Yifrach und MacKinnon's (2002) Alaninscan am Shaker-Kaliumkanal ergab eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung von bis zu -35mV. Durch diese Methode der „mutational perturbation“ identifizierten sie „hot spots“ der für das gating sensitiven Aminosäuren in den Segmenten S5 und S6.

1.6.2 STRUKTURELEMENTE DER AKTIVIERUNG VON KALZIUMKANÄLEN

Strukturelemente, die die unterschiedliche Spannungsabhängigkeit der verschiedenen Familien der Kalziumkanäle bedingen, sind weitgehend unbekannt. Tanabe et al. (1991) führten anhand von Kanal-Chimären erste Untersuchungen zur Identifizierung von Struktur determinanten in der α_1 -Untereinheit von Ca_v1 Kanälen durch. Konstrukte, in denen Sequenzabschnitte der schnell aktivierenden $Ca_v1.2$ α_1 -Untereinheiten („kardialer Typ“) durch Abschnitte (Domäne I) langsam aktivierender $Ca_v1.1$ α_1 -Untereinheiten („Skelettmuskeltyp“) ersetzt wurden, aktivierten langsam. Li et al. (2004) konstruierten Chimären zwischen LVA-Kanälen ($Ca_v3.1$) und HVA-Kanälen ($Ca_v1.2$) und zeigten, dass die Substitution der Domänen I, III und IV von $Ca_v3.1$ mit den korrespondierenden Domänen von $Ca_v1.2$ in HVA-Kanälen resultierte. Ersatz der Domäne II von $Ca_v3.1$ durch die korrespondierende Domäne II von $Ca_v1.2$ verschob die I-V Kurve nach rechts und beeinflusste die Aktivierungskinetik, führte aber nicht zum HVA Phänotyp. Regionen der Domäne I, die entscheidend zur Verschiebung der Spannungsabhängigkeit beitragen, beinhalten Sequenzabschnitte der Pore, aber nicht des Spannungssensors. Der modulierende Effekt von DIII hingegen wird hervorgerufen durch Unterschiede in der Sequenz des Spannungssensors (S1-S4) und S5-S6 (Li et al., 2005).

Raybaud et al. (2007) substituierten eine konservierte Region hydrophober Reste (VAVIM 1718-1722) im porenformenden Segment IVS6 von $Ca_v2.3$ durch flexible Glycine. Die

Mutanten A1719G und V1720G führten zu einer verlangsamten Aktivierung, begleitet von einer -20mV Verschiebung der Kurve, was ein Hinweis auf einen relativen Anstieg der Stabilisierung des offenen Zustands ist. Der deutlichste Effekt in $\text{Ca}_v2.3$ wurde von I701G (diese Aminosäure entspricht I781 in IIS6 von $\text{Ca}_v1.2$) ausgelöst, was ein Indiz dafür sein könnte, dass Segment IIS6 eine spezielle Rolle im Gating von Kalziumkanälen spielt. Unterschiedliche Beiträge von Aminosäuren einer unsymmetrischen Kanalpore in analogen Positionen der Segmente IS6-IVS6 sind nicht überraschend.

Untersuchungen von Nakai et al. (1994) zeigten, dass Segment IS3 und der IS3-S4 Linker entscheidend sind für die Unterschiede in der Aktivierungskinetik zwischen Kanälen vom Skelettmuskeltyp $\text{Ca}_v1.1$ und dem kardialen $\text{Ca}_v1.2$.

Garcia et al. (1997) substituierten Arginine in S4 Segmenten aller 4 Domänen eines chimären Kanals durch neutrale oder negative Aminosäuren und fanden, dass die Spannungssensoren der Domänen I und III, jedoch nicht II und IV, in der Spannungsabhängigkeit und dem zeitlichen Verlauf der Aktivierung eine wichtige Rolle spielen. Die Substitution von Prolinen, die in IS4 und IIIS4 von Kalziumkanälen konserviert sind, führte zu kürzerer Offenzeit der Kanäle, während das Einführen von extra Prolinen an entsprechende Positionen in IIS4 und IVS4 die Zeit im offenen Zustand verlängerte (Yamaguchi et al., 1999).

Zhen et al. (2005) beschrieben substantielle Veränderungen bei der Aktivierung von $\text{Ca}_v2.1$ nach Substitutionen in den S6 Segmenten und Aminosäuren in benachbarten intrazellulären Schleifen durch Cysteine. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass wichtige Aktivierungs-determinanten dieses Kanaltyps in den intrazellulären Schleifen lokalisiert sein könnten. „Cysteinaccessibility“ durch MTSET der inneren Porenregion gibt Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Architektur von $\text{Ca}_v2.1$ im Vergleich zu Kaliumkanälen.

1.5 KANALOPATHIEN VON KALZIUMKANÄLEN

Strukturelle Aberrationen innerhalb der porenformenden α_1 -Untereinheit können L-Typ Kanalopathien (L-Type Channelopathies) hervorrufen (Striessnig et al., 2004). Prominente Beispiele sind Mutationen an der retinalen $\text{Ca}_v1.4$ α_1 -Untereinheit, die zu inkompletter kongenitaler stationärer Nachtblindheit (CSNB2) führen (siehe Abschnitt 1.5.1.2). Andere Mutationen an $\text{Ca}_v1.1$ α_1 im Skelettmuskel führen zu Maligner Hyperthermie (MHT) oder Hypokalämischer Periodischer Paralyse (HPP) (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999). Ein weiteres Beispiel für einen Ca_v assoziierten Phänotyp (in „nicht L-Typ“, non-LTCCs, Catterall et al., 2003) sind Mutationen im $\text{Ca}_v2.1$, die zur "tottering mice" führen (Striessnig et al.,

2004). Ein umfassender Überblick zu Kanalopathien wird z.B. in den Übersichtsarbeiten von Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999; Pietrobon, 2002; Lorenzon and Beam, 2000; Weiergräber et al., 2008 gegeben. Hier werden nur ausgewählte Beispiele an Kanalopathien erörtert, die in unmittelbarem Bezug zur experimentellen Aufgabenstellung der Arbeit stehen.

1.5.1 L-TYP KALZIUMKANALDYSFUNKTIONEN

1.5.1.1 TIMOTHY SYNDROM

Beim Timothy Syndrom handelt es sich um eine seltene L-Typ Kalziumkanalopathie im Kindesalter, die sich in einer abnormalen Verlängerung des kardialen Aktionspotentials manifestiert und stark assoziiert ist mit Autismus, ASD (autism spectrum disorders) sowie einem weiten Spektrum an Entwicklungsstörungen. Es wurde 1992 beschrieben (Reichenbach et al., 1992; Marks et al., 1995a,b) und ist auf eine Missense-Mutation G406R am Ende des IS6 Segments, der α_1 -Untereinheit des $\text{Ca}_v1.2$ L-Typ Kalziumkanals zurückzuführen (Splawsky et al., 2004). Berret and Tsien (2008) fanden, dass diese Mutation die spannungsabhängige Inaktivierung verlangsamt und zugleich die Kinetik der kalziumabhängigen Inaktivierung beschleunigt. Die Verzögerung der spannungsabhängigen Inaktivierung wurde sowohl bei Koexpression mit der β_1 als auch mit der β_2 Untereinheit beobachtet.

1.5.1.2 CONGENITALE STATIONÄRE NACHTBLINDHEIT (CSNB2)

$\text{Ca}_v1.4$ Kanäle kontrollieren den lichtabhängigen Kalziumeinstrom in Photorezeptorzellen (Hoda et al., 2006). Im Gegensatz zu den meisten schnellen chemischen Synapsen, an denen phasische Neurotransmittersekretion stattfindet, vermitteln diese Zellen eine tonische Sekretion als Antwort auf Veränderungen des Membranpotentials (Striessnig et al., 2004). Die tonische Freisetzung wird durch unvollständige Inaktivierung von $\text{Ca}_v1.3$ bzw. $\text{Ca}_v1.4$ Kanälen und schnelle Aktivierung bei Spannungen unter -40mV ermöglicht (Koschak et al., 2003; Baumann et al., 2004; Mc Rory et al., 2004).

Photorezeptoren depolarisieren in Dunkelheit auf ein Ruhepotential von ca. -40mV, Kalzium strömt in die Zelle (Hoda et al., 2005) und triggert die tonische Freisetzung von Glutamat (Morgans et al., 2000). Dieser Prozess findet an sogenannten („Ribbon-,“) Bänder-Synapsen, an denen Ca^{2+} Kanäle geklustert vorliegen, statt (Morgans, 2000; Striessnig et al., 2004). Ein Lichtreiz lässt die Photorezeptor-Plasmamembran auf ca. -55mV (Witkovsky et al., 1997) hyperpolarisieren und reduziert die Freisetzung der exzitatorischen Neurotransmitter an den synaptischen Enden (Striessnig et al., 2004). Ein „loss of function“ der $\text{Ca}_v1.4$ Kanäle würde

daher die Neurotransmitterfreisetzung in Photorezeptoren verringern und das Signalling an Neuronen zweiter Ordnung abschwächen (Striessnig et al., 2004)

Ca_v1.4 Kanäle werden überwiegend in retinalen Neuronen exprimiert, wurden jedoch auch in Spinalganglien (Murakami et al., 2001), lymphatischen Geweben und Immunzellen identifiziert (McRory et al., 2004). Ihre Beteiligung an der retinalen Signalübertragung wird evident durch Mutationen des Ca_v1.4 Gens (CACNA1F), die zu Krankheitsbildern wie der an das X-Chromosom gekoppelten angeborenen stationären Nachtblindheit Typ 2 (CSNB2) führen (Hoda et al., 2005). Von den mittlerweile mehr als 70 bekannten (McKeown et al., 2006) CACNA1F Alterationen führen die meisten zu schwer-wiegenden, strukturellen Veränderungen, wie z.B. trunkierten α_1 -Untereinheiten, die ein Funktionieren der Kanäle unwahrscheinlich machen (Hoda et al., 2005; Bech-Hansen et al., 1998; Strom et al., 1998; Boycott et al., 2001). Die Abwesenheit eines funktionsfähigen Allels bei betroffenen Männern lässt vermuten, dass CSNB2 aus einem kompletten Verlust der Kanalfunktion resultieren kann. Klinische CSNB2-Symptome resultieren nicht nur aus einem kompletten Verlust der Kanalfunktion („loss of function“), sondern auch aus Veränderungen im Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten (inklusive „gain of function“) oder verminderter Expression mutierter Kanäle mit unverändertem Gating Verhalten (Hoda et al., 2005; Striessnig et al., 2004).

Untersuchungen von Hoda et al. (2005) an der missense Mutation G369D in Segment IS6 der Ca_v1.4 α_1 -Untereinheit zeigten eine Verschiebung der Aktivierungskurve in die hyperpolarisierte Richtung, eine verlangsamte Inaktivierung und den Verlust der kalzium-abhängigen Inaktivierung. Dieses Ergebnis deutet auf einen „gain of function“ des Kanals hin (Striessnig et al., 2004). R508Q und L1364H wiederum resultieren in einer verminderten Proteinexpressionsdichte in transfizierten tsA-Zellen, was die retinale Stromdichte herabsetzen könnte (Striessnig et al., 2004).

CSNB2 ist eine X-chromosomale Form der stationären Nachtblindheit mit variablen Ausprägungsgraden. Die Betroffenen leiden an mittlerer bis niedriger Sehschärfe, Myopie oder Nystagmus, aber eines oder mehrere dieser Symptome können fehlen (Weiergräber et al., 2008). Im Gegensatz zu CSNB1, das aus einem anderen genetischen Defekt hervorgeht, ist bei CSNB2 die Nachtblindheit nicht die Hauptstörung. Der Augenfundus ist normal, die ERG-Protokolle weisen jedoch charakteristische Alterationen auf. Während die A-Wellen normal ausgeprägt sind, sind die B-Wellen stark reduziert (Tremblay et al., 1995). Es lässt sich eine reduzierte aber noch detektierbare Stäbchen Antwort messen, die bei der kompletten Form der Nachtblindheit gänzlich fehlt. Diese ERG-Daten lassen sich mit einem Defekt der

intraretinalen Neurotransmission zwischen Photorezeptoren und Neuronen zweiter Ordnung, den Bipolarzellen erklären (Striessnig et al., 2004).

In einer Neuseeländischen Familie wurde 2005 ein neuartiges CACNA1F Allel (I745T) identifiziert, welches mit schwerer Sehbeeinträchtigung einhergeht und dem CSNB2 ähnelt. Die Ca_v1.4 Mutante zeigt einen „gain of function“ Phänotyp (Hemara-Wahanui et al., 2005). In funktionellen Untersuchungen wurden eine Verschiebung der Aktivierungskurve von -30mV, sowie eine verlangsamte Inaktivierungskinetik beobachtet.

Männliche Träger der I745T Mutation leiden u.a. an angeborenem Nystagmus und schwerer, nicht progressiver Beeinträchtigung der Sehschärfe. Weibliche Patienten leiden ebenfalls an kongenitalem Nystagmus sowie an verminderter Sehschärfe und meist starker Myopie. Betroffene Männer litten außerdem an intellektuellen Beeinträchtigungen (Autismus) (Hemara-Wahanui et al., 2005).

1.5.2 AUSGEWÄHLTE „NON L-TYPE“ KANALOPATHIEN

1.5.2.1 FAMILIÄRE HEMIPLEGE MIGRÄNE (FHM)

Seit der Identifikation des CACNA1A Gens 1996 als primären Locus für FHM (Ophoff et al., 1996), wurden 17 Mutationen auf diesem Gen identifiziert, die in allen 4 Domänen der Ca_v2.1 α_1 -Untereinheit vorkommen und wichtige Strukturen wie den Spannungssensor oder die Kanalpore betreffen (Weiss et al., 2007). Mutationen in der humanen Ca_v2.1 α_1 -Untereinheit sind mit Familiärer Hemiplegischer Migräne (FHM), episodischer Ataxie Typ2 (EA2) und der ebenfalls allelischen spinocerebellären Ataxie (SCA6) assoziiert (Pietrobon, 2002). Bei der FHM liegen ausschließlich „missense“-Punktmutationen vor (Weiss et al., 2007), die auf eine Veränderung der Kanalfunktion als pathogenen Mechanismus hindeuten, während bei EA2 Mutationen zu Veränderungen im postrationalen Spleissen oder vorzeitiger Trunkierung führen, die mit einem „loss of function“ einhergehen (Lehmann-Horn and Jurkat Rott, 1999). Im Gegensatz dazu steht SCA6 mit einer Trinukleotidexpansion in der codierenden Region (Zhuchenko et al., 1997).

Proteinsequenzvergleiche mit anderen Kalziumkanaluntereinheiten und spannungsabhängigen Natriumkanälen zeigten, dass hochkonservierte Aminosäuren von Mutationen betroffen sind, was darauf schließen lässt, dass diese wichtige Determinanten für eine normale Funktion der Ionenkanäle sind (Weiss et al., 2007).

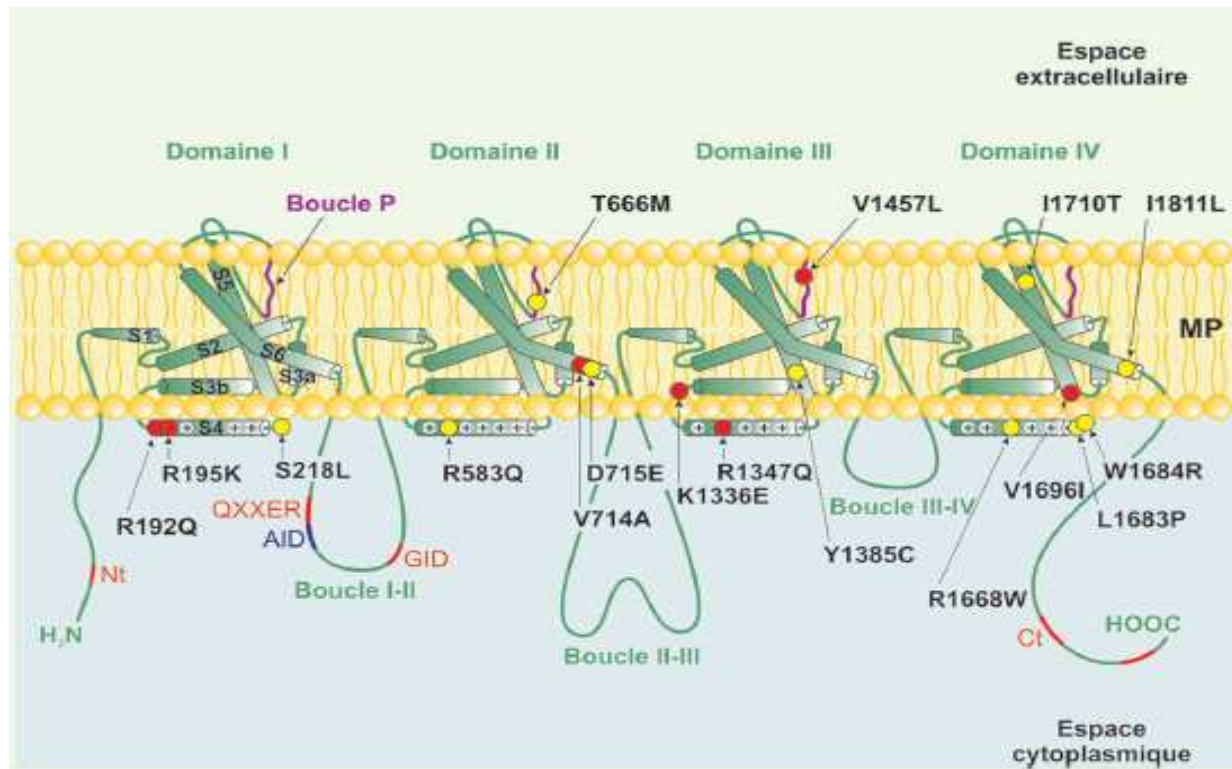


Abb. 9 Vermutliche Membrantopologie der $Ca_v2.1$ Untereinheit von P/Q-Kanälen und FHM1-assoziierte Mutationen (Quelle: Weiss N, Tournier-Lasserre E, De Waard M., 2007).

10 von 11 charakterisierten Mutationen tragen zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung in Richtung negativer Spannung bei und verursachen dadurch eine Verringerung des Schwellenpotentials und eine Erleichterung des Kanalöffnens (Weiss et al., 2007). Lehman-Horn and Jurkat-Rott, (1999) beschreiben 6 Missense-Mutationen, die entweder im Spannungssensor liegen oder mit der P-Region assoziiert sind und zur Veränderung der Spannungsabhängigkeit beim Gating und der Gatingkinetik, der Ionenleitfähigkeit und Spezifität führen. All diese Faktoren würden in einer Membrandepolarisation resultieren und eine „gain of function“ Hypothese unterstützen. I1815L (in IVS6) verschiebt $V_{0,5act}$ um -5mV (Hans et al., 1999), V714A (in IIS6) um etwa -10mV (Hans et al., 1999) oder V1457L (in der IIS5-S6 Schleife) um ~ -7 mV (Tottene et al., 2002). Müllner et al. (2004) fand in funktionellen Untersuchungen an K1336E (im IIS3-S4 Linker) und W1684R (im IVS4-S5 Linker) Verschiebungen in den Aktivierungskurven ($V_{0,5act}$) in die hyperpolarisierte Richtung von jeweils -3mv bzw. -12mV, was die Theorie eines „gain of function“ Phenotyps unterstützt. K1336E verschiebt die Inaktivierung in die hyperpolarisierte Richtung nur bei Koexpression mit β_3 (Müllner et al., 2004). Die Verschiebung der Aktivierung in die hyperpolarisierte Richtung bei KE und WR unterstützt die Hypothese von Pietrobon and Striessnig (2003), dass eine gesteigerte Aktivität der $Ca_v2.1$ Kanäle bei negativen Spannungen als pathogener Mechanismus bei FHM dient. V1696I (in

IVS5) hat zwar keinen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, aber es führt zu einer signifikanten Verlangsamung der Inaktivierungskinetik mit $\beta 1$ und $\beta 3$ (Müllner et al., 2004). Die Daten von Müllner et al. (2004) lassen darauf schließen, dass die durch Mutationen ausgelösten Veränderungen der Kanalfunktion von der Zusammensetzung der β -Untereinheiten abhängig sind.

Nicht alle Mutationen, die zu FHM oder Ataxie führen, verschieben die spannungsabhängige Aktivierung in die hyperpolarisierte Richtung. Wappl et al. (2002) beschreiben eine Mutation (G293R, in der zytoplasmatischen Schleife zwischen IS5 und IS6), die mit Episodischer Ataxie (EA2) assoziiert ist und die Aktivierungskurve ($V_{0,5act}$) um ca 6mV in die depolarisierte Richtung verschiebt.

Von Mutationen betroffene FHM-Patienten leiden unter unilateralen, migränösen Kopfschmerzen begleitet von Nausea und Photo- bzw Phonophobie. Die Episoden werden typischerweise von einer Aura eingeleitet (Weiergräber et al., 2008). Einige Familien leiden zusätzlich unter Epilepsie, retinaler Degeneration, persistenter cerebellarer Dysfunktion oder Purkinjezell-Atrophie (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999). Gegenwärtige Modelle zur Pathogenese der FHM gehen von einer Depolarisationswelle der kortikalen Neurone (Cortical Spreading Depression, CSD) aus, die anfänglich zu einer zellulären Übererregbarkeit mit spontanen Aktionspotenzialen führt und von einer lang anhaltenden Membrandepolarisation mit Unerregbarkeit gefolgt wird. Die Mutationen im CACAN1A Gen erhöhen die Konzentration von Glutamat im synaptischen Spalt und könnten die anfängliche CSD auslösen, die das trigeminovaskuläre System aktiviert und zu den trigeminal bedingten Migräne-Kopfschmerzen führt (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 2008; Weiss et al., 2007).

1.6 ZIELSTELLUNGEN

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Aufklärung der molekularen Ursachen für die von Wahanui et al. (2005) an $\text{Ca}_v1.4$ beschriebene L-Typ Kanalopathie beizutragen. Die Untersuchungen zur funktionellen Rolle von Ile745 und benachbarter Aminosäuren wurden an einem $\text{Cav}1.2$ durchgeführt, bei dem das untere Drittel von Segment IIS6 eine idente Aminosäuresequenz mit $\text{Ca}_v1.4$ aufweist (Abb.11; siehe auch Hohaus et al., 2005). Im Zentrum der Arbeit standen folgende Fragen:

1. Hat die Threoninsubstitution von I781 in $\text{Cav}1.2$ einen vergleichbaren Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung wie die Mutation I745T in $\text{Ca}_v1.4$? Kann $\text{Ca}_v1.2$ für Struktur-Funktions-Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Kanalfunktion verwendet werden ?
2. Welche Aminosäuren in Segment IIS6 haben einen besonders starken Einfluss auf die spannungsabhängige Aktivierung von $\text{Cav}1.2$? Können Schlüsselaminosäuren identifiziert werden?
3. Welchen Einfluss haben Prolinsubstitutionen in Segment IIS6 auf die Kanalaktivierung? Prolinmutationen induzieren ein „Helix bending“ ($\sim 26^\circ$) (Zhao et al., 2004a,b) wodurch in Analogie zum Gating-Verhalten von Kaliumkanälen, eine Stabilisierung des Offenen Kanalzustandes bewirkt werden könnte.
4. Welche Eigenschaften von Aminosäuren (z.B. Größe, Ladung und Hydrophobizität) sind besonders kritisch für das Aktivierungsverhalten von $\text{Ca}_v1.2$?
5. Welche Aminosäuren in Segment IS6 haben einen besonders starken Einfluss auf die Kanalaktivierung?
6. Welchen Einfluss haben Prolinsubstitutionen in Segment IS6 auf das „Gating“ Verhalten? Werden analoge Veränderungen wie in IIS6 induziert?
7. Sind die Veränderungen im Gating Verhalten von Doppelmutanten in Segmenten IS6 und IIS6 additiv (d.h. unabhängig), oder muss von einer Interaktion der Segmente ausgegangen werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 ZELLKULTUR UND TRANSIENTE TRANSFEKTION DER TSA-201 ZELLEN MIT KALZIUM-KANAL-UNTEREINHEITEN

Humane embryonale Nierenzellen (= kidney) „HEK“ tsA-201 Zellen wurden in „Dulbecco`s modifizierten Eagle`s/F-12“ Medium unter Zusatz von 10% (v/v) fetalem Kälber Serum und 100 Einheiten/ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C im CO₂-Inkubator (5%) kultiviert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, wurden diese mittels Trypsin-EDTA-Lösung gesplittet und ~16 Stunden vor der Transfektion auf 35-mm Petrischalen (Falcon) eingesäät. Anschließend wurden die tsA-201 Zellen mit cDNAs co-transfiziert, die für den Wildtyp oder mutierte Ca_v1.2 α_1 -Untereinheiten codieren, sowie mit den akzessorischen Untereinheiten β_{1a} (Ruth et al., 1989) oder β_{2a} (Perez-Reyes et al., 1992) und $\alpha_2\text{-}\delta_1$ (Ellis et al., 1988). Für die Transfektion der Zellen wurde das „FuGENE 6 Transfection Reagent“ (Roche Applied Science) benutzt. Das verwendete Ca_v1.2 α_1 -Konstrukt (GenBankTM X15539) mit N-terminalem GFP-Tag wurde freundlicherweise von Dr. M. Grabner zur Verfügung gestellt (Grabner et al., 1998).

2.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN MITTELS PATCH-CLAMP-TECHNIK UND DATENERFASSUNG

Barium Ströme (I_{Ba}) durch spannungsabhängige Ca²⁺ Kanäle wurden bei 22-25 °C mittels Patch-Clamp Technik (Hamill et al., 1981) mit einem „Axopatch 200A patch clamp amplifier“ (Axon Instruments, Foster City) 36-48h nach der Transfektion aufgenommen. Die extrazelluläre Badlösung enthielt (in mM): BaCl₂ 5, MgCl₂ 1, HEPES 10, Choline-Cl 140, mit Methansulfonsäure auf pH 7.4 titriert. Die Patch Pipetten mit einem Widerstand von 1 bis 4 M Ω wurden aus Borosilikatglas gezogen (Clark Electromedical Instruments, UK) und mit folgender Pipettenlösung befüllt (in mM): CsCl 145, MgCl₂ 3, HEPES 10, EGTA 10, mit CsOH auf pH 7.25 titriert. Alle Daten wurden mittels DIGIDATA 1200 interface (Axon Instruments, Foster City) digitalisiert. Das pClamp-Softwarepaket (Version 10.0 Axon Instruments, Inc.) wurde zur Datenerhebung und zur vorläufigen Analyse verwendet. Microcal Origin 5.0[®] wurde zur Analyse und Kurvenfitting eingesetzt. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung wurde, wie in Hohaus et al. (2005) und Kudrnac et al. (2009) beschrieben, bestimmt. Ausgegeben wurden die Daten als Mittelwert $\pm$ S.E und die statistische Signifikanz mittels Student`s unpaired t-test bewertet. Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Dr. Stanislav Beyl durchgeführt und ausgewertet.

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1 EINFÜHRUNG VON PUNKTMUTATIONEN IN DIE CA_v1.2 UNTEREINHEIT

Mit Hilfe der von Kary B. Mullis (1987) entwickelten Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde es möglich, cDNA Fragmente definierter Länge und Sequenz exponentiell zu vervielfältigen bzw. zu modifizieren (White, 1996). Die Methode basiert auf sich wiederholenden Zyklen, im Laufe derer sich, in Anwesenheit einer DNA-Polymerase und freien Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs), spezifische komplementäre Oligonukleotide (Primer) jeweils an das 5' und 3' Ende der zu amplifizierenden Matrize anlagern und diese vervielfältigt wird. Da jedes pro Zyklus entstandene Produkt selbst als Template fungieren kann, erfolgt die Amplifikation nicht linear sondern exponentiell. Die 3 Grundschrirte der PCR sind: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Während des Denaturierungsschrittes bei 90-95°C, wird die doppelsträngige Matrizen-DNA in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Der anschließende Annealing Schritt findet bei einer Temperatur zwischen 50 und 70° C statt. An Stellen, an denen die komplementären Primer hybridisieren, bilden sich stabilere, etwas länger anhaltende Bindungen aus und werden zum Angriffspunkt für die Polymerase. Sobald an den 3'-OH Enden der Primer beginnend einige Nukleotidbasen eingebaut sind, ist die Template-Primerbindung stark genug, nicht mehr zu brechen. Die Erhöhung der Temperatur auf das Temperaturoptimum der jeweils eingesetzten Polymerase, die in der Regel 72° entspricht, leitet die Elongationsphase ein, in der die zwischen beiden Primern liegende DNA-Sequenz mit dazu komplementären Nukleotiden vom 5' zum 3' Ende des jeweiligen Primers zum neuen Doppelstrang aufgefüllt wird (siehe auch Müller 2001).

Die gerichteten Punktmutationen in den unterschiedlichen Segmenten der Ca_v1.2 α 1-Untereinheit wurden mittels "gene SOEing" (splicing by overlap extension) PCR-Technik (Horton et al., 1989) eingeführt. Diese Methode bestand aus zwei separaten PCR Schritten. Im ersten Schritt wurden aus dem Ausgangstemplate mit jeweils einem flankierenden Oligonukleotidprimer und einem, die Mutation enthaltenden Hybridisierungsprimer zwei DNA Fragmente mit einem überlappenden Ende generiert. Im zweiten Schritt durchliefen die beiden Fragmente gemeinsam eine PCR, in der sie selbst als Template dienten und miteinander hybridisierten. Zugabe der beiden flankierenden Primer aus der ersten PCR nach 7 durchlaufenen Zyklen führte zur Bildung des gewünschten Endprodukts. Sämtliche Konstrukte wurden durch „Restriction Site Mapping“ und Sequenzierung auf Fehlerfreiheit überprüft.

	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°	2 min
Zyklenzahl	1	
Denaturierung	94°	0,25 min
Annealing	55°	0,30 min
Synthese	72°	2 min
Zyklenzahl	4	
Denaturierung	94°	0,25 min
Annealing	55-64°	0,30 min
Synthese	72°	2,15 min
Zyklenzahl	23	
Finale Extension	72°	7 min

Tab. 2 Amplifikation von Fragment 1 und Fragment 2 mit *Taq*-DNA Polymerase

	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94°	2 min
Zyklenzahl	1	
Denaturierung	94°	0,25 min
Annealing	55°	0,30 min
Synthese	72°	2 min
Zyklenzahl	4	
Zugabe der Außenprimer		
Denaturierung	94°	0,25 min
Annealing	55-64°	0,30 min
Synthese	72°	2,15 min
Zyklenzahl	23	
Finale Extension	72°	7 min

Tab. 3 Amplifikation des Fusionsproduktes mit *Taq*-DNA Polymerase

2.3.2 ISOLIERUNG VON cDNA FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Für die Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „Spin DNA Extraction Kit“ der Firma Invitex verwendet. Das Gelstück (bis zu 300mg) wurde dazu mit 1000µl *Gel Solubilizer S.* versetzt und für mindestens 10 Minuten unter permanentem Schütteln auf 50°C erwärmt, bis es vollständig gelöst war. Danach wurden 500µl *Binding Enhancer* zugegeben, die Suspension gut durchmischt, und 800µl davon auf ein Spin Filter aufgetragen und bei 12000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Vorgang mit der restlichen Suspension wiederholt. Anschließend wurde das Spin Filter zweimal mit je 500µl *Wash-Buffer* versetzt, 30 Sekunden bei 12000 rpm zentrifugiert

und das Filtrat verworfen. Der Restalkohol des *Wash-Buffers* wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 4 Minuten entfernt. Das Spinfilter wurde in ein neues Mikrozentrifugen-Eppendorfgesäß überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur mit *Elution Buffer* inkubiert. Abschließend wurde dieses für eine Minute bei 12000rpm zentrifugiert und die in den Buffer eluierten DNA-Fragmente bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die Konzentration der DNA wurde anschließend durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm am „NanoDrop ND-1000-Spectrophotometer“ mittels der dazugehörigen Computersoftware berechnet. Um die Reinheit der DNA abzuschätzen wurde der Quotient der bei 260 nm bzw. 280nm Wellenlänge gemessenen optischen Dichte (OD_{260}/OD_{280}) gebildet, der zwischen 1,7 und 1,9 liegen sollte.

2.3.3 KLONIERUNG VON cDNA ABSCHNITTEN

Die Klonierung des mittels der PCR mutierten DNA-Abschnittes in den, die Wildtyp α_1 -Untereinheit enthaltenden Plasmidvektor, war Voraussetzung für dessen Transformation in kompetente E.coli-Zellen und die anschließende Plasmidexpression. Durchgeführt wurde die Klonierung mit dem *DNA Ligation Kit Ver.1* (TaKara BIO.INC.). Zuvor wurden sowohl der Plasmidvektor als auch das Fusions-PCR Produkt jeweils mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und dann bei 16°C eine Stunde ligiert. Für die Mutationen in Segment IIS6 wurde mit BamHI und BstEII geschnitten. Für den Restriktionsverdau der Mutationen in IS6 wurde mittels „silent mutation“ eine Schnittstell für BshTI eingeführt. Somit konnte für die Mutationen in IS6 mit BshTI und BstEII geschnitten werden.

Die Ligation wurde mit einem Gesamtvolumen von 25µl durchgeführt. Pufferlösung A und T4 DNA Ligase-hältige Pufferlösung B wurden im Verhältnis 1:8 eingesetzt. Dabei fielen 20µl auf Pufferlösung A und 2,5µl auf Pufferlösung B. Die, den Vektor und das Insert enthaltende Lösung wurde, je nach Konzentration der beiden, mit H₂O auf 2,5µl ergänzt.

2.3.4 TRANSFORMATION VON KOMPETENTEN E.COLI ZELLEN (DH5A HANAHAN 1983)

Zur Plasmidtransformation in Bakterien wurden chemisch kompetente E.coli-Zellen (Subcloning Efficiency DH5 α TM) der Firma Invitrogen verwendet.

Es wurden jeweils 100µl Zellen in eisgekühlten Eppendorfgesäßen vorgelegt und mit 25µl des ligierten Plasmids gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 37° für 45 Sekunden in einem Wasserbad Hitze-geschockt und anschließend weitere 2 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden sie mit 950µl LB-Medium (Trypton 10g/l, Hefeextrakt 5g/l, NaCl 5g/l, pH 7.5) versetzt und eine Stunde bei 37° bei 225 rpm geschüttelt. Anschließend

wurde die Zellsuspension für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, 900µl des Überstandes wurden verworfen und das entstandene Zellpellet in dem restlichen Überstand resuspendiert. Die Suspension wurde auf ampicillinhältige (100µg/µl) LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C 14 Stunden lang über Nacht inkubiert. Die auf den Platten gewachsenen Einzelkolonien wurden anschließend jeweils in 2,5 ml ampicillinhaltigem (100µg/µl) LB-Medium 12-15 Stunden bei 37°C unter Schütteln (280 rpm) vermehrt und zur Isolierung der Plasmid- DNA wie in 2.3.3. weiterverarbeitet.

2.3.5 ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON PLASMID DNA AUS BAKTERIEN

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte mittels „Invisorb Spin Plasmid Mini Kit“ der FirmaInvitek. 1,5ml einer E.Coli Übernachtskultur wurden für 1 Minute bei 13500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das sedimentierte Pellett mit 200µl *Resuspension Buffer* mittels „Vortexer“ resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde mit 200µl *Alkaline Lysis Buffer* fünf Minuten zur Lyse der Bakterien und der Freisetzung der Plasmid-DNA inkubiert. Danach wurde sie mit 200µl *Neutralization Solution* neutralisiert, was zum Präzipitieren der genomischen Bakterien-DNA und der Zelldebris führte, die in einem anschließenden fünf minütigen Zentrifugationsschritt pelletiert wurden. Der, die Plasmid-DNA beinhaltende Überstand, wurde auf ein Spin Filter dekantiert, mit 200µl *Binding Solution* versetzt, und bei 800 rpm für eine Minute abermals zentrifugiert. Die, an die Matrix des Spin Filters gebundene DNA wurde mit 750µl *Wash Buffer PL* von Kontaminationen gereinigt, und der Restalkohol mittels Zentrifugation bei 13500 rpm für 3 Minuten entfernt. Mittels Zugabe von 30µl *Elution Buffer P* wurde die gereinigte Plasmid DNA eluiert und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.4 UNTERSUCHUNG DER MEMBRANEXPRESSION MITTELS KONFOKALER MIKROSKOPIE

Für die Konfokalaufnahmen wurde ein, mit einem „LSM 510 laser scanning module“ und einem 63x (1.4 NA) Öl-Immersionsobjektiv ausgestattetes Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop, verwendet. Die Aufnahmen wurden ca. 30 Stunden nach der Transfektion gemacht. Die Fluoreszenz der GFP-markierten Ca_v1.2 α₁-Untereinheit wurde mittels Argonlaser bei 488 nm angeregt und das emittierte Licht mit einem 505-530 nm „bandpass filter“ aufgenommen. Die Plasmamembran wurde mit 2 µM FM4-64 (Molecular Probes) gefärbt. Der amphiphile Styryl-Farbstoff wurde mittels Helium-Neon Laser (Anregung bei 543 nm) in Kombination mit einem 650 nm „long-pass filter“ detektiert. Gearbeitet wurde im „multitracking“ Modus um Nebensignaleffekte zu minimieren. Die Blenden wurden so eingestellt, dass optische Schichten von 1 µm Dicke erhalten wurden. Die abgebildeten Aufnahmen sind repräsentativ für 15-20 tsA-201 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.

3. ERGEBNISSE

3.1 AKTIVIERUNGSDETERMINANTEN IN SEGMENT IIS6

3.1.1 MUTATION I781T VERSCHIEBT DIE $Ca_v1.2$ KANAL AKTIVIERUNG

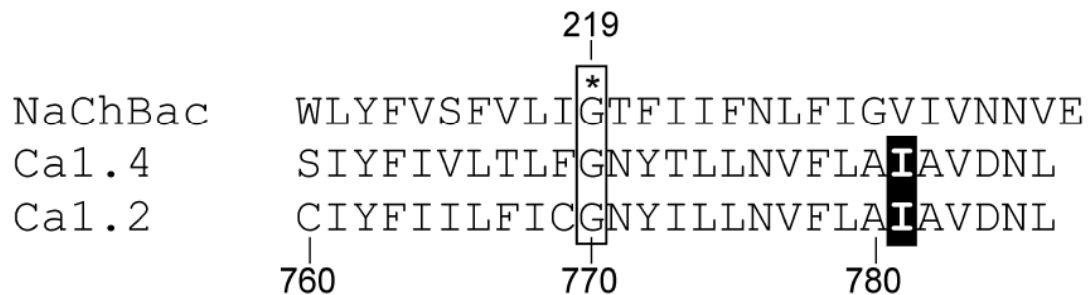


Abb. 11 „Alignment“ der porenbildenden Sequenzen von NaChBac (*Bacillus halodurans* Ren et al., 2001) mit den IIS6 Segmenten der beiden L-Typ Kanäle $Ca_v1.2$ und $Ca_v1.4$. Der Aminosäurerest, analog zu einem konservierten Glycin in der M2 Helix des Kalium Kanals MthK (Jiang et al., 2002) ist eingerahmt. Der in der Arbeit untersuchte Isoleucinrest ist schwarz unterlegt.

Ile781 in der $Ca_v1.2$ α_1 -Untereinheit entspricht dem Aminosäurerest I745 im Segment IIS6 der $Ca_v1.4$ α_1 -Untereinheit (Abb. 11). Es wurde untersucht, ob I781T einen vergleichbaren Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung hat, wie Mutation I745T (Hemara-Wahanui et al., 2005). Die $Ca_v1.2$ α_1 -Untereinheiten vom Wildtyp bzw. der I781T Mutation wurden jeweils zusammen mit den akzessorischen Untereinheiten β_{1a} und $\alpha_2\delta_1$ in tsA- 201 Zellen exprimiert. Die halbmaximale Spannung für die Aktivierung ($V_{act,0,5}$) wurde von $-9.9 \pm 1,1$ mV im Wildtyp nach $-37,7 \pm 1,2$ mV im I781T Kanal verschoben (Abb. 13). I781T verschob ebenfalls die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ($V_{inact,0,5}$) von $-38,7 \pm 1,0$ mV (Wildtyp) auf $-57,8$ mV $\pm 0,7$ mV (I781T) (Abb. 14, Abb. 15). Während eines 300-ms Pulses auf das Potential des Maximalstroms der I-V Kurve (0mV vs.-30mV) inaktivierten WT Kanäle zu $65 \pm 4\%$, I781T Kanäle hingegen zu $47 \pm 3\%$ (Abb.12 A, Tab. 4).

Sowohl beim Wildtyp als auch bei den mutierten Kanälen lag das Umkehrpotential bei ~ 50 mV. Die Mutation scheint demnach keinen Einfluß auf die Ionenselektivität zu haben (Abb. 12 B).

I781T führt zu vergleichbaren Verschiebungen der spannungsabhängigen Aktivierung und Inaktivierung wie I745T des $Ca_v1.4$ Kanals. Somit konnte der in Säugerzellen besser exprimierende $Ca_v1.2$ Kanal für die weiteren Struktur-Funktions-Untersuchungen der $Ca_v1.4$ Mutation (I745T) verwendet werden.

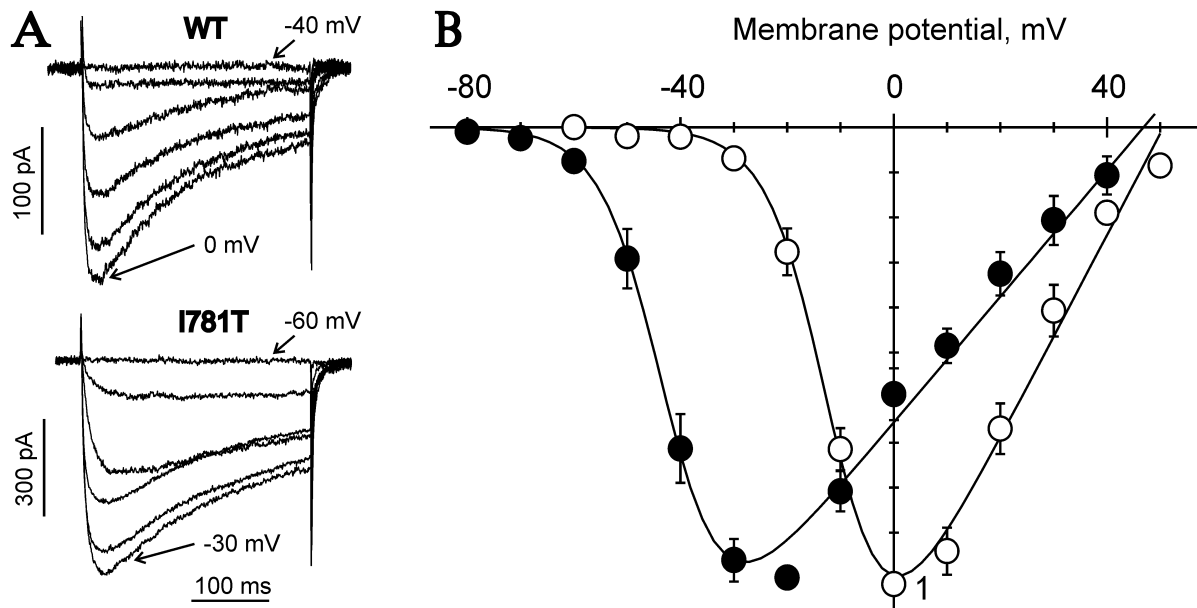


Abb. 12 A, Repräsentative Ströme von Ba^{2+} durch Wildtyp (WT) und den I781T mutierten Kanal während depolarisierender Testpulse von -100mV (Schwellen- und Maximalspannungen sind angegeben, 10-mV Schritte). Wildtyp oder I781T mutierte $\text{Ca}_v1.2$ α_1 -Untereinheiten wurden zusammen mit β_{1a} und $\alpha_2\delta_1$ Untereinheiten koexprimiert. B, gemittelte Strom-Spannungs Kurven von Wildtyp ($n=8$, leere Kreise) und I781T mutierten ($n=7$, gefüllte Kreise) Kanälen.

3.1.2 VERSCHIEBUNG DER SPANNUNGSABHÄNGIGKEIT DES „GATINGS“ DURCH WEITERE MUTATIONEN IN SEGMENT IIS6

Um die strukturellen Anforderungen an Position 781 genauer aufzuklären wurde Ile781 durch Reste unterschiedlicher Hydrophobizität, Größe, und Polarität substituiert. Substitution von I781 durch Leucin, Alanin, Asparagin und Prolin führte zu einer Verschiebung der Aktivierung von $\sim -10\text{mV}$ (I781L) bis $\sim -37\text{mV}$ (I781P) (Tab. 4).

Die Verschiebungen in der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung verliefen dabei parallel zu jenen der spannungsabhängigen Aktivierung. Die Mutationen führten zu einer Verschiebung der Inaktivierungskurven von ungefähr -6mV (I781L) bis zu ca -30mV (I781P) (Abb. 14, Abb. 15) (Hohaus et al., 2005). Der parallele Verlauf von Aktivierung und Inaktivierung wird deutlich, wenn man die halbmaximalen Spannungen der Aktivierungskurven gegen die halbmaximalen Spannungen der Inaktivierungskurven der jeweiligen Mutationen aufträgt. Die Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,97 (Abb. 15).

	Halbmaximale - Aktivierung	Slope (mV)	r300 (%)
Wildtyp	-9.9 ± 1.1	6.3 ± 0.7	65 ± 4
I781T	-37.7 ± 1.2	7.2 ± 1.0	47 ± 3
I781P	-47.2 ± 1.1	6.3 ± 0.6	53 ± 6
I781L	-20.6 ± 1.2	6.1 ± 0.2	63 ± 7
I781A	-29.5 ± 0.6	7.9 ± 0.5	51 ± 4
I781N	-34.6 ± 1.6	9.1 ± 0.4	37 ± 6
I781Q	kein Strom		
I781R	kein Strom		

Tab. 4 Substitution von I781 der $\text{Ca}_v1.2 \alpha_1$ -Untereinheit durch unterschiedliche Aminosäuren. Das Potential der halb-maximalen Aktivierung, die Steilheit der Kurven (*slope factor*) und die Kanalinaktivierung in % während eines 300-ms Pulses (*r300*) auf das Potential maximaler Stromamplituden der I-V Kurve sind angegeben.

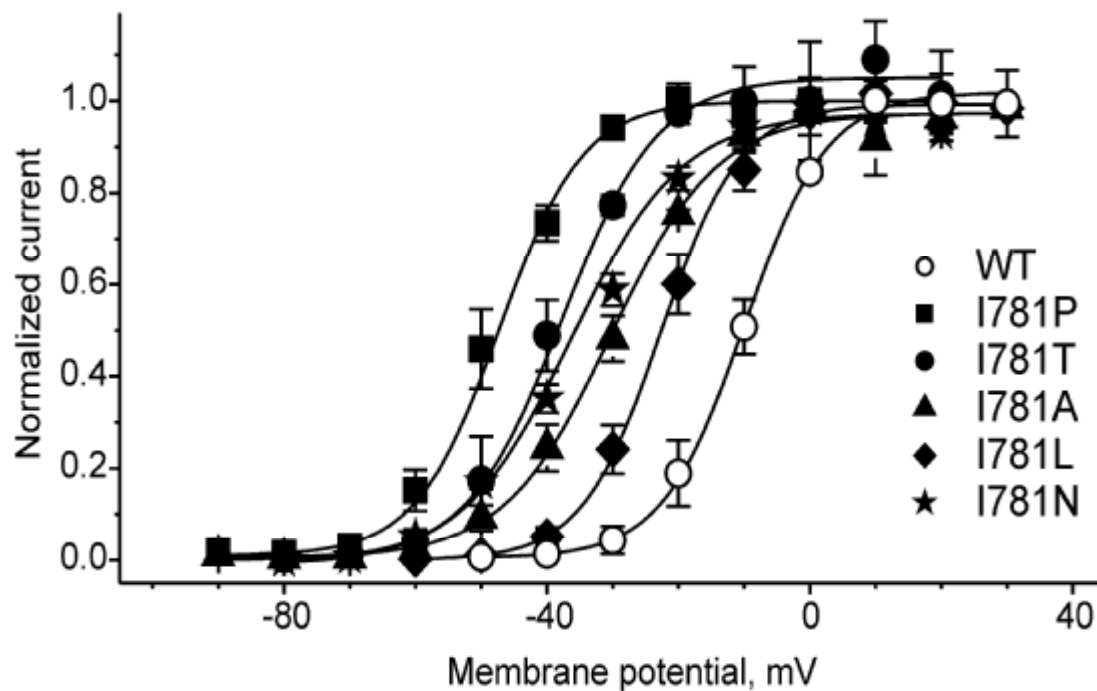


Abb. 13 Gemittelte Spannungsabhängigkeiten der Aktivierung von Wildtyp ($n = 8$), I781P ($n = 8$), I781T ($n = 7$), I781A ($n = 7$), I781L ($n = 5$), und I781N ($n = 4$) Kanälen.

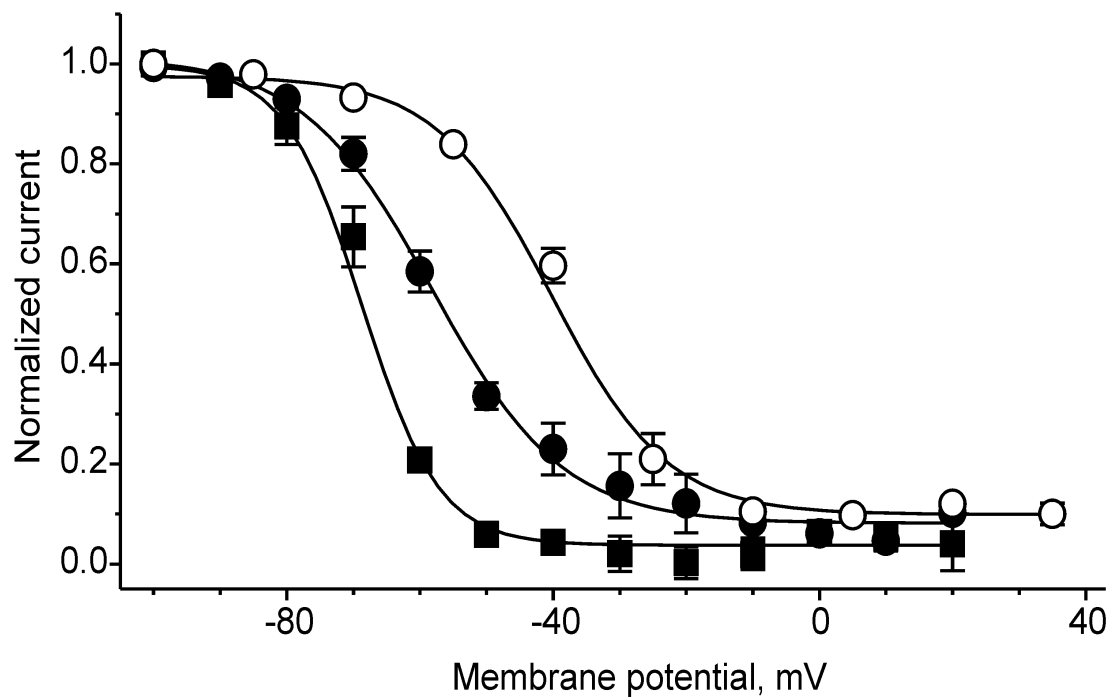


Abb. 14 Gemittelte Spannungsabhängigkeit der steady-state Inaktivierungskurve für Wildtyp ($n = 3$, leerer Kreis), I781P ($n = 5$, gefülltes Rechteck), und I781T ($n = 3$, gefüllter Kreis). Durchgehende Linien repräsentieren die Anpassung der Kurve an eine Boltzmannfunktion.

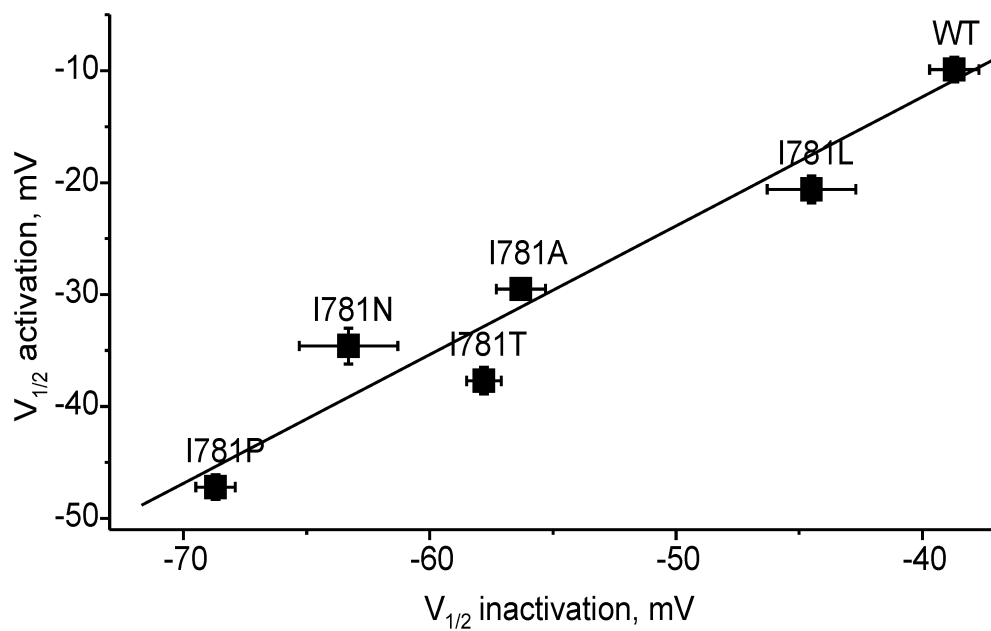


Abb. 15 Korrelation zwischen den Potentialen halb-maximaler Aktivierung ($V_{0.5,act}$) und halb-maximaler Inaktivierung ($V_{0.5,inakt}$) der Ile-781 Mutanten. Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,97.

3.1.3 I781 SUBSTITUTIONEN INDUZIEREN LANGSAME AKTIVIERUNG BEI HYPERPOLARISIERTEN SPANNUNGEN UND LANGSAME DEAKTIVIERUNG

Es wurden die Spannungsabhängigkeiten der Aktivierungs-Zeitkonstanten für die I781 Substitutionen bestimmt. Zwischen -30 mV und $+30\text{ mV}$ verlief die Aktivierung von Wildtyp und mutiertem Kanal mit ähnlichem Zeitverlauf. Wildtyp τ_m reichten von 3.2 ms (-30 mV) bis 2.5 ms (30 mV); I781P τ_m reichten von 3.9 ms (-30 mV) bis 2.1 ms (10 mV) (Abb. 16). Bei negativen Spannungen (-40 mV , Abb.13), zeigten die mutierten Kanäle eine verlangsamte Aktivierungskinetik. Bei -50 mV wurde keine Aktivierung von Wildtyp und I781L beobachtet (Abb.16A), während die restlichen vier mutierten Kanäle vergleichsweise langsam aktivierten (Zeitkonstanten siehe Abb.16, B). Die Aktivierung von I781P bei -60 mV mit einer Zeitkonstante $\tau_m \sim 25\text{ ms}$. Je weiter sich die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in die hyperpolarisierte Richtung verschob (Tab. 4), desto langsamer aktivierten die Kanäle (Abb. 16B).

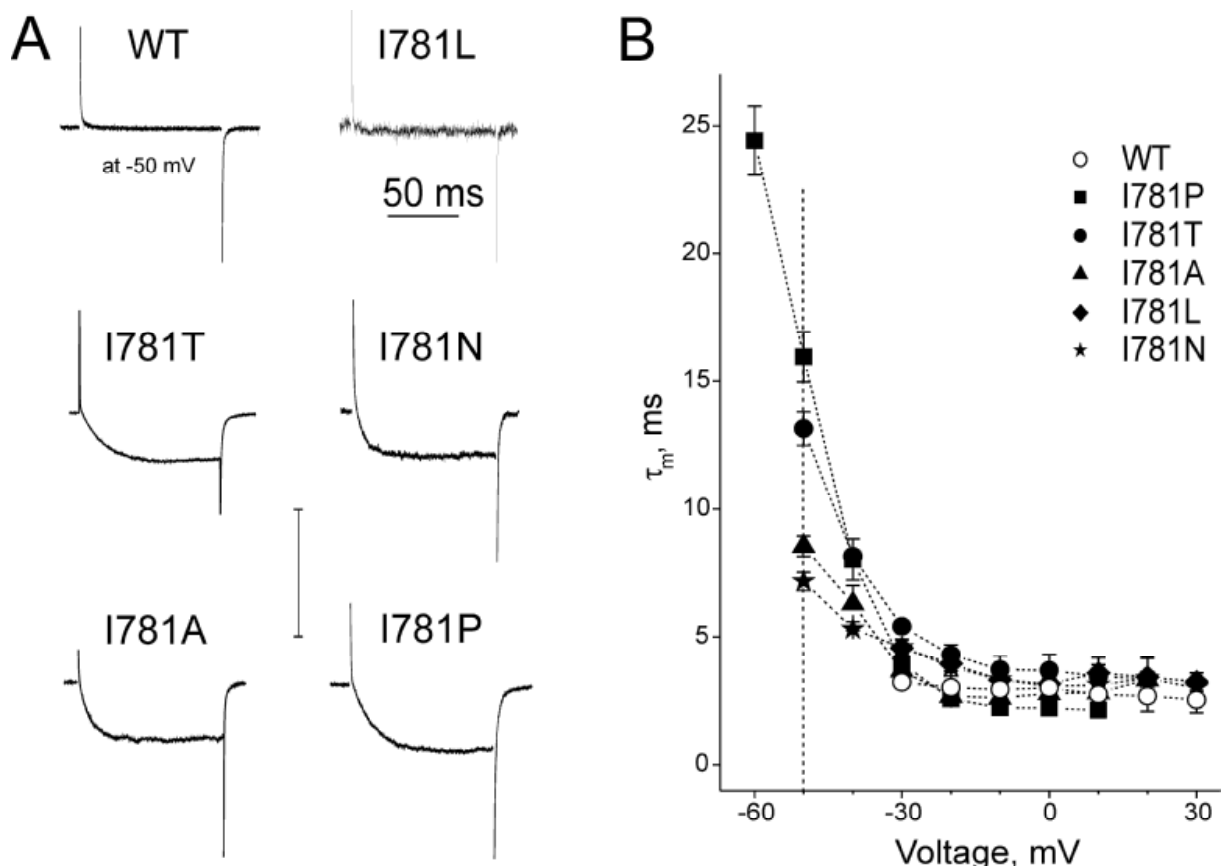


Abb. 16 Repräsentative Bariumströme durch Wildtyp und Ile-781 Mutanten, sowie die zugehörigen Aktivierungs-Zeitkonstanten (τ_m) (siehe Hohaus et al., 2005 für Details). I_{Ba} während Depolarisationen vom Haltepotential von -100 mV bis -50 mV (gepunktete Linie in B).

Um Einblick in die Stabilität der offenen Porenkonformation zu erhalten, wurde auch die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung der Mutanten I781P und I781T analysiert. Sie deaktivierten bei allen Spannungen langsamer als der Wildtypkanal wobei I781P langsamer deaktivierte als I781T (Abb. 17).

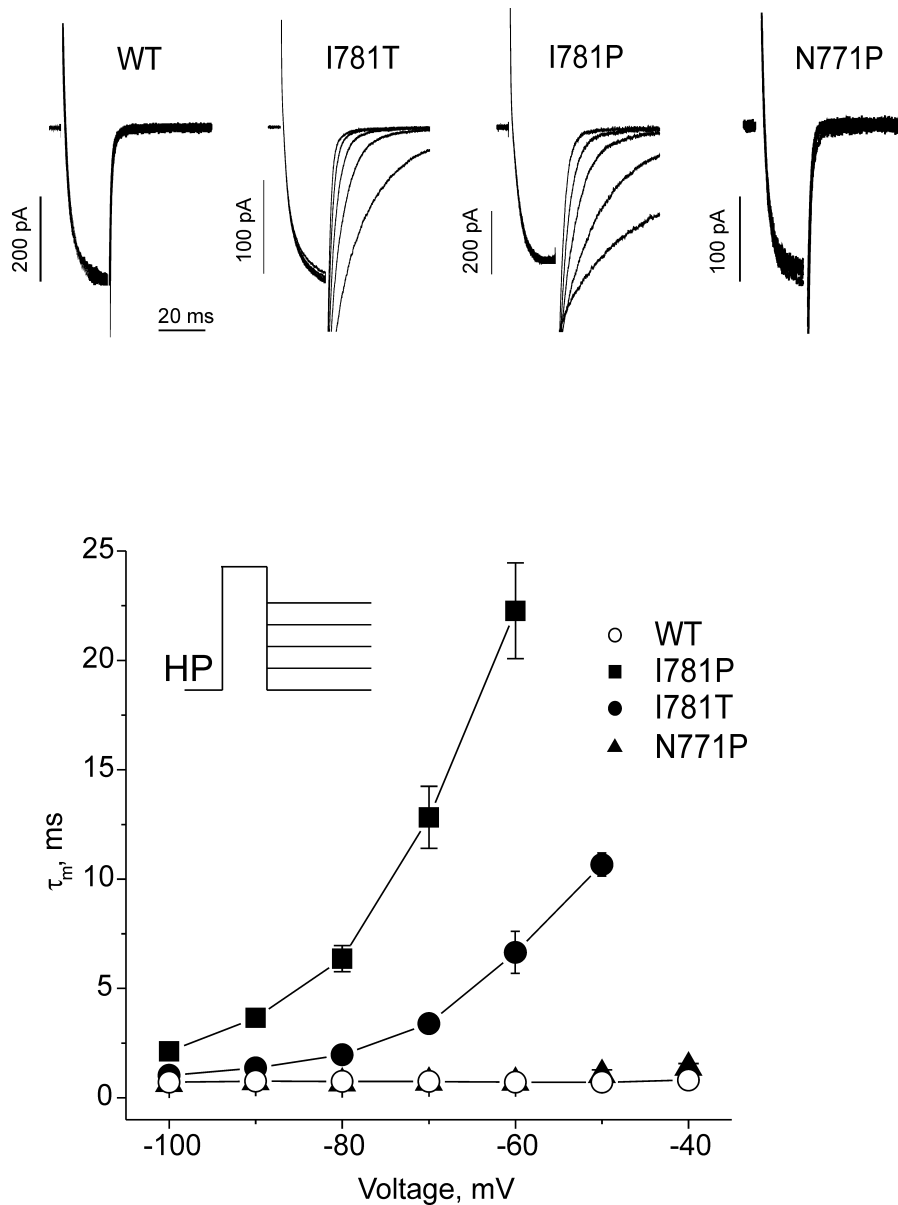


Abb. 17 Die Mutationen I781P und I781T verlangsamen die Deaktivierungskinetik von $\text{Ca}_v1.2$. Repräsentative „tail currents“ von Wildtyp, I781T, I781P und N771P. Die Ströme wurden während einer 20-ms Depolarisation von 0 mV für Wildtyp, -40mV für I781P, -30 mV für I781T, and -20 mV für N771P aktiviert. Die Deaktivierung wurde während der Repolarisationen in 10 mV Stufen, beginnend mit -100 mV, aufgenommen. Im unteren Teil der Abbildung sind die mittleren Zeitkonstanten der Kanaldeaktivierung dargestellt.

3.1.4 SPEZIFITÄT DER MUTATION IN POSITION I781P

Um zu untersuchen welche weiteren Aminosäuren in Segment IIS6 einen besonders starken Einfluss auf die spannungsabhängige Aktivierung von $\text{Ca}_v1.2$ besitzen, wurden systematisch alle Aminosäuren zwischen Cys769 und Val783 durch Proline ersetzt (Abb.18, Abb.19, Tab.5).

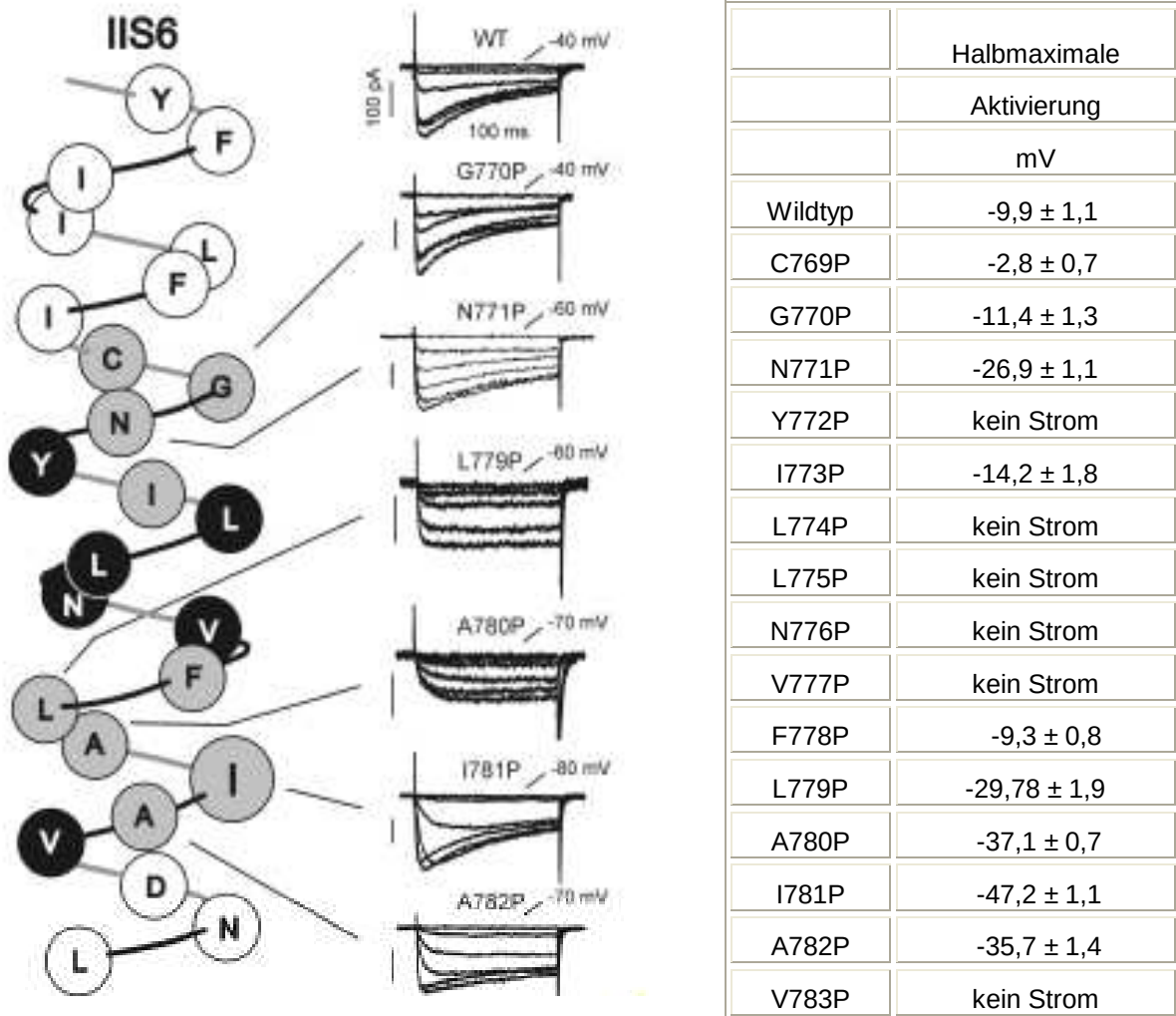


Abb. 18 α -helikale Repräsentation von Segment IIS6 der $\text{Ca}_v1.2$ α_1 -Untereinheit. Funktionelle Prolinmutanten werden in grau gezeigt, nicht-funktionelle Mutanten in schwarz. **Tab. 5** repräsentative Familien von I_{Ba} durch Wildtyp und mutierte Kanäle (siehe Hohaus et al., 2005 für Details).

Die Substitution der beiden Ile781 flankierenden Alaninreste A780P und A782P sowie L779P, induzierte die größten Verschiebungen der spannungsabhängigen Aktivierung (Abb. 19). $V_{\text{act},0.5}$ lag beim Wildtyp bei $-9,9 \pm 1,1$ mV, A780P verschob $V_{\text{act},0.5}$ auf $-37,1 \pm 0,7$ mV, A782P verschob $V_{\text{act},0.5}$ auf $-35,7 \pm 1,4$ mV und bei L779P wurde eine Verschiebung auf $-29,78 \pm 1,9$ mV gemessen (Tab. 5). Weiters zeigten A782P und L779P verlangsamte Aktivierung bei hyperpolarisierten Spannungen (Abb. 20). Die Kanalinaktivierung von I782P

war während eines 300ms Pulses verlangsamt und für A780P und L779P praktisch nicht messbar (Abb. 18, Tab. 5). Die Prolinsubstitutionen C769P, I773P und F778P verursachten geringe oder nicht signifikante Verschiebungen der spannungsabhängigen Aktivierung (Tab. 5). A780P verschob nur die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung nicht aber die der Inaktivierung (Abb. 19, B). Weiters verlangsamte A780P die Kinetik der Aktivierung bei allen Spannungen (siehe Insert Abb. 20).

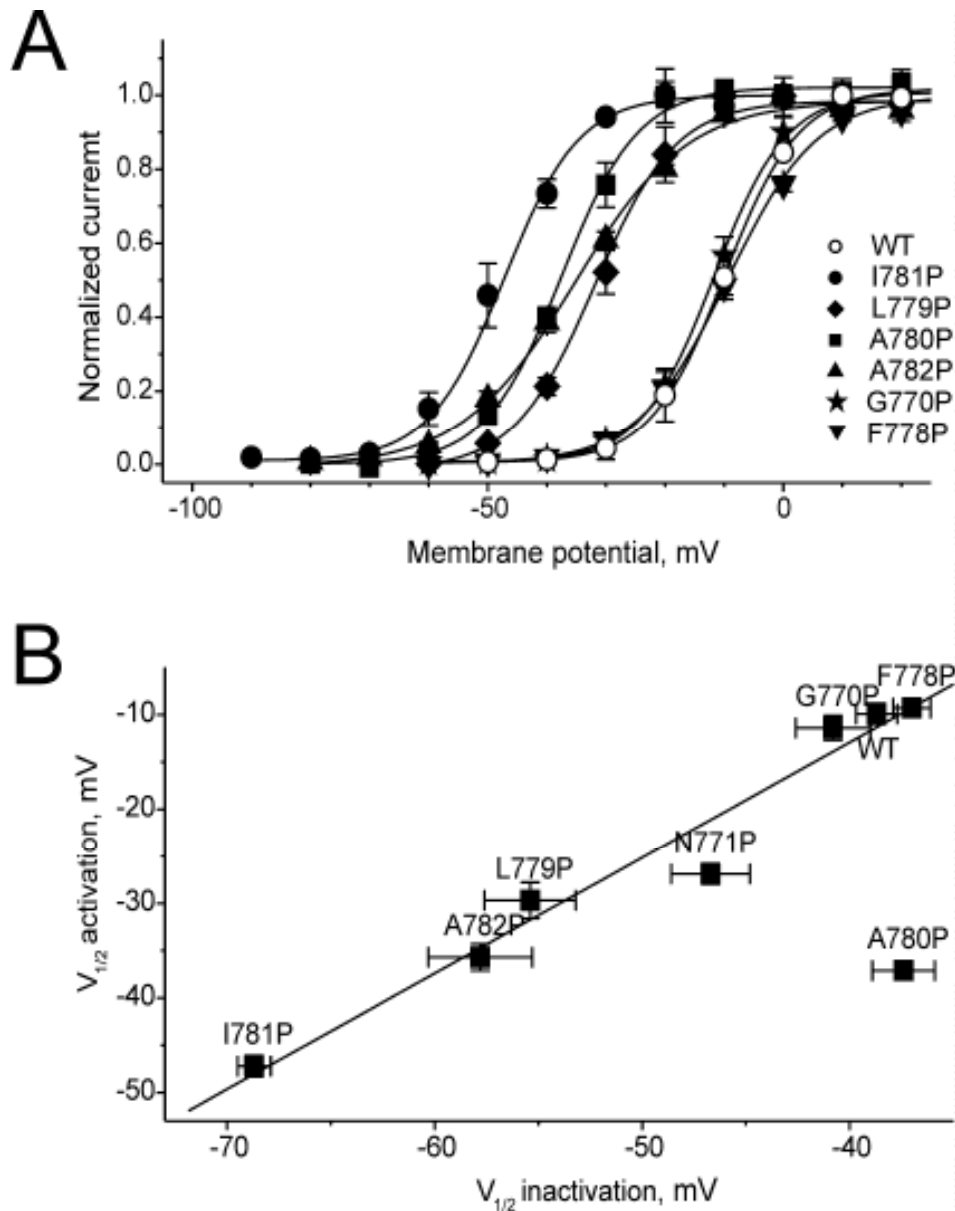


Abb. 19 Positionale Spezifität der Effekte der Prolinsubstitution auf die Spannungsabhängigkeit des „gatings“ von $\text{Ca}_v1.2$. A, Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von Wildtyp und Mutanten. Durchgezogene Linie zeigt den besten Fit einer Boltzmann Funktion. B, Korrelation zwischen den Potentialen der halbmaximalen Aktivierung ($V_{0.5,act}$) und halbmaximalen Inaktivierung ($V_{0.5,inact}$). Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0.98. A780P wurde aufgrund seines ungewöhnlichen kinetischen Phenotyps (siehe Abb. 20) nicht in die Korrelationsanalyse miteinbezogen.

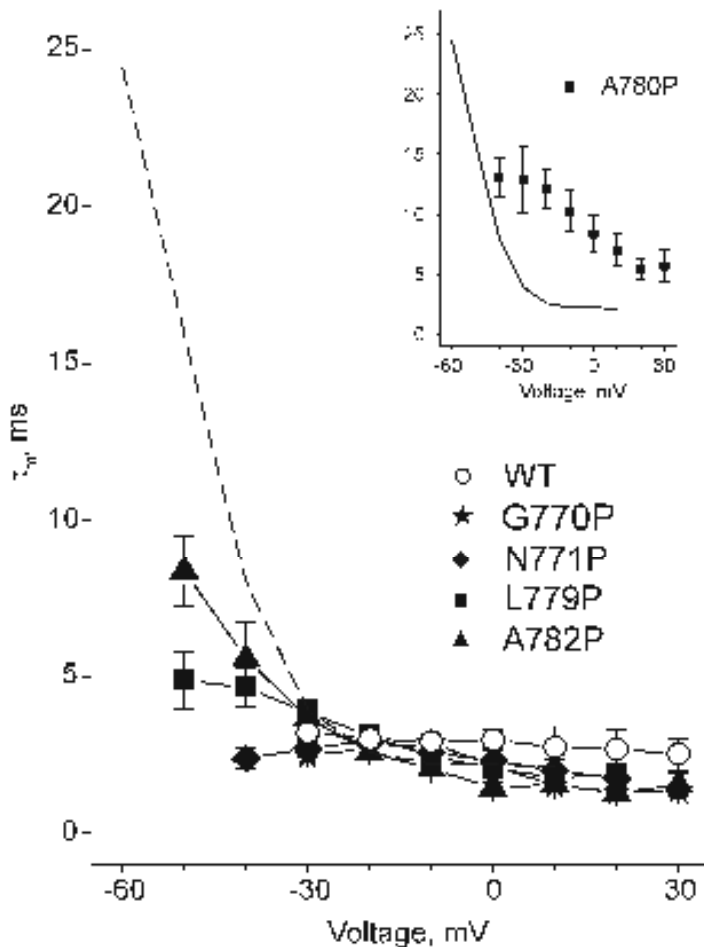


Abb. 20 Spannungsabhängigkeit der Aktivierungs-Zeit Konstanen (τ_m). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von I781P ist in gestrichelter Linie angegeben. Das Inset zeigt die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungs-Zeit Konstanen der langsam aktivierenden Mutante A780P.

3.1.5 MODULATION VON ILE 781 DURCH BETA-UNTEREINHEITEN

Es ist bekannt, dass β -Untereinheiten das „gating“ von HVA- Ca^{2+} -Kanälen modulieren (Birnbaumer et al., 1998; Arikath and Campbell, 2003; Hering, 2002). Um herauszufinden, ob die beobachteten Veränderungen in der spannungsabhängigen Aktivierung mit der Modulation durch die β -Untereinheit interferieren, wurden Wildtyp, I781T und

I781P $\text{Ca}_v1.2$ α_1 -Untereinheiten mit β_{1a} - oder β_{2a} -Untereinheiten und der $\alpha_2\delta_1$ -Untereinheit koexprimiert und die resultierenden Aktivierungskurven analysiert. Im Vergleich zur Koexpression mit der β_{1a} -Untereinheit, führte die Koexpression der β_{2a} - Untereinheit bei jedem Kanalkonstrukt zu einer kleinen zusätzlichen Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung in die hyperpolarisierte Richtung und zu einer langsameren Kanalinaktivierung. Das ähnliche Ausmaß dieser Effekte wie im Wildtyp, lässt vermuten, dass Ile-781 Substitutionen die Modulation durch die β -Untereinheit nicht grundlegend beeinflussen (Abb. 21).

	Halbmaximale - Aktivierung	Halbmaximale - Aktivierung
	mV	mV
	Koexpression mit β_{1a}	Koexpression mit β_{2a}
Wildtyp	$-9,9 \pm 1.1$	$-13,8 \pm 0.9$
I781T	-37.7 ± 1.2	-44.9 ± 1.4
I781P	-47.2 ± 1.1	-52.3 ± 1.3

Tab. 6 Modulation der spannungsabhängigen Aktivierung von Mutation Ile781 und Wildtyp durch β_{1a} und β_{2a} - Untereinheiten. Halbmaximale Aktivierung angegeben in mV.

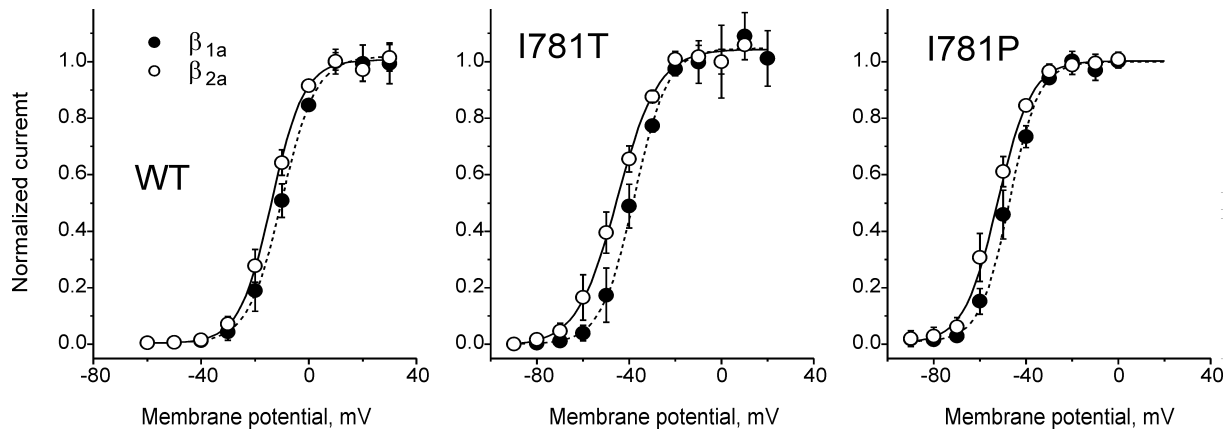


Abb. 21 I781T und I781P Substitutionen interferierten nicht mit der Modulation des „gatings“ durch β -Untereinheiten. Vergleich der spannungsabhängigen Aktivierung von Wildtyp, I781T und I781P Ca_v1.2 Kanälen, koexprimiert entweder mit β_{1a} - (leere Kreise) oder β_{2a} -Untereinheiten (gefüllte Kreise).

3.1.6 NACHWEIS DER MEMBRANEXPRESSION MITTELS KONFOKALER MIKROSKOPIE

Sechs Konstrukte (Y772P, L774P, L775P, N776P, V777P, V783P) leiteten keine Bariumströme. Um zu untersuchen ob das Fehlen eines Stroms durch Störung des zielgerichteten Transports an die Plasmamembran verursacht wird, wurde die subzelluläre Verteilung von GFP-markierten Mutanten (Grabner et al., 1998) mittels Konfokalmikroskopie getestet. Wildtyp und mutierte, GFP-markierte Ca_v1.2 α_1 -Untereinheiten wurden mit β_{1a} und $\alpha_2\delta_1$ Untereinheiten in TSA-201 Zellen co-transfiziert und die Plasmamembran durch den Membranfarbstoff FM4-64 sichtbar gemacht. Die Wildtyp Ca_v1.2 α_1 -Untereinheit war deutlich im Membranbereich lokalisiert, intrazelluläres Labeling war ebenfalls zu beobachten (Abb.22).

Aufnahmen von Zellen, die die nichtfunktionellen Kanalkonstrukte exprimieren, ergaben, dass alle mutierten Untereinheiten in ähnlicher Weise in der Plasmamembran sichtbar waren. Intrazelluläre Kanalproteine wurden ebenfalls detektiert. Die Befunde stützen die Hypothese, dass die betroffenen Mutanten in der Membran lokalisiert sind jedoch die Kanäle „nicht funktionell“ sind.

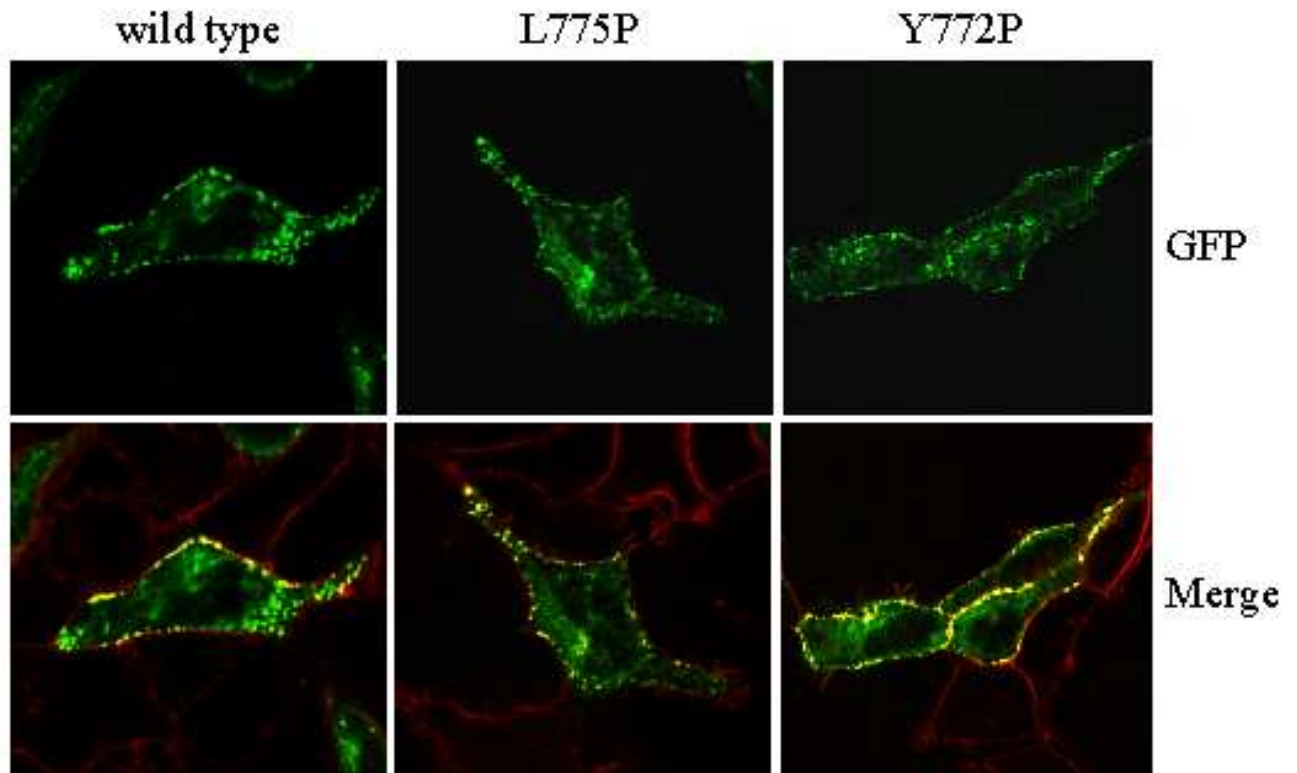


Abb. 22: Lokalisation von Wildtyp und mutierten Ca_v1.2 Konstrukten in tsA-201 Zellen. Transient transfizierte tsA-201 Zellen exprimieren Wildtyp und zwei repräsentative „nicht-funktionelle“ mutierte Ca_v1.2 Kanäle. L755P und Y772P sind gezeigt. Der Wildtyp und die mutierten GFP-markierten (grün) Ca_v1.2 α₁-Untereinheiten wurden mit β_{1a} und α₂δ₁-Untereinheiten koexprimiert, und die Zellen mit FM4-64 (rot)-einem Plasmamembranmarker-markiert. GFP-markierte α₁-Untereinheiten werden als membranständige gepunktete gelbe Cluster sichtbar.

3.2. AKTIVIERUNGSDETERMINANTEN IN SEGMENT IS6

3.2.1 PROLINSUBSTITUTIONEN IM SEGMENT IS6

Aminosäuren des Segments IS6 (von Gly422 bis Ser439) der Ca_v1.2 α₁-Untereinheit wurden durch Proline substituiert und nach Koexpression der α₁-Untereinheit mit den akkessorischen Untereinheiten β_{1a} und α₂δ₁ in tsA-201 Zellen, wurden I_{Ba} mittels „patch clamp“ Technik gemessen. Lediglich 1 von 14 Prolinmutanten (S435P) leitete Ionenströme. I_{Ba} und die entsprechende Strom-Spannungskurve von S435P sind in Abb.23 zu sehen. Die halbmaximale Spannung der „steady state“ Aktivierung verschob sich von -9.9 ± 1.1 mV im Wildtypkanal, auf -35.8 ± 0.6 mV in S435P (Abb.23C). Die Aktivierungs-Zeit Konstante (τ_m) von S435P, lag zwischen 10.4 ms (-50 mV) und 3.1 ms (10 mV) (Abb.23E). Die Abbildung 23 E,G zeigt die entsprechenden Veränderungen der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik. S435P verschob die halbmaximale Spannung der Inaktivierungskurve von -38.7 ± 1.0 mV im Wildtypkanal auf -65.7 ± 0.7 mV (Abb.23C). Während eine 300-ms Pulses inaktivierten Wildtypkanäle zu $65 \pm 4\%$, S435P inaktivierte jedoch nur zu $5 \pm 4\%$ (Tab.7) Ein ähnliches

Umkehrpotential von Wildtyp und S435P (~50mV) verdeutlichte, dass die Mutation die Ionenselektivität nicht beeinflusst (Abb.23B).

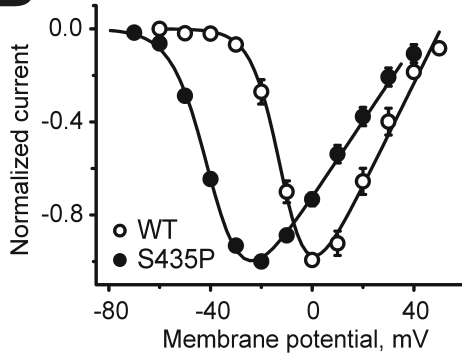
Mutanten	$V_{0.5, \text{act}}$, mV	k, mV	$V_{0.5, \text{inact}}$, mV	r_{300} , %
Wildtyp	-9.9 ± 1.1 (n=8)	6.3 ± 0.7	-38.7 ± 1.0 (3)	65 ± 4
IS6-Segment				
L429T	-16.5 ± 0.6 (5)	7.5 ± 0.6	-42.5 ± 1.1 (3)	69 ± 6
L434T	-21.9 ± 1.3 (5)	6.9 ± 0.9	-51.1 ± 1.1 (3)	63 ± 5
S435A	-15.9 ± 0.6 (6)	6.9 ± 0.5	-44.1 ± 0.9 (4)	70 ± 5
S435P	-35.8 ± 0.6 (6)	8.8 ± 0.6	-65.7 ± 0.7 (4)	5 ± 4
IIS6 - Segment				
L779T	-18.6 ± 0.7 (5)	6.4 ± 0.6	-50.5 ± 1.2 (3)	
I781T*	-37.7 ± 1.2 (7)	7.2 ± 1.0	-57.8 ± 0.7 (3)	47 ± 3
I781P*	-47.2 ± 1.1 (8)	6.3 ± 0.6	-68.7 ± 0.8 (5)	53 ± 6
Doppelmutanten				
L429T/I781T	-44.0 ± 1.0 (7)	8.3 ± 0.9	-61.2 ± 1.0 (4)	41 ± 5
L429T/L779T	-22.5 ± 0.8 (5)	6.4 ± 0.7	-49.6 ± 1.3 (3)	12 ± 6
L434T/I781T	-50.3 ± 0.8 (5)	5.4 ± 0.8	-70.0 ± 1.6 (3)	15 ± 4
L434T/L779T	-32.3 ± 0.8 (7)	7.1 ± 0.7	-58.2 ± 0.8 (5)	52 ± 5
S435A/I781T	-35.3 ± 0.9 (6)	8.7 ± 0.7	-59.1 ± 0.9 (4)	48 ± 4
S435P/I781T	-43.7 ± 0.9 (5)	9.1 ± 0.9	-64.1 ± 1.1 (3)	44 ± 5
S435P/I781P	Kein Strom			

Tab. 7 Einfluß der Porenmutationen auf die Spannungsabhängigkeit des „gatings“ von $\text{Ca}_v1.2$. Das Potential der halbmaximalen Aktivierung und die Steilheit (slope factor) der Aktivierungskurven, das Potential der halbmaximalen Inaktivierungskurven und Ausmaß der Kanalinaktivierung während eines 300-ms Pulses (r_{300}). Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angeführt.

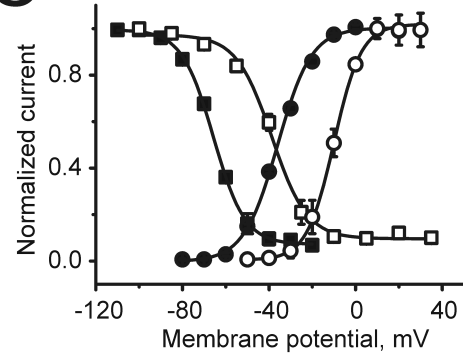
A

CaV1.2 IS6	QDAMGYELPWVVFVSLVIFGSFFVLNLVLGVLSGEFSK	403-440
CaV1.2 IIS6	GPSFPGMLVCIYFTIILFICGNYILLNVFLAIIVDNLAD	751-788
CaV1.2 IIIS6	PIYNRYVEISIEFTIIYIIIIIAFFMMNIFVGVIVTFQE	1164-1201
CaV1.2 IVS6	ETPCGSSFAVFYFTSFYMLCAFLIINLFFAVIMDNFDY	1474-1511
MlotiK M2	QSFAGRVLAVMMSSGIGIFGLWAGILATGFYQE	185-218
KcsA M2	VTLWGRCAVAVVMVAGITSFGLVTAALATWVFGVGR	84-117

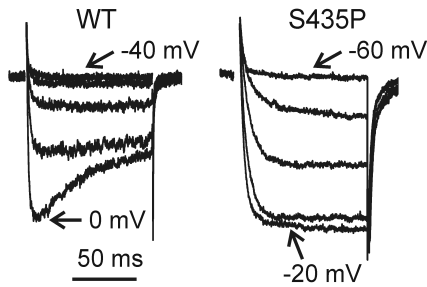
B



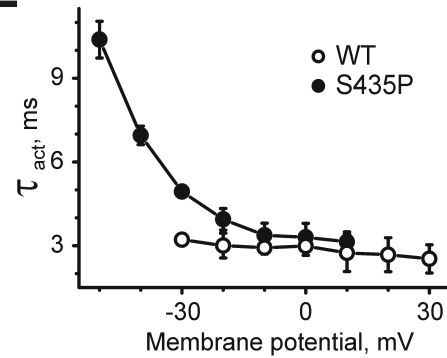
C



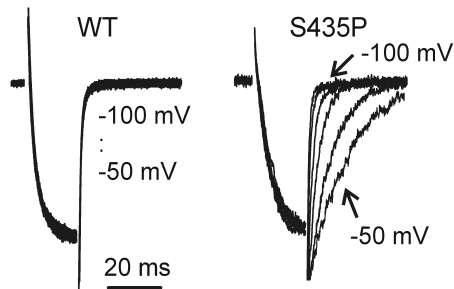
D



E



F



G

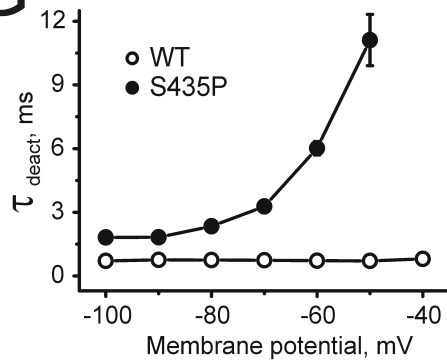


Abb. 23 Funktionelle Eigenschaften von Konstrukt S435P in Ca_v1.2.

A, Alignment der Poren-bildenden S6 Segmente von Ca_v1.2 mit den Poren-säumenden M2 Helices der K⁺ Kanäle MlotiK und KcsA. Positionen mit 4 identen Aminosäuren sind schwarz unterlegt und Positionen mit 3 identen Aminosäuren sind grau unterlegt. S435 in Segment IS6 ist umrandet; weitere Positionen von Interesse sind unterstrichen.

B, Gemittelte Strom-Spannungsverhältnisse der Aktivierung von Wildtyp (n=8) und S435P (n=6).

- C, Steady-state Aktivierung und Inaktivierung von Wildtyp (leere Symbole) und S435P (gefüllte Symbole).
- D, Repräsentative I_{Ba} durch Wildtyp- und S435P Kanäle während depolarisierender Testpulse von -100 mV.
- E, Gemittelte Zeitkonstanten der Kanalaktivierung von Wildtyp (n=8) und S435P (n=6) als Funktion des Testpotentials.
- F, Representative “tail currents” von Wildtyp und S435P Kanälen. Die Ströme wurden durch 20 ms Depolarisation aktiviert (0 mV, Wildtyp; -30 mV, S435P). Die Deaktivierung wurde während der Repolarisationen in 10 mV Stufen, beginnend mit -100 mV, aufgenommen.
- G, Darstellung der mittleren Zeitkonstanten der Deaktivierung für Wildtyp (n=8) und S435P (n=6) $Ca_v1.2$ Kanäle.

3.2.2 THREONINSUBSTITUTIONEN VON HYDROPHOBEN AMINOSÄUREN

Mehr als 90% der Prolin Mutanten in Segment IS6 leiteten keine Barium Ströme (Tab.7). Unsere früheren Untersuchungen an IIS6 ergaben, dass Veränderungen der Hydrophobizität in IIS6 signifikante Effekte auf das „gating“-Verhalten von $Ca_v1.2$ induzieren (Hering et al., 2008). Um eine mögliche analoge Rolle hydrophober Interaktionen in Segment IS6 aufzuklären, wurden Aminosäuren in der „bundle crossing region“ (Leu429-Leu434) systematisch durch das kleine und polare Threonin substituiert. Die Konstrukte L429T und L434T waren funktionell während andere Threoninmutationen keine I_{Ba} leiteten (Abb.24, Tab.7). L429T and L434T verschoben die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in die hyperpolarisierte Richtung und verlangsamten sowohl die Aktivierungs- als auch die Deaktivierungskinetik. Die größte Verschiebung der Kanalaktivierung und die entsprechende langsamste Kinetik bei Aktivierung und Deaktivierung wurden bei L434T beobachtet, was auf eine wichtige Rolle beim „gating“ von $Ca_v1.2$ Kanälen hindeutet. L429T und L434T inaktivierten während eines 300 ms Pulses zu jeweils $69\pm6\%$ und $63\pm5\%$ (Tab.7). In Einklang mit unseren vorangegangenen Beobachtungen in Segment IIS6 verliefen die Veränderungen der Spannungsabhängigkeiten der Aktivierung und Inaktivierung in IS6 ebenfalls parallel (Abb.32).

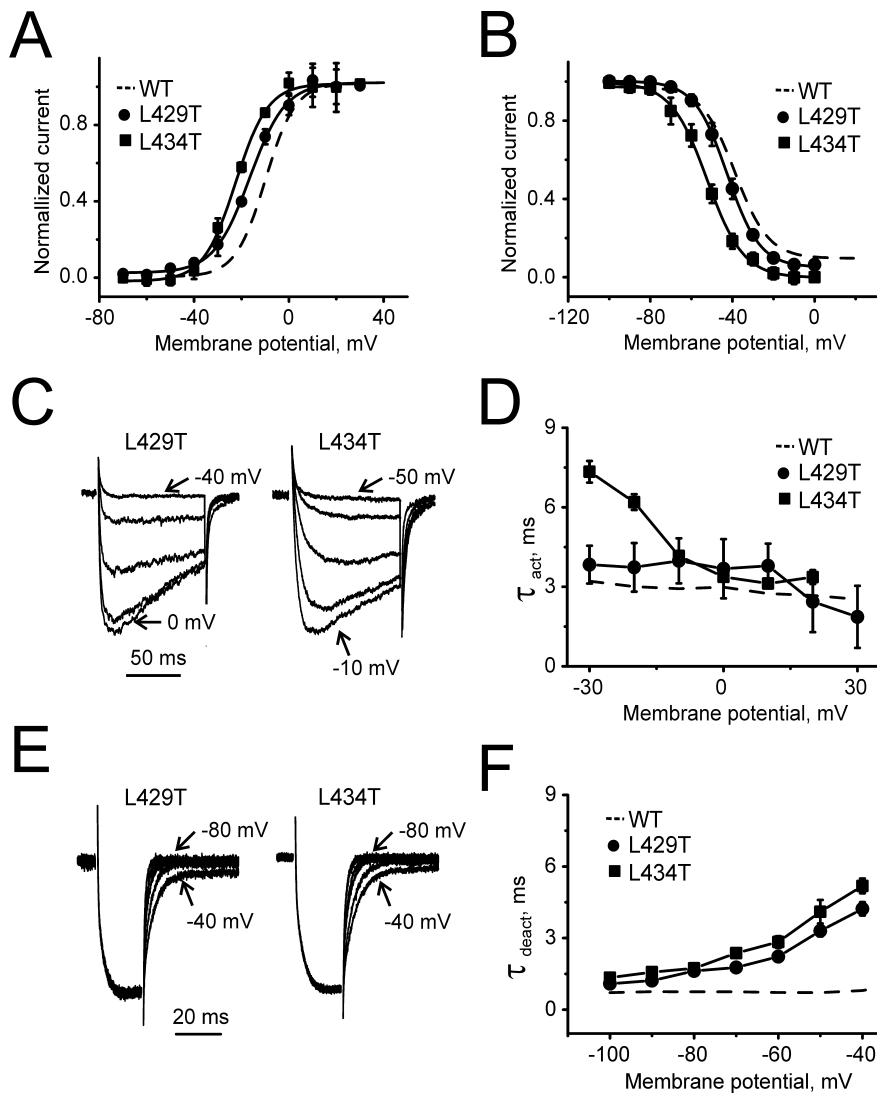


Abb. 24 Funktionsanalysen der Threoninmutationen von $Ca_V1.2$.

A, B Gemittelte Strom-Spannungs Verhältnisse der Aktivierung (A) und Inaktivierung (B) von Wildtyp (gestrichelte Linie $n=8$), L429T ($n=5$) und L434T ($n=5$).

C, I_{Ba} von L429T und L434T während depolarisierender Testpulse von -100 mV. L429T und L434T $Ca_V1.2$ α_1 -Untereinheiten wurden zusammen mit β_{1a} und $\alpha_2\delta_1$ Untereinheiten koexprimiert D, Gemittelte Zeitkonstanten der Kanalaktivierung von Wildtyp (gepunktete Linie, $n=8$), L429T ($n=5$) und L434T ($n=5$) $Ca_V1.2$ Kanälen. E, Repräsentative „tail currents“ von L429T und L434T. Die Ströme wurden während einer 20 ms Depolarisation auf -10 mV aktiviert. Die Deaktivierung wurde während der Repolarisationen in 10 mV

Stufen, beginnend mit -100 mV, aufgenommen. F, Gemittelte Zeitkonstanten der Deaktivierung von Wildtyp (gepunktete Linie, $n=8$), L429T ($n=5$) und L434T ($n=5$) $Ca_V1.2$ Kanälen.

3.3.3 SUBSTITUTION VON L434 DURCH AMINOSÄUREN UNTERSCHIEDLICHER HYDROPHOBIZITÄT

Um Einblicke in die strukturellen Anforderungen in Position Leu 434 zu bekommen, wurde dieser Rest durch Aminosäuren verschiedener Größe und Hydrophobizität ersetzt (L434T/V/G/A). Alanin, Valin und Glycin verschoben die Kanalaktivierung in Richtung negativerer Spannungen (von ~ -14 mV [L434V] bis ~ -21 mV [L434A] Abb.25). Die „steady state“ Inaktivierungskurven wurden in ähnlicher Weise verschoben, von ~ -9 mV (L434V) auf ~ -29 mV (L434A). Generell ähneln diese Veränderungen den zuvor an IIS6 Mutanten beobachteten Veränderungen im „gating“ (vergleiche Hohaus et al., 2005). Die Verschiebungen der Aktivierungskurve korrelierten jedoch nicht mit den Veränderungen der Hydrophobizitäten, was L434 von I781, bei dem diese Korrelation klar zu erkennen war, unterscheidet. (vergleiche Abbildung 26; und Abb.15 in Hering et al., 2008).

In Übereinstimmung mit den früheren Ergebnissen zu IIS6 Mutanten verliefen die Verschiebungen der Spannungsabhängigkeiten der Kanalaktivierung und Inaktivierung auch in Segment IS6 parallel. Dies wird auf Abbildung 25 deutlich in dem die halbmaximalen Spannungen der Aktivierung der L434 Mutanten gegen die halbmaximalen Spannungen der Inaktivierungen aufgetragen wurden. Die Korrelationsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0.95.

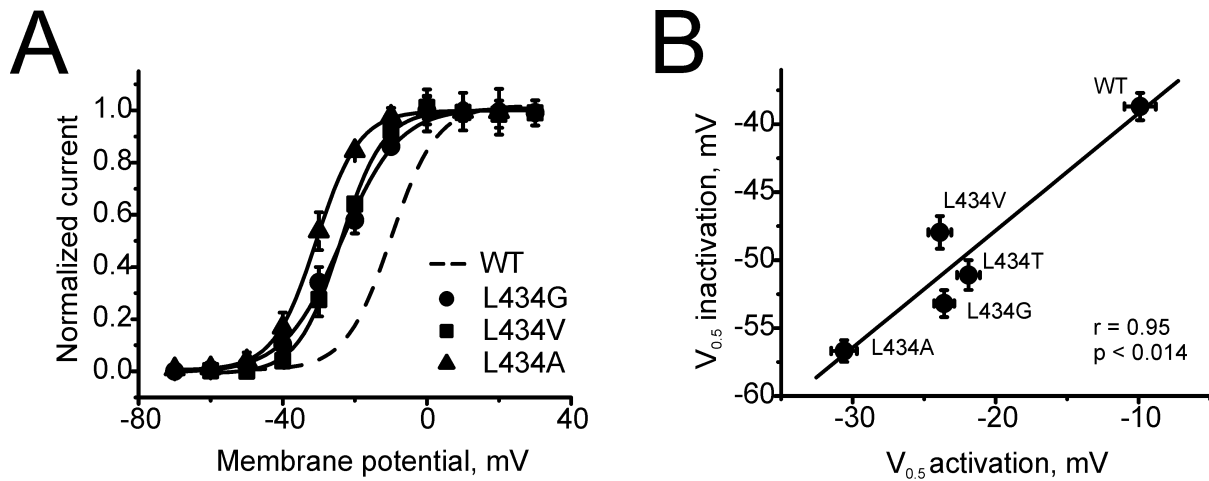


Abb. 25 L434 Substitutionen verschieben die Spannungsabhängigkeiten der Ca_v1.2 Kanalaktivierung und Inaktivierung.

A, Gemittelte Spannungsabhängigkeiten der Aktivierung von L434G, L434V und L434A Kanälen im Vergleich zum Wildtypkanal.

B, Korrelation zwischen den Potentialen der halb-maximalen Aktivierung ($V_{0.5,activation}$) und halb-maximalen Inaktivierung ($V_{0.5,inactivation}$) der L434 Mutanten. Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0.95.

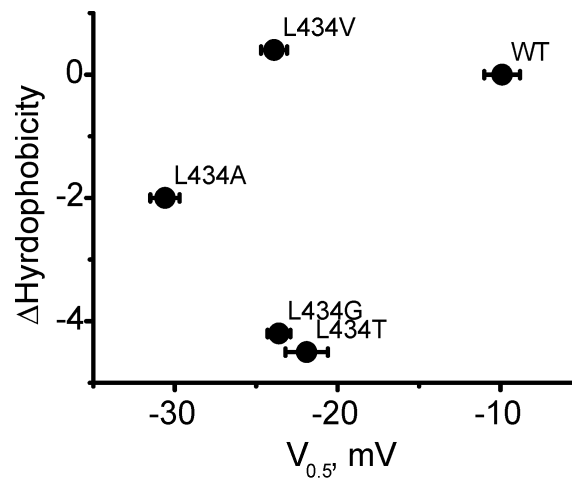


Abb.26 Veränderungen der Hydrophobizität (Δ hydrophobicity) in L434 aufgetragen gegen das Potential der halb maximalen Aktivierung.

3.2.4 DOPPELMUTATIONEN IN IS6 UND IIS6 DIE ADDITIVE VERSCHIEBUNGEN DER AKTIVIERUNGSKURVE VERURSACHEN

Die Identifizierung von „gating“-sensitiven Aminosäuren in den Segmenten IS6 und IIS6 (Hohaus et al., 2005 und in der vorliegenden Arbeit) ermöglichte es, durch Konstruktion von Doppelmutanten zu untersuchen, ob strukturelle Veränderungen in den Domänen I und II das „gating“ des Kanals voneinander unabhängig beeinflussen oder ob die Mutationen voneinander abhängig sind. Zuerst wurde der kombinierte Einfluss der IIS6 Mutationen L779T (-9 mV shift) und I781T (-28 mV shift) und der „gating sensitiven“ Aminosäuren in Segment IS6, L429T und L434T (mit Verschiebungen von jeweils ~ -7 and -12 mV) analysiert (Tab.7). Entsprechend unserem Homologiemodell der geschlossenen Konformation, befinden sich alle vier Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zueinander (Abb.33), wobei Leu434 (IS6) und Leu779 (IIS6) direkt miteinander interagieren und Ser435 (IS6) und Ile781(IIS6) mit Aminosäuren benachbarter S6 Helices interagieren. Es sollte daher untersucht werden, ob die Mutationen in diesen IS6 und IIS6 Regionen additive (=unabhängige) oder nicht-additive Effekte auf die Aktivierungs- und Inaktivierungskurven haben. Die Abbildung 27 zeigt, dass der Einfluss aller vier Mutationen in den Segmenten IS6 und IIS6 auf die Aktivierungskurven additiv waren. $V_{act0,5}$ wurde von Konstrukt L434T/I781T um -40 mV (-12 mV auf 28mV) und von Konstrukt L429T/I781T um -34 mV (-7 mV auf 28mV) verschoben.

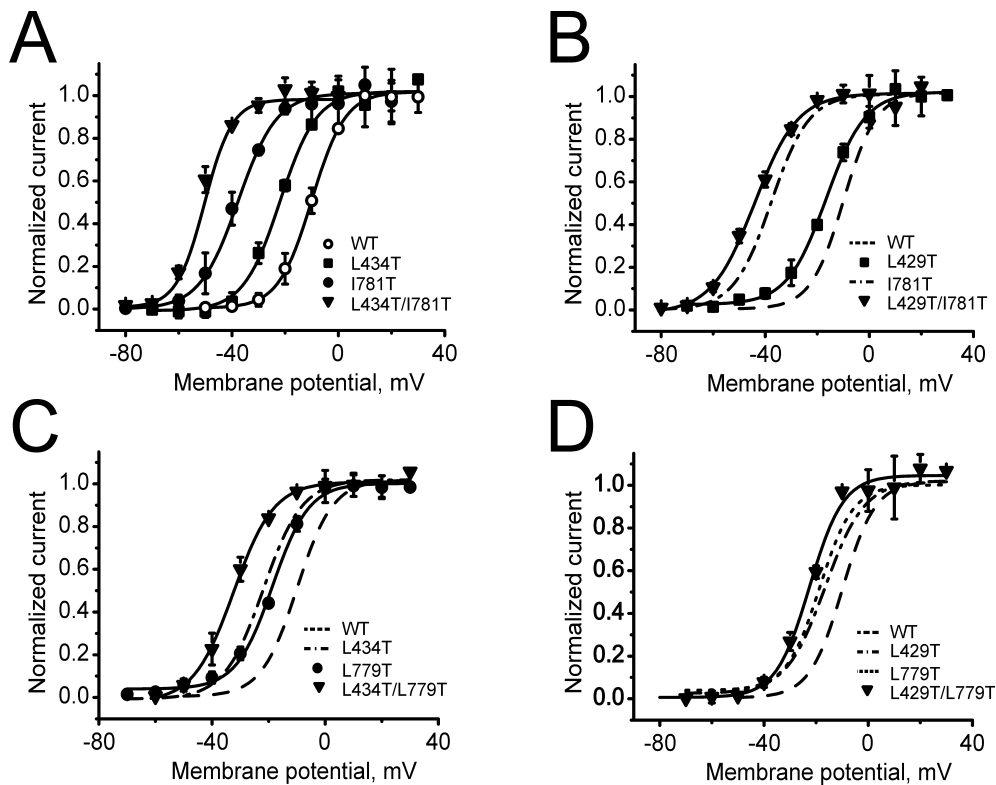


Abb. 27 Additive Verschiebungen der Spannungsabhängigkeiten der $\text{Ca}_v1.2$ Kanal Aktivierung. A-C, Gemittelte Spannungsabhängigkeiten der Aktivierung von Wildtyp (n=8), I781T (n=7), L429T (n=5), L434T (n=5), L779T (n=5) und den entsprechenden Doppelmutanten L434T/I781T (n=5), L429T/I781T (n=7), L429T/L779T (n=5) und L434T/L779T (n=7).

Die Doppelmutationen L429T/I781T und L434T/I781T zeigten eine langsame Aktivierung bei hyperpolarisierten Spannungen (Abb.28). Die starke Verschiebung der Aktivierungskurve von L434T/I781T war mit einer langsameren Aktivierung ($\tau_{\text{act}} \approx 27$ ms bei -60 mV) assoziiert als bei I781T (13 ms bei -50 mV, siehe Hohaus et al., 2005). Die Deaktivierung der Doppelmutanten L429T/I781T und L434T/I781T war bei allen Spannungen langsamer, als die der Einzelmutante I781T (Abb.29).

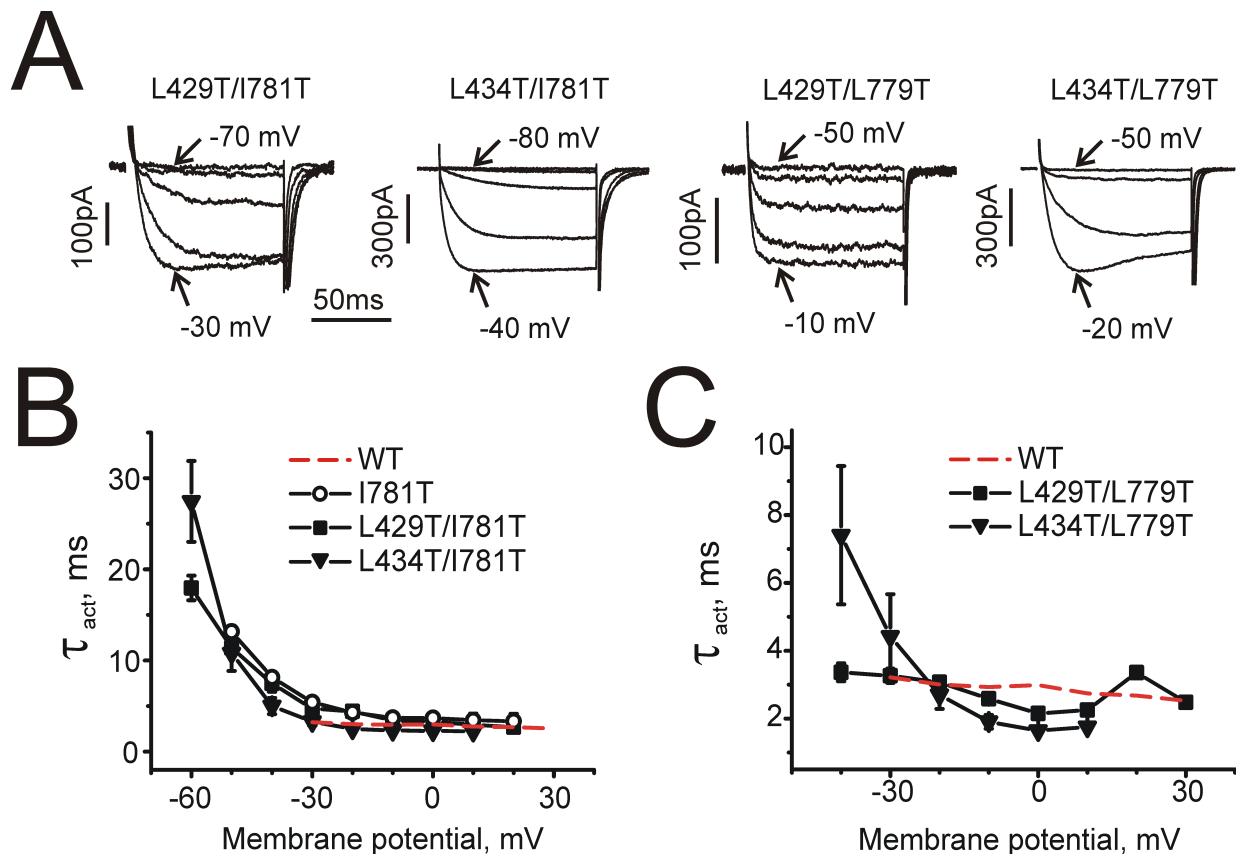


Abb. 28 Doppelmutationen in den Segmenten IS6 und IIS6 verlangsamten die Aktivierungskinetik von $\text{Ca}_v1.2$. A, I_{Ba} durch die Konstrukte L429T/L779T, L429T/I781T, L434T/L779T und L434T/I781T. I_{Ba} wurden aktiviert durch depolarisierende Testpulse von einem Haltepotential von -100 mV. B,C, Spannungsabhängigkeit der gemittelten Zeitkonstanten der Aktivierung von Wildtyp (gepunktete Linie, n=8) im Vergleich zu L429T/L779T (n=5), L429T/I781T (n=7), L434T/L779T (n=7) und L434T/I781T (n=5) $\text{Ca}_v1.2$ Kanälen.

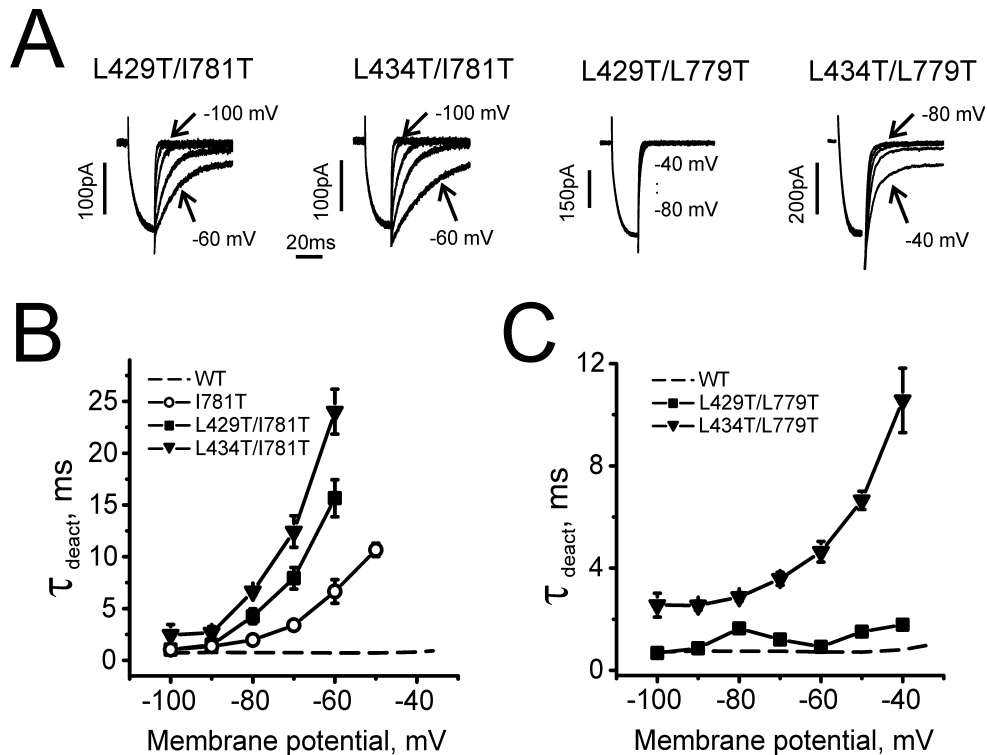


Abb. 29 Doppelmutationen in den Segmenten IS6 und IIS6 verlangsamten die Deaktivierungskinetik von $Ca_v1.2$. A, Representative “tail currents” der mutierten Kanäle L429T/L779T, L429T/I781T, L434T/L779T und L434T/I781T. Die Ströme wurden aktiviert während einer 20 ms konditionierenden Depolarisation auf -10 mV bei L429T/L779T, -40 mV bei L429T/I781T, -20 mV bei L434T/L779T und -40 mV bei L434T/I781T. Die Deaktivierung wurde während der Repolarisationen in 10 mV Stufen, beginnend mit -100 mV, aufgenommen. B,C Spannungsabhängigkeit der gemittelten Zeitkonstanten der Deaktivierung von Wildtyp und I781T im Vergleich zu L429T/L779T, L429T/I781T, L434T/L779T und L434T/I781T.

3.2.5 NICHT ADDITIVE VERSCHIEBUNGEN DER AKTIVIERUNGSKURVE DURCH DOPPELMUTATIONEN IN IS6 UND IIS6

Während die Doppelmutation von S435P (IS6) und I781P (IIS6), die als Einzelmutanten die Aktivierungskurve jeweils stark verschoben (-26 mV und -37 mV), nicht zu einem leitenden Kanal führte (Tab.7), war die Doppelmutante S435P/I781T funktionell (Abb.30). Die entsprechenden Verschiebungen der Aktivierungskurven von S435P (-26 mV) und I781T (-28 mV) waren nicht additiv (-26 mV -28 mV $\neq$ -33 mV, Abb.30A). Interessanterweise ähnelten die Zeitverläufe der Aktivierung und Deaktivierung von S435P/I781T jenen der Kinetik der Einzelmutanten S435P und I781T (siehe Abb. 30B-E). Nicht additive Verschiebungen der Aktivierungskurven sind Anzeichen für energetische Kopplung der zugrundeliegenden Konformationsänderungen von IS6 und IIS6 (Yifrach and MacKinnon, 2002).

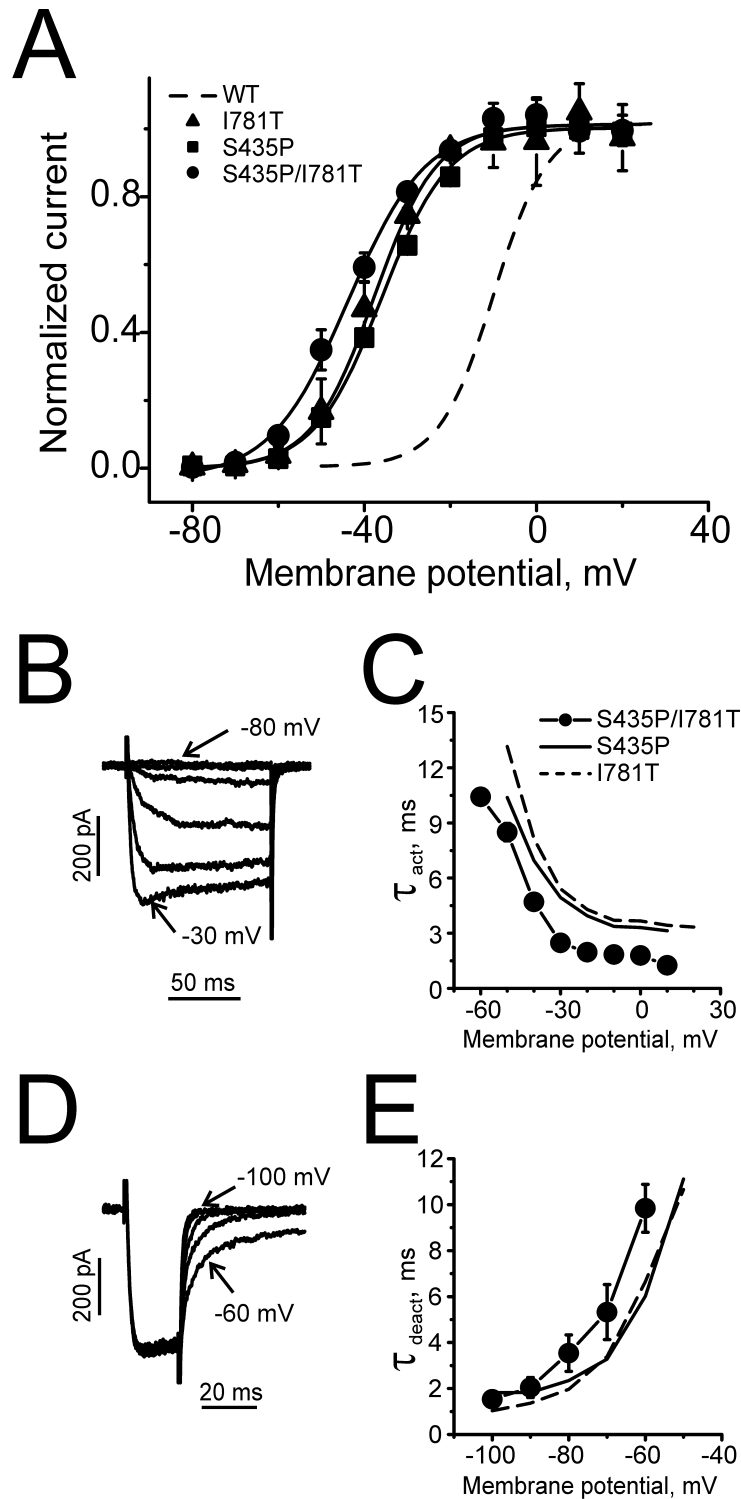


Abb. 30 „gating“ der Doppelmutante S435P/I781T

A, Gemittelte Aktivierungskurven der Mutanten S435P/I781T, S435P, I781T und Wildtyp (gepunktete Linie).

B, Representative I_{Ba} durch die Doppelmutante S435P/I781T während depolarisierender Testpulse in 10 mV Schritten, ausgehend von -100 mV.

C, Gemittelte Zeitkonstanten der Kanalaktivierung von S435P/I781T sowie S435P und I781T.

D, Representative “tail currents” von S435P/I781T. Die Ströme wurden aktiviert durch depolarisierende Testpulse auf -10 mV. Die Deaktivierung wurde während der Repolarisationen in 10 mV Stufen, beginnend mit -100 mV, aufgenommen. E. Gemittelte Zeitkonstanten der Deaktivierung von S435P/I781T sowie S435P und I781T.

Um zu untersuchen, ob ein von S435P verursachtes „helix-bending“ zu diesen Veränderungen führte, wurde zusätzlich die Mutante S435A/I781T analysiert. S435A induzierte eine statistisch signifikante Verschiebung der Aktivierungskurve um 6 mV in die negative Richtung. Die Doppelmutante verschob die Aktivierungskurve jedoch in ähnlichem Ausmaß wie I781T (Abb.31).

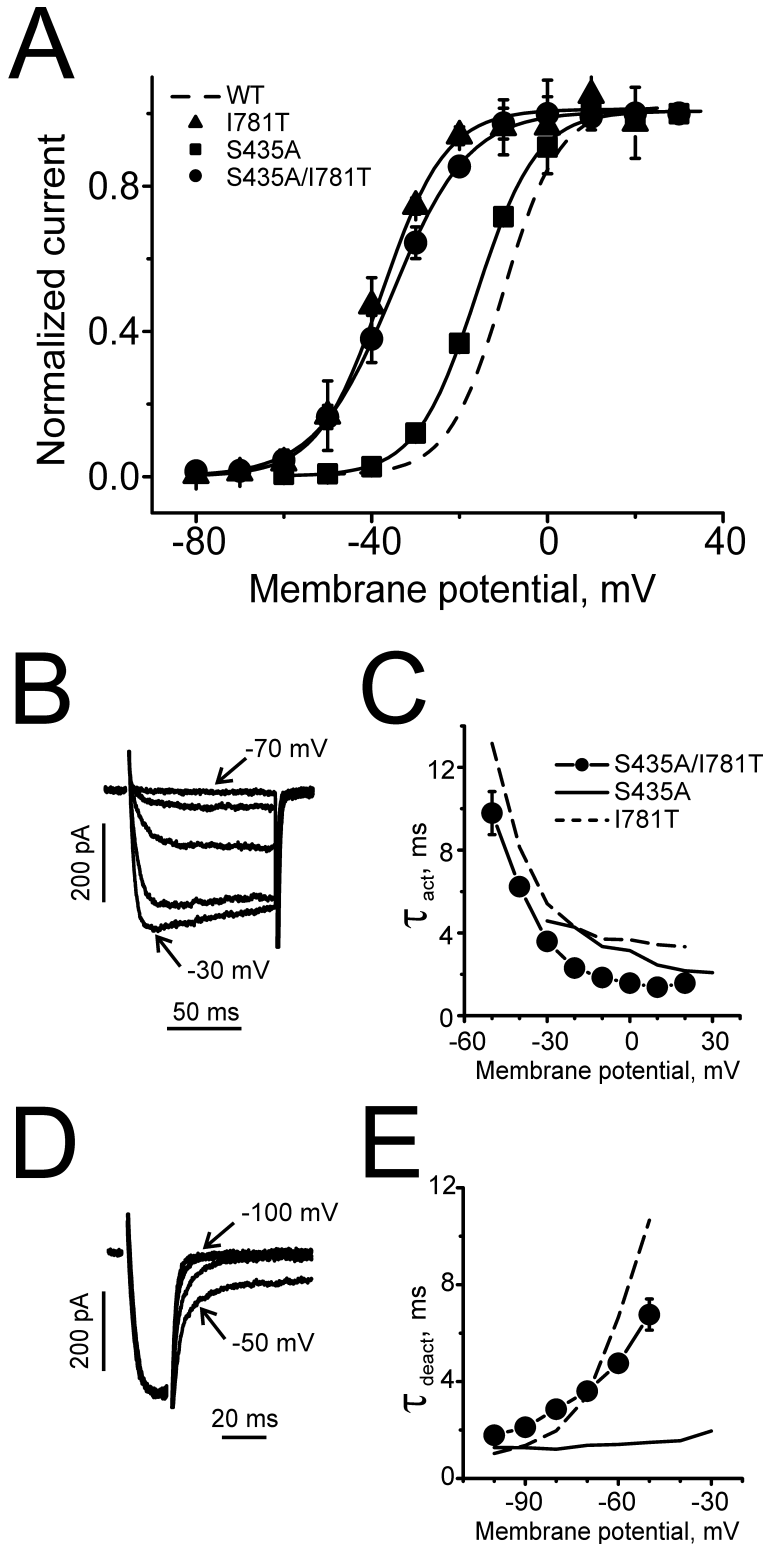


Abb. 31 Gating der Doppelmutante S435A/I781T.

A, Gemittelte Aktivierungskurven von S435A/I781T, S435A, I781T und Wildtyp (gestrichelte Linie).

B, Representative I_{Ba} von S435A/I781T während depolarisierender Testpulse in 10 mV Schritten beginnend -100 mV.

C, Gemittelte Zeitkonstanten der Aktivierung von S435A/I781T sowie S435A und I781T.

D, Representative “tail currents” von S435A/I781T. Die Ströme wurden aktiviert während einer 20 ms konditionierenden Depolarisation auf -10 mV. Die Deaktivierung wurde während der Repolarisationen in 10 mV Stufen, beginnend mit -100 mV, aufgenommen.

E, Gemittelte Zeitkonstanten der Deaktivierung von S435A/I781T sowie S435A und I781T.

3.2.6 KORRELATION ZWISCHEN DEN VERSCHIEBUNGEN DER AKTIVIERUNGS- UND INAKTIVIERUNGSKURVEN

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in IIS6 verliefen die Veränderungen der Spannungsabhängigkeiten von Aktivierung und Inaktivierung parallel. Größere Verschiebungen der Aktivierungskurven resultierten ebenfalls in größeren Verschiebungen der Inaktivierungskurven (siehe Abb. 32).

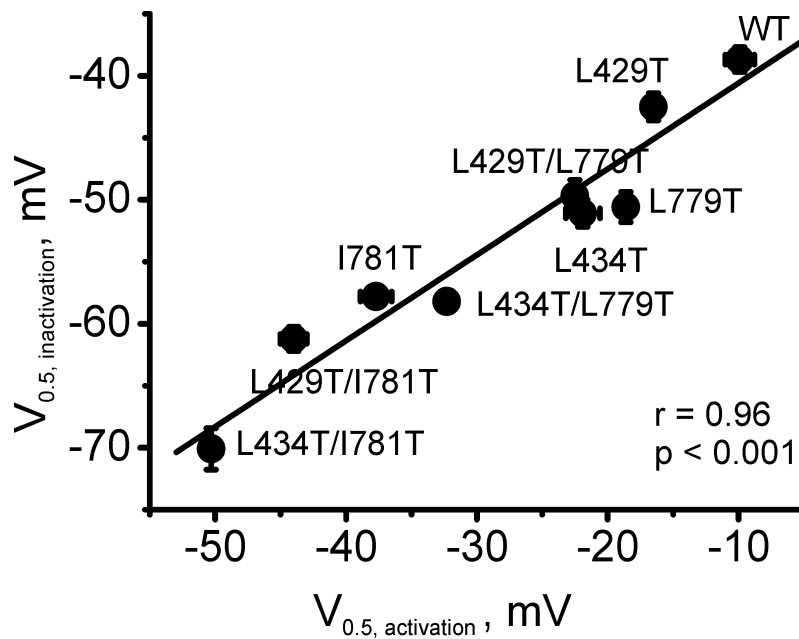


Abb. 32 Korrelation der Potentiale der halb-maximalen Aktivierung ($V_{0.5, \text{activation}}$) und der halbmaximalen Inaktivierung ($V_{0.5, \text{inactivation}}$) der $\text{Ca}_v1.2$ Mutanten. Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,96.

4.DISKUSSION

Im Rahmen der Dissertationsarbeit ist es gelungen, eine Reihe von Aminosäuren (Leu 779, Ala 780, Ile 781, Ala 782) im porenformenden Segment IIS6 zu identifizieren, die eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Inaktivierung von $\text{Ca}_v1.2$ Kanälen spielen. Die Ergebnisse zu den veränderten „gating“ Eigenschaften weisen Ähnlichkeiten mit einer kürzlich beschriebenen Kanalopathie auf, die, ausgelöst durch eine Punktmutation (Ile745T) im $\text{Ca}_v1.4$ Kanal, zu schweren X-gebundenen Dysfunktionen an der Retina führt (Hope et al., 2005).

Threoninsubstitution von I781 in $\text{Ca}_v1.2$ und I745 in $\text{Ca}_v1.4$ haben ähnlichen Phänotyp

Analog zu der, an äquivalenter Position im $\text{Ca}_v1.4$ Kanal gelegenen I745T Mutation (Hemara-Wahanui et al., 2005), resultierte auch die Mutation I781T des $\text{Ca}_v1.2$ Kanals in einer fast identischen Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (Abb.12B) und verlangsamter Inaktivierung (Tab.4, was auf einen gemeinsamen Mechanismus von „gating“disturbances (Beeinträchtigungen) in beiden Kanaltypen schließen lässt.

I781T verursachte weiters eine Verschiebung der spannungsabhängigen Inaktivierung in die negative Richtung (Abb.14) und verlangsamte die Aktivierung bei hyperpolarisierten Spannungen (Abb.16), sowie die Deaktivierung bei allen Potentialen (Abb.17). Diese veränderten „gating“ Eigenschaften begünstigen den Übergang des Kanals in den geöffneten Zustand, was sich einerseits mit einer Destabilisierung des geschlossenen Zustands erklären lässt (das heißt durch einen beschleunigten Übergang in den offenen Zustand; siehe Yifrach and MacKinnon, 2002), andererseits durch eine Stabilisierung des offenen Zustands (das heißt durch verlangsamtes Zurückkehren in den geschlossenen Zustand; siehe Zhao et al., 2004a), beziehungsweise durch beide Mechanismen.

Fünf weitere Ile781 Substitutionen durch Aminosäuren unterschiedlicher Hydrophobizität, die funktionsfähige Kanäle produzierten, führten zu ähnlichen Veränderungen im „gating“ (Abb.13,14) und lassen eine Destabilisierung der Kanalkonformation plausibler erscheinen als eine Stabilisierung. Ein möglicher Mechanismus für die Destabilisierung des geschlossenen Zustands könnte eine Reduktion hydrophober Interaktionen in Position Ile781 mit benachbarten Resten in der S6-„bundle crossing“ Region sein. Diese Hypothese entspricht auch den gemessenen größeren Verschiebungen der Aktivierungskurve der weniger hydrophoben I781T Mutante, im Vergleich zu den hydrophoberen Substitutionen durch Alanin und Leucin (Abb.13). In Wildtyp Kanälen tragen demnach hydrophobe Interaktionen

von Ile781 mit benachbarten Resten in der „bundle crossing“ Region zu einer Stabilisierung der geschlossenen Konformation bei.

Da Asparagin weniger hydrophob ist als Threonin (Kyte and Doolittle, 1982) und dennoch eine ähnliche Verschiebung induziert (Abb.15), lässt sich das gesamte Bild nicht ausschließlich durch Veränderungen der Hydrophobizität erklären. Leucin unterscheidet sich von Isoleucin nur durch die Positionierung einer einzigen Methylgruppe, induzierte jedoch eine geringe Verschiebung. Es kann angenommen werden, dass Ile781 Teil einer „tightly fitted region“ im geschlossenen Kanalzustand ist. Prolin, dessen Hydrophobizität näher dem des Wildtyp-Ile781, als dem Threonin und Asparagin ist, verursachte den größten Effekt auf die Kanalaktivierung. Es könnte, durch ein begünstigen des „bending“ an der α -Helix (Cordes et al., 2002), die Interaktion mit benachbarten Aminosäuren im geschlossenen Zustand stören, und somit die offene Konformation begünstigen.

HINWEISE AUF EINE STÄRKERE STABILISIERUNG DES OFFENEN ZUSTANDS

Die für I781P und I781T beobachtete Verlangsamung der Deaktivierung (Abb.17), sowie eine reduzierte Inaktivierung, die für die Mehrheit der Ile781 Mutationen (Tab.4) beobachtet wurde, sind ein starkes Indiz für eine Stabilisierung des offenen Zustands. Ein verlängertes Verweilen im offenen Zustand würde in einer langsameren netto-Übergangsrate vom offenen in den inaktivierten Zustand resultieren. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass bereits eine einzelne Punktmutation in einem S6 Segment ausreichend ist, um das Schließen des Kanals zu verlangsamen. Man kann daher vermuten, dass für das Schließen des Kanals die Rückkehr aller 4 porenformenden Elemente in den Ruhezustand erforderlich ist. Wenn ein Element der „gatig“ Struktur“ im geschlossenen Zustand nicht präzise passt, dann könnte die ionenleitende Pore länger im offenen Zustand verweilen.

POSITIONALE SPEZIFITÄT VON ILE781

Um die Spezifität der Strukturveränderungen in Position Ile 781 zu untersuchen, wurden die benachbarten Aminosäuren von Cys769-Val783 ebenfalls durch Proline substituiert (Abb.18). Dabei konnten Reste (I781P>L779P, A782P, A780P), die markante Verschiebungen der Aktivierung und Inaktivierung verursachten, in einem Cluster nahe der inneren Kanalöffnung (innerer Kanalmund) lokalisiert werden. Die mutierten Kanäle aktivierten bei hyperpolarisierten Spannungen umso langsamer, je weiter ihre spannungsabhängige Aktivierung durch die Prolinsubstitution verschoben war (Abb.19A,20). A782P zeigte eine mittelmäßig verlangsamte Inaktivierung, während die Inaktivierung für L779P und A780P

sehr stark reduziert wurde, was vermuten lässt, dass alle 3 Reste in unterschiedlichem Ausmaß zur Aktivierung und Inaktivierung beitragen.

Im oberen Abschnitt von IIS6 verursachte N771P eine Verschiebung der Aktivierungskurve von -17mV. Dies führte zu einer geringen Verlangsamung der Inaktivierungskinetik, ohne die Inaktivierungskurve markant zu verschieben und beeinträchtigte die Aktivierungsrate bei hyperpolarisierten Spannungen nicht (Abb.19B,20, Tab.5). Darüberhinaus blieb bei N771P, anders als bei I781P und I781T, die Spannungsabhängigkeit der Deaktivierung nahezu unverändert (Abb.17B). Diese Resultate deuten darauf hin, dass N771P nicht zur Stabilisierung des offenen Kanalzustands beiträgt, sondern wahrscheinlicher den geschlossenen Kanalzustand destabilisiert.

Die für alle Mutanten (außer für A780P) beobachtete Korrelation zwischen der Verschiebung der Aktivierung und Inaktivierung, ist eine interessante Beobachtung *per se* (Abb.14,19B). Der strukturelle Hintergrund dieser Korrelation ist derzeit unbekannt.

MODULATION DER AKTIVIERUNG DURCH DIE β -UNTEREINHEIT

Funktionelle und strukturelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Modulation der Kanalaktivierung und Inaktivierung durch β -Untereinheiten, genauer durch deren Einfluss auf die Bewegung von Segment IS6, verursacht sein könnte (Hering, 2002; Van Petegem et al., 2004). Um sicher zustellen, dass die gemessenen Effekte der Mutationen auf die Stabilität der Pore, unabhängig sind von den Modulationen, die durch die akzessorische β -Untereinheit verursacht werden, wurden Wildtyp, I781P und I781T jeweils mit β_{1a} bzw β_{2a} koexprimiert. I781P und I781T zeigten die gleiche Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung und verlangsamte Inaktivierung, die entsteht, wenn Wildtyp α_1 -Untereinheiten koexprimiert werden mit β_{2a} eher als mit β_{1a} (Abb.21,Tab.6). Diese Ergebnisse, sind ein Hinweis darauf, dass die β -Untereinheiten Modulation von Segment IIS6 und die Effekte von I781 auf die Porenstabilität durch unabhängige Mechanismen bestimmt werden.

SIGNIFIKANZ VON ILE 781 UND BENACHBARTEN RESTEN FÜR DIE AKTIVIERUNG VON Ca^{2+} KANÄLEN

Die Kristallstruktur des 2TM helikalen kalziumgesteuerten Kaliumkanals MthK zeigte, dass ein konserviertes Glycin in Position 83 zum Auslenken („bending“) der porenauskleidenden M2 Helix beiträgt, was in Folge zum Öffnen des Kanals führt (Jiang et al., 2002). Frühere Studien zeigten, dass das entsprechende Glycin (Gly219) des bakteriellen spannungsabhängigen Natriumkanals NaChBac einen „gating hinge“ darstellt (Zhao et al.,

2004a). Diese Schlussfolgerung basiert auf zwei wesentlichen Befunden: 1. G219P verschiebt die Aktivierungskurve in negativer Richtung und 2. diese Verschiebung wird begleitet von einer Verlangsamung der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik. Mutiert man das korrespondierende Gly770 in Ca_v1.2 zu Prolin, kommt es zu keinen signifikanten Effekten auf das „gating“ des Kanals (Abb.19, Tab.5). Es ist daher unwahrscheinlich, dass Gly770 Teil eines „gating hinges“ ist. Der kinetische Phenotyp von Ile781 und benachbarter Reste (Leu 779, Ala 780, und Ala782), die in dieser Arbeit untersucht wurden, ist jedenfalls dem, der für das NaChBac-Konstrukt G219P (Zhao et al., 2004a) beschrieben wurde, sehr ähnlich. Die Daten deuten daher eher auf ein „Helix bending“ in Ca_v1.2 am inneren Kanalmund hin. Die Aminosäuren L779-A782 sind in HVA Kalziumkanälen konserviert, und es kann angenommen werden, dass diese Sequenz (LAIA) Teil eines universellen „gating“ Mechanismus von HVA Kanälen ist.

Obwohl die mutierten Kanalproteine offensichtlich in die Plasmamembran eingebaut werden, leiteten manche Prolinmutationen keine Ba²⁺ Ströme (Abb.22). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Substitutionen in S6 Segmenten die Funktionalität der ionenleitenden Pore stören könnten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Prolinsubstitutionen im zentralen Teil des NaChBac S6 Segments gemacht (Zhao et al., 2004b).

Man kann jedoch nicht ausschließen, dass andere Substitutionen in diesen Positionen zu funktionsfähigen Kalziumkanälen mit anderen „gating“ Eigenschaften führen.

“GATING” SENSITIVE AMINOSÄUREN IN SEGMENT IS6

In Weiterführung der Arbeiten an Segment IIS6, wurden in Segment IS6 des Ca_v1.2 Kanals ebenfalls durch Punktmutationen induzierte Veränderungen der Stromkinetik und „steady state“ Aktivierungs- und Inaktivierungskurven untersucht.

Anders als aufgrund der Ergebnisse in IIS6 erwartet, ergab ein Prolinscan von Segment IS6 jedoch nur eine einzige funktionsfähige Mutante S435P, die die Aktivierungs- und Inaktivierungskurve um ~ -26mV verschob (Abb.23). Aktivierung und Deaktivierung von S435P waren signifikant langsamer als im Wildtyp und verliefen analog zu den zuvor untersuchten Prolinmutationen zwischen den Aminosäuren Leu779 und Ile781 (LAIA Motiv) in IIS6.

ZUR ROLLE VON PROLINSUBSTITUTIONEN IN S6 SEGMENTEN

Proline könnten starre Auslenkungen („Knicke“) in den Helices verursachen und dadurch eine der möglichen Konformationen während der Aktivierung stabilisieren. Man könnte daher spekulieren, dass die Konformationsänderungen durch Prolinsubstitutionen offensichtlich zu

einer Stabilisierung des offenen und einer Destabilisierung des geschlossenen Zustands beitragen (Hohaus et al., 2005; Hering et al., 2008). Es ist weiters möglich, dass Prolinmutationen das Öffnen des Kanals über eine Destabilisierung der Wasserstoffbrücken-Interaktionen des geschlossenen Zustands erleichtern. Die Amidgruppe des Prolins kann nicht als Wasserstoff-Donor agieren und zerstört dadurch die Wasserstoffbrücken-Bindungen am Rückgrat der α -Helix, was wiederum die Energie, die für den Übergang vom geschlossenen in den offenen Zustand notwendig ist, reduzieren könnte. Für einige Kaliumkanäle wird angenommen, dass die Helix-Destabilisierung durch Proline für das reguläre Gating erforderlich ist (vergleiche z.B. Shrivastava et al., 2000; Labro et al., 2003). Das Unvermögen der IS6 Prolinmutanten funktionsfähige Kanäle zu bilden scheint mit den Folgen der Helixkrümmung zusammen zu hängen. Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass auch die nicht funktionellen Konstrukte korrekt in die Membran transportiert wurden.

WEITERE EIGENSCHAFTEN VON AMINOSÄUREN, DIE DAS AKTIVIERUNGSVERHALTEN BEEINFLUSSEN

Die IS6 Helix ist insofern einzigartig, als dass sie drei Glycine (Gly422, Gly432, Gly436) besitzt, die ihr nicht nur Flexibilität verleihen sondern auch durch die kleine Größe ein dichtes „packen“ der Helix ermöglichen. Helix-stabilisierende Alaninsubstitutionen in dieser Region (G432A und G436A) sind funktional (Raybaud et al., 2006). Proline könnten also diese dichte „Packung“ zerstören, während die zweitkleinste Aminosäure Alanin toleriert wird.

Ein ähnlicher Gating-Phenotyp wie der für S435P beobachtete, wurde durch Threonin Substitutionen (L429T, L434T) in der „bundle crossing region“ von IS6 produziert (putative Position siehe Alignment Abb. 23). Diese Mutanten erweiterten die vorangegangenen Untersuchungen, in denen ein Cluster von Aminosäuren in IIS6 (LAIA Motiv, siehe Hohaus et al., 2005) als „gating-related region“ identifiziert wurden. Die bei S435P, L429T und L434T (Abb. 23, 24) beobachtete Verlangsamung der Deaktivierung ist ein starkes Indiz für die Stabilisierung der offenen Kanal-Konformation. Der starke Effekt von S435P liefert einen weiteren Beweis, dass ein mögliches „Helix-bending“ in der Pore von Cav1.2 wahrscheinlich nahe am inneren Ende des Kanals stattfindet. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus bleibt jedoch unklar.

DIE VERSCHIEBUNGEN DER „STEADY-STATE“ KURVEN DER DOPPELMUTANTEN

L429T/I781T, L434T/I781T KORRELIERT MIT DER VERLANGSAMUNG DES AKTIVIERUNGS- UND DEAKTIVIERUNGSVERHALTENS

Die in Ile781 (IIS6) nach Aminosäuresubstitutionen unterschiedlicher Hydrophobizität, Größe und Polarität analysierten Veränderungen der „gating“-Eigenschaften, wurden durch die Untersuchungen an IS6/IIS6 Doppelmutanten bestätigt und erweitert. Die Mutante L434T/I781T verschob die Aktivierungskurve um ~ -40 mV und zeigte den langsamsten Aktivierungs-Zeit Verlauf ($\tau_m=27$ ms bei -60 mV), während die Aktivierungskurve des schneller aktivierenden Konstrukts L429T/I781T ($\tau_m=17$ ms bei -60 mV) um ~ -24 mV verschoben wurde (Abb. 27, 28). Dieser Trend zeigte sich bei der Deaktivierung noch deutlicher, wo die Kinetik des Stromabfalls („current decay“) bei L434T/I781T > L429T/I781T > I781T > Wildtyp am langsamsten verlief (Abb. 27, 29). Ähnliche Verschiebungen und Verlangsamung der Deaktivierungskinetik wurden auch bei NaChBac Kanälen beobachtet, wenn das konservierte Gly219 (entsprechend einem putativen „hinge Glycin“ in IS6 der meisten Kaliumkanäle) zu Prolin mutiert wurde (Zhao et al., 2004a).

ADDITIVE EFFEKTE VON MUTATIONEN IN DEN BENACHBARTEN SEGMENTEN IS6 UND IIS6

Bei energetischer Kopplung von Aminosäuren würden sich die Verschiebungen der Aktivierungskurven der Doppelpmutanten von der Summe der beiden Einzelmutanten unterscheiden. Unsere Daten zeigen, dass die Mutanten L429T, L434T in IS6 sowie L779T und I781T in Segment IIS6 unabhängig voneinander zum Öffnen von $\text{Ca}_v1.2$ beitragen (additive Verschiebungen der Aktivierungskurven). Man könnte daher schließen, dass die individuellen Konformationsänderungen in IS6 und IIS6 energetisch unabhängig voneinander sind. Diese Annahme wurde auch durch „mutant cycling analysis“ nach Horovitz, 1996 (Daten nicht gezeigt) bestätigt.

INTERAKTION VON S435P (IS6) UND I781T (IIS6)

Mutation S435P in Segment IS6 hatte den stärksten Einfluss auf die Kanalaktivierung von allen untersuchten IS6 Aminosäuren (Abb.23). Um mögliche Wechselwirkungen zwischen IS6 und IIS6 Aminosäuren zu untersuchen wurde die Doppelmutante S435P/I781P kreiert (I781P in IIS6 induziert die ausgeprägteste Verschiebung der Aktivierungskurve), die jedoch nicht funktionell war. S435P wurde deshalb mit I781T, das zu milderer „gating perturbations“ führte kombiniert. Beide Mutationen produzierten ähnliche Verschiebungen der Aktivierungskurven ($\Delta V_{0.5\text{act.}(S435P)} \approx -26$ mV, $\Delta V_{0.5\text{act.}(I781T)} \approx -28$ mV). Die nicht-

additiven Verschiebungen der Aktivierungskurven durch die Doppelmutante S435P/I781T ($\Delta V_{0.5act.(S435P/I781T)} \approx -33$ mV, Abb.30A) ist ein starkes Indiz für die Abhängigkeit der „gating perturbation“ in beiden Segmenten. Interessanterweise ähnelt der kinetische Phenotyp von S435P/I781T der Aktivierung und Deaktivierung der jeweiligen Einzelmutanten (Abb.30C,E). Eine mögliche Interpretation wäre, dass diese Aminosäuren miteinander interagieren. Die Mutation von entweder S435 oder I781 (oder beider gleichzeitig) würde im Rahmen einer solchen Hypothese die Interaktion gleichermaßen stören und folglich ähnliche Veränderungen im „gating“ verursachen.

Die Lokalisierung dieser Aminosäuren in einem Homologiemodell (Abb.33) lässt eine direkte Interaktion unwahrscheinlich erscheinen. Eine „long-range Kopplung“ (siehe Übersichtsarbeit Horovitz, 1996) der Aminosäuren kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Basierend auf MD Simulationen wäre eine „long-range“ Interaktion zwischen den benachbarten IIS6 und IIIS6 Helices möglich (Stary et al., 2008). Substitution von S435 durch Helix-stabilisierende Alanine verschob die „steady state“ Aktivierungskurve um 6 mV nach links. Diese Verschiebung war vergleichsweise gering, jedoch statistisch signifikant ($p < 0.05$). Die Doppelmutation S435A/I781T produzierte ebenso nicht-additive Verschiebungen der Aktivierungskurven (Abb.31, z.B. der Unterschied zwischen den halbmaximalen Potentialen der Kanalaktivierung der Doppelmutante S435A/I781T und I781T war geringer, als die für die Einzelmutation S435A beobachtete Verschiebung). Die „mutant cycling analysis“ ergab jedoch ein $\Delta\Delta G \approx 1.13 \pm 0.70$ kcal/mol, ein Wert der sich statistisch nicht signifikant von Null unterscheidet. Im Vergleich zu S435P/I781T, bei dem die „mutant cycling analysis“ einen deutlichen Hinweis auf Kooperativität ergab, ist eine energetische Kopplung zwischen S435A und I781T deshalb weniger wahrscheinlich. Die unterliegenden molekularen Mechanismen sowie die jeweiligen Beiträge von verschiedenen S6 Segmenten zur Stabilität der offenen und/oder geschlossenen $Ca_v1.2$ Konformationen bedürfen weiterer Untersuchungen.

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Mutationen in den Poren-formenden Segmenten IS6 und IIS6 systematisch untersucht. Veränderungen in der Hydrophobizität (ausführlich untersucht für I781) und Prolin-Substitutionen verursachten die ausgeprägtesten Verschiebungen der Potentialabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung. Hydrophobizitätsänderungen in der Position I781 korrelierten mit den resultierenden Verschiebungen der Aktivierungskurven auf der Potentialachse. Weiters konnte durch Untersuchungen des „gating“ Verhaltens von IS6/IIS6 Doppelmutanten erste Einblicke in

mögliche Interaktionen von „benachbarten“ S6 Aminosäuren erhalten werden. Die auf Abb. 33 gezeigte distante Lokalisation der jeweiligen S6 Aminosäuren zeigt, dass das vorliegende Homologiemodell der $\text{Ca}_v1.2$ Pore weiterer Präzisierungen bedarf. Die in meiner Arbeit vorgestellten methodologischen Ansätze scheinen geeignet, in weiterführenden Untersuchungen unter Einbeziehung der Segmente IIS6 und IVS6 zur Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehungen an $\text{Ca}_v1.2$ beizutragen.

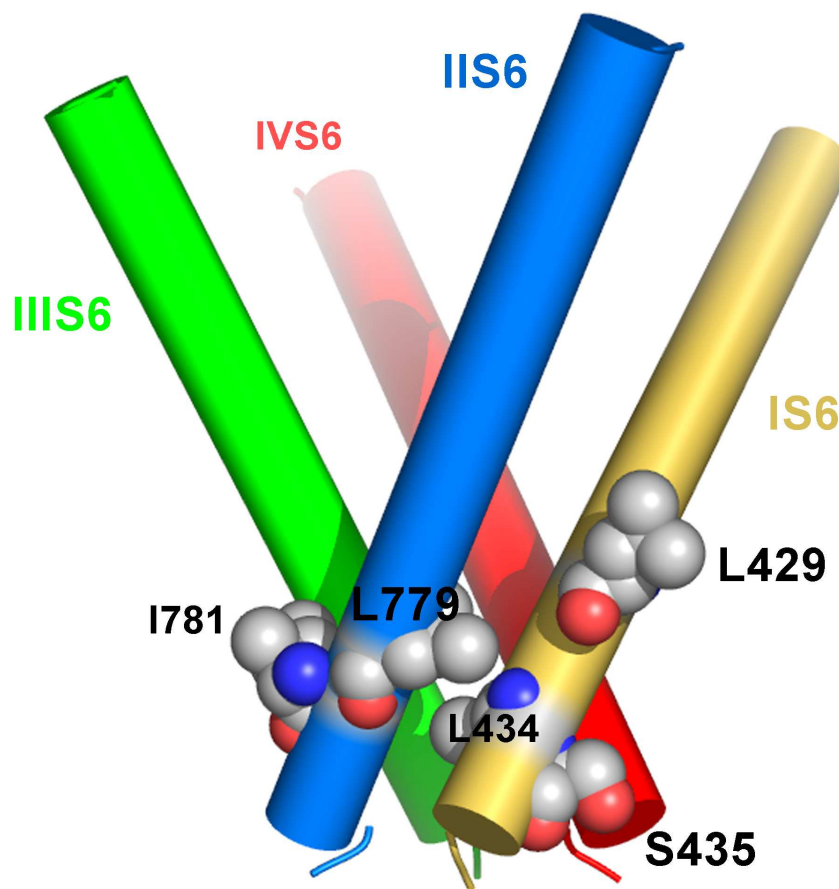


Abb. 33 Illustration der „bundle-crossing region“ von $\text{Ca}_v1.2$ in einem Homologiemodell der geschlossenen Konformation. Die Abbildung ist eine Seitenansicht der S6 Segmente, Aminosäuren Leu429, Leu434 von IS6 und Leu779 und Ile781 sind hervorgehoben. Die Aminosäuren Leu434 und Leu779 sind Teil dichter Helix-Helix Packung zwischen den Segmenten IS6 und IIS6. Ser435 und Ile781 hingegen interagieren mit den benachbarten S6 Segmenten. Die Abb.wurde mittels Pymol (<http://pymol.sorceryforge.net>) generiert (Kudrnac et al., 2009).

5 ZUSAMMENFASSUNG (SUMMARY)

In the present study we analyzed the role of amino acid residues in pore-lining S6 segments in gating of $\text{Ca}_v1.2$ channels. Most significant effects are induced by proline or threonine substitutions in the lower third of segments IS6 and IIS6 ('bundle crossing region'): We hypothesise that hydrophobic interactions between S6 segments or adjacent regions participate in stabilisation of the closed channel conformation. (Hohaus et al., 2005; Kudrnac et al., 2009). This scenario is supported by substitutions of amino acids of different hydrophobicity, size and polarity. A shift in the voltage dependence of activation was accompanied by a deceleration of current activation kinetics at hyperpolarized potentials, a deceleration of deactivation at all potentials (I781P and I781T), and reduced inactivation. Our findings indicate that substitutions of Ile781 destabilize the closed conformation and simultaneously stabilize the open channel state of $\text{Ca}_v1.2$. Moreover there may be a flexible center of helix bending at positions Cys779–Ala782 of $\text{Ca}_v1.2$. Proline substitution S435P in IS6 results in a large shift of the activation curve and slower current kinetics. Threonine substitutions Leu429 and Leu434 induced a similar kinetic phenotype with shifted activation and the corresponding inactivation curves. The interdependence of IS6 and IIS6 mutations was analysed by means of mutant cycle analysis. Double mutations induce either additive or non-additive shifts of the activation curves along the voltage axis. Mutant cycle analysis revealed energetic coupling between residues S435 and I781 while other paired mutations in IS6 and IIS6 had independent effects on activation gating.

Als Ziel der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Mutationen in porenbildenden S6 Segmenten auf das „gating“ Verhalten von $\text{Ca}_v1.2$ untersucht. Besonders signifikante Effekte wurden durch Prolin- bzw. Threoninsubstitutionen im unteren Drittel („bundle crossing region“) der Segmente IS6 und IIS6 induziert. Hydrophobe Interaktionen zwischen S6 Segmenten oder Nachbarregionen sind an der Stabilisierung der geschlossenen Kanalkonformation beteiligt (Hohaus et al., 2005; Kudrnac et al., 2009). Diese Hypothese wurde durch Mutationen mit Aminosäuren unterschiedlicher Hydrophobizität, Größe und Polarität erhärtet. Die Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung ging mit einer verlangsamten Aktivierung bei hyperpolarisierten Potentialen, einer verlangsamten Dekativierung und verminderter Inaktivierung einher. Substitutionen von Ile781 können sowohl die geschlossene Konformation destabilisieren als auch die offene Konformation von $\text{Ca}_v1.2$ stabilisieren. Außerdem könnte an den Positionen Cys779–Ala782 eine flexible Position für „helix bending“ vorliegen. Auch Prolinsubstitution S435P in IS6 führte zu einer starken Verschiebung der Aktivierungskurve und verlangsamter Stromkinetik. Die Threoninsubstitutionen Leu429 und Leu434 führten zu einem ähnlichen kinetischen Phänotyp mit verschobenen Aktivierungskurven. Die entsprechenden Inaktivierungskurven aller Mutanten wurden proportional in negativer Richtung auf der Potentialachse verschoben. Eine Abhängigkeit von strukturellen Veränderungen in IS6 und IIS6 wurde mittels „mutant cycle analysis“ analysiert. Doppelmutationen in diesen S6 Segmenten induzieren entweder additive oder nicht-additive Verschiebungen der Aktivierungskurven entlang der Potentialachse. Die „mutant cycle analysis“ ergab eine energetische Kopplung zwischen den Aminosäuren S435 und I781; weitere Doppelmutationen in IS6 und IIS6 zeigten unabhängige Effekte auf das Aktivierungsverhalten von $\text{Ca}_v1.2$.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Angelotti T and Hofmann F (1996) Tissue-specific expression of splice variants of the mouse voltage-gated calcium channel $\alpha 2/\delta$ subunit. *FEBS Lett* **397**:331-7.
- Arias JM, Murbartian J, Vitko I, Lee JH and Perez-Reyes E (2005) Transfer of beta subunit regulation from high to low voltage-gated Ca^{2+} channels. *FEBS Lett* **579**:3907-12.
- Armstrong CM (2003) Voltage-gated K channels. *Sci STKE* **2003**:re10.
- Bangalore R, Mehrke G, Gingrich K, Hofmann F and Kass RS (1996) Influence of L-type Ca channel $\alpha 2/\delta$ -subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am J Physiol* **270**:H1521-8.
- Barclay J, Balaguero N, Mione M, Ackerman SL, Letts VA, Brodbeck J, Canti C, Meir A, Page KM, Kusumi K, Perez-Reyes E, Lander ES, Frankel WN, Gardiner RM, Dolphin AC and Rees M (2001) Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* **21**:6095-104.
- Barrett CF and Tsien RW (2008) The Timothy syndrome mutation differentially affects voltage- and calcium-dependent inactivation of $\text{CaV}1.2$ L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:2157-62.
- Baumann L, Gerstner A, Zong X, Biel M and Wahl-Schott C (2004) Functional characterization of the L-type Ca^{2+} channel $\text{Cav}1.4\alpha 1$ from mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**:708-13.
- Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA and Boycott KM (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel $\alpha 1$ -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* **19**:264-7.
- Berjukow S, Marksteiner R, Sokolov S, Weiss RG, Margreiter E and Hering S (2001) Amino acids in segment IVS6 and beta-subunit interaction support distinct conformational changes during $\text{Ca(v)}2.1$ inactivation. *J Biol Chem* **276**:17076-82.
- Berrou L, Bernatchez G and Parent L (2001) Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of $\alpha 1E$ ($\text{CaV}2.3$) calcium channels. *Biophys J* **80**:215-28.
- Beyl S, Timin EN, Hohaus A, Stary A, Kudrnat M, Guy RH and Hering S (2007) Probing the architecture of an L-type calcium channel with a charged phenylalkylamine: evidence for a widely open pore and drug trapping. *J Biol Chem* **282**:3864-70.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y and De Waard M (2000) The I-II loop of the Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* **25**:177-90.
- Bichet D, Lecomte C, Sabatier JM, Felix R and De Waard M (2000) Reversibility of the Ca^{2+} channel $\alpha 1$ -beta subunit interaction. *Biochem Biophys Res Commun* **277**:729-35.
- Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stuhmer W, Flockerzi V and Hofmann F (1990) Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* **269**:409-12.
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T and et al. (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **13**:505-6.
- Birnbaumer L, Qin N, Olcese R, Tareilus E, Platano D, Costantin J and Stefani E (1998) Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J Bioenerg Biomembr* **30**:357-75.
- Black JL, 3rd (2003) The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature. *J Bioenerg Biomembr* **35**:649-60.

- Borsotto M, Barhanin J, Fosset M and Lazdunski M (1985) The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel. Purification and subunit composition. *J Biol Chem* **260**:14255-63.
- Bosse E, Regulla S, Biel M, Ruth P, Meyer HE, Flockerzi V and Hofmann F (1990) The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* **267**:153-6.
- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J and Snutch TP (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* **2**:407-15.
- Boycott KM, Pearce WG and Bech-Hansen NT (2000) Clinical variability among patients with incomplete X-linked congenital stationary night blindness and a founder mutation in CACNA1F. *Can J Ophthalmol* **35**:204-13.
- Brehm P and Eckert R (1978) Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science* **202**:1203-6.
- Brehm P, Eckert R and Tillotson D (1980) Calcium-mediated inactivation of calcium current in Paramecium. *J Physiol* **306**:193-203.
- Brodbeck J, Davies A, Courtney JM, Meir A, Balaguero N, Canti C, Moss FJ, Page KM, Pratt WS, Hunt SP, Barclay J, Rees M and Dolphin AC (2002) The ducky mutation in Cacna2d2 results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated alpha 2 delta-2 protein with abnormal function. *J Biol Chem* **277**:7684-93.
- Canti C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Heblich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, Davies A and Dolphin AC (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:11230-5.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**:521-55.
- Catterall WA and Curtis BM (1987) Molecular properties of voltage-sensitive calcium channels. *Soc Gen Physiol Ser* **41**:201-13.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP and Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57**:411-25.
- Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP and Perez-Reyes E (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* **55**:579-81.
- Cens T, Restituito S, Galas S and Charnet P (1999) Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J Biol Chem* **274**:5483-90.
- Cens T, Rousset M, Leyris JP, Fesquet P and Charnet P (2006) Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca^{2+} channels. *Prog Biophys Mol Biol* **90**:104-17.
- Censier K, Urwyler A, Zorzato F and Treves S (1998) Intracellular calcium homeostasis in human primary muscle cells from malignant hyperthermia-susceptible and normal individuals. Effect Of overexpression of recombinant wild-type and Arg163Cys mutated ryanodine receptors. *J Clin Invest* **101**:1233-42.
- Chandy KG and Gutman GA (1993) Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci* **14**:434.
- Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E and Swartz KJ (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* **1**:668-74.
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**:1047-58.

- Cole RL, Lechner SM, Williams ME, Prodanovich P, Bleicher L, Varney MA and Gu G (2005) Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta (alpha2delta) subunit mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* **491**:246-69.
- Cordes FS, Bright JN and Sansom MS (2002) Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J Mol Biol* **323**:951-60.
- Coronado R, Morrisette J, Sukhareva M and Vaughan DM (1994) Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* **266**:C1485-504.
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M and Perez-Reyes E (1998) Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* **83**:103-9.
- Curtis BM and Catterall WA (1983) Solubilization of the calcium antagonist receptor from rat brain. *J Biol Chem* **258**:7280-3.
- Curtis BM and Catterall WA (1984) Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* **23**:2113-8.
- Davies A, Hendrich J, Van Minh AT, Wratten J, Douglas L and Dolphin AC (2007) Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* **28**:220-8.
- De Jongh KS, Warner C and Catterall WA (1990) Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J Biol Chem* **265**:14738-41.
- De Waard M and Campbell KP (1995) Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **485** (Pt 3):619-34.
- De Waard M, Scott VE, Pragnell M and Campbell KP (1996) Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* **380**:272-6.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT and MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77.
- Dworakowska B and Dolowy K (2000) Ion channels-related diseases. *Acta Biochim Pol* **47**:685-703.
- Ellinor PT, Yang J, Sather WA, Zhang JF and Tsien RW (1995) Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron* **15**:1121-32.
- Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, Campbell KP, McKenna E, Koch WJ, Hui A and et al. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* **241**:1661-4.
- Erickson MG, Liang H, Mori MX and Yue DT (2003) FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca²⁺ channel CaM preassociation. *Neuron* **39**:97-107.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW and Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**:533-5.
- Fatt P and Ginsborg BL (1958) The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J Physiol* **142**:516-43.
- Fatt P and Katz B (1953) The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol* **120**:171-204.
- Flockerzi V, Oeken HJ and Hofmann F (1986) Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur J Biochem* **161**:217-24.
- Garcia J, Nakai J, Imoto K and Beam KG (1997) Role of S4 segments and the leucine heptad motif in the activation of an L-type calcium channel. *Biophys J* **72**:2515-23.

- Gerster U, Neuhuber B, Groschner K, Striessnig J and Flucher BE (1999) Current modulation and membrane targeting of the calcium channel α_1C subunit are independent functions of the beta subunit. *J Physiol* **517** (Pt 2):353-68.
- Gillard EF, Otsu K, Fujii J, Khanna VK, de Leon S, Derdemezi J, Britt BA, Duff CL, Worton RG and MacLennan DH (1991) A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* **11**:751-5.
- Gong HC, Hang J, Kohler W, Li L and Su TZ (2001) Tissue-specific expression and gabapentin-binding properties of calcium channel $\alpha_2\delta$ subunit subtypes. *J Membr Biol* **184**:35-43.
- Grabner M, Dirksen RT and Beam KG (1998) Tagging with green fluorescent protein reveals a distinct subcellular distribution of L-type and non-L-type Ca^{2+} channels expressed in dysgenic myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:1903-8.
- Haack JA and Rosenberg RL (1994) Calcium-dependent inactivation of L-type calcium channels in planar lipid bilayers. *Biophys J* **66**:1051-60.
- Hagiwara S and Naka KI (1964) The Initiation of Spike Potential in Barnacle Muscle Fibers under Low Intracellular Ca^{++} . *J Gen Physiol* **48**:141-62.
- Hagiwara S, Ozawa S and Sand O (1975) Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* **65**:617-44.
- Hagiwara S (1983) Membrane Potential-Dependent Ion Channels in Cell Membrane. Phylogenetic and Developmental Approach. *Raven Press, New York* 118pp.[4,5,15]
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**:85-100.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
- Hans M, Luvisetto S, Williams ME, Spagnolo M, Urrutia A, Tottene A, Brust PF, Johnson EC, Harpold MM, Stauderman KA and Pietrobon D (1999) Functional consequences of mutations in the human α_1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* **19**:1610-9.
- Hemara-Wahanui A, Berjukow S, Hope CI, Dearden PK, Wu SB, Wilson-Wheeler J, Sharp DM, London-Treweek P, Clover GM, Hoda JC, Striessnig J, Marksteiner R, Hering S and Maw MA (2005) A CACNA1F mutation identified in an X-linked retinal disorder shifts the voltage dependence of Cav1.4 channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:7553-8.
- Hering S (2002) beta-Subunits: fine tuning of Ca^{2+} channel block. *Trends Pharmacol Sci* **23**:509-13.
- Hering S, Aczel S, Grabner M, Doring F, Berjukow S, Mitterdorfer J, Sinnegger MJ, Striessnig J, Degtiar VE, Wang Z and Glossmann H (1996) Transfer of high sensitivity for benzothiazepines from L-type to class A (BI) calcium channels. *J Biol Chem* **271**:24471-5.
- Hering S, Berjukow S, Aczel S and Timin EN (1998) Ca^{2+} channel block and inactivation: common molecular determinants. *Trends Pharmacol Sci* **19**:439-43.
- Hering S, Berjukow S, Sokolov S, Marksteiner R, Weiss RG, Kraus R and Timin EN (2000) Molecular determinants of inactivation in voltage-gated Ca^{2+} channels. *J Physiol* **528** Pt 2:237-49.
- Hering S, Beyl S, Stary A, Kudrnac M, Hohaus A, Guy HR and Timin E (2008) Pore stability and gating in voltage-activated calcium channels. *Channels (Austin)* **2**.
- Herlitze S, Hockerman GH, Scheuer T and Catterall WA (1997) Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel α_1A subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1512-6.

- Hidalgo P and MacKinnon R (1995) Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* **268**:307-10.
- Hockerman GH, Johnson BD, Abbott MR, Scheuer T and Catterall WA (1997) Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIS6 and the pore region of the alpha1 subunit. *J Biol Chem* **272**:18759-65.
- Hoda JC, Zaghetto F, Koschak A and Striessnig J (2005) Congenital stationary night blindness type 2 mutations S229P, G369D, L1068P, and W1440X alter channel gating or functional expression of Ca(v)1.4 L-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci* **25**:252-9.
- Hoda JC, Zaghetto F, Singh A, Koschak A and Striessnig J (2006) Effects of congenital stationary night blindness type 2 mutations R508Q and L1364H on Cav1.4 L-type Ca²⁺ channel function and expression. *J Neurochem* **96**:1648-58.
- Hodgkin AL and Huxley AF (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**:449-72.
- Hodgkin AL and Huxley AF (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**:473-96.
- Hodgkin AL and Huxley AF (1952) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* **116**:497-506.
- Hofmann F, Lacinova L and Klugbauer N (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**:33-87.
- Hohaus A, Beyl S, Kudrnac M, Berjukow S, Timin EN, Marksteiner R, Maw MA and Hering S (2005) Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal disorder. *J Biol Chem* **280**:38471-7.
- Hope CI, Sharp DM, Hemara-Wahanui A, Sissinigh JI, London P, Mitchell EA, Maw MA and Clover GM (2005) Clinical manifestations of a unique X-linked retinal disorder in a large New Zealand family with a novel mutation in CACNA1F, the gene responsible for CSNB2. *Clin Experiment Ophthalmol* **33**:129-36.
- Horovitz A (1996) Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function. *Fold Des* **1**:R121-6.
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK and Pease LR (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**:61-8.
- Imredy JP and Yue DT (1994) Mechanism of Ca(2⁺)-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *Neuron* **12**:1301-18.
- Ivanina T, Blumenstein Y, Shistik E, Barzilai R and Dascal N (2000) Modulation of L-type Ca²⁺ channels by gamma and calmodulin via interactions with N and C termini of alpha 1C. *J Biol Chem* **275**:39846-54.
- Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM and Campbell KP (1990) Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **248**:490-2.
- Jay SD, Sharp AH, Kahl SD, Vedvick TS, Harpold MM and Campbell KP (1991) Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *J Biol Chem* **266**:3287-93.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT and MacKinnon R (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**:515-22.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT and MacKinnon R (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**:523-6.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT and MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**:33-41.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A and MacKinnon R (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**:42-8.

- Josephson IR and Varadi G (1996) The beta subunit increases Ca^{2+} currents and gating charge movements of human cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Biophys J* **70**:1285-93.
- Kamp TJ, Perez-Garcia MT and Marban E (1996) Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel beta 1A subunit with alpha 1C subunit in a human embryonic kidney cell line. *J Physiol* **492** (Pt 1):89-96.
- Kasri NN, Parys JB, Callewaert G, Missiaen L and De Smedt H (2004) Calmodulin and calcium-release channels. *Biol Res* **37**:577-82.
- Klugbauer N, Dai S, Specht V, Lacinova L, Marais E, Bohn G and Hofmann F (2000) A family of gamma-like calcium channel subunits. *FEBS Lett* **470**:189-97.
- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M and Hofmann F (1999a) Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* **19**:684-91.
- Klugbauer N, Marais E and Hofmann F (2003) Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* **35**:639-47.
- Klugbauer N, Marais E, Lacinova L and Hofmann F (1999b) A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflugers Arch* **437**:710-5.
- Koschak A, Reimer D, Walter D, Hoda JC, Heinzle T, Grabner M and Striessnig J (2003) Cav1.4alpha1 subunits can form slowly inactivating dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channels lacking Ca^{2+} -dependent inactivation. *J Neurosci* **23**:6041-9.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Glossmann H, Hering S and Striessnig J (1998) Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca^{2+} channel kinetics. *J Biol Chem* **273**:5586-90.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Koschak A, Glossmann H, Stenirri S, Carrera P and Striessnig J (2000) Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca^{2+} channel kinetics. *J Biol Chem* **275**:9239-43.
- Kudrnac M, Beyl S, Hohaus A, Stary A, Peterbauer T, Timin E and Hering S (2009) Coupled and independent contributions of residues in IS6 and IIS6 to activation gating of $\text{CaV}1.2$. *J Biol Chem*.
- Kugler G, Weiss RG, Flucher BE and Grabner M (2004) Structural requirements of the dihydropyridine receptor alpha1S II-III loop for skeletal-type excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* **279**:4721-8.
- Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**:105-32.
- Labro AJ, Raes AL, Bellens I, Ottschytch N and Snyders DJ (2003) Gating of shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines. *J Biol Chem* **278**:50724-31.
- Lacerda AE, Kim HS, Ruth P, Perez-Reyes E, Flockerzi V, Hofmann F, Birnbaumer L and Brown AM (1991) Normalization of current kinetics by interaction between the alpha 1 and beta subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel. *Nature* **352**:527-30.
- Lacinova L (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* **24 Suppl 1**:1-78.
- Lacinova L, Klugbauer N and Hofmann F (1999) Absence of modulation of the expressed calcium channel alpha1G subunit by alpha2delta subunits. *J Physiol* **516** (Pt 3):639-45.
- Lacinova L, Klugbauer N and Hofmann F (2000) Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys* **19**:121-36.
- Lehmann-Horn F and Jurkat-Rott K (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* **79**:1317-72.
- Lehmann-Horn F and Jurkat-Rott K (2008). *Ärzteweche* **36**:Dieselben Kopfschmerzen wie bei der Cousine.
- Leong P and MacLennan DH (1998) A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* **273**:7791-4.

- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, 2nd, Mori Y, Campbell KP and Frankel WN (1998) The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat Genet* **19**:340-7.
- Leung AT, Imagawa T, Block B, Franzini-Armstrong C and Campbell KP (1988) Biochemical and ultrastructural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000 Da subunit. *J Biol Chem* **263**:994-1001.
- Li J, Stevens L, Klugbauer N and Wray D (2004) Roles of molecular regions in determining differences between voltage dependence of activation of CaV3.1 and CaV1.2 calcium channels. *J Biol Chem* **279**:26858-67.
- Li J, Stevens L and Wray D (2005) Molecular regions underlying the activation of low- and high-voltage activating calcium channels. *Eur Biophys J* **34**:1017-29.
- Lian LY, Myatt D and Kitmitto A (2007) Apo calmodulin binding to the L-type voltage-gated calcium channel Cav1.2 IQ peptide. *Biochem Biophys Res Commun* **353**:565-70.
- Liang H, DeMaria CD, Erickson MG, Mori MX, Alseikhan BA and Yue DT (2003) Unified mechanisms of Ca²⁺ regulation across the Ca²⁺ channel family. *Neuron* **39**:951-60.
- Llinas R and Yarom Y (1981) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol* **315**:549-67.
- Lorenzon NM and Beam KG (2000) Calcium channelopathies. *Kidney Int* **57**:794-802.
- Marks ML, Trippel DL and Keating MT (1995) Long QT syndrome associated with syndactyly identified in females. *Am J Cardiol* **76**:744-5.
- Marks ML, Whisler SL, Clericuzio C and Keating M (1995) A new form of long QT syndrome associated with syndactyly. *J Am Coll Cardiol* **25**:59-64.
- McKeown L, Robinson P and Jones OT (2006) Molecular basis of inherited calcium channelopathies: role of mutations in pore-forming subunits. *Acta Pharmacol Sin* **27**:799-812.
- McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T and Catterall WA (1994) A mutation in segment IVS6 disrupts fast inactivation of sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12346-50.
- McRory JE, Hamid J, Doering CJ, Garcia E, Parker R, Hamming K, Chen L, Hildebrand M, Beedle AM, Feldcamp L, Zamponi GW and Snutch TP (2004) The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution. *J Neurosci* **24**:1707-18.
- Meissner G (1994) Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* **56**:485-508.
- Mickelson JR and Louis CF (1996) Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ release channel, and cell Ca²⁺ regulation defects. *Physiol Rev* **76**:537-92.
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S and Numa S (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**:230-3.
- Morgans CW (2000) Neurotransmitter release at ribbon synapses in the retina. *Immunol Cell Biol* **78**:442-6.
- Mori MX, Erickson MG and Yue DT (2004) Functional stoichiometry and local enrichment of calmodulin interacting with Ca²⁺ channels. *Science* **304**:432-5.
- Müller HJ (2001) PCR-Polymerase Kettenreaktion. *Heidelberg; Berlin Spektrum Akademischer Verlag. ISBN 3-8274-1058-4*
- Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-50.
- Mullner C, Broos LA, van den Maagdenberg AM and Striessnig J (2004) Familial hemiplegic migraine type 1 mutations K1336E, W1684R, and V1696I alter Cav2.1 Ca²⁺ channel gating: evidence for beta-subunit isoform-specific effects. *J Biol Chem* **279**:51844-50.

- Murakami M, Nakagawasai O, Fujii S, Kameyama K, Murakami S, Hozumi S, Esashi A, Taniguchi R, Yanagisawa T, Tan-no K, Tadano T, Kitamura K and Kisara K (2001) Antinociceptive action of amlodipine blocking N-type Ca^{2+} channels at the primary afferent neurons in mice. *Eur J Pharmacol* **419**:175-81.
- Nakai J, Adams BA, Imoto K and Beam KG (1994) Critical roles of the S3 segment and S3-S4 linker of repeat I in activation of L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:1014-8.
- Neely A, Wei X, Olcese R, Birnbaumer L and Stefani E (1993) Potentiation by the beta subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science* **262**:575-8.
- Neher E and Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**:799-802.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, Frants RR and Ferrari MD (1997) Familial hemiplegic migraine: involvement of a calcium neuronal channel. *Neurologia* **12 Suppl 5**:31-7.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD and Frants RR (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4. *Cell* **87**:543-52.
- Otsu K, Nishida K, Kimura Y, Kuzuya T, Hori M, Kamada T and Tada M (1994) The point mutation Arg615-->Cys in the Ca^{2+} release channel of skeletal sarcoplasmic reticulum is responsible for hypersensitivity to caffeine and halothane in malignant hyperthermia. *J Biol Chem* **269**:9413-5.
- Parent L and Gopalakrishnan M (1995) Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca^{2+} channel. *Biophys J* **69**:1801-13.
- Patil PG, Brody DL and Yue DT (1998) Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron* **20**:1027-38.
- Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**:117-61.
- Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda AE, Wei XY and Birnbaumer L (1992) Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* **267**:1792-7.
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M and Lee JH (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**:896-900.
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP and Yue DT (1999) Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* **22**:549-58.
- Peterson BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M and Yue DT (2000) Critical determinants of Ca^{2+} -dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca^{2+} channels. *Biophys J* **78**:1906-20.
- Pietrobon D (2002) Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Mol Neurobiol* **25**:31-50.
- Pietrobon D (2007) Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* **4**:274-84.
- Pietrobon D and Striessnig J (2003) Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* **4**:386-98.
- Pitt GS, Zuhlke RD, Hudmon A, Schulman H, Reuter H and Tsien RW (2001) Molecular basis of calmodulin tethering and Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* **276**:30794-802.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP and Campbell KP (1994) Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* **368**:67-70.

- Qin N, Olcese R, Stefani E and Birnbaumer L (1998) Modulation of human neuronal alpha 1E-type calcium channel by alpha 2 delta-subunit. *Am J Physiol* **274**:C1324-31.
- Qin N, Yagel S, Momplaisir ML, Codd EE and D'Andrea MR (2002) Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol* **62**:485-96.
- Ranganathan R, Lewis JH and MacKinnon R (1996) Spatial localization of the K⁺ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* **16**:131-9.
- Raybaud A, Baspinar EE, Dionne F, Dodier Y, Sauve R and Parent L (2007) The role of distal S6 hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of CaV2.3 channels. *J Biol Chem* **282**:27944-52.
- Raybaud A, Dodier Y, Bissonnette P, Simoes M, Bichet DG, Sauve R and Parent L (2006) The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **281**:39424-36.
- Reichenbach H, Meister EM and Theile H (1992) [The heart-hand syndrome. A new variant of disorders of heart conduction and syndactylia including osseous changes in hands and feet]. *Kinderarztl Prax* **60**:54-6.
- Richter M, Schleithoff L, Deufel T, Lehmann-Horn F and Herrmann-Frank A (1997) Functional characterization of a distinct ryanodine receptor mutation in human malignant hyperthermia-susceptible muscle. *J Biol Chem* **272**:5256-60.
- Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V and Hofmann F (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **245**:1115-8.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-4.
- Sandoz G, Bichet D, Cornet V, Mori Y, Felix R and De Waard M (2001) Distinct properties and differential beta subunit regulation of two C-terminal isoforms of the P/Q-type Ca(2⁺)-channel alpha(1A) subunit. *Eur J Neurosci* **14**:987-97.
- Schultz D, Mikala G, Yatani A, Engle DB, Iles DE, Segers B, Sinke RJ, Weghuis DO, Klockner U, Wakamori M and et al. (1993) Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6228-32.
- Shi C and Soldatov NM (2002) Molecular determinants of voltage-dependent slow inactivation of the Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* **277**:6813-21.
- Shirokov R, Ferreira G, Yi J and Rios E (1998) Inactivation of gating currents of L-type calcium channels. Specific role of the alpha 2 delta subunit. *J Gen Physiol* **111**:807-23.
- Shistik E, Ivanina T, Puri T, Hosey M and Dascal N (1995) Ca²⁺ current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol* **489** (Pt 1):55-62.
- Shrivastava IH, Capener CE, Forrest LR and Sansom MS (2000) Structure and dynamics of K channel pore-lining helices: a comparative simulation study. *Biophys J* **78**:79-92.
- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F and Dascal N (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* **253**:1553-7.
- Sokolov S, Weiss RG, Timin EN and Hering S (2000) Modulation of slow inactivation in class A Ca²⁺ channels by beta-subunits. *J Physiol* **527** Pt 3:445-54.
- Soldatov NM (1994) Genomic structure of human L-type Ca²⁺ channel. *Genomics* **22**:77-87.
- Soldatov NM, Oz M, O'Brien KA, Abernethy DR and Morad M (1998) Molecular determinants of L-type Ca²⁺ channel inactivation. Segment exchange analysis of the carboxyl-terminal cytoplasmic motif encoded by exons 40-42 of the human alpha1C subunit gene. *J Biol Chem* **273**:957-63.

- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC and Keating MT (2004) Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119**:19-31.
- Szanyi A, Kudrinc M, Beyl S, Hohaus A, Timin EN, Wolschann P, Guy HR and Hering S (2008) Molecular dynamics and mutational analysis of a channelopathy mutation in the IIS6 helix of Ca(V)1.2. *Channels (Austin)* **2**.
- Szanyi A, (2007) Molecular Modelling of Membrane Proteins: Olfactory Receptors and Ion Channels.
- Stephens GJ, Page KM, Bogdanov Y and Dolphin AC (2000) The alpha1B Ca²⁺ channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol* **525 Pt 2**:377-90.
- Stotz SC, Jarvis SE and Zamponi GW (2004) Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol* **554**:263-73.
- Stotz SC and Zamponi GW (2001) Identification of inactivation determinants in the domain IIS6 region of high voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* **276**:33001-10.
- Stotz SC and Zamponi GW (2001) Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels. *Trends Neurosci* **24**:176-81.
- Striessnig J (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol Biochem* **9**:242-69.
- Striessnig J, Grabner M, Mitterdorfer J, Hering S, Sinnegger MJ and Glossmann H (1998) Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **19**:108-15.
- Striessnig J, Hoda JC, Koschak A, Zaghetto F, Mullner C, Sinnegger-Brauns MJ, Wild C, Watschinger K, Trockenbacher A and Pelster G (2004) L-type Ca²⁺ channels in Ca²⁺ channelopathies. *Biochem Biophys Res Commun* **322**:1341-6.
- Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, Wutz K, Gutwillinger N, Ruther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A and Meindl A (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* **19**:260-3.
- Tanabe T, Adams BA, Numa S and Beam KG (1991) Repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium channel activation kinetics. *Nature* **352**:800-3.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T and Numa S (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**:313-8.
- Tang S, Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Varadi G and Schwartz A (1993) Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel. *J Biol Chem* **268**:13026-9.
- Tang W, Halling DB, Black DJ, Pate P, Zhang JZ, Pedersen S, Altschuld RA and Hamilton SL (2003) Apocalmodulin and Ca²⁺ calmodulin-binding sites on the CaV1.2 channel. *Biophys J* **85**:1538-47.
- Tang ZZ, Liang MC, Lu S, Yu D, Yu CY, Yue DT and Soong TW (2004) Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human l-type voltage-gated calcium channel, Cav1.2 alpha1 subunit. *J Biol Chem* **279**:44335-43.
- Terwindt GM, Ophoff RA, Haan J, Sandkuijl LA, Frants RR and Ferrari MD (1998) Migraine, ataxia and epilepsy: a challenging spectrum of genetically determined calcium channelopathies. Dutch Migraine Genetics Research Group. *Eur J Hum Genet* **6**:297-307.

- Tong J, Oyamada H, Demaurex N, Grinstein S, McCarthy TV and MacLennan DH (1997) Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca^{2+} release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem* **272**:26332-9.
- Tottene A, Fellin T, Pagnutti S, Luvisetto S, Striessnig J, Fletcher C and Pietrobon D (2002) Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca^{2+} influx through single human $\text{CaV}2.1$ channels and decrease maximal $\text{CaV}2.1$ current density in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13284-9.
- Tremblay F, Laroche RG and De Becker I (1995) The electroretinographic diagnosis of the incomplete form of congenital stationary night blindness. *Vision Res* **35**:2383-93.
- Tseng TT, McMahon AM, Zahm RJ, Pacold ME and Jakobsson E (2006) Calcium channel auxiliary subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**:326-44.
- Tsien RW, Hess P, McCleskey EW and Rosenberg RL (1987) Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **16**:265-90.
- Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC and Minor DL, Jr. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* **429**:671-5.
- Van Petegem F and Minor DL, Jr. (2006) The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochem Soc Trans* **34**:887-93.
- Wappl E, Koschak A, Poteser M, Sinnegger MJ, Walter D, Eberhart A, Groschner K, Glossmann H, Kraus RL, Grabner M and Striessnig J (2002) Functional consequences of P/Q-type Ca^{2+} channel $\text{Cav}2.1$ missense mutations associated with episodic ataxia type 2 and progressive ataxia. *J Biol Chem* **277**:6960-6.
- Weiergraber M, Hescheler J and Schneider T (2008) [Human calcium channelopathies. Voltage-gated Ca^{2+} channels in etiology, pathogenesis, and pharmacotherapy of neurologic disorders]. *Nervenarzt* **79**:426-36.
- Weiss N, Tournier-Lasserre E and De Waard M (2007) [Role of P/Q calcium channel in familial hemiplegic migraine]. *Med Sci (Paris)* **23**:53-63.
- Welling A, Ludwig A, Zimmer S, Klugbauer N, Flockerzi V and Hofmann F (1997) Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca^{2+} channels. *Circ Res* **81**:526-32.
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL and Catterall WA (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na^{+} -channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10910-4.
- White TJ (1996) The future of PCR technology: diversification of technologies and applications. *Trends Biotechnol* **14**:478-83.
- Witcher DR, De Waard M, Liu H, Pragnell M and Campbell KP (1995) Association of native Ca^{2+} channel beta subunits with the alpha 1 subunit interaction domain. *J Biol Chem* **270**:18088-93.
- Witkovsky P, Schmitz Y, Akopian A, Krizaj D and Tranchina D (1997) Gain of rod to horizontal cell synaptic transfer: relation to glutamate release and a dihydropyridine-sensitive calcium current. *J Neurosci* **17**:7297-306.
- Xie C, Zhen XG and Yang J (2005) Localization of the activation gate of a voltage-gated Ca^{2+} channel. *J Gen Physiol* **126**:205-12.
- Yamaguchi H, Hara M, Strobeck M, Fukasawa K, Schwartz A and Varadi G (1998) Multiple modulation pathways of calcium channel activity by a beta subunit. Direct evidence of beta subunit participation in membrane trafficking of the alpha1C subunit. *J Biol Chem* **273**:19348-56.

- Yamaguchi H, Muth JN, Varadi M, Schwartz A and Varadi G (1999) Critical role of conserved proline residues in the transmembrane segment 4 voltage sensor function and in the gating of L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1357-62.
- Yang J, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF and Tsien RW (1993) Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. *Nature* **366**:158-61.
- Yang T and Poovaiah BW (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci* **8**:505-12.
- Yifrach O and MacKinnon R (2002) Energetics of pore opening in a voltage-gated K^{+} channel. *Cell* **111**:231-9.
- Yu FH and Catterall WA (2004) The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* **2004**:re15.
- Zandany N, Ovadia M, Orr I and Yifrach O (2008) Direct analysis of cooperativity in multisubunit allosteric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:11697-702.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW and Tsien RW (1994) Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* **372**:97-100.
- Zhao Y, Scheuer T and Catterall WA (2004b) Reversed voltage-dependent gating of a bacterial sodium channel with proline substitutions in the S6 transmembrane segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17873-8.
- Zhao Y, Yarov-Yarovoy V, Scheuer T and Catterall WA (2004a) A gating hinge in Na^{+} channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* **41**:859-65.
- Zhen XG, Xie C, Fitzmaurice A, Schoonover CE, Orenstein ET and Yang J (2005) Functional architecture of the inner pore of a voltage-gated Ca^{2+} channel. *J Gen Physiol* **126**:193-204.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY and Lee CC (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the $\alpha 1\text{A}$ -voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* **15**:62-9.
- Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW and Reuter H (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399**:159-62.
- Zuhlke RD and Reuter H (1998) Ca^{2+} -sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the $\alpha 1\text{C}$ subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3287-94.

7 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Prof.Dr.Steffen Hering bedanken, dass er es mir ermöglicht hat am Institut für Pharmakologie und Toxikologie zu dissertieren und für seine permanente Unterstützung. Die zahlreichen wissenschaftlichen sowie auch die philosophischen Gespräche habe ich immer sehr geschätzt. Ich danke Dr.Annette Hohaus, die mich ins molekularbiologische Arbeiten eingeführt hat und mir während meiner ganzen Arbeit nicht nur als Lehrer, sondern auch als Kollegin immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist. Weiters danke ich Dr. Stanislav Beyl, der den elektrophysiologischen Part dieser Arbeit durchgeführt hat, für unsere gute Zusammenarbeit und seinen wissenschaftlichen Input.

Prof. Dr. Eugen Timin, danke ich für seine überaus wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen und Hilfestellungen, sowie für das Teilen seines Arbeitszimmers und seines unglaublich großen Erfahrungsschatzes. Ich danke Dr.Sophia Khom, die maßgeblich dazu beigetragen hat den Arbeitsalltag durch gemeinsames Durchstehen fröhlicher zu machen. Dieser Dank richtet sich auch an meine zahlreichen anderen Kollegen, die zu einem familiären Arbeitsklima beigetragen haben.

Frau Doris Stenitzer danke ich für ihre zahlreichen organisatorischen Mühen und dafür,dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Zu guter Letzt, aber mindestens genauso wichtig, möchte ich meiner Familie danken, die mich in all den Jahren immer wieder gefördert und tatkräftig unterstützt hat und ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre.DANKE!

8 LEBENSLAUF

Name: Mag. pharm. Kudrnac Michaela
Geburtsdatum: 23.10.1974
Geburtsort: Wien
Staatsangehörigkeit: Österreich

AUSBILDUNG

1992 Matura am neusprachlichen Privatgymnasium Sacre Coeur
1992-2000 Studium der Pharmazie an der Universität Wien
Diplomarbeit am Institut für pharmazeutische Technologie
ab 2004 Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie

PUBLIKATIONEN

Kudrnac M, Beyl S, Hohaus A, Sary A, Peterbauer T, Timin E, Hering S.
Coupled and independent contributions of residues in IS6 and IIS6 to activation gating of CaV1.2.
J Biol Chem. 2009 Mar 5.

Hering S, Beyl S, Sary A, **Kudrnac M**, Hohaus A, Guy HR, Timin E.
Pore stability and gating in voltage-activated calcium channels.
Channels (Austin). 2008 Mar 14;2(2).

Sary A, **Kudrnac M**, Beyl S, Hohaus A, Timin EN, Wolschann P, Guy HR, Hering S.
Molecular dynamics and mutational analysis of a channelopathy mutation in the IIS6 helix of Ca(V)1.2.
Channels (Austin). 2008 May 18;2(3).

Beyl S, Timin EN, Hohaus A, Stary A, **Kudrnac M**, Guy RH, Hering S.
Probing the architecture of an L-type calcium channel with a charged phenylalkylamine:
evidence for a widely open pore and drug trapping.
J Biol Chem. 2007 Feb 9;282(6):3864-70. Epub 2006 Nov 30.

Hohaus A, Beyl S, **Kudrnac M**, Berjukow S, Timin EN, Marksteiner R, Maw MA, Hering S.
Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal
disorder.
J Biol Chem. 2005 Nov 18;280(46):38471-7. Epub 2005 Sep 12.

POSTER:

53rd Biophysical Society Annual Meeting
Boston, Massachusetts, USA, Februar 2009
Coupled and independent contributions of residues in IS6 and IIS6 to activation gating of
Ca_v1.2

53rd Biophysical Society Annual Meeting
Boston, Massachusetts, USA, Februar 2009
Different pathways for activation and deactivation in Ca_v1.2: A minimal gating model

52nd Biophysical Society Annual Meeting
Long Beach, California, USA, Februar 2008
L-type calcium channel activation: Rate constants of open and closed state transitions

51st Biophysical Society Annual Meeting
Baltimore, Maryland, USA, März 2007
Probing the Architecture of an L-type Calcium Channel with a Charged
Phenylalkylamine: Evidence for a widely open pore and drug trapping

50th Biophysical Society Annual Meeting
Salt Lake City, Utah, USA, Februar 2006
Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal
disorder