

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Untersuchungen zur Regulation des L-Typ Calciumkanals
Cav1.4 durch Calcium / Calmodulin**

Kristina Grießmeier

aus

Roth

2009

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 20.09.09

Kristina Grießmeier

Dissertation eingereicht am	06.10.09
1. Gutachter	Prof. Dr. M. Biel
2. Gutachter	Prof. Dr. C. Wahl-Schott
mündliche Prüfung am	12.11.09

Meinen Eltern und meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	4
ABKÜRZUNGEN	7
ANMERKUNGEN.....	9
1 EINLEITUNG	10
1.1 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 Chemikalien und Lösungen	21
2.2 Arbeiten mit DNA.....	21
2.2.1 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden	21
2.2.1.1 Verwendete Plasmide	21
2.2.1.2 Kultivierung kompetenter E. coli	22
2.2.1.3 Transformation kompetenter E. coli	23
2.2.1.4 Alkalische Lyse im kleinen Maßstab (Miniprep).....	23
2.2.1.5 Alkalische Lyse im Großmaßstab (Maxiprep).....	23
2.2.1.6 Quantifizierung von DNA.....	24
2.2.2 Auftrennung und Aufreinigung von DNA.....	24
2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	25
2.2.2.2 PAGE-Gelelektrophorese.....	25
2.2.2.3 Isolierung von DNA aus Gelen.....	25
2.2.2.4 Präzipitation von DNA	26
2.2.2.5 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	26
2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA.....	26
2.2.3.1 Restriktionsverdau	26
2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	27
2.2.4.1 Standard-Klonierungs-PCR.....	27
2.2.4.2 Overlap-PCR.....	28
2.2.4.3 Quikchange-PCR	28
2.3 Kultur und Transfektion eukaryotischer Zellen	30
2.3.1 Kultur von HEK293-Zellen	30
2.3.2 Transiente Transfektion mit Fugene	30
2.3.2.1 Transfektion für die Elektrophysiologie	31
2.3.2.2 Transfektion für FRET-Messungen.....	31
2.3.3 Transiente Transfektion mit Calciumphosphat	31
2.4 Arbeiten mit Proteinen.....	32
2.4.1 Quantifizierung von Proteinen.....	32
2.4.2 Co-Immunpräzipitation.....	32
2.4.2.1 Proteingewinnung durch Lyse.....	32
2.4.2.2 Experimentelle Durchführung der Co-Immunpräzipitation	33
2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	33
2.4.4 Western Blot.....	34
2.4.5 Konstrukte	35

2.5	Elektrophysiologie	36
2.5.1	Experimentelle Durchführung	36
2.5.2	Patch-Clamp-Protokolle	37
2.5.3	Datenanalyse	37
2.5.4	Konstrukte	37
2.6	FRET-Messungen	38
2.6.1	Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers	38
2.6.2	Quantifizierung von FRET	42
2.6.3	Experimentelle Durchführung	48
2.6.4	Datenanalyse	48
2.6.5	Konstrukte	49
2.7	Kinetische FRET-Messungen	50
2.7.1	Experimentelle Durchführung	50
2.7.2	Protokoll	50
2.7.3	Datenanalyse	51
2.7.4	Konstrukte	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Calmodulin-Bindung am Calciumkanal Cav1.4	52
3.1.1	FRET-Messungen: Aufklärung der CaM-Interaktion mittels verschiedener CFP-Varianten	52
3.1.2	FRET-Messungen: Apo-CaM-Bindung am Cav1.4	55
3.1.3	Kinetische FRET-Messungen: Einfluss von Calcium auf die Calmodulin-Bindung	55
3.1.4	Charakterisierung einer CaM-defizienten Variante des Cav1.4	57
3.1.4.1	Co-Immunpräzipitations-Experimente zum Nachweis der fehlenden CaM-Bindung	57
3.1.4.2	Elektrophysiologische Untersuchungen der CaM-defizienten Variante.	59
3.1.5	Einfluss einer CaM-Überexpression auf die Funktion der ICDI des Cav1.4 ..	61
3.2	Interaktion der ICDI mit dem proximalen C-Terminus des Cav1.4	62
3.2.1	Intramolekulare FRET-Messungen: Aufklärung der Interaktion der ICDI mit dem proximalen C-Terminus des Cav1.4	62
3.2.2	Intermolekulare FRET-Messungen: Aufklärung der Interaktion der ICDI mit dem proximalen C-Terminus des Cav1.4	63
3.2.2.1	Identifikation der Bindungsregion innerhalb des proximalen C-Terminus des Cav1.4	63
3.2.2.2	Identifikation der Bindungsregion innerhalb der ICDI des Cav1.4	64
3.2.3	Kinetische FRET-Messungen: Einfluss von Calcium auf die ICDI-Bindung ..	66
4	DISKUSSION	67
4.1	Bindung und Funktion von CaM am Calciumkanal Cav1.4	67
4.1.1	Nachweis der CaM-Bindung am Cav1.4 mittels FRET	67
4.1.2	Funktionelle Bedeutung der CaM-Assoziation am Cav1.4	68
4.2	Interaktion der ICDI mit dem Cav1.4	69
4.2.1	ICDI-Bindung an das EF-Hand-Motiv und weitere proximale Sequenzen des C-Terminus	69
4.2.2	Identifikation der genauen Interaktionsdomäne im distalen C-Terminus	70
4.2.3	Keine konkurrierende Bindung zwischen ICDI und CaM	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	72

6	ANHANG	74
6.1	Sequenzvergleich der C-Termini des Cav1.2 und Cav1.4	74
6.2	Verwendete Primer	75
6.2.1	PCR-Primer für FRET-Konstrukte.....	75
6.2.1.1	PCR-Primer zur Generierung monomerer GFPs	75
6.2.1.2	PCR-Primer für Cav1.4-Konstrukte.....	75
6.2.1.3	PCR-Primer für Cav1.2-Konstrukte.....	76
6.2.1.4	PCR-Primer für CaM-Konstrukte	76
6.2.2	PCR-Primer für Elektrophysiologie-Konstrukte.....	77
6.2.3	Allgemeine PCR-Primer.....	77
6.3	Zusammenstellung der elektrophysiologischen Messdaten	78
6.4	Zusammenstellung der FRET-Messdaten.....	79
6.4.1	FR für die CaM-Interaktion.....	79
6.4.2	FR für die ICDI-Interaktion	79
6.4.2.1	Intramolekulare FRET-Messungen	79
6.4.2.2	Intermolekulare FRET-Messungen	80
6.5	Verwendete Antikörper	80
6.5.1	Primärantikörper	80
6.5.2	Sekundärantikörper.....	80
7	LITERATURVERZEICHNIS	81
8	PUBLIKATIONEN	85
9	DANKSAGUNG.....	86
10	LEBENS LAUF.....	88

ABKÜRZUNGEN

Å	Ångström
A	Adenin
AC	Amakrinzellen
ÅIED	Åland Island eye disease
ANOVA	Analysis of variance
ApoCaM	Apo-Calmodulin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Ba ²⁺	Barium
BaCl ₂	Bariumchlorid
Bp	Basenpaare
BP	Bipolarzellen
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
Cav	Spannungsgesteuerter Calciumkanal
CDI	Calcium dependent inactivation, Calcium-abhängige Inaktivierung
CIP	Calf intestinal phosphatase
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CORDX3	X-linked cone-rod dystrophy , X-chromosomal-gebundene Stäbchen-Zapfen-Dystrophie vom Typ 3
Cp	Circular permutation, zirkuläre Permutation
CSNB	Congenital stationary night blindness
CsOH	Cäsiumhydroxid
d. h.	Das heißt
DHP	Dihydropyridine
DMEM	Dulbecco's modified eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
(E)CFP	(Enhanced) cyan fluorescent protein, (verstärktes) cyan fluoreszierendes Protein
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(E)GFP	(Enhanced) green fluorescent protein, (verstärktes) grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N-N'-N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Retikulum

(E)YFP	(Enhanced) yellow fluorescent protein, (verstärktes) gelb fluoreszierendes Protein
FBS	Fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
FR	FRET-Ratio
FRET	Fluorescence resonance energy transfer, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
G	Guanosin
GC	Ganglienzellen
GST	Glutathione-S-Transferase
h	Stunde
HC	Horizontalzellen
HCl	Salzsäure
HEK293	Human embryonic kidney cells, humane embryonale Nierenzelllinie, Klon 293
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HVA	High voltage-activated
ICDI	Inhibitor of calcium dependent inactivation, Inhibitor der Calcium-abhängigen Inaktivierung
IRES	Internal ribosome entry site
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Luria-Bertani
LTCC	L-type calcium channel, L-Typ Calciumkanal
LVA	Low voltage-activated
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MCS	Multiple cloning site
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgATP	Magnesium-ATP
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
n.s.	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
pA	Picoampere
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Elektrolytlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ph	Photorezeptoren
PVDF	Polyvinylidenfluorid

ROI	Region of interest
rpm	Rounds per minute , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean , Standardfehler
T	Tyrosin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	Unter anderem
V	Volt
v. a.	Vor allem
VDI	Voltage-dependent inactivation , spannungsabhängige Inaktivierung
vgl.	Vergleiche
vs.	Versus
WT	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

ANMERKUNGEN

In der vorliegenden Arbeit wurden, falls es keine adäquate deutsche Übersetzung gab, englische Fremdwörter verwendet. Diese sind kursiv geschrieben.

1 EINLEITUNG

Licht, das ins Auge einfällt, durchdringt zunächst den optischen Apparat aus Hornhaut, Linse und Glaskörper und trifft dann auf die Retina. Die Retina ist ein spezialisiertes neuronales Netzwerk, das visuelle Reize in Nervenimpulse umwandelt. Der Aufbau der Retina ist relativ einfach. Drei Arten von hintereinander geschalteten Neuronen - Photorezeptoren, Bipolarzellen und retinale Ganglienzellen - bilden die funktionelle Grundeinheit. Tausende dieser Einheiten sind parallel zueinander angeordnet und übertragen die visuellen Informationen in vertikaler Richtung; über Horizontal- und Amakrinzellen erfolgt zusätzlich eine laterale Verschaltung. Die Axone der Ganglienzellen leiten die optischen Reize schließlich über den Nervus opticus (Sehnerv) an das Gehirn weiter.

Die Übertragung visueller Informationen beginnt mit der Absorption der Lichtreize durch die Photorezeptoren. Man unterscheidet generell zwei Arten von Photorezeptoren, Stäbchen für das skotopische Sehen (Dämmerungssehen) und Zapfen für das photopische Sehen (Farbsehen).

Innerhalb der Retina werden die sensorischen Erregungen dann über so genannte Bändersynapsen, spezialisierte Synapsen der Photorezeptoren und Bipolarzellen, übertragen. Diese Bändersynapsen koppeln Licht abhängige Änderungen des Membranpotentials an eine graduelle Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat¹⁻⁶. Im Dunkeln liegt das Membranpotential dieser Zellen bei ca. -40 mV; unter diesen Bedingungen wird Glutamat kontinuierlich in hoher Menge ausgeschüttet. Lichtreize führen über eine Signalkaskade zur Hyperpolarisation und damit Hemmung der Glutamatfreisetzung. Eine Schlüsselrolle in der synaptischen Transmission spielt Calcium, welches durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle in die Zelle strömt und die Exozytose des Neurotransmitters auslöst (Abb. 1-1).

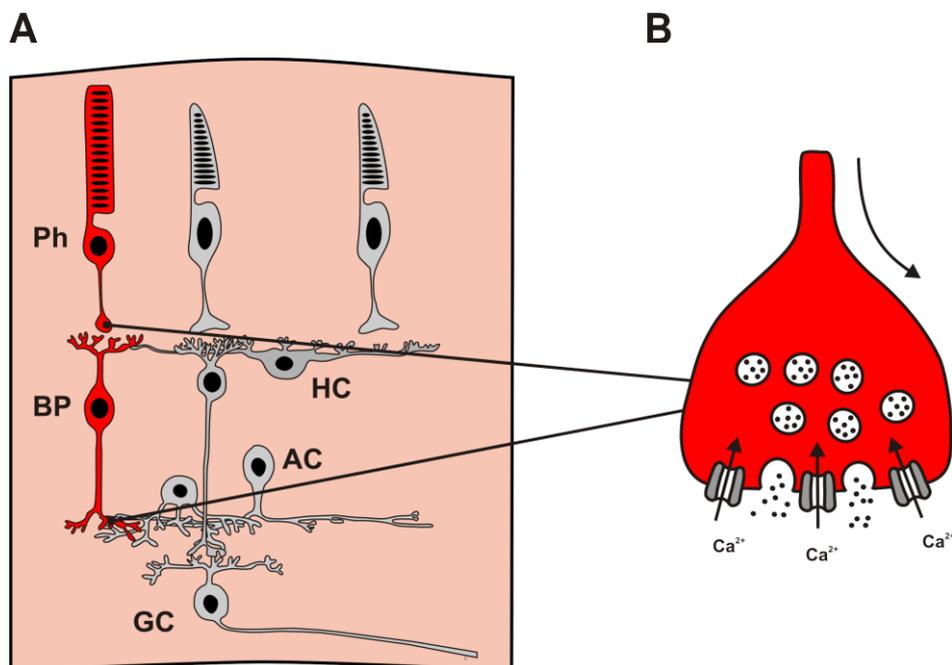
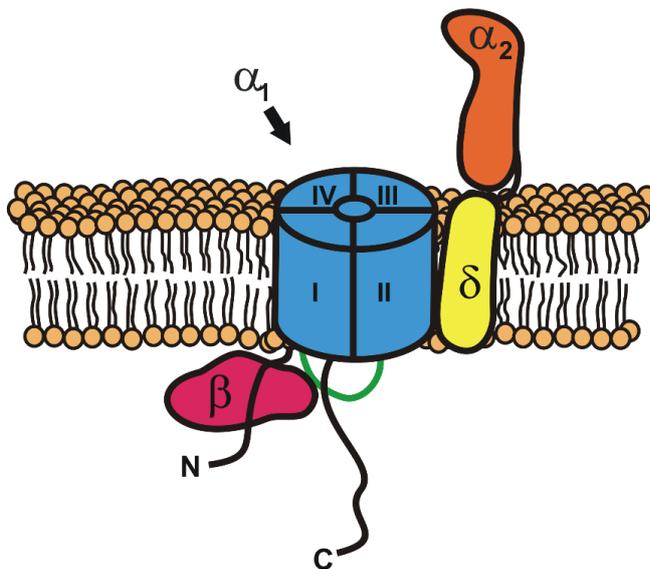


Abb. 1-1 A Anatomischer Aufbau des retinalen Netzwerks. Photorezeptoren (Ph), Bipolar- (BP) und Ganglienzellen (GC) übertragen visuelle Informationen in vertikaler, Horizontal- (HC) und Amakrinzellen (AC) in lateraler Richtung. **B** In den Bändersynapsen der Photorezeptoren und Bipolarzellen wird Glutamat in Abhängigkeit des Membranpotentials freigesetzt. Für die kontinuierliche Neurotransmitterfreisetzung im Dunkeln sind spannungsgesteuerte Ionenkanäle nötig. Sie gewährleisten im Dunkeln einen permanenten Ca²⁺-Einstrom in die Synapsen.

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle (Cavs) sind Membranproteine, über die Calcium entlang seines elektrochemischen Gradienten spannungsabhängig in die Zelle strömt. Diese Kanäle sind hochmolekulare Komplexe, die strukturell aus mindestens drei Untereinheiten bestehen. Die Haupteigenschaften der Calciumkanäle - ihr pharmakologisches und electrophysiologisches Profil - werden von der Ionen leitenden α_1 -Untereinheit des Kanals bestimmt. Diese weist strukturelle Homologien mit spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanälen auf und besteht aus vier homologen Domänen (I - IV) mit jeweils sechs Transmembransegmenten. Die Kanalpore wird vom fünften und sechsten Segment und der dazwischen liegenden Porenschleife gebildet. Daneben existieren noch einige Untereinheiten mit modulatorischen Effekten wie β und $\alpha_2\delta$ (Abb. 1-2)⁷⁻⁹.

A



B

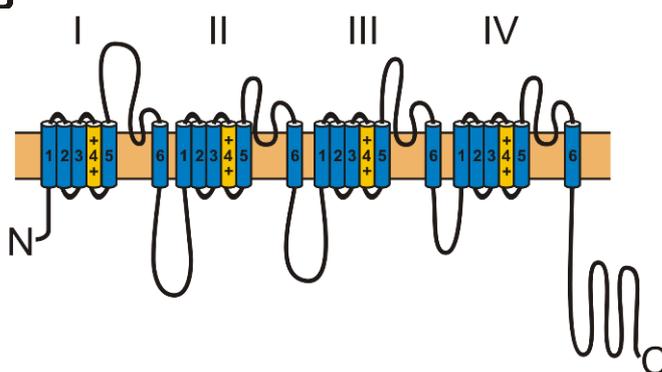


Abb. 1-2 A Membrantopologie spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Kanalkomplex mit porenbildender α_1 -Untereinheit und modulatorischen $\alpha_2\delta$ - und β -Untereinheiten. Die α_1 -Untereinheit (blau) umfasst ca. 1800 - 2300 Aminosäuren und besteht aus vier homologen Domänen (I - IV), die über intrazelluläre Schleifen (Loops) miteinander verbunden sind. Der Klarheit halber ist nur der Loop zwischen Domäne I und II dargestellt (grün). Der $\alpha_2\delta$ -Komplex besteht aus zwei, über Disulfidbrücken verlinkten, Polypeptiden: der transmembranären δ -Untereinheit (ca. 150 Aminosäuren, gelb) und der extrazellulären α_2 -Untereinheit (ca. 930 Aminosäuren, orange). Die intrazelluläre β -Untereinheit (ca. 460 - 600 Aminosäuren, rot) komplettiert den Kanalkomplex. Sie bindet mit hoher Affinität an den I-II-Loop (grün) der α_1 -Untereinheit. Der N- und C-Terminus ist in schwarz dargestellt. Quelle: Van Petegem et Minor. 2006. **B** Schematische Darstellung der α_1 -Untereinheit. Jede Domäne (I - IV) besteht aus sechs Transmembransegmenten (S1 - S6). Die Porenregion befindet sich zwischen dem fünften und sechsten Segment, Segment vier besitzt viele positiv geladene Aminosäurereste und bildet den Spannungssensor.

Insgesamt gibt es jeweils vier verschiedene β - und $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten. β -Untereinheiten sind cytosolische Proteine, die aus zwei hoch konservierten Domänen und drei variablen Regionen bestehen. Sie binden mit hoher Affinität an die α_1 -Untereinheit des Kanals (*I-II-Loop*). $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten bestehen aus der extrazellulären α_2 -Untereinheit, die über Disulfidbrücken mit der transmembranären δ -Untereinheit verbunden ist. Die modulatorischen Untereinheiten beeinflussen u. a. die Stromamplitude und die kinetischen Eigenschaften der Ionen leitenden α_1 -Untereinheit des Kanals⁹.

In Säugern existieren zehn verschiedene α_1 -Untereinheiten (Abb. 1-3); Cav-Kanäle werden in Abhängigkeit ihrer α_1 -Untereinheit, die auch den Spannungssensor (S4, Abb. 1-2 B) enthält und damit die zur Aktivierung nötige Depolarisation bestimmt, in zwei Gruppen eingeteilt: die *low voltage-activated* (LVA)- und die *high voltage-activated* (HVA)-Kanäle. Die LVA-Kanäle werden schon bei vergleichsweise geringer Depolarisation des Membranpotentials aktiviert, bei den HVA-Kanälen sind dagegen höhere Membranpotentiale nötig. LVA-Kanäle, die man auch T-Typ-Kanäle nennt, besitzen damit eine niedrige Aktivierungsschwelle, HVA-Kanäle eine hohe.

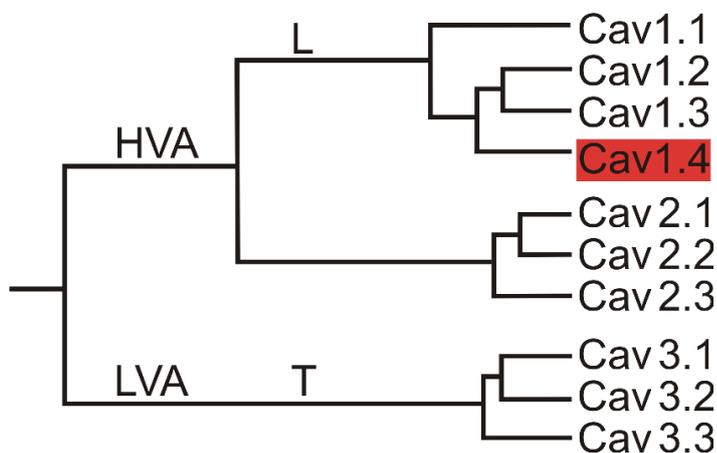


Abb. 1-3 Phylogenetischer Stammbaum der spannungsgesteuerten Calciumkanäle gemäß ihrer α_1 -Untereinheit. L-Typ-Kanäle: Cav1.1 - Cav1.4, P / Q-Typ-Kanal: Cav2.1, N-Typ-Kanal: Cav2.2, R-Typ-Kanal: Cav2.3, T-Typ-Kanäle: Cav3.1 - Cav3.3.

HVA-Kanäle teilt man nach ihrer Sensitivität gegenüber Dihydropyridinen (DHP) in zwei Gruppen ein. Die L-Typ-Kanäle sind DHP-sensitiv, die P / Q-, N-, und R-Typ-Kanäle DHP-insensitiv. L-Typ Calciumkanäle werden außerdem durch Calciumantagonisten vom Phenylalkylamintyp und Benzothiazepintyp blockiert.

Über den Einstrom durch Calciumkanäle werden neben der Ausschüttung von Neurotransmittern wie z. B. Glutamat in der Retina auch zahlreiche weitere physiologische Prozesse wie z. B. Muskelkontraktion, Sekretion, Hormonfreisetzung sowie Genexpression und Zelldifferenzierung vermittelt^{7,10}.

Zu den am besten charakterisierten Calciumkanälen zählen die L-Typ Calciumkanäle. Sie zeigen eine weite Verbreitung im Herz- und Skelettmuskel, im zentralen und peripheren Nervensystem sowie in endokrinen Geweben (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1 Übersicht – Gewebeverteilung und Physiologie / Pathophysiologie der L-Typ Calciumkanäle.

Kanal	Splicevariante	Gewebe	Physiologische Funktion	Pathophysiologie
Cav1.1		Skelettmuskel ⁷	Elektromechan. Kopplung, Ca ²⁺ -Homöostase ⁷	Maligne Hyperthermie ¹¹ , Hypokaliäm. period. Paralyse Typ 1 ¹¹
Cav1.2	Cav1.2a Cav1.2b Cav1.2c	Herz ⁷ Glatte Muskulatur ⁷ Neurone ⁷	Aktionspotential ⁷ Elektromechan. Kopplung ⁷ Synaptische Plastizität ⁷	Timothy Syndrom ¹²⁻¹⁴ , Knockout-Mäuse mit multiplen Phänotypen ^{7,15-16}
Cav1.3		Gehirn, Niere, Pankreas, Herz ⁷	Hormon-Freisetzung, Transkription, synaptische Integration ⁷	Knockout-Mäuse sind taub, mit Sinusknoten-Dysfunktion ¹⁷
Cav1.4		V.a. Retina ^{7,18}	Neurotransmitter-Freisetzung ^{7,20-21}	CSNB ^{7,19-21} , CORDX ²² , ÅIED ²³

Der L-Typ Calciumkanal Cav1.4 ist in Bändersynapsen exprimiert und nimmt eine zentrale Rolle in der synaptischen Transmission ein^{1,6,20-21,24-29}. Mutationen im kodierenden Gen (CACNA1F, Chromosom Xp_{11.23}), die zu Aberrationen oder dem Verlust des Cav1.4-Proteins führen, können beim Menschen schwere Erkrankungen hervorrufen. Ganz allgemein spricht man bei Erkrankungen, deren Symptome auf die Fehlfunktion eines Ionenkanals zurückgeführt werden können, von *channelopathies*. Im Falle des Cav1.4 ist eine dieser *channelopathies* die CSNB vom Typ 2 (*congenital stationary night blindness 2*), eine angeborene, nicht progressive Form der Nachtblindheit^{7,11,20-21}. Ein Krankheitsbild, das ebenfalls auf Mutationen im CACNA1F-Gen beruht, ist die CORDX3 (*x-linked cone-rod dystrophy*). Dabei handelt es sich um eine X-chromosomal-gebundene Stäbchen-Zapfen-Dystrophie vom Typ 3 mit progressivem Verlauf^{19,22}. Eine weitere retinale Erkrankung, die auf Cav1.4-Mutationen zurückgeht, ist die *Åland Island eye disease* (ÅIED, Forsius-Eriksson-Syndrom)²³.

Die Symptome der genannten Krankheiten reichen dabei von relativ milden Formen der Nachtblindheit bis zu schweren Formen, bei denen zusätzlich Myopie bzw. Hyperopie, Nystagmus, Visusverlust und Dystrophie der Photorezeptoren auftreten können. Transgene Mauslinien, bei denen das Gen für den Cav1.4-Kanal ausgeschaltet ist, zeigen ebenfalls einen CSNB-ähnlichen Phänotyp. Die Elektroretinogramme der Knockout-Tiere weisen auf eine Beeinträchtigung in der Neurotransmission zwischen Stäbchen und Bipolarzellen hin^{21,30-31}. Ob dem Cav1.4-Kanal weitere physiologisch essentielle Rollen zukommen, ist beim derzeitigen Wissensstand noch offen.

Bei Patienten ist das klinische Bild nicht immer nur auf das visuelle System beschränkt; es bestehen auch Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Mutationen im Cav1.4-Genlocus und neurologischen Erkrankungen wie mentale Retardierung, Autismus oder Epilepsie³²⁻³³.

Der Cav1.4 unterscheidet sich in wichtigen biophysikalischen Eigenschaften von anderen HVA-Kanälen. Zum einen sind dies die relativ niedrige Aktivierungsschwelle des Kanals nahe dem typischen Photorezeptorpotential von ca. -40 mV und die sehr schnelle Aktivierungskinetik. Das hervorstechendste Merkmal des Cav1.4 ist die langsame Inaktivierung des Kanals, ein Prozess der den Calcium-Einstrom durch den Kanal begrenzt.

Grund der langsamen Inaktivierung ist der relativ breite *window current* des Kanals, ein Bereich, in dem der Kanal zwischen offenem und geschlossenem Zustand wechselt ohne zu inaktivieren (Abb. 1-4).

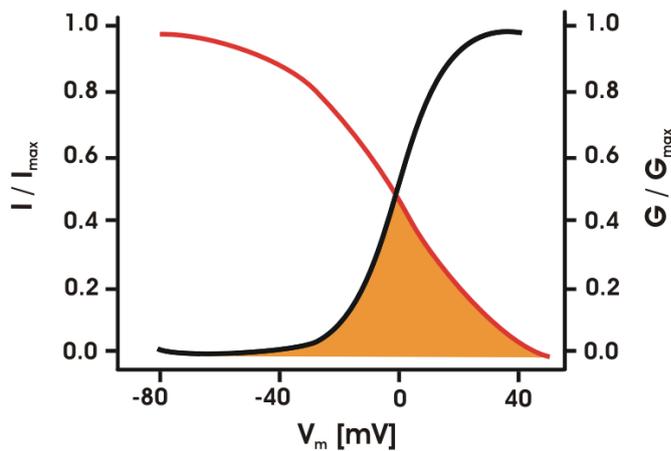


Abb. 1-4 Schematische Darstellung des *window current* des Cav1.4. Experimentell lässt sich der *window current* des Cav1.4 als überlappender Bereich (orange Fläche) der normalisierten *steady-state*-Inaktivierungskurve (rote Kurve) und -Aktivierungskurve (schwarze Kurve) bestimmen. G: Leitfähigkeit, I: Strom, V_m : Membranpotential.

Man nimmt an, dass die genannten Eigenschaften v. a. das langsame Inaktivierungsverhalten von grundlegender Bedeutung für die Übertragung sensorischer Informationen innerhalb der Retina sind. Auf diese Weise können Cav1.4-Kanäle im Dunkeln einen lang anhaltenden präsynaptischen Einstrom von Calcium in Bändersynapsen gewährleisten. Die daran gekoppelte kontinuierliche Glutamatfreisetzung ist für die physiologische Funktion der Retina essentiell.

In meiner Arbeit habe ich mich näher mit der Inaktivierung des Cav1.4 beschäftigt. Generell werden spannungsabhängige Calciumkanäle durch eine Depolarisation zunächst aktiviert (Abb. 1-5). Eine langanhaltende Depolarisation führt dann zur Inaktivierung des Kanals. Den Mechanismus bezeichnet man als spannungsabhängige Inaktivierung (*voltage-dependent inactivation*, VDI). Vom inaktiven Zustand, in dem kein Calcium durch den Kanal strömt, kann der Kanal erst durch eine Hyperpolarisation wieder in den geschlossenen, aktivierbaren Zustand überführt werden. HVA-Kanäle verfügen neben der VDI noch über einen zusätzlichen, hoch konservierten Inaktivierungsmechanismus. Dieser beruht auf der Eigenschaft von Calciumionen ihren eigenen Einstrom durch einen negativen *Feedback*-Mechanismus selbst zu limitieren. Diesen, im Vergleich zur VDI, schnelleren Vorgang nennt man Calcium-abhängige Inaktivierung (*calcium-dependent inactivation*, CDI).

Der Cav1.4 unterscheidet sich von anderen HVA-Kanälen durch seine sehr langsame spannungsabhängige Inaktivierung und das komplette Fehlen einer Calcium-abhängigen Inaktivierung (Abb. 1-5).

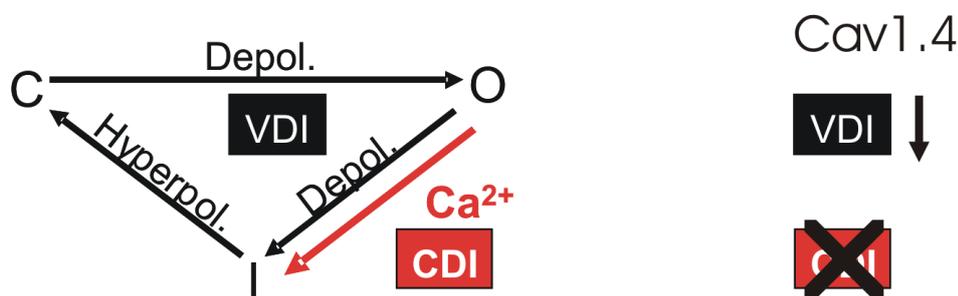


Abb. 1-5 Schematische Darstellung der verschiedenen Zustandsformen von HVA-Kanälen. Eine Depolarisation überführt den geschlossenen Kanal (C, *closed*) in den offenen Zustand (O, *open*). Eine langanhaltende Depolarisation führt zur spannungsabhängigen Inaktivierung (VDI), Calcium beschleunigt die Inaktivierung (Calcium-abhängige Inaktivierung, CDI). Vom inaktivierten Zustand (I, *inactivated*) wird der Kanal über eine Hyperpolarisation wieder in den geschlossenen, aktivierbaren Zustand überführt (links). Der Cav1.4 nimmt eine Sonderstellung unter den HVA-Kanälen ein: er zeigt eine sehr langsame VDI, und besitzt keine CDI (rechts).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war es nicht bekannt, worauf das Fehlen der CDI im Cav1.4 zurückzuführen ist. Funktionelle Bereiche, die in anderen Calciumkanälen CDI vermitteln, sind jedoch weitgehend bekannt. Am Besten untersucht ist die Inaktivierung bei dem, mit dem retinalen Kanal nahe verwandten, kardialen L-Typ Calciumkanal Cav1.2.

Schlüsselstrukturen für die Inaktivierung liegen im Cav1.2 im proximalen C-Terminus³⁴⁻⁴³. Drei Segmente spielen dabei eine besonders wichtige Rolle: das EF-Hand-, preIQ- und IQ-Motiv⁴³. Das EF-Hand-Motiv ist eine allosterische Domäne, die sowohl für die spannungsabhängige als auch die Calcium-abhängige Inaktivierung bedeutend ist^{36,42,44-47}. Durch Depolarisation wird der Kanal zunächst aktiviert, eine anhaltende Depolarisation löst schließlich eine Konformationsänderung des EF-Hand-Motivs aus, das dadurch mit anderen Kanalbereichen interagieren kann. Dies führt zur Inaktivierung d. h. zum Schließen des Kanals (VDI). Kontrovers diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Funktion des cytoplasmatischen Linkers zwischen Domäne I und II, der womöglich wie ein Pfropf, als so genannter *pore occluder*, die Kanalpore spannungsabhängig verschließt⁴⁸⁻⁵⁰.

Bei der CDI ist die Inaktivierung durch Calciumionen beschleunigt. Der Calciumsensor Calmodulin (CaM), der vier Calciumbindungsdomänen, zwei weniger affine (N-lobe) und zwei hochaffine (C-lobe) aufweist, bindet an das IQ- und preIQ-Motiv^{36-37,51}.

Im Cav1.2 ist Calmodulin auch in seiner Calcium-freien Form, als Apocalmodulin (ApoCaM) am C-Terminus präassoziiert. Nach dem Öffnen des Kanals strömt Calcium in die Zelle, bindet an präassoziiertes Calmodulin und induziert ebenso wie bei der VDI eine Konformationsänderung des EF-Hand-Motivs⁵². Der Porenschluss erfolgt allerdings, getriggert durch Calcium, wesentlich schneller (Abb. 1-6).

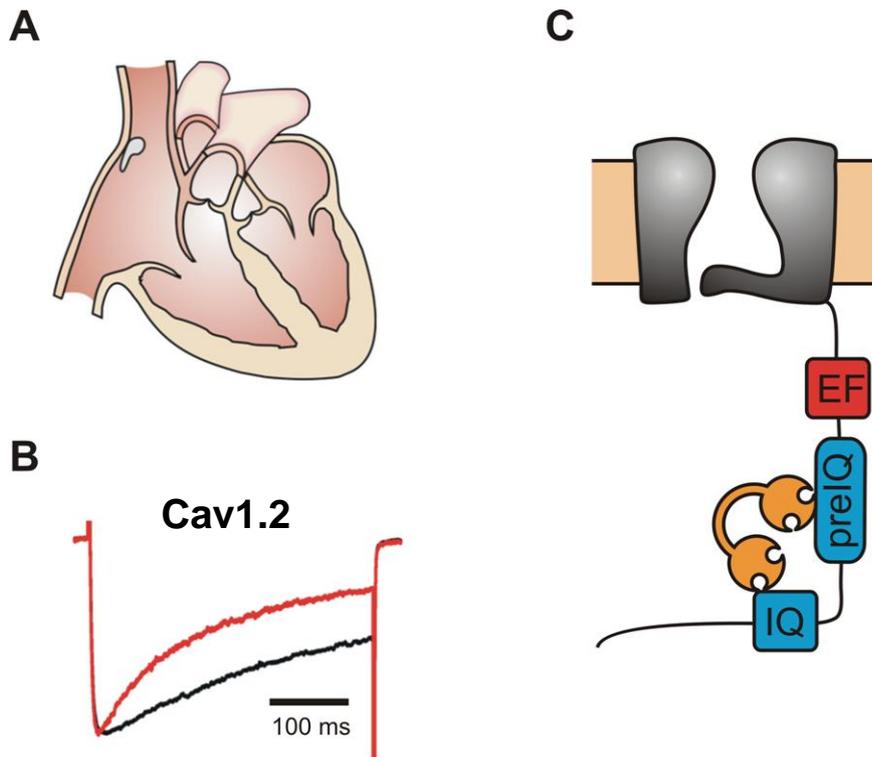


Abb. 1-6 Mechanismus der CDI am Beispiel des kardialen Calciumkanals Cav1.2. **A** Der Calciumkanal Cav1.2 ist im Herzen exprimiert und wesentlich beteiligt an der Ausbildung des kardialen Aktionspotentials. **B** Stromspuren in der Anwesenheit von Ba²⁺ (schwarze Spur) und Ca²⁺ (rote Spur). Die Inaktivierung wird durch Ca²⁺ spezifisch beschleunigt (CDI vs. VDI). **C** Modell des Cav1.2. Schlüsselstrukturen für die über Ca²⁺ / CaM (orange) vermittelte CDI liegen im proximalen C-Terminus (EF-Hand-, preIQ- und IQ-Motiv).

Der kardiale Cav1.2 benötigt CDI, um z. B. die Aktionspotentialdauer im Herzen zu begrenzen und damit eine toxische Überladung der Zelle mit Calcium zu verhindern. Die Bedeutung dieses Rückkopplungsmechanismus zeigt sich in einer Erkrankung, die sich Timothy-Syndrom nennt. Diese Multisystemerkrankung beruht auf *gain-of-function-missense*-Mutationen im Cav1.2-Gen, die zu einer deutlichen Reduktion der VDI und CDI führen¹²⁻¹⁴.

Symptome des Timothy-Syndroms sind kardiale Arrhythmien, komplexe Entwicklungsstörungen wie Syndaktylie (Verwachsung der Finger und Zehen) und oftmals mentale Retardierung (Abb. 1-7). Die betroffenen Patienten weisen außerdem eine Immundefizienz und häufig neurologische Symptome wie Autismus und Epilepsie auf. Das kardiale Krankheitsbild ist u. a. geprägt von einem *long* QT-Syndrom und ventrikulären Tachyarrhythmien. Diese Symptome lassen sich direkt aus der verlangsamt inaktivierten des Kanals, dem längeren Calcium-Einstrom während der Plateauphase des Aktionspotentials und der dadurch verzögerten Repolarisation ableiten. Aufgrund der schweren kardialen Symptomatik versterben die Patienten im Durchschnitt bereits mit 2 ½ Jahren¹²⁻¹³.

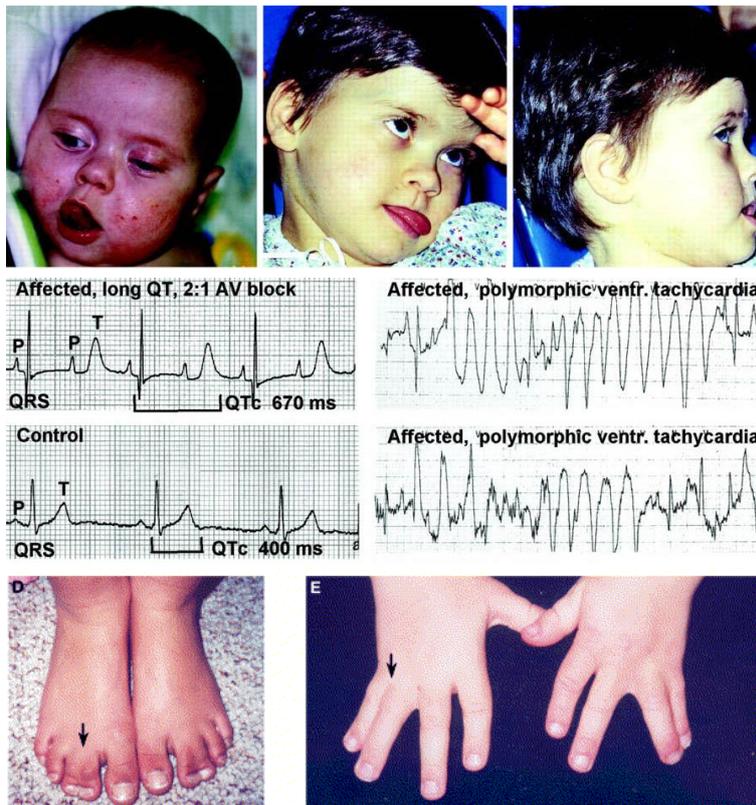


Abb. 1-7 Symptomatik des Timothy-Syndroms. Die Erkrankung beruht auf Mutationen im Cav1.2-Gen, die zu einer verlangsamt inaktivierten führen. Die Patienten leiden an komplexen Entwicklungsstörungen wie Gesichtsdysmorphien (oben), Syndaktylie der Finger und Zehen (unten), *long* QT-Syndrom und ventrikulären Tachyarrhythmien (Mitte). Quelle: Splawski et al. 2004, 2005.

Die beim Timothy-Syndrom beschriebenen Mutationen (G406R, G402S) liegen am C-terminalen Ende des Segments sechs der Domäne I¹²⁻¹³.

Dieser Bereich sowie andere Strukturen, die im Cav1.2 CDI vermitteln, sind auch im retinalen Calciumkanal konserviert⁵². Im Gegensatz zum kardialen Calciumkanal befindet sich jedoch am Ende des C-Terminus im Cav1.4 eine inhibitorische Domäne von ca. 100 Aminosäuren (Inhibitor der Calcium-abhängigen Inaktivierung, ICDI), die durch Bindung an proximale Bereiche die CDI abschaltet⁵³⁻⁵⁴ (Abb. 1-8). Die Ergebnisse von Co-Immunpräzipitationen weisen darauf hin, dass dabei besonders die Interaktion zwischen der ICDI und dem EF-Hand-Motiv wichtig ist.

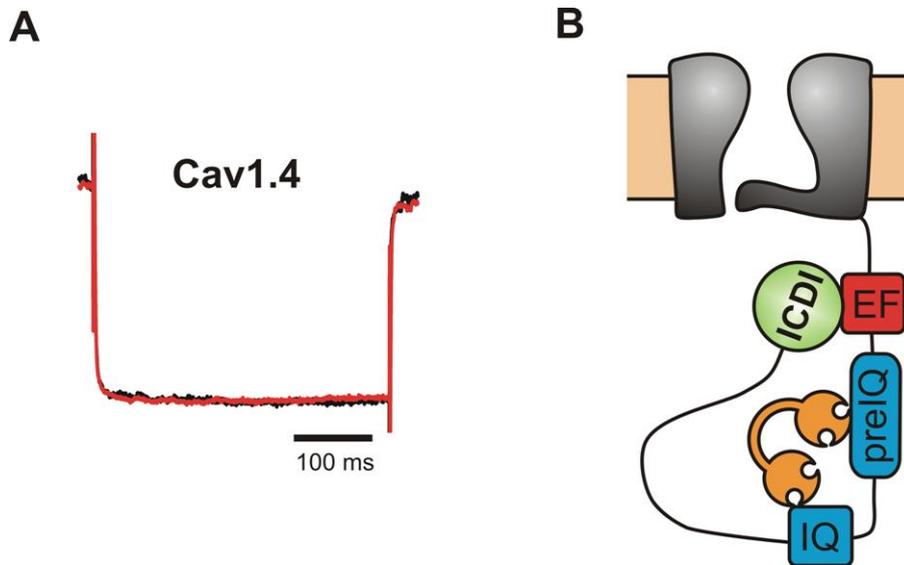


Abb. 1-8 Modell des retinalen Calciumkanals Cav1.4 **A** Stromspuren in der Anwesenheit von Ba^{2+} (schwarze Spur) und Ca^{2+} (rote Spur). Es liegt keine CDI vor. **B** Schlüsselstrukturen, die im Cav1.2 CDI vermitteln (EF-Hand-, preIQ- und IQ-Motiv), sind auch im Cav1.4 konserviert. Die ICDI am Ende des C-Terminus des Cav1.4 agiert als inhibitorische Domäne. Durch Bindung an proximale Bereiche (v. a. an das EF-Hand-Motiv) schaltet sie die CDI ab.

Die Bedeutung der ICDI zeigt sich darin, dass durch die Deletion der entsprechenden Domäne (Cav1.4 Δ ICDI), die durch Ca^{2+} / CaM induzierte CDI wieder hergestellt werden kann (Abb. 1-9).

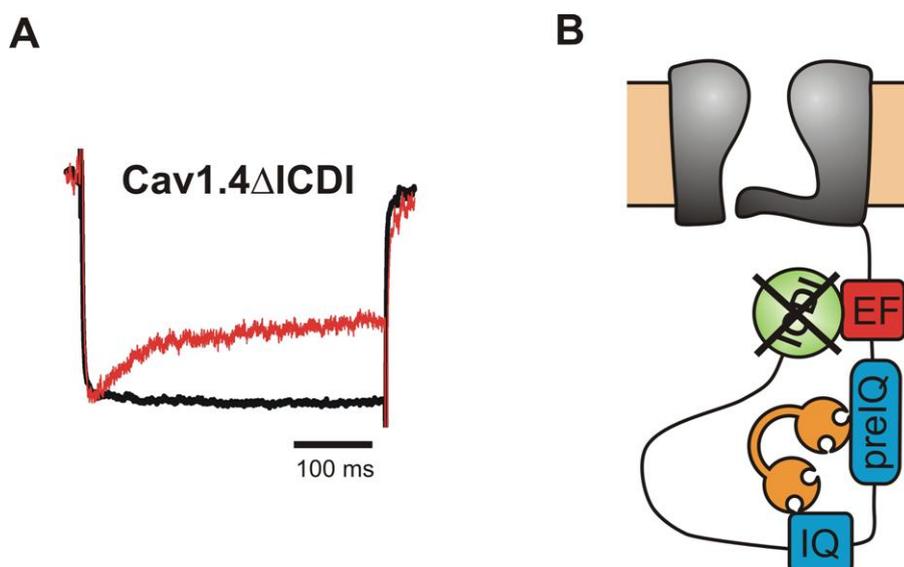


Abb. 1-9 Modell des trunkierten retinalen Calciumkanals Cav1.4 (Cav1.4 Δ ICDI) **A** Stromspuren in der Anwesenheit von Ba^{2+} (schwarze Spur) und Ca^{2+} (rote Spur). Die Deletion der ICDI induziert CDI. **B** Schematische Darstellung des trunkierten Kanals Cav1.4 Δ ICDI.

Die Koexpression dieser trunkierten Kanal-Variante (Cav1.4 Δ ICDI) mit der ICDI, schaltet die CDI wiederum aus, was die Vermutung zulässt, dass die ICDI als autoinhibitorische Einheit fungiert.

Anhand weiterer Trunktationsvarianten der ca. 2000 Aminosäuren umfassenden α_1 -Untereinheit konnte schließlich ein Sequenzbereich von 23 Aminosäuren (1930 - 53) identifiziert werden, der von besonderer Bedeutung für die Funktion der ICDI ist⁵³⁻⁵⁴. In Anwesenheit dieser Aminosäuren zeigt der Kanal wie in seiner Wildtypform keine CDI, werden sie deletiert, inaktiviert der Kanal Calcium-abhängig.

Durch Einfügen der ICDI lässt sich auch in anderen L-Typ-Kanälen (Cav1.2 und Cav1.3) die beschleunigte Inaktivierung in Anwesenheit von Calcium abschalten⁵³⁻⁵⁴. Die ICDI ist damit eine weitere, für die Regulation der L-Typ Calciumkanäle wichtige, funktionelle Proteindomäne.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Der genaue molekulare Mechanismus, wie die inhibitorische Domäne des retinalen Cav1.4 Kanals die Calcium-abhängige Inaktivierung unterbindet, war zu Beginn meiner Arbeit noch unklar. Im Wesentlichen existierten zwei unterschiedliche Modelle.

Eine Hypothese beschreibt ein kompetitives Modell, in dem die ICDI den Calciumsensor Calmodulin vom C-Terminus verdrängt und dadurch keine CDI mehr stattfinden kann⁵⁴. Eine andere Modellvorstellung besagt, dass sowohl die inhibitorische Domäne als auch CaM gleichzeitig am Kanal gebunden sind und die Wechselwirkung der ICDI mit dem EF-Hand-Motiv, das eine zentrale Rolle in der Vermittlung der CDI anderer L-Typ Calciumkanäle einnimmt, für das Fehlen des Inaktivierungsmechanismus verantwortlich ist⁵³.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwischen diesen beiden Modellen zu differenzieren.

Im Besonderen sollten zwei Fragen geklärt werden:

1. Ist Calmodulin, trotz des Fehlens der Calcium-abhängigen Inaktivierung, konstitutiv an den C-Terminus des Cav1.4 gebunden und wenn ja, welche Bedeutung nimmt der Calciumsensor in der Regulation des retinalen Calciumkanals ein?
2. Lässt sich die Interaktionsdomäne der ICDI innerhalb des proximalen C-Terminus näher charakterisieren und welche Schlüsse lassen sich daraus auf den Mechanismus der ICDI ziehen?

2 MATERIAL UND METHODEN

Für die gentechnologischen Arbeiten lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vom 19.01.2000 (Aktenzeichen 821-8763.14.469/30) vor.

2.1 Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Roth, Sigma-Aldrich oder Biorad bezogen und entsprachen der Qualität „pro analysi“ oder „für molekularbiologische Zwecke“. Für die Herstellung aller Lösungen wurde generell hochreines entionisiertes Wasser (Reinstwassersystem Easypure UV / UF, Werner GmbH) verwendet. Bei Anwendungen, bei denen eine sehr hohe Reinheit wichtig war, wie z. B. bei PCRs oder Arbeiten in der Zellkultur, wurden die Lösungen zusätzlich autoklaviert.

2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.1 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in Bakterien extrachromosomal vorkommen und autonom replizierbar sind. Davon abgeleitet werden in der Molekularbiologie synthetisch hergestellte Plasmide, so genannte Vektoren, verwendet, um DNA zu amplifizieren oder zu exprimieren. Essentielle Bestandteile von Klonierungsvektoren sind der bakterielle Replikationsursprung (*origin of replication*), ein Antibiotika-Resistenzgen zur Selektion und ein Polylinker, auch *multiple cloning site* (MCS) genannt, der Erkennungssequenzen für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen trägt. Diese Schnittstellen schneiden die Vektorsequenz in der Regel nur einmal und ermöglichen so die Klonierung von DNA-Fragmenten.

2.2.1.1 Verwendete Plasmide

pcDNA3 (5,4 kb, Invitrogen)

Wesentliche Bestandteile dieses eukaryotischen Expressionsvektors sind ein Cytomegalievirus-Promoter (CMV-Promoter), der eine starke, konstitutive Expression gewährleistet, und ein Ampicillin-Resistenzgen. In dieser Arbeit diente der pcDNA3 Vektor vor allem der heterologen Expression der L-Typ Calciumkanäle Cav1.4 und Cav1.2 für die Elektrophysiologie, sowie verschiedener Kanalfragmente für die FRET-Messungen.

pIRES2-EGFP (5,3 kb, Clontech)

Der bizistronische Vektor pIRES2-EGFP besitzt neben einem CMV-Promoter und einem Selektionsgen für Kanamycin auch eine IRES-Sequenz (*internal ribosome entry site*). Sie liegt zwischen der MCS und einem für EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) kodierenden Bereich und ermöglicht über zwei offene Leserahmen die gleichzeitige Expression zweier Proteine, nämlich die des eingefügten Gens und des grün fluoreszierenden Proteins. Anhand letzterem lässt sich eine Aussage zur Effizienz der Transfektion machen. Der Vektor pIRES2-EGFP wurde für die Expression der α_1 -Untereinheit des Cav1.4 verwendet. Bei den anschließenden Patch-Clamp-Messungen konnten transfizierte Zellen so leicht anhand der grünen Fluoreszenz identifiziert werden.

pECFP-C1 (4,7 kb, Clontech)

Der ebenfalls Kanamycin resistente pECFP-C1 Vektor trägt die Sequenz für ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*), einer cyan fluoreszierenden Variante des EGFP. Die MCS befindet sich zwischen dem für die Fluorophore kodierenden Bereich und dem Stopp-Codon. Bei der Expression entstehen so N-terminale ECFP-Fusionsproteine. Dieser Vektor diente als Template für DNA-Amplifikationen; eine Mutante des Vektors (A206K) wurde außerdem bei FRET-Messungen aufgrund der Expression von reinem, monomerem ECFP als Negativkontrolle verwendet.

pEYFP-C1 (4,7 kb, Clontech)

Dieser Vektor enthält die Gensequenz des gelb fluoreszierenden Proteins (EYFP, *enhanced yellow fluorescent protein*), einer weiteren EGFP-Variante. Der Aufbau und die Verwendung dieses Vektors entsprechen dem des pECFP-C1.

2.2.1.2 Kultivierung kompetenter E. coli

Transformationskompetente *E. coli* vom Stamm XL1 Blue MRF (Stratagen) wurden in Glucose haltigem, autoklavierten Luria-Bertani-Medium (LB+) kultiviert. Der Flüssigkultur bzw. den Agar haltigen Petrischalen wurde außerdem das, den jeweiligen Klonierungsvektoren entsprechende, Selektions-Antibiotikum zugesetzt. Die Inkubation der Flüssigkulturen erfolgte bei 37°C in einem Schüttelinkubator (CERTOMAT® IS, B. Braun Biotech International) bei 225 rpm, die der Agarplatten bei 37°C im Brutschrank (Heraeus).

(LB+)-Medium

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,2 - 7,5	

(LB+)-Agar

Agar	15 g
(LB+)-Medium	ad 1000 ml

2.2.1.3 Transformation kompetenter *E. coli*

Die Transformation der *E. coli* wurde nach dem Protokoll von Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Dabei wurden jeweils ein 100 µl Aliquot transformationskompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut; nach Zugabe eines Ligationsansatzes von 10 - 15 µl bzw. 10 - 50 ng Plasmid-DNA bei Retransformationen erfolgte eine Inkubation für weitere 30 min auf Eis. Anschließend wurde der Transformationsansatz einem Hitzeschock (45 sec, 42°C) unterzogen und nochmals 2 min auf Eis gestellt. Danach wurden 900 µl SOC-Medium dazupipettiert und das 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 - 1,5 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Schließlich wurde die Kultur 2 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das resuspendierte Pellet auf Antibiotikum haltigen Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht (16 - 20 h) im Brutschrank bei 37°C inkubiert und im Anschluss bei 4°C aufbewahrt.

SOC-Medium

Pepton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	20 mM
Glucose	20 mM
H ₂ O	ad 1000 ml

2.2.1.4 Alkalische Lyse im kleinen Maßstab (Miniprep)

Mit einer Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab werden die nach einer Transformation gewachsenen Bakterienkolonien auf Integration der richtigen Plasmid-DNA überprüft. Einzelne Kolonien wurden dabei von der Agarplatte gepickt und mit jeweils 7 ml Antibiotika haltigem (LB+)-Medium versetzt. Nach Kultivierung über Nacht bei 37°C und 225 rpm wurden die Zellsuspensionen abzentrifugiert (3500 rpm, 10 min) und die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse isoliert.

Zur Identifizierung korrekter Bakterien-Klone wurde anschließend jeweils 1 µl der erhaltenen DNA für einen Restriktionsverdau verwendet (2.2.3.1).

2.2.1.5 Alkalische Lyse im Großmaßstab (Maxiprep)

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab und mit höherer Reinheit wurde mit 100 - 200 ml Kulturen gearbeitet. Die Inkubation der Bakterienklone erfolgte nach den oben beschriebenen Standardbedingungen (2.2.1.2). Für die Isolation des Plasmids wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) verwendet, das ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht. Durch die Aufreinigung über eine Silikat-Membran-Säule ist die erhaltene DNA wesentlich sauberer als DNA aus Minipräparationen.

2.2.1.6 Quantifizierung von DNA

Für die Quantifizierung der gewonnenen Plasmid-DNA wurde ihre spezifische Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Eppendorf BioPhotometer bestimmt. Über das Lambert-Beersche-Gesetz kann damit eine Aussage über die DNA-Konzentration getroffen werden. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine optische Dichte (OD_{260}) von 1 einer DNA-Menge von 50 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ (doppelsträngige DNA). Das Verhältnis von OD_{260} und OD_{280} sollte ungefähr zwischen 1,7 und 2 liegen, wesentlich niedrigere Werte deuten auf Proteinkontaminationen hin, höhere Werte auf einen höheren Gehalt an RNA bzw. einsträngiger DNA. Aus dem Verhältnis OD_{260} zu OD_{230} erhält man außerdem eine Aussage über Kontaminationen mit Peptiden, aromatischen Verbindungen, Phenolen und Kohlenhydraten, da diese Verbindungen bei 230 nm absorbieren. Der Quotient OD_{260} / OD_{230} sollte größer als 2 sein.

2.2.2 Auftrennung und Aufreinigung von DNA

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese getrennt. Die negativ geladenen Nucleinsäuren wandern im elektrischen Feld zum Pluspol und werden in Abhängigkeit von der angelegten Spannung, der Zusammensetzung des Gels sowie der Form und Größe der DNA-Fragmente aufgetrennt.

Zusätzlich zu den Proben wurde ein universeller Größenstandard für DNA-Fragmente (1 kb DNA Ladder, invitrogen) aufgetragen. Der verwendete Gel-Ladepuffer (6x Dye) enthielt die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, die den Verlauf der Elektrophorese anzeigten. 1x TBE diente als Elektrophorese-Laufpuffer. Nach Isolierung der DNA (2.2.2.3) aus den entsprechenden Gelen folgten mehrere Aufreinigungsschritte.

<u>6x Dye</u>		<u>10x TBE</u>	
Ficoll Typ 400	18 g	Tris HCl	0,9 M
0,5 M EDTA pH 8	24 ml	Borsäure	0,9 M
10x TBE	60 ml	EDTA pH 8,0	20 mM
H ₂ O	ad 100 ml		
Bromphenolblau (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$)	3 ml	<u>Elektrophorese-Laufpuffer</u>	
Xylencyanol (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$)	3 ml	1x TBE (1 T 10x TBE + 9 T H ₂ O)	

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente kam entweder die horizontale Elektrophorese mittels Agarosegelen oder die vertikale mittels PAGE-Gelen zum Einsatz.

2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Das Standardverfahren zur Auftrennung von DNA war die Elektrophorese in Agarosegelen. Abhängig von der Fragmentgröße wurden dabei Gele mit einer Konzentration von 0,7 - 2% Agarose (peqGOLD Universal-Agarose, Peqlab) verwendet. Die Agarose wurde zunächst in 1x TBE aufgekocht und nach Abkühlung Ethidiumbromid (100 mg / ml in H₂O, Endkonzentration 0,8 µg / ml), ein DNA-Interkalator zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht (Gel Doc 2000, Biorad), zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 - 135 V.

2.2.2.2 PAGE-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von sehr kleinen DNA-Fragmenten (< 400 bp) wurden 5% Polyacrylamid-Gele verwendet. Gele mit einer Dicke von 0,75 mm für analytische Zwecke, 1,5 mm dicke Gele für präparative Zwecke. Die Laufstrecke betrug in beiden Fällen 15 cm. Die vertikale Elektrophorese der PAGE-Gele erfolgte 10 min bei 100 V, dann in der Regel 50 min bei 260 V.

Im Anschluss wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,8 µg / ml) gefärbt, gefolgt von einem Waschschrift mit H₂O, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen.

5% Polyacrylamidgel

Rotiphorese Gel 40	3,75 ml
(Acrylamid / N,N'-Bisacrylamid = 29:1, 40% wässrige Lösung)	
10x TBE	3 ml
H ₂ O	ad 30 ml
TEMED	20 µl
APS (20%ige Lösung in H ₂ O)	70 µl

2.2.2.3 Isolierung von DNA aus Gelen

Zur Isolierung von DNA aus Gelen wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Im Falle von Agarosegelen erfolgte die Isolierung und Aufreinigung mit einem Kit nach Anweisung des Herstellers (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences). Bei präparativen PAGE-Gelen wurde eine Elektroelution durchgeführt. Die ausgeschnittene DNA-Bande wurde mit 300 µl 1x TBE luftblasenfrei in einen Dialyseschlauch (Sigma) gegeben und unter Kühlung 2 - 3 h bei 145 mA in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Laufpuffer 1x TBE) eluiert. Der Puffer des Dialyseschlauchs, in dem sich nach der Elution die DNA befand, wurde im Anschluss in ein Reaktionsgefäß überführt; es folgte eine DNA-Fällung (2.2.2.4).

2.2.2.4 Präzipitation von DNA

DNA aus wässrigen Lösungen wurde zum Zweck der Aufreinigung bzw. Aufkonzentrierung in Ethanol gefällt. Dabei wurde die Lösung mit dem 0,1 fachen Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und dem 2,5 fachen Volumen 100%igem Ethanol (-20°C) versetzt, gemischt und zur Fällung der DNA für 10 min bei -80°C inkubiert. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 5 min). Zum Schluss wurde die DNA 3 - 5 min in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Heraeus) getrocknet und in der gewünschten Menge Wasser gelöst.

2.2.2.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um besonders reine DNA zu erhalten, wurde vor der Fällung zusätzlich eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dadurch wurden Proteine, die möglicherweise bei sich anschließenden Arbeitsschritten stören könnten, entfernt. So wurden z. B. Restriktionsenzyme vor einer anschließenden Dephosphorylierung der Vektor-DNA (2.2.3.2) aus dem Reaktionsansatz extrahiert oder nach einer PCR (2.2.4) die DNA-Polymerase vor einem Restriktionsverdau entfernt. Die zu fällende Lösung wurde dazu zunächst mit autoklaviertem H₂O ad 300 µl verdünnt und dann mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt, geschüttelt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Proteine sammelten sich dabei in der unteren organischen Phase. Die obere Phase, die auch die DNA enthielt, wurde abgenommen und mit 300 µl Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Die in der oberen Phase enthaltene DNA wurde im Anschluss gefällt (2.2.2.4).

2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

Die Klonierung von DNA-Fragmenten beinhaltet neben der oben beschriebenen Amplifikation und Aufreinigung auch die Linearisierung des Vektors und die Generierung des zu klonierenden DNA-Fragments (*insert*) mit anschließender Ligation. Für die Umsetzung dieser einzelnen Schritte wurden verschiedene enzymatische Modifikationen angewandt. Die dabei verwendeten Enzyme wurden, sofern nicht anders vermerkt, von der Firma New England Biolabs bezogen.

2.2.3.1 Restriktionsverdau

Enzymmenge, Zusammensetzung der Puffer und Reaktionsbedingungen des Restriktionsverdaus entsprachen den Angaben des Herstellers. Verwendet wurden dabei Restriktionsendonucleasen vom Typ II, die die DNA innerhalb ihrer spezifischen Erkennungssequenz palindromisch spalten. Dabei entstehen zueinander komplementäre 5'- bzw. 3'-überhängende, kohäsive Enden (*sticky ends*). Ausgangsmaterial für den Restriktionsverdau war entweder Plasmid-DNA oder über PCR amplifizierte DNA-Fragmente.

2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation des nach einem Restriktionsverdau linearisiert vorliegenden Vektors zu verhindern, wurden 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit CIP (*calf intestinal phosphatase*), einer Phosphatase aus Kalbsdärmen, abgespalten. Dazu wurde der Restriktionsansatz nach dem Verdau zunächst einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung unterzogen (2.2.2.4, 2.2.2.5), die DNA in Wasser resuspendiert und nach Zugabe des geeigneten Puffers und 1 µl CIP (10 Einheiten) für mindestens 1,5 h, in manchen Fällen über Nacht, bei 37°C inkubiert.

2.2.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung der kompatiblen Enden des linearisierten Vektors und des zu klonierenden DNA-Fragments wurde die T4-DNA-Ligase eingesetzt. Dieses Enzym ligiert unter ATP-Verbrauch die Enden doppelsträngiger DNA, indem es die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe katalysiert. Als Ergebnis entstehen ringförmige Plasmide, die die gewünschte DNA-Sequenz des *inserts* enthalten. Für die Ligation wurde der Vektor mit einem zwei- bis mehrfachen Überschuss an *insert*-DNA, ATP-haltigen T4-Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 Einheiten) über Nacht bei 16°C oder alternativ 2 - 3 h bei 25°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente in dieser Arbeit der Generierung von DNA-Fragmenten (*inserts*) zur Klonierung. Ebenfalls zum Einsatz kam die Overlap-PCR. Eine weitere Sonderform der PCR, Quikchange genannt, wurde angewandt, um in DNA-Plasmiden einzelne oder mehrere Basen zu mutieren. Das PCR-Standardprotokoll wurde nach Bedarf den jeweiligen Bedingungen angepasst. Für sämtliche Reaktionen wurde ein Thermocycler T1 (Biometra) verwendet.

Die Synthese der Primer übernahm die Firma MWG-Biotech.

2.2.4.1 Standard-Klonierungs-PCR

Für die Standard-Klonierungs-PCR wurde die Phusion-Polymerase (Finnzymes) mit dem entsprechenden Reaktionspuffer (HF-Puffer) verwendet. Dieses Enzym besitzt im Gegensatz zu vielen anderen Polymerasen Exonukleaseaktivität, d. h. sie erkennt und korrigiert Synthesefehler. Außerdem verfügt sie über eine sehr hohe Synthesegeschwindigkeit (30 - 60 Basen / sec).

Die Reaktionsbedingungen mussten in zwei Punkten spezifisch für jede PCR angepasst werden. Zum einen richtet sich die Temperatur für die Primeranlagerung (*annealing*) nach der spezifischen Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Zum anderen ist die Elongationszeit abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments der Ausgangs-DNA (*template*).

Standard-PCR-Protokoll:**Reaktionsansatz**

Primer forward (10 pmol / µl)	2,5 µl
Primer reverse (10 pmol / µl)	2,5 µl
5x HF-Puffer	10 µl
Template	15 - 30 ng
dNTPs	8 µl
Phusion-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	98°C	3 min	
Denaturierung	98°C	30 sec	
Annealing	52 - 60°C	30 sec	20 - 40 Zyklen
Elongation	72°C	30 - 60 Basen / sec	
Finale Elongation	72°C	5 min	

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt in der Regel gefällt, einem Restriktionsverdau unterzogen und wie bereits beschrieben isoliert, aufgereinigt und im Anschluss zur Ligation verwendet (2.2.2, 2.2.3).

2.2.4.2 Overlap-PCR

Neben der Standard-Klonierungs-PCR kam häufig auch die sogenannte Overlap-PCR zum Einsatz. Mithilfe dieser Variante der PCR kann ein Polynukleotidstrang durch Deletion einer bestimmten DNA-Sequenz verkürzt werden. Zunächst wurden dabei zwei herkömmliche PCRs (2.2.4.1) durchgeführt, jeweils mit einem flankierenden und einem mutagenen Primer mit überhängendem Ende. Letztere waren zueinander komplementär, wodurch zwei DNA-Fragmente mit teilweise überlappender Sequenz entstanden. Die zwei neu synthetisierten Fragmente wurden im Anschluss als Matrizenstränge in der Overlap-PCR eingesetzt, als Primer dienten die beiden flankierenden Primer. Die beiden PCR-Produkte wurden dadurch zu einem Strang verbunden, der im Gegensatz zum Ausgangstemplate die gewünschte Deletion aufweist.

2.2.4.3 Quikchange-PCR

Eine weitere Sonderform der Polymerase-Kettenreaktion ist die Quikchange-PCR. Dieses Verfahren kann eingesetzt werden, um in einem Plasmid, einzelne Basen zu mutieren, zusätzlich einzufügen oder zu deletieren. Benötigt wird dazu ein doppelsträngiger DNA-Vektor mit dem gewünschten Insert und zwei Primer (25 - 45 bp), die komplementär zu den beiden DNA-Strängen sind und etwa in der Mitte, flankiert von ca. 10 - 15 Basen, die entsprechende Mutation enthalten. Während der PCR werden diese Primer dann verlängert, die Ausgangs-DNA wird im Anschluss durch einen enzymatischen Verdau abgebaut. Die PCR wurde mit dem Quikchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Quikchange-PCR-Protokoll:**Reaktionsansatz**

Primer forward (10 pmol / μ l)	1 μ l
Primer reverse (10 pmol / μ l)	1 μ l
10x Reaction Buffer	5 μ l
Template	10 - 100 ng
dNTPs	1 μ l
QuikSolution	3 μ l
H ₂ O	ad 50 μ l
+ PfuTurbo DNA-Polymerase	1 μ l

Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung	95°C	1 min	
Denaturierung	95°C	50 sec	
Annealing	55 - 60°C	30 sec	18 Zyklen
Elongation	68°C	1 min / kb	
Finale Elongation	68°C	7 min	

2.3 Kultur und Transfektion eukaryotischer Zellen

Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (Laminar Air Flow, HERAsafe HS18, Heraeus) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Medien und Standard-Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.3.1 Kultur von HEK293-Zellen

Zur heterologen Expression der Calciumkanäle wurde in dieser Arbeit die Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney*, ATCC Nr. CRL-1573) verwendet. Es handelt sich dabei um, durch Transfektion mit dem Adenovirus Typ 5, immortalisierte Zellen. Die Kultur fand in 75 cm²-Flaschen (Sarstedt) in einem Inkubator (Heraeus) bei 37°C und 10% CO₂ statt. Als Kulturmedium wurde DMEM-Medium (*Dulbecco's modified eagle medium*) mit 1000 mg / l D-Glucose unter Zusatz von 10% FBS (Biochrom) und Antibiotika (100 Einheiten / ml Penicillin G, Biochrom, und 100 µg /ml Streptomycin, Biochrom) verwendet. Beim Erreichen einer Konfluenz von etwa 80%, was einem Kultur-Zeitraum von 2 - 3 Tagen entsprach, wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die HEK293-Zellen, nach einem Waschschrift mit PBS, durch Trypsinisierung (EDTA-Trypsin-Lösung, 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert, vereinzelt und im Verhältnis von etwa 1:10 passagiert. Alle 3 Wochen wurde ein neuer Gefrierstock aufgetaut (Lagerung -196°C) und in Kultur genommen.

PBS

NaCl	40,0 g
KCl	1,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	14,5 g
KH ₂ PO ₄	1,2 g
H ₂ O	ad 5000 ml
pH 7,4 einstellen	

EDTA-Trypsin-Lösung

Stocklösung (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA)	10 ml
PBS	ad 100 ml

2.3.2 Transiente Transfektion mit Fugene

Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte sowohl für die Elektrophysiologie- als auch für die Fluoreszenz-Messungen mit Fugene 6 (Roche) nach dem Prinzip der Lipofektion gemäß der Herstellervorschrift. Das Verhältnis DNA (µg) zu Fugene (µl) betrug in der Regel 3:1, das Verhältnis Fugene (µl) zu Reaktionsmedium (µl, DMEM ohne Zusätze) 1:10.

2.3.2.1 Transfektion für die Elektrophysiologie

Je nach Transfektionszeitpunkt wurden ungefähr $0,5 - 3 \times 10^5$ Zellen in jedes Well einer 6-Wellplatte in 2 ml Medium ausgesät. Frühestens 4 - 6 h bzw. spätestens 48 h später erfolgte die Transfektion.

2.3.2.2 Transfektion für FRET-Messungen

Einen Tag vor der Transfektion wurden ca. $5 - 7,5 \times 10^4$ Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete ibiTreat Träger (μ -Dish, 35 mm, low, ibidi) in 400 μ l Medium ausgesät.

2.3.3 Transiente Transfektion mit Calciumphosphat

Zur Proteingewinnung für die Co-Immunpräzipitation wurden Zellen auf 10 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert und im Anschluss mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Pro Platte wurden bis zu 30 μ g Plasmid-DNA eingesetzt. Nach Verdünnung der DNA auf 400 μ l H_2O , wurden 100 μ l 2,5 M $CaCl_2$ und dann 500 μ l 2x BBS tropfenweise zugegeben. Nach zweimaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde der Ansatz für 12 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich tropfenweise auf der 10 cm Platte verteilt. Zunächst erfolgte dann eine Inkubation für ca. 16 h über Nacht im 37°C Brutschrank bei einer CO_2 -Begasung von 3%. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur Lyse (2 - 3 Tage) bei 37°C und 10% CO_2 weiter kultiviert.

2,5 M $CaCl_2$

$CaCl_2 \times 2 H_2O$	7,35 g
H_2O	ad 20 ml

2x BBS (BES-buffered solution)

BES (N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)- 2-amino-ethansulfonsäure)	0,533 g
NaCl	0,818 g
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	0,013 g
H_2O	ad 50 ml
HEPES	5 mM
mit NaOH pH 6,95 einstellen	

2.4 Arbeiten mit Proteinen

Arbeiten mit Proteinen wurden, wenn möglich, bei 4°C durchgeführt, um eine Denaturierung oder Degradation der Proteine zu verhindern.

2.4.1 Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung der Proteine fand photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) nach der Methode von Bradford statt. Dazu wurden 5 µl der Proteinlösung mit 95 µl 0,15 M NaCl und dann mit 1 ml Coomassie-Lösung gemischt und im Anschluss 2 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Der zugesetzte Farbstoff Coomassie Brillantblau G250 bildet in saurer Lösung Komplexe mit Proteinen. Durch diese Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist daher ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zur Kalibrierung des Photometers wurde eine Standardreihe mit unterschiedlichen Proteinmengen BSA (1 - 30 µg in je 100 µl 0,15 M NaCl) vermessen.

Coomassie-Lösung

Coomassie brillant blue G250	50 mg
EtOH 95%	25 ml
H ₃ PO ₄ 85%	50 ml
H ₂ O	ad 500 ml

Lagerung der filtrierten Lösung bei 4°C

2.4.2 Co-Immunpräzipitation

Zum In-vitro-Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) verwendet. Man geht dabei generell folgendermaßen vor: das Protein A wird mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert, aufgereinigt und über Western-Blot auf eine Membran übertragen. Ist es möglich, auf dieser Membran das Protein B nachzuweisen, so stellt dies einen Nachweis für die Interaktion von Protein A und B dar.

2.4.2.1 Proteingewinnung durch Lyse

HEK293-Zellen wurden, wie bereits beschrieben, mit Calciumphosphat transfiziert (2.3.3) und 2 - 3 Tage nach der Transfektion geerntet. Für die Lyse der Zellen wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt, einmal mit 10 ml PBS gewaschen und pro 10 cm Platte 1 ml Zell-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (Complete® EDTA-free, Roche) zugegeben. Zum Ablösen der Zellen wurden die Platten bei 4°C für 15 min geschüttelt und im Anschluss unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C (13000 rpm) wurde der Überstand mit den gelösten Proteinen in ein neues Gefäß überführt, das Präzipitat mit den Zelltrümmern wurde verworfen. Der Gehalt des Proteinlysats wurde vermessen (2.4.1), die Proteinlösung entsprechend aliquotiert und für die Co-IP eingesetzt.

Zell-Lysepuffer

Tris HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	50 mM

2.4.2.2 Experimentelle Durchführung der Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation wurde pro Ansatz 500 µg Protein eingesetzt und mit 40 µl einer 1:1-Suspension aus Protein-A-Sepharose Beads (Amersham) und Zell-Lysepuffer vermischt. Nach Zugabe eines spezifischen Antikörpers wurde der Ansatz mit Proteaseinhibitoren haltigem Zell-Lysepuffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C über Kopf rolliert.

Nach der Inkubation wurde bei 2600 g zentrifugiert und so die Protein-Antikörper-Sepharose-Präzipitate sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgten ungefähr drei Waschschrte. Wobei die Zusammensetzung des Waschpuffers (Konzentration an KCl) für das jeweilige Präzipitat individuell ermittelt wurde. Im Anschluss wurden die Proteine wie im Folgenden beschrieben denaturiert, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet (2.4.3, 2.4.4).

Waschpuffer

Tris HCl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	5 mM
DTT	0,5 mM
Glycerin	20%
KCl	x mM

2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli.

Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich mit seiner negativen Ladung an Polypeptidketten an und zwar jeweils ein Molekül SDS an zwei Aminosäurereste. Dadurch ist das Ladungs-Größen-Verhältnis für alle Proteine praktisch gleich und die Auftrennung hängt lediglich von der Größe und nicht von der Nettoladung der Proteine ab.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben nach Zugabe von Lämmli-Puffer 5 min bei 97°C denaturiert. Als Größenmarker diente der Proteinstandard Kaleidoscope Protein Ladder (Biorad). Die Elektrophorese fand in einer Elektrophoreseapparatur (Protean 3, Biorad) bei 100 V in 1x Elektrophoresepuffer statt.

4x Trenngelpuffer

Tris-Base	18,2 g
SDS	0,4 g
H ₂ O	ad 100 ml
mit HCl auf pH 8,8 einstellen, sterilfiltrieren	

Trenngel (7 - 10%)

Rotiphoresegel 30	3,5 - 7,5 ml
4x Trenngelpuffer pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O	7,75 - 3,75 ml
TEMED	10 µl
APS (20%ige Lösung in H ₂ O)	30 µl

6x Lämmli-Probenpuffer

4x Sammelgelpuffer pH 6,8	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
Bromphenolblau	0,004 %
H ₂ O	ad 10 ml

Lagerung bei -20°C

4x Sammelgelpuffer pH 6,8

Tris-Base	3,02 g
SDS	0,2 g
H ₂ O	ad 50 ml
mit HCl auf pH 6,8 einstellen, sterilfiltrieren	

Sammelgel

Rotiphoresegel 30	0,65 ml
4x Sammelgelpuffer pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
TEMED	5 µl
APS (20%ige Lösung in H ₂ O)	25 µl

10x Elektrophoresepuffer

Tris-Base	30,2 g
Glycin	144,0 g
SDS	10,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml

2.4.4 Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte im Fall der Co-IP die Übertragung der Proteine auf eine mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran (Immobilon, Porengröße 0,45 µm, Millipore) mit Hilfe eines Tank-Blot-Systems (Mini Trans Blot, Biorad). Der Western-Blot fand in Transferpuffer unter Eiskühlung bei 300 mA statt. Die Dauer des Blottens richtete sich nach der Größe der zu übertragenden Proteine. Danach wurde die Membran für ca. 1 h bei 37°C getrocknet, dann kurz in Methanol hydrophilisiert und für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung geschwenkt. Nach dem Blockieren wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen und schließlich über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in Blockierlösung inkubiert (horizontaler Rollierer). Am nächsten Tag folgte, nach zwei fünfminütigen Waschschritten, die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1 h, RT). Nach fünf weiteren Waschschritten á 5 min erfolgte die Detektion (Hyperfilm ECL, Amersham) des nachzuweisenden Proteins über Chemilumineszenz mittels dem ECL-Kit (Amersham).

Transferpuffer

MeOH 100%	20 ml
10x Elektrophoresepuffer	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Blockierlösung

5% Milchpulver in 1x TBST

10x TBS pH 8

Tris-Base	12,1 g
NaCl	80,23 g
H ₂ O	ad 1000 ml

TBST

0,1% Tween 20 in 1x TBS

2.4.5 Konstrukte

Die für die Co-IP und den anschließenden Western-Blot verwendeten Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pcDNA3 (2.2.1.1) kloniert. Alle Kanalfragmente der α_1 -Untereinheit des Cav1.4 (GenBank *accession number* AJ579852)⁵⁵ wurden über PCR (2.2.4.1) amplifiziert und enthielten N-terminal einen Myc-Tag. Explizit sind dies, der komplette und nach dem IQ-Motiv trunkierte C-Terminus des Cav1.4: CT1.4/5A und CT1.4R1610Stop/5A. In diesen Konstrukten ist die CaM-Bindung durch die Mutation der im IQ-Motiv liegenden Aminosäuren I1592 - F1596 in Alanine unterbunden⁵⁶⁻⁵⁷. Neben den 5A-Konstrukten wurde außerdem die Wildtyp-Sequenz des trunkierten C-Terminus (CT1.4R1610) für die Co-IP verwendet. CaM₁₂₃₄ wurde analog zu den Kanalfragmenten über PCR kloniert, wobei N-terminal über den 5'-Primer ein Triple-Flag-Tag eingefügt wurde.

2.5 Elektrophysiologie

2.5.1 Experimentelle Durchführung

Soweit nicht anders vermerkt wurden HEK293-Zellen mit für die α_1 -Untereinheit des Cav1.4 (GenBank accession number AJ579852)⁵⁵ oder Cav1.2b (GenBank accession number X55763)⁵⁸ codierenden Expressionsvektoren, zusammen mit äquimolaren Mengen der entsprechenden Untereinheiten (β_{2a} ⁵⁹, $\alpha_2\delta$ ⁶⁰) transfiziert (2.3.2.1). Je nach Calciumkanal wurden die transfizierten Zellen nach 2 - 3 Tagen mit PBS gewaschen, trypsinisiert (2.3.1) und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser einer 24-Wellplatte in 1 ml Medium ausgesät. Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in der *whole-cell*-Konfiguration. Für die Daten-Akquise wurde ein Axopatch 200B Verstärker und das Computerprogramm Clampex 8.2 (Axon Instruments) benutzt. Die Auswertung der Patch-Clamp-Daten erfolgte ebenfalls mit Clampex 8.2 und zusätzlich mit der Origin 6.1 Software.

Die Pipetten für die Messungen wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem äußeren Durchmesser von 1,5 mm und einem inneren Durchmesser von 1,17 mm (Harvard Apparatus) hergestellt. Das Ziehen der Pipetten erfolgte an einem horizontalen Pipettenziehgerät (DMZ-Universal Puller).

Folgende Bad- und Pipettenlösungen wurden für die *whole-cell*-Messungen verwendet:

Badlösung 10 mM Ba²⁺ bzw. Ca²⁺

NaCl	102 mM
BaCl ₂ x 2 H ₂ O bzw. CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mM
CsCl	5,4 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1 mM
Tetraethylammoniumchlorid	20 mM
HEPES	5 mM
Glucose x 1 H ₂ O	10 mM
mit NaOH pH 7,4 einstellen	

Pipettenlösung

CsCl	112 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	3 mM
MgATP	3 mM
EGTA	10 mM
HEPES	5 mM
mit CsOH pH 7,4 einstellen	

Für Messungen unter milder Calcium-Pufferung wurde die EGTA-Menge der Pipettenlösung von 10 mM auf 0,5 mM reduziert. Calcium- und Bariumströme (I_{Ca} und I_{Ba}) wurden von derselben Zelle aufgenommen. Der Austausch der Badlösungen erfolgte über eine Perfusionpipette.

2.5.2 Patch-Clamp-Protokolle

Zur Messung der Membranströme kamen zwei verschiedene Spannungsprotokolle zur Anwendung, die sich in der Dauer der Einzelpulse unterschieden (350 ms vs. 5 s). Das Standardprotokoll bestand aus Spannungssprüngen zwischen -80 und +70 mV mit 10 mV Spannungsdifferenz zwischen den einzelnen Pulsen. Das Haltepotential betrug -80 mV.

2.5.3 Datenanalyse

Alle Ergebniswerte wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm SEM angegeben; n steht für die Anzahl der Experimente.

Bei der statistischen Auswertung wurden zwei Gruppen anhand des t-Tests für gepaarte Stichproben nach Student miteinander verglichen. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde der ANOVA-Test (F-Test), gefolgt vom Dunnett-Test, durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Zur Berechnung der Stromdichte wurde die maximale Stromamplitude bei der maximalen Aktivierungsspannung (V_{\max}) auf die Kapazität (C_m) der Zelle normiert.

Bei der Bestimmung der halbmaximalen Aktivierungsspannung ($V_{0,5 \text{ act}}$) wurden I-V-Kurven aufgenommen und die Leitfähigkeit G (*chord conductance*) berechnet. $G = I_{\max} / (V_m - V_{\text{rev}})$.

Die Leitfähigkeit G ist definiert als der Quotient der maximalen Stromamplitude (I_{\max}) und der Triebkraft beim jeweiligen Spannungspuls ($V_m - V_{\text{rev}}$). Die Triebkraft ihrerseits stellt die Differenz zwischen Spannungspuls (V_m) und Umkehrpotential (*reversal potential*, V_{rev}) dar. Das Umkehrpotential ist diejenige Spannung, bei der durch den Kanal kein Nettostromfluss stattfindet. Ermittelt wird es als Schnittpunkt der I-V-Kurve mit der x-Achse ($I = 0$ pA).

Leitfähigkeitskurven wurden durch *nonlinear curve fitting* unter Verwendung der Boltzmann-Gleichung berechnet: $G = G_{\max} / (1 + \exp((V_{0,5 \text{ act}} - V_m) / k_{\text{act}}))$. Dabei ist G_{\max} die maximale Leitfähigkeit, V_m das Membranpotential und k_{act} die Steigung der Aktivierungskurve (*slope factor*).

Als Maß für die Inaktivierung der Calciumkanäle wurden so genannte R_{300} bzw. R_{5000} -Werte bestimmt. R stellt das Verhältnis (*ratio*) der Peakamplitude zum Reststrom nach 300 bzw. 5000 ms dar.

2.5.4 Konstrukte

Für die Expression der murinen Cav1.4 α_1 -Untereinheit bzw. davon abgeleiteten Mutanten wurde je nach Versuchsaufbau der bizistronische Vektor pIRES2-EGFP oder im Falle der Überexpression mit Calmodulin der Vektor pcDNA3 (2.2.1.1) verwendet. Letzterer diente außerdem der Expression der Cav1.2b α_1 - (Wildtyp und 5A-Mutante) sowie der β_{2a} - und $\alpha_2\delta$ -Untereinheit.

Für die Calmodulin-Überexpression wurde das Fusionspeptid CFP-wtCaM (pcDNA3) verwendet.

Im Cav1.2/5A bzw. Cav1.4/5A Konstrukt wurde die CaM-Bindung durch die Mutation der im IQ-Motiv liegenden Aminosäuren I1649 - F1653 bzw. I1592 - F1596 in Alanine unterbunden⁵⁶⁻⁵⁷.

2.6 FRET-Messungen

2.6.1 Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, kurz FRET genannt, stellt einen physikalischen Prozess dar, der erstmals 1946 von Theodor Förster beschrieben wurde. Das Phänomen kann zwischen zwei Farbstoffen beobachtet werden, die zur Fluoreszenz befähigt sind. Unter Fluoreszenz versteht man die Eigenschaft, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und schließlich in einem längeren Wellenlängenbereich wieder zu emittieren. Die Absorption von Photonen durch die Fluorophore führt zur Anhebung der Elektronen vom Grundzustand (S_0) in elektronisch angeregte Zustände (S_1 , S_2). Die Rückkehr in den Grundzustand erfolgt vom tiefstliegenden angeregten Zustand (S_1) durch die Emission von Strahlung (Abb. 2-1). Die bei der Emission abgegebene Energie ist dabei kleiner (längerer Wellenlängenbereich) als die bei der Anregung aufgenommene Energie (*stokes' shift*).

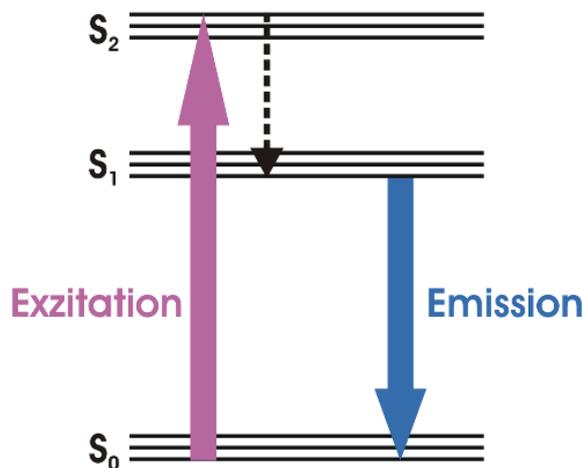


Abb. 2-1 Jablonski-Termschema: schematische Energiezustände einer Fluorophore. Durch die Absorption von Photonen werden die Elektronen elektronisch angeregt und in einen höheren Energiezustand angehoben (S_1 , S_2). Nach energetisch verlustreichen Zwischenstufen erfolgt die Rückkehr von S_1 in den Grundzustand (S_0) unter Emission von Licht (Fluoreszenz). Strahlende Übergänge sind mit farbigen Pfeilen dargestellt, strahlunglose mit gestrichelten.

Die Form des Emissionsspektrums ist dabei generell unabhängig von der Exzitationswellenlänge (*shape invariance, Kasha's rule*); lediglich die Amplitude der Emission wird durch die Wellenlänge der Anregung bestimmt (Abb. 2-2).

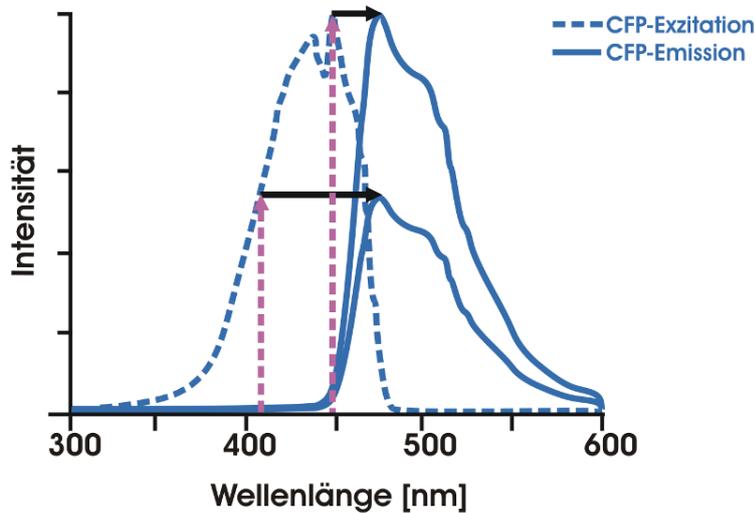


Abb. 2-2 Abhängigkeit der Emission von der Anregungswellenlänge am Beispiel des CFP. CFP-Exzitations- (blaue, gestrichelte Kurve) und -Emissionsspektrum (blaue Kurve). Die Form des Emissionsspektrums ist unabhängig von der Exzitationswellenlänge (lila, gestrichelte Pfeile, *shape invariance*), nur die Amplitude verändert sich (schwarze Pfeile).

Findet FRET statt, wird die Energie des angeregten Farbstoffs (Donor) nicht in Form von Fluoreszenz abgegeben, sondern strahlungslos (ohne Abgabe eines Photons), über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, auf eine zweite Fluorophore (Akzeptor) übertragen, die ihrerseits Licht einer charakteristischen Wellenlänge emittiert (Abb. 2-3).

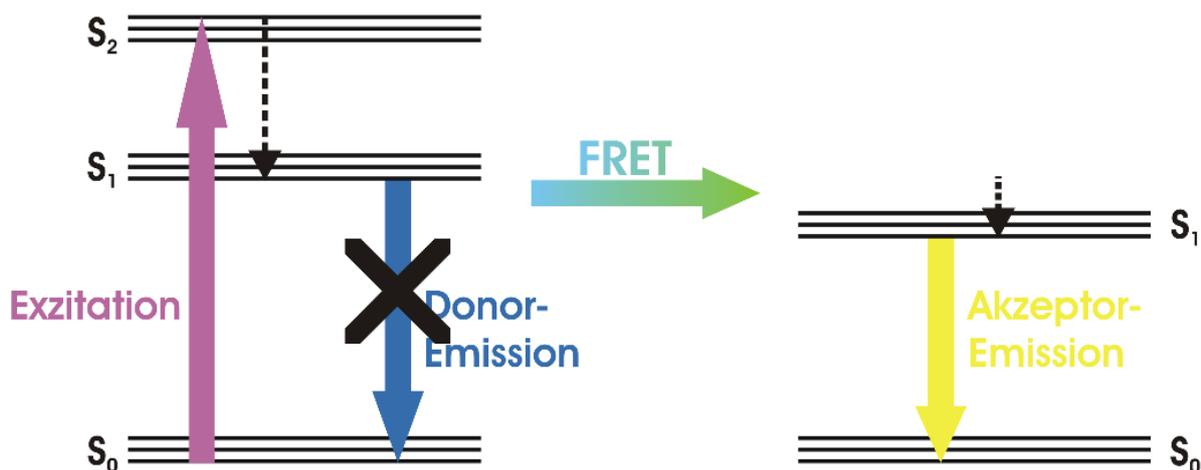


Abb. 2-3 Jablonski-Termschema: schematische Energiezustände bei FRET. Durch die Absorption von Photonen werden die Elektronen des Donors elektronisch angeregt und in einen höheren Energiezustand angehoben (S_1 , S_2). Nach energetisch verlustreichen Zwischenstufen, wird die Energie nicht in Form von Donor-Emission abgegeben, sondern strahlungslos auf den Akzeptor übertragen (FRET); die Rückkehr von S_1 in den Grundzustand (S_0) erfolgt unter Emission von Licht durch den Akzeptor. Strahlende Übergänge sind mit farbigen Pfeilen dargestellt, strahlungslose mit gestrichelten, FRET ist durch den blau-grünen Pfeil dargestellt.

Für das Zustandekommen von FRET müssen die FRET-Partner gewisse Voraussetzungen erfüllen. Zum einen muss, um eine Energieübertragung überhaupt zu ermöglichen, das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen (Abb. 2-4). Erfüllt wird dieses Kriterium z. B. von dem Fluorophorenpaar CFP (*cyan fluorescent protein*) und YFP (*yellow fluorescent protein*). Bei den cyan und gelb fluoreszierenden Proteinen handelt es sich um Derivate des GFP (*green fluorescent protein*, grün fluoreszierendes Protein), die über modifizierte Spektraleigenschaften verfügen.

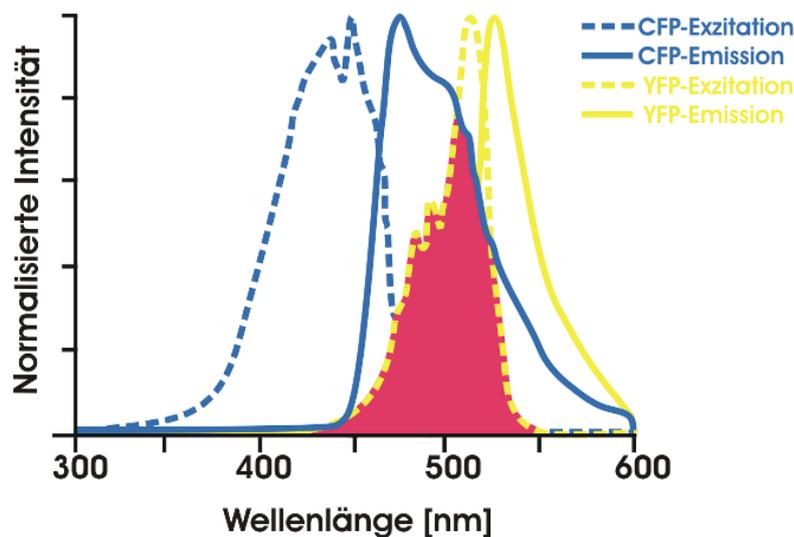


Abb. 2-4 Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Exzitationsspektrum am Beispiel des FRET-Paares CFP / YFP. Normalisierte Exzitations- und Emissionsspektren von CFP (blau) und YFP (gelb). Die Überlappung (rote Fläche) des CFP-Emissionsspektrums (blaue Kurve) mit dem YFP-Exzitationsspektrum (gelbe, gestrichelte Kurve) ist eine wichtige Voraussetzung für FRET.

Neben den überlappenden Spektren, sind zum anderen die große Nähe von Donor und Akzeptor, sowie ihre räumliche Orientierung von grundlegender Bedeutung.

Zwischen zwei, an FRET-Fluorophoren gekoppelten Proteinen, findet FRET nur statt, wenn die beiden Moleküle interagieren und die angehängten Fluorophoren dadurch ebenfalls in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden (Abb. 2-5). Der Abstand zwischen den FRET-Partnern sollte im Bereich unterhalb von ca. 100 Ångström (100 \AA , $< 10 \text{ nm}$) liegen.

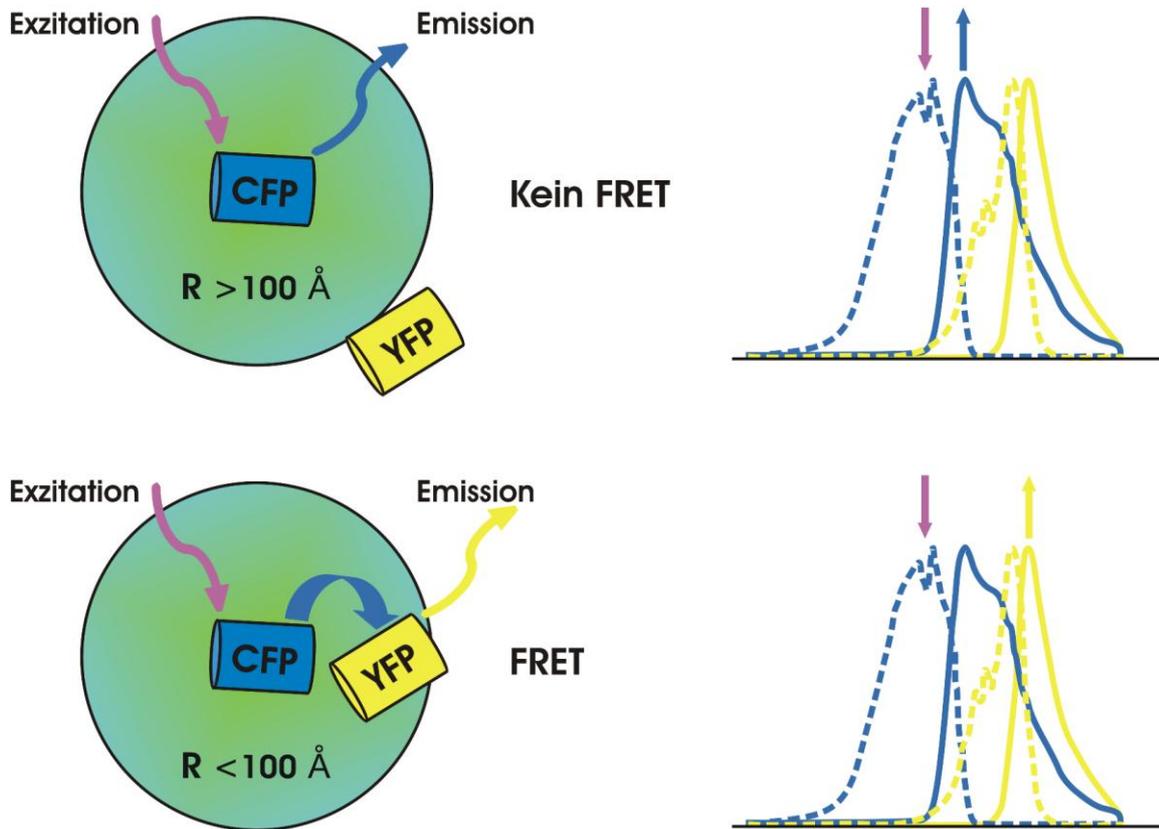


Abb. 2-5 Schematische Darstellung von FRET. FRET findet nur statt, wenn sich die beiden Fluorophoren CFP (FRET-Donor) und YFP (FRET-Akzeptor) in großer räumlicher Nähe zueinander befinden ($R < 100 \text{ \AA}$, unten). Nach Anregung des Donors, kann dann die emittierte Energie, aufgrund der überlappenden Spektren der CFP-Emission und der YFP-Exzitation, strahlungslos auf den Akzeptor übertragen werden. Der angeregte Akzeptor emittiert daraufhin Licht des YFP-Emissionsspektrums (unten). Findet kein Energietransfer statt, entspricht das emittierte Licht dem Wellenlängenbereich der CFP-Emission (oben).

Die Effizienz des Energietransfers ist dabei abhängig vom Energieanteil des Donors, der durch Resonanz auf den Akzeptor übertragen wird. Sie liegt definitionsgemäß zwischen 0 und 1.

Die FRET-Effizienz (E) ist neben dem Abstand (R) der beiden Moleküle auch vom so genannten Förster-Radius (R_0) abhängig. Dieser beschreibt den Abstand der Fluorophoren zueinander, bei dem die Energieübertragung zu 50% erfolgt. Der Förster-Radius variiert je nach verwendeten FRET-Partnern und liegt typischerweise im Bereich von $20 - 80 \text{ \AA}$ (für CFP / YFP 49 \AA).

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$$

Der geringe Abstand, der für den Energietransfer nötig ist, macht FRET zu einem wichtigen Werkzeug der Biochemie, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Auf diese Weise können Interaktionen in lebenden Zellen oder auch mit aufgereinigten Proteinen gezeigt werden. Weitere Anwendungsbeispiele für FRET sind neben Interaktionsstudien die Aufklärung von Signaltransduktionswegen und die Bestimmung von Konformationsänderungen.

2.6.2 Quantifizierung von FRET

Nach spezifischer Anregung des Donors, zeigt sich FRET in einer Reduktion der Emissionsintensität des Donors (*donor quenching*) und einer Erhöhung der Emissionsintensität des Akzeptors (*sensitized emission*) (Abb. 2-6). Diese charakteristischen Veränderungen in den Emissionsintensitäten der FRET-Partner macht man sich für die meisten FRET-Auswertungen zu Nutze. Generell unterscheidet man dabei zwischen destruktiven Messungen und nicht-destruktiven, ratiometrischen Messungen.

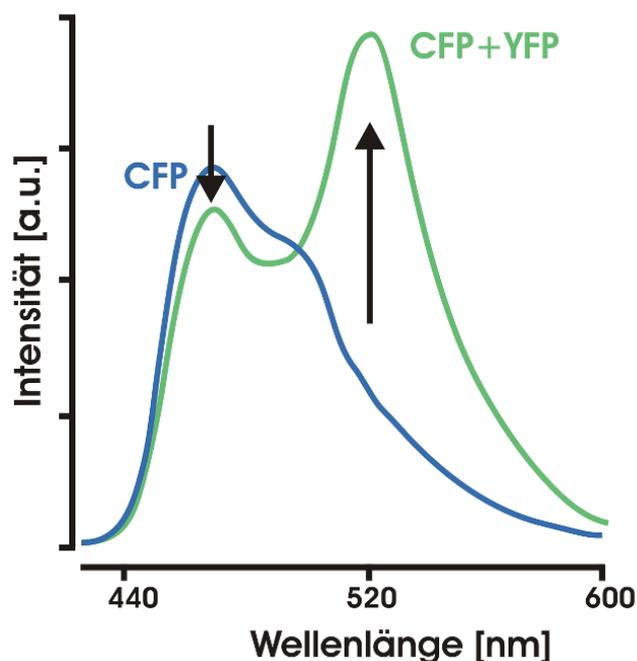


Abb. 2-6 Charakteristische Veränderungen des Emissionsspektrums durch FRET. Emissionsspektrum nach Donor-Anregung (CFP). Die blaue Linie stellt das Emissionsspektrum des Donors in Abwesenheit des Akzeptors dar. Ist ein Akzeptor (YFP) anwesend und findet FRET statt, so führt der Energietransfer zu charakteristischen Änderungen (grüne Linie). Die Emissionsintensität des Donors nimmt ab, die des Akzeptors zu (schwarze Pfeile).

In der vorliegenden Arbeit kamen zwei nicht-destruktive, ratiometrische Messungen zur Anwendung, die die Bestimmung von FRET in lebenden Zellen ermöglichen. Zum einen für die *steady-state*-Messungen die von David Yue etablierte Methode des *Three-Cube-FRET*^{43,61}; zum anderen wurde für die kinetischen Messungen, die relative FRET-Änderung als fraktionale Änderung der Emissionsintensitäten berechnet⁶²⁻⁶³.

Die dabei benutzten Abkürzungen stehen für folgende Messeinstellungen:

S_{FRET}	FRET-Filter:	Donor-Exzitation – Akzeptor-Emission
S_{CFP}	CFP-Filter:	Donor-Exzitation – Donor-Emission
S_{YFP}	YFP-Filter:	Akzeptor-Exzitation – Akzeptor-Emission

Die Buchstaben D und A z. B. in $S_{\text{FRET, DA}}$ sind Abkürzungen für Donor und Akzeptor und geben an, welche Zellen vermessen werden, d. h. ob sie Donor und Akzeptor (FRET-Präparat) oder nur Donor oder Akzeptor (Kalibrierungspräparate) enthalten. $S_{\text{FRET, DA}}$ wäre demnach das FRET-Präparat (Donor und Akzeptor werden exprimiert), das mit dem FRET-Filtersatz vermessen wird.

Beim *Three-Cube-FRET* wird FRET quantifiziert als FRET-Ratio (FR), welches definitionsgemäß den Anteil des Anstiegs der YFP-Emission durch FRET angibt (*sensitized emission*). Die prinzipiellen Grundlagen des *Three-Cube-FRET* können anhand des dargestellten Emissionsspektrums (Abb. 2-7) erklärt werden. Die YFP-Emission, die man bei FRET misst (grüne Kurve, 5), ist nicht nur durch den Energietransfer allein bedingt, sondern enthält zusätzliche, FRET-unabhängige Komponenten, die sich aus den überlappenden Spektren der FRET-Partner ergeben.

Die Komponenten der YFP-Emission (5) im FRET-Präparat nach Donor-Anregung sind (Abb. 2-7):

- (1) FRET
- (2) Donor bleed through
- (3) Acceptor cross excitation

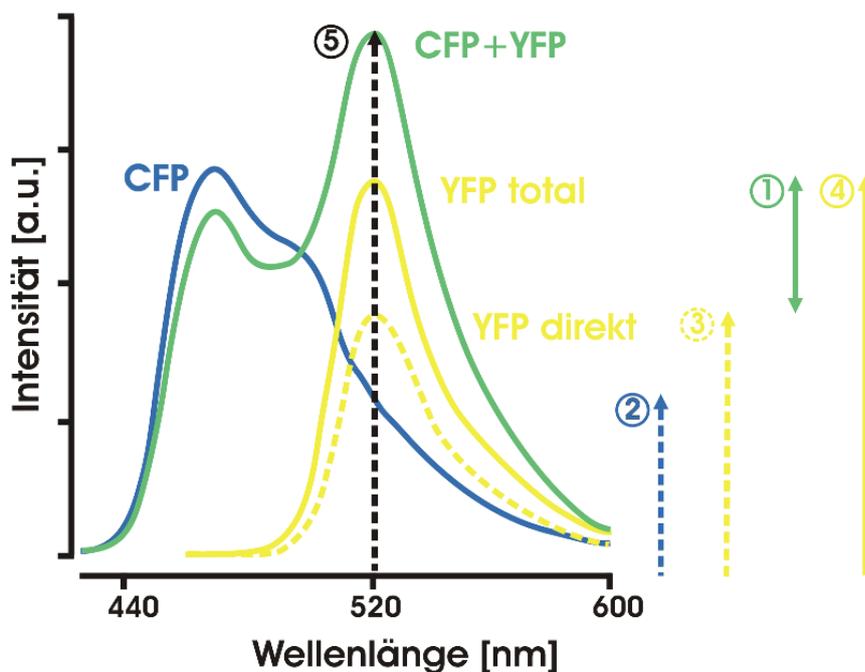


Abb. 2-7 Komponenten der YFP-Emission bei FRET. Emissionsspektrum nach Donor-Anregung (CFP) vgl. Abb. 2-6. Die YFP-Peak-Emission (schwarzer, gestrichelter Pfeil, 5) nach Donor-Anregung ist die Summe verschiedener Komponenten. Der FRET-unabhängige Teil ist gekennzeichnet als YFP direkt (gelbe, gestrichelte Kurve, 3). Die Komponente YFP total (gelbe Kurve, 4) setzt sich aus diesem Anteil und dem spezifisch durch FRET bedingten YFP-Emissionsanstieg zusammen (grüner Pfeil, 1).

Für die Berechnung der einzelnen Komponenten der YFP-Emission benötigt man Fluoreszenz-Messungen von einem:

- FRET-Präparat
- Donor-Kalibrierungspräparat
- Akzeptor-Kalibrierungspräparat

Die Zellen des FRET-Präparats exprimieren CFP- zusammen mit YFP-Fusionspeptiden. Anhand der Kalibrierungspräparate, die entweder CFP- oder YFP-Fusionspeptide alleine exprimieren, werden in einem FRET-freien System Konstanten berechnet, die der Korrektur von *bleed through* und *cross excitation* im FRET-Präparat dienen.

Ein großer Anteil der YFP-Emission in Abb. 2-7 stammt vom *donor bleed through* (2). Der *donor bleed through* ergibt sich durch die CFP-Emission im Wellenlängenbereich der YFP-Peak-Emission, aufgrund der überlappenden Emissionsspektren des Donors und Akzeptors. Um die YFP-Emission um den *donor bleed through* zu korrigieren, bestimmt man zunächst die Konstante R_{D1} mittels dem CFP-Kalibrierungspräparat; R_{D1} gibt den Anteil des *donor bleed through* bei der YFP-Peak-Emission an (Abb. 2-8).

$$R_{D1} = S_{\text{FRET, D}} / S_{\text{CFP, D}}$$

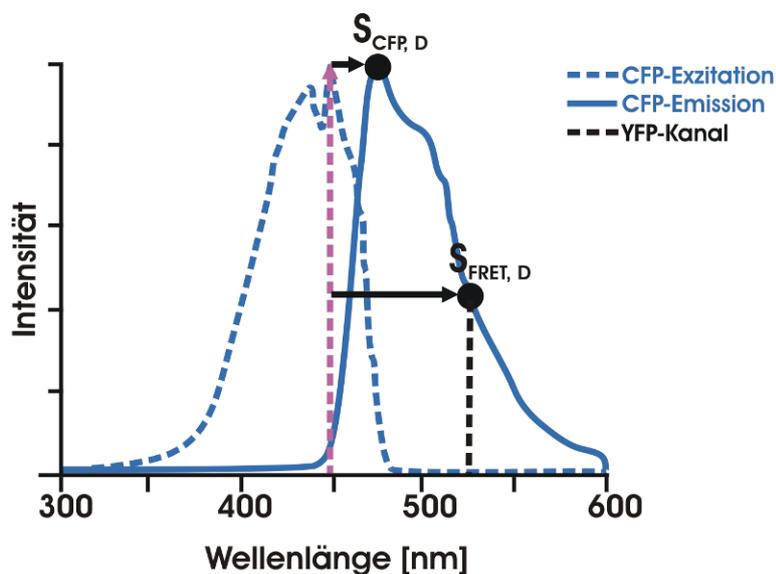


Abb. 2-8 Bestimmung der Konstante R_{D1} zur Korrektur des *donor bleed through*. Exzitations- und Emissionsspektren von CFP (blau). Die Konstante R_{D1} gibt den Anteil des *donor bleed through* an. Die Werte $S_{\text{CFP, D}}$ und $S_{\text{FRET, D}}$ stammen von Zellen, die nur CFP exprimieren (CFP-Kalibrierungspräparat). Nach CFP-Anregung (ilja, gestrichelter Pfeil) wird die Fluoreszenz bei der YFP-Peak-Emission (schwarze, gestrichelte Linie, YFP-Kanal, $S_{\text{FRET, D}}$) im Verhältnis zur CFP-Peak-Emission ($S_{\text{CFP, D}}$) bestimmt (schwarze Pfeile).

Um die durch CFP bedingte YFP-Emission im FRET-Präparat zu berechnen, misst man zunächst die CFP-Peak-Emission nach direkter CFP-Anregung (CFP-Filter, $S_{\text{CFP, DA}}$) und multipliziert diesen Wert mit der Konstante R_{D1} . Subtrahiert man die so erhaltene Emission von der Gesamt-YFP-Emission in der FRET-Probe (Abb. 2.7, 5), so erhält man F_{AD} (Abb. 2.7, YFP total, 4).

$$F_{AD} = (S_{FRET, DA}) - (R_{D1}) (S_{CFP, DA})$$

F_{AD} enthält neben der spezifisch durch FRET bedingten Emission noch eine Komponente, die sich aus der *acceptor cross excitation* (Abb. 2-7, YFP direkt, 3) ergibt.

Die detektierte *acceptor cross excitation* resultiert aus der direkten Anregung der YFP-Fluorophore durch die CFP-Anregung bei der FRET-Messung. Sie ist bedingt durch die teilweise überlappenden Exzitationsspektren der FRET-Partner. Zur Berechnung des Anteils der *acceptor cross excitation* verwendet man das YFP-Kalibrierungspräparat und bestimmt die Konstante R_{A1} (Abb. 2-9).

$$R_{A1} = S_{FRET, A} / S_{YFP, A}$$

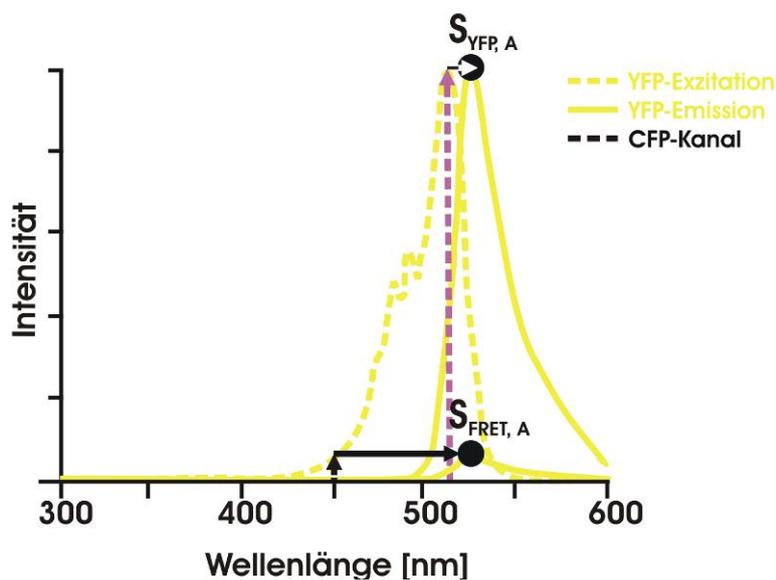


Abb. 2-9 Bestimmung der Konstante R_{A1} zur Korrektur der *acceptor cross excitation*. Exzitations- und Emissionsspektren von YFP (gelb). Die Konstante R_{A1} gibt den Anteil der *acceptor cross excitation* an. Die Werte $S_{FRET, A}$ und $S_{YFP, A}$ stammen von Zellen, die nur YFP exprimieren (YFP-Kalibrierungspräparat). Das Verhältnis der YFP-Emission nach Anregung bei der CFP-Peak-Exzitation (CFP-Kanal, schwarze, gestrichelter Pfeil, $S_{FRET, A}$) zur YFP-Peak-Exzitation (lila, gestrichelter Pfeil, $S_{YFP, A}$) wird bestimmt.

Multipliziert man die Konstante R_{A1} mit der YFP-Emission, die man mit dem YFP-Filter (YFP-Anregung und -Emission) im FRET-Präparat messen kann, so erhält man die um die *acceptor cross excitation* korrigierte YFP-Emission. Bei der Vermessung der FRET-Probe muss bei der Berechnung von YFP direkt (Abb. 2-7, 3) allerdings noch berücksichtigt werden, dass man durch die YFP-Exzitation auch einen sehr kleinen Teil des koexprimierten CFP anregt, der im Anschluss auch im YFP-Emissionskanal mit erfasst wird. Misst man also die YFP-Emission (YFP-Filter), so stammt ein kleiner Teil dieser emittierten Fluoreszenz vom koexprimierten CFP (*donor cross talk*). Dieser *donor cross talk* muss in der YFP-Emission korrigiert werden.

Der Anteil des CFP in der FRET-Probe, der fälschlicherweise durch den YFP-Filter detektiert wird, wird durch die Konstante R_{D2} erfasst (Abb. 2-10).

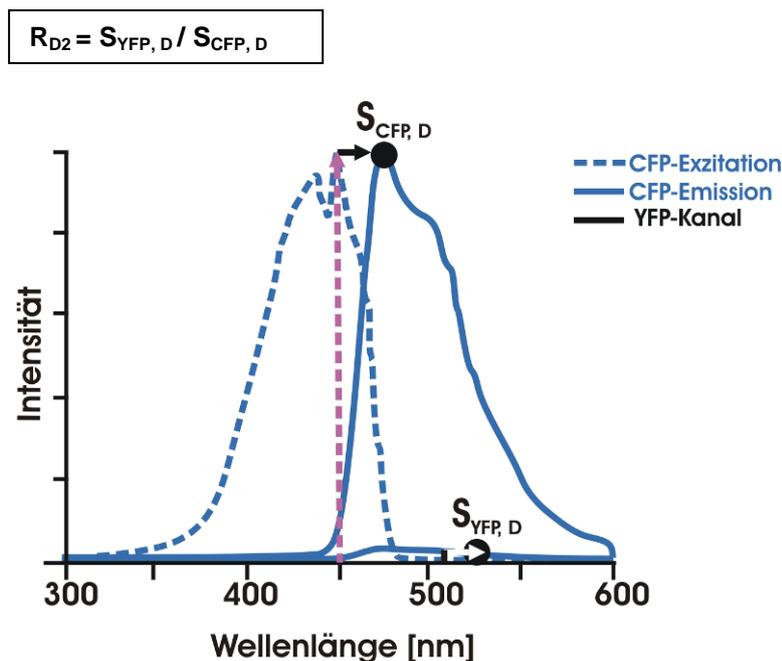


Abb. 2-10 Bestimmung der Konstante R_{D2} zur Korrektur des *donor cross talk*. Exzitations- und Emissionsspektren von CFP (blau). Die Werte $S_{CFP, D}$ und $S_{YFP, D}$ stammen von Zellen, die nur CFP exprimieren (CFP-Kalibrierungspräparat). Über $S_{CFP, D}$ wird die CFP-Emission mit dem CFP-Filter bestimmt, über $S_{YFP, D}$ die Fluoreszenz, die von CFP mit dem YFP-Filter erfasst wird. R_{D2} berechnet sich aus dem Verhältnis $S_{YFP, D}$ zu $S_{CFP, D}$.

Multipliziert man die Konstante R_{D2} mit der CFP-Emission, die man in der FRET-Probe über den CFP-Filter misst (Gesamt-CFP-Menge), erhält man die durch das koexprimierte CFP bedingte YFP-Emission. Subtrahiert man diesen Wert von $S_{YFP, DA}$ (FRET-Probe, YFP-Filter), ist die YFP-Emission um den *donor cross talk* korrigiert. Die anschließende Multiplikation dieser Emission mit R_{A1} liefert F_A (Abb. 2-7, YFP direkt, 4).

$$F_A = (R_{A1}) ((S_{YFP, DA}) - (R_{D2}) (S_{CFP, DA}))$$

F_A gibt somit die um die *acceptor cross excitation* und den *donor cross talk* korrigierte YFP-Emission an. Die berechneten Komponenten F_{AD} und F_A (Abb. 2.7, YFP total und YFP direkt, 4 und 3) unterscheiden sich lediglich durch den durch FRET bedingten Anstieg der YFP-Emission in F_{AD} (Abb. 2-7, 1). Demnach berechnet sich das FR, das laut Definition den fraktionellen Anstieg der YFP-Emission durch FRET darstellt, aus dem Quotient F_{AD} / F_A .

$$FR = F_{AD} / F_A = [S_{FRET, DA} - (R_{D1}) (S_{CFP, DA}) / (R_{A1}) ((S_{YFP, DA}) - (R_{D2}) (S_{CFP, DA}))]$$

$FR > 1 \rightarrow$ FRET

$FR = 1 \rightarrow$ Kein FRET

Das FR wurde in dieser Arbeit bei *steady-state*-FRET-Messungen berechnet.

Für kinetische Messungen, in denen FRET durch einen Stimulus induziert werden kann, ist es möglich, die relative FRET-Änderung als fraktionelle Änderung ($\Delta R / R_0$) der Emissionsintensitäten darzustellen⁶²⁻⁶³. Betrachtet man das Emissions-Verhältnis Akzeptor ($S_{\text{FRET, DA}}$) zu Donor ($S_{\text{CFP, DA}}$) nach Donor-Anregung so zeigt sich FRET gemäß dem oben dargestellten Sachverhalt in einem Anstieg dieses Ratios (Abb. 2-6).

$$R = S_{\text{FRET, DA}} / S_{\text{CFP, DA}}$$

Als Stimulus kann z. B. Calcium bei Calciumsensoren dienen oder ganz einfach die Zugabe des FRET-Akzeptors zu einer Donor-Proteinlösung. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der intrazellulären Calcium-Konzentration auf das FRET-Signal zwischen Calciumkanal und Calmodulin bzw. zwischen verschiedenen Kanalfragmenten untersucht. Da die kinetischen Messungen, abgesehen von der Stimulusgabe, unter exakt den gleichen Bedingungen stattfinden, müssen Gerätekonstanten oder andere Einflussgrößen, die sich z. B. durch die Fluoreszenzspektren der FRET-Partner ergeben (*bleed through*, *cross excitation*, *cross talk*), nicht berücksichtigt werden. Eine aufwendige Kalibrierung des Systems wie im Falle des *Three-Cube*-FRET ist nicht nötig.

Daneben existieren noch eine Reihe destruktiver Möglichkeiten, FRET zu quantifizieren. Eine Methode ist das *acceptor photobleaching*. Beim *acceptor photobleaching* bestimmt man die Donor-Emission vor und nach selektivem Ausbleichen des Akzeptors. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch die Zerstörung des Akzeptors in ein und demselben Versuchsaufbau die CFP-Emission zunächst unter Bedingungen, die einen Energietransfer erlauben und im Anschluss unter Bedingungen, die FRET ausschließen (*donor dequenching*), gemessen werden kann. Die FRET-Effizienz wird dabei aus den relativen Fluoreszenzintensitäten des Donors, in Abwesenheit ($S_{\text{CFP, D}}$) und Anwesenheit ($S_{\text{CFP, DA}}$) des Akzeptors berechnet.

$$E = 1 - S_{\text{CFP, DA}} / S_{\text{CFP, D}}$$

Ein Nachteil des *acceptor photobleaching* liegt darin, dass eine vollständige Akzeptor-Zerstörung ohne Beeinflussung des Donors oft schwierig ist. Eine Reduktion der Donor-Konzentration durch *donor bleaching* resultiert dann in einer fälschlicherweise herabgesetzten FRET-Effizienz. Ein weiterer Nachteil ist die teilweise sehr lange *bleaching*-Zeit. Aus diesen Gründen wurde das *acceptor photobleaching* in dieser Arbeit nicht verwendet.

Eine andere Möglichkeit, die Effizienz des Energie-Transfers im Sinne des *acceptor photobleachings* zu bestimmen, besteht in der Behandlung einer aufgereinigten CFP-YFP-Proteinlösung mit der Protease Trypsin. Die Endopeptidase spaltet Peptidbindungen selektiv nach den Aminosäuren Lysin, Arginin und auch nach modifiziertem Cystein. Die Fluorophoren CFP und YFP werden aufgrund ihrer Proteinstruktur nicht zersetzt. Durch Messen der Emissionsintensitäten einer CFP-YFP-Proteinlösung vor und nach Trypsin-Behandlung, also unter Bedingungen, die FRET zunächst ermöglichen und dann verhindern, kann somit ebenfalls eine Aussage zur FRET-Effizienz getroffen werden.

2.6.3 Experimentelle Durchführung

Für die FRET-Messungen wurden HEK293-Zellen auf ibiTreat Trägern ausgesät und wie oben beschrieben transfiziert (2.3.2, 2.4). Die Menge der Plasmid-DNA richtete sich nach der Expressionsstärke der einzelnen Konstrukte (0,01 - 1,5 µg / dish). Ungefähr 24 - 36 h nach Transfektion erfolgten die FRET-Messungen bei Raumtemperatur.

Die verwendete Badlösung hatte folgende Zusammensetzung:

FRET-Badlösung

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mM
Glucose x 1 H ₂ O	10 mM
Na-HEPES	10 mM

mit NaOH pH 7,4 einstellen

Die Messungen wurden an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop mit einem photometrischen System zur dualen Emissionsaufnahme (iMIC 2010, Till Photonics) durchgeführt. Für die *steady-state*-Messungen wurde ein 60x Objektiv (UPlanSApo, OL / 1,35, Olympus) benutzt. Der verwendete Multiband-FRET-Filtersatz (CFP / YFP-A-000, Semrock) umfasste einen Dualband-Exzitations-Filter (Exzitationsbänder 416 ± 12,5 nm und 501 ± 9 nm) und -Emissions-Filter (Emissionsbänder 464 ± 11,5 nm und 547 ± 15,5 nm), sowie einen dichroiden Beamsplitter (Reflektionsbänder 423,5 ± 8,5 nm und 502 ± 9 nm, Transmissionsbänder 466 ± 17 nm und 549,5 ± 19,5 nm). Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit einem Polychrom 5000 (Till Photonics, Anregungswellenlänge ± 7,5 nm). Die Belichtungszeit betrug, soweit nicht anders vermerkt, 10 ms. Für die Bildakquise wurde eine CCD-Kamera (IMAGO-QE, Till Photonics) nebst DSP-Kontroller verwendet. Für die Bildaufnahme und -auswertung diente die TILLvisiON 4.0 Software.

2.6.4 Datenanalyse

Die Auswertung der FRET-Daten bei den *steady-state*-Messungen erfolgte nach der Methode des *Three-Cube*-FRET (2.6.2). Für die Datenanalyse wurde dabei generell folgendermaßen vorgegangen: Nach CFP- und YFP-Anregung und Aufnahme der entsprechenden Emissionsbilder wurden für die Bildverarbeitung relevante Bereiche (*regions of interest*, ROIs) im Zytoplasma der Zellen markiert. Zusätzlich für jeden einzelnen Kanal (CFP, YFP) wurde die Autofluoreszenz bestimmt und als Hintergrundwert von den entsprechenden ROIs abgezogen. Im Anschluss wurde das FR, wie bereits beschrieben berechnet.

$$FR = F_{AD} / F_A = [S_{FRET, DA} - (R_{D1}) (S_{CFP, DA}) / (R_{A1}) ((S_{YFP, DA}) - (R_{D2}) (S_{CFP, DA}))]$$

Alle Ergebniswerte wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm SEM angegeben; n steht für die Anzahl der Experimente. Zur statistischen Auswertung siehe 2.5.3.

2.6.5 Konstrukte

Für alle FRET-Konstrukte wurden, um eine Homo- und Heterodimerisierung der Proteine zu vermeiden, monomere Varianten der Fluorophoren ECFP und EYFP, im Folgenden der Einfachheit halber als CFP und YFP bezeichnet, verwendet⁶⁴⁻⁶⁵. Zur Generierung der monomeren GFPs wurde über die Quikchange-PCR (2.2.4.3) eine Mutation eingefügt, die den Austausch der Aminosäure Alanin zu Lysin an Position 206 (A206K) zur Folge hatte.

Als Klonierungsvektor für alle FRET-Konstrukte diente, sofern nicht anders angegeben, der pcDNA3. Sämtliche Konstrukte, die sich vom Cav1.4 C-Terminus ableiten, wurden über BamH I / Xho I Schnittstellen kloniert und enthielten entweder N-terminal YFP und / oder C-terminal CFP, außerdem die Kozak-Sequenz GCC GCC ACC ATG, sowie am 3'-Ende direkt vor der eingefügten Xho I-Schnittstelle ein Stopcodon. Zwischen der Fluorophore und dem Kanalfragment wurde in allen Fällen ein Alanin-Linker (AAA) eingefügt.

Für intramolekulare FRET-Experimente wurden Fragmente des C-Terminus des Cav1.4 N-terminal an YFP und C-terminal an CFP fusioniert. Die folgenden Konstrukte wurden verwendet: YFP-CT1.4-CFP stellt den kompletten C-Terminus des Cav1.4 (D1445 - L1984), flankiert von den beiden FRET-Fluorophoren, dar. Die dazu analogen Konstrukte YFP-CT1.4 Δ 1493-1609-CFP und YFP-CT1.4 Δ 1445-1609-CFP beinhalten die Deletionen Q1493 - G1609 bzw. D1445 - G1609.

Für intermolekulare FRET-Experimente zur Aufklärung der ICDI-Interaktion wurden Fragmente des C-Terminus des Cav1.4 N-terminal mit YFP getagged. Verwendet wurde der komplette C-Terminus des Cav1.4, YFP-CT1.4 (D1445 - L1984), sowie drei trunkierte Varianten: YFP-CT1.4 Δ ICDI (D1445 - T1883), YFP-CT1.4R1610Stop (D1445 - G1609) und YFP-EF (D1445 - I1492). Konstrukte, die sich von der ICDI-Domäne ableiten, wurden C-terminal an CFP fusioniert. Die Bezeichnungen der verwendeten Konstrukte samt Sequenzbereich sind im Folgenden aufgeführt: ICDI-CFP umfasst die komplette ICDI-Domäne (L1885 - L1984), die Konstrukte proxICDI-CFP (L1885 - K1929), midICDI-CFP (Q1930-A1952) und distICDI-CFP (Q1953-L1984) den proximalen, mittleren und distalen Bereich der ICDI-Domäne; L-ICDI-CFP (I1742 - L1984) und XL-ICDI-CFP (R1610 - L1984) sind zwei Konstrukte, bei denen die ICDI-Domäne in 5'-Richtung verlängert wurde.

Für FRET-Experimente zur CaM-Interaktion wurden die folgenden Kanalkonstrukte verwendet: YFP-CT1.4 (D1445 - L1984), YFP-CT1.4 Δ ICDI (D1445 - T1883) sowie als Positivkontrolle der komplette, N-terminal an YFP fusionierte, C-Terminus des Cav1.2 (YFP-CT1.2, D1500 - L2166). In den Calmodulin-Konstrukten wurde CFP N-terminal an CaM fusioniert. Bei den Klonierungsschnittstellen handelte es sich um BamH I und Xba I. Im Konstrukt CFP-wtCaM befindet sich zwischen CFP und Calmodulin ein Linker mit drei Alaninen. Das Konstrukt CFP227-CaM beinhaltet eine nach der Aminosäure A227 trunkierte CFP-Variante, die über den Linker CGC an CaM fusioniert wurde. Die Expression dieser beiden Calmodulin-Varianten wurde, zur Vermeidung von unspezifischem FRET, durch Veränderung der Kozak-Sequenz von GCC GCC ACC ATG zu GCC TCC TTT ATG reduziert^{43,61}.

Die Konstrukte CFPcp174 und CFPcp158 wurden, wie bei Mank et al. (2006) beschrieben, kloniert⁶⁶. Dabei wurden die ursprünglichen N- und C-Termini des Wildtyp CFP durch den Linker GGTGGS verbunden und, wie in Fig. 3-1 B dargestellt, neue N- und C-Termini eingefügt. Eine durch Mutationen in allen vier EF-Hand-Motiven bedingte Ca^{2+} -insensitive CaM-Variante³⁵ (CaM₁₂₃₄) wurde über einen Triple-Alanin-Linker an CFP-wt bzw. ohne Linker an CFPcp174 fusioniert.

Als Negativkontrollen wurden die Vektoren pECFP A206K und pEYFP A206K zur Expression monomerer Fluorophoren eingesetzt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Klonierung der aufgeführten FRET-Konstrukte sind im Anhang zusammengestellt.

2.7 Kinetische FRET-Messungen

2.7.1 Experimentelle Durchführung

Die kinetischen FRET-Messungen erfolgten am oben beschriebenen Setup (2.6.3). Was die experimentelle Durchführung betrifft, wurden im Vergleich zu den *steady-state*-Messungen (2.6.4) lediglich folgende Parameter verändert: es wurde ein 20x Objektiv (UPlanSApo, N.A. 0,75, Olympus) für die Datenaufnahme verwendet, außerdem wurde die Belichtungszeit auf 100 ms erhöht.

2.7.2 Protokoll

Zu Anfang der Messung befanden sich die Zellen in der Standard-Badlösung (2.6.3), 10 s nach Start der Aufnahme erfolgte die Perfusion mit 5 μM Ionomycin-Lösung, nach weiteren 20 s wurde auf eine 5 mM EGTA-Lösung (0 mM Ca^{2+} , 5 μM Ionomycin) umgestellt. Die Aufnahmegeschwindigkeit bei insgesamt 80 Bildern betrug 1 Bild / sec.

5 μM Ionomycin-Lösung, pH 7,4

5 μM Ionomycin (Calbiochem[®], 1 mM Stammlösung gelöst in DMSO)
in FRET-Badlösung

5 mM EGTA-Lösung

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
Glucose x 1 H ₂ O	10 mM
Na-HEPES	10 mM
Ionomycin	5 μM
EGTA	5 mM

mit NaOH pH 7,4 einstellen

2.7.3 Datenanalyse

Für die Datenanalyse der kinetischen FRET-Messungen wurde die FRET-Änderung als fraktionelle Änderung ($\Delta R / R_0$) der CFP- / YFP-Emissionsintensitäten dargestellt (2.6.2)⁶²⁻⁶³. Das Ratio R ist dabei folgendermaßen definiert:

$$R = S_{\text{FRET, DA}} / S_{\text{CFP, DA}}$$

Als Ausgangswert (*baseline ratio*, R_0) wurde der Quotient R_0 als Durchschnitt der ersten 10 sec vor Stimulusgabe berechnet.

2.7.4 Konstrukte

Für die kinetischen FRET-Messungen wurden die bereits unter 2.6.5 beschriebenen Konstrukte verwendet. Explizit waren dies für den CaM-Assay: YFP-CT1.4, YFP-CT1.2, CFP-wtCaM, CFP227-CaM, CFPcp174-CaM, CFPcp174-CaM₁₂₃₄ und CFP-wtCaM₁₂₃₄. Für den ICDI-Assay: YFP-CT14 Δ ICDI und ICDI-CFP, sowie für die CaM-Überexpression Wildtyp CaM und Flag-CaM₁₂₃₄ (2.4.5), beide im Vektor pcDNA3.

3 ERGEBNISSE

3.1 Calmodulin-Bindung am Calciumkanal Cav1.4

3.1.1 FRET-Messungen: Aufklärung der CaM-Interaktion mittels verschiedener CFP-Varianten

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war es, aufzuklären, wie im Cav1.4 die Calcium-abhängige Inaktivierung abgeschaltet wird. Eine mögliche Erklärung könnte die fehlende Calmodulin-Bindung sein⁵⁴. Um die CaM-Bindung am Kanal zu untersuchen, habe ich den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer nach David Yue (*Three-Cube-FRET*, 2.6.2) in unserem Arbeitskreis etabliert. Da die räumliche Orientierung der FRET-Fluorophoren das FRET-Signal entscheidend beeinflusst, wurden FRET-Experimente mit verschiedenen modifizierten CFP-Varianten durchgeführt (2.6.5). Der FRET-Donor CFP wurde in allen Fällen N-terminal an Calmodulin fusioniert. Für die verschiedenen CFP-Varianten entstanden so Fusionsproteine mit unterschiedlicher geometrischer Ausrichtung der Fluorophore (Abb. 3-1). Verwendet wurde CFP in seiner Wildtypform (CFP-wtCaM), daneben eine trunkierte Variante des Original-CFP (CFP227-CaM) und zwei *circular permuted* CFPs (CFPcp158-CaM und CFPcp174-CaM)⁶⁶. In zirkulären Permutationen werden die ursprünglichen N- und C-Termini über einen kurzen Linker verknüpft und neue C- und N-Termini eingefügt. Dadurch entstehen funktionelle Fluorophoren mit derselben dreidimensionalen Struktur wie das Original-Protein, aber mit unterschiedlicher geometrischer Ausrichtung zum fusionierten Protein, in unserem Fall Calmodulin⁶⁷⁻⁶⁹.

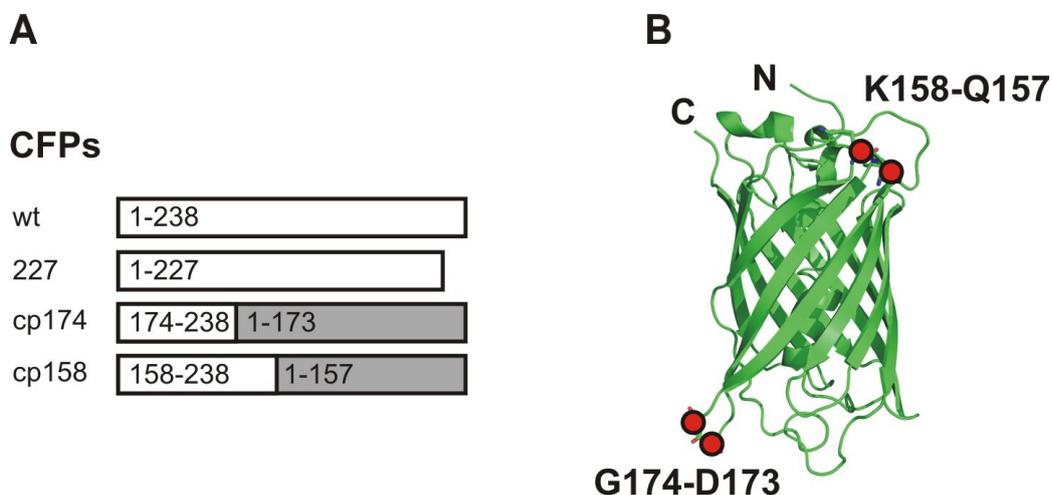


Abb. 3-1 Schematische Darstellung der CFP-Varianten. **A** Das Original-CFP (wt) weist 238 Aminosäuren auf. Im CFP-wt-Konstrukt ist die Fluorophore über einen flexiblen Alanin-Linker an CaM fusioniert (CFP-wtCaM), in der CFP227-Variante wurden die letzten elf Aminosäuren der Fluorophore deletiert. Für die cp-CFP-Konstrukte (cp174 und cp158) wurden die ursprünglichen C- und N-Termini des CFP über den Linker GGTGGS verknüpft und an den angegebenen Stellen neue C- und N-Termini eingefügt. **B** Kristallstruktur des GFP. Die Chromophore befindet sich im Zentrum der β -Can-Struktur. Gekennzeichnet sind die C- und N-Termini der Wildtypform, sowie die Positionen der neuen C- und N-Termini der mutierten Varianten (cp).

Für die FRET-Messungen wurden die verschiedenen CFP-CaMs mit dem an YFP fusionierten C-Terminus des Cav1.4 bzw. einer vor der ICDI trunkierten Variante (YFP-CT14ΔICDI) in HEK293-Zellen koexprimiert. Als Positivkontrolle diente die Koexpression mit dem C-Terminus des Cav1.2, bei dem FRET bereits gezeigt wurde^{43,61}, als Negativkontrolle die Koexpression mit reinem monomeren YFP (Abb. 3-2).

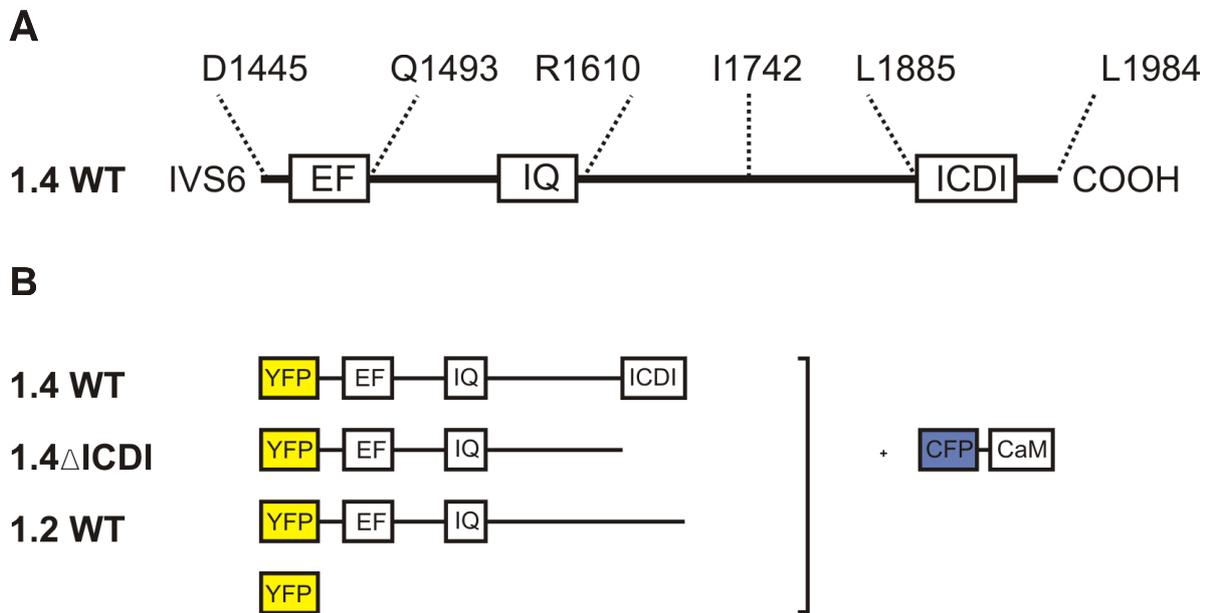


Abb. 3-2 Konstrukte für den CaM-Bindungsassay **A** Schematische Darstellung des Cav1.4 C-Terminus, beginnend mit dem IVS6-Segment. **B** Schema der Koexpression zur Aufklärung der CaM-Bindung mittels FRET. C-terminale Kanalfragmente wurden N-terminal mit YFP getagged. Die verwendeten CFP-Varianten, die N-terminal an CaM fusioniert wurden, sind in Abb. 3-1 dargestellt. Als Negativkontrolle diente monomeres YFP.

Im Konstrukt CFP-wtCaM wurde CFP in seiner Wildtypform über einen Linker mit Calmodulin verbunden. Die drei Alanine, die zwischen Fluorophore und dem CaM eingefügt wurden, sollten dem Fusionsprotein Flexibilität verleihen^{43,52}. Für den C-Terminus des Cav1.2 konnte für diese CFP-CaM-Variante ein signifikantes FRET-Signal ($FR = 1,66 \pm 0,12$, $n = 20$) beobachtet werden, das gut mit den aus der Literatur bekannten Daten übereinstimmt^{43,61}. Im Gegensatz dazu ergab die Auswertung für den C-Terminus des Cav1.4 kein FRET ($FR = 1,08 \pm 0,12$, $n = 8$).

Als nächstes wurde die trunkierte Variante des CFP verwendet (CFP227-CaM), bei der durch Deletion der letzten elf Aminosäuren der Abstand zwischen CaM und der eigentlichen Chromophore in der Mitte des CFP-Proteins verkürzt wurde. Zwischen CFP227-CaM und YFP-CT1.2 konnte auch in diesem Fall FRET ($FR = 1,79 \pm 0,08$, $n = 74$) detektiert werden. Im Einklang mit bereits veröffentlichten Werten, zeigte auch der um die ICDI verkürzte C-Terminus des Cav1.4 (YFP-CT14ΔICDI) FRET ($FR = 1,43 \pm 0,08$, $n = 64$)⁵⁴. Für den kompletten C-Terminus konnte ebenso ein kleines, allerdings nicht signifikantes, FRET-Signal ($FR = 1,16 \pm 0,05$, $n = 120$) ermittelt werden.

Um die räumliche Orientierung der Fluorophoren weiter zu verbessern, wurden im nächsten Schritt die *circular permuted* CFPs (CFPcp158-CaM und CFPcp174-CaM) eingesetzt⁶⁶. Die Ergebnisse für den C-Terminus des Cav1.2 und der trunkierten Form des Cav1.4 konnten auch mit diesen CFP-Varianten reproduziert werden.

Zudem konnte auch zwischen CFPcp174-CaM und YFP-CT1.4 ein signifikantes FRET-Signal (FR = $1,39 \pm 0,07$, n = 32) nachgewiesen werden. Der Wert war dabei signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle und lag in der Größenordnung für bereits berichtete FRET-Ratios zwischen CaM und anderen Cav-Kanälen^{43,61} (Abb. 3-3).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Calmodulin tatsächlich am Cav1.4 gebunden ist, womöglich allerdings in der Gegenwart der ICDI in einer veränderten geometrischen Orientierung, die FRET erschwert.

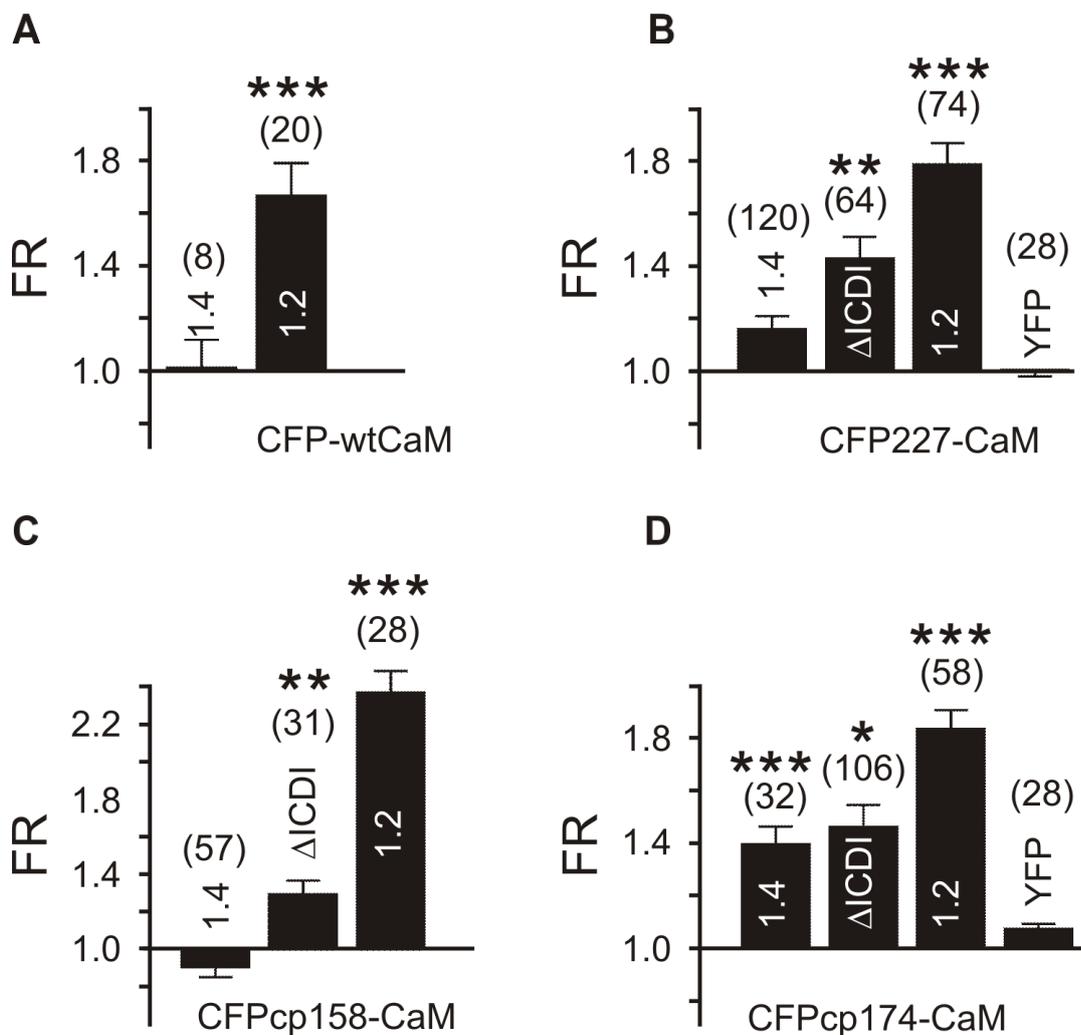


Abb. 3-3 FRET-Messungen zur CaM-Bindung am C-Terminus des Cav1.2 und Cav1.4. A-D Ergebnisse der FRET-Messungen mit CFP-wtCaM (A), CFP227-CaM (B), CFPcp158-CaM (C) und CFPcp174-CaM (D). Eine Bindung zwischen CaM und CT1.2 sowie CT1.4 Δ ICDI kann unabhängig von der verwendeten CFP-Variante nachgewiesen werden (A-D). CaM-Bindung an den C-Terminus des Cav1.4 kann nur bei Verwendung von CFPcp174-CaM gezeigt werden (D). FR: FRET Ratio; Nummern in Klammern stehen für die Anzahl der Zellen; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Signifikanz getestet gegen die entsprechenden Negativkontrollen.

3.1.2 FRET-Messungen: Apo-CaM-Bindung am Cav1.4

Um aufzuklären, ob die Interaktion zwischen CaM und dem C-Terminus des Cav1.4 unabhängig von Calcium und einer damit verbundenen Calcium-Aktivierung von Calmodulin ist, wurden als nächstes FRET-Messungen mit einer Calcium-insensitiven CaM-Variante (CaM₁₂₃₄) durchgeführt. Im CaM₁₂₃₄ sind in allen vier Calcium-bindenden EF-Hand-Motiven Aspartat-zu-Alanin-Mutationen eingefügt, wodurch die Bindung von Calcium verhindert wird. CaM₁₂₃₄ diente damit als Calcium-freies Calmodulin (Apocalmodulin, ApoCaM). Von ApoCaM weiß man, dass es mit den C-Termini anderer HVA-Kanäle z. B. dem des Cav1.2 präassoziiert ist^{43,52}; die Präassoziation von CaM ist damit unabhängig von Calcium.

FRET-Experimente zwischen dem C-Terminus des Cav1.4 und der Calcium-insensitiven CaM-Variante CFPcp174-CaM₁₂₃₄ bestätigen diese Calcium-unabhängige Präassoziation auch für den retinalen Calciumkanal. Das FR war dabei vergleichbar mit dem der Calcium-bindenden Form des Calmodulins (FR = 1,34 ± 0,06, n = 30, Abb. 3-4).

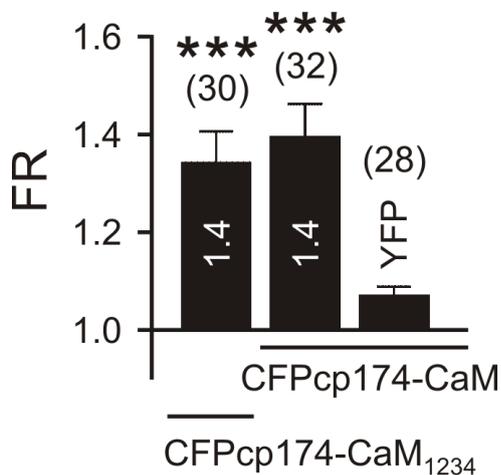


Abb. 3-4 FRET-Messungen zur Apo-CaM-Bindung am C-Terminus des Cav1.4. Ergebnis der FRET-Messung mit CFPcp174-CaM₁₂₃₄ und YFP-CT1.4. Eine Bindung zwischen CaM und dem C-Terminus des Cav1.4 kann unabhängig von der Calcium-Bindung an Calmodulin detektiert werden. Das FR für ApoCaM und CaM ist vergleichbar. FR: FRET Ratio; Nummern in Klammern stehen für die Anzahl der Zellen; *** p < 0,001, Signifikanz getestet gegen die Negativkontrolle (CFPcp174-CaM und YFP).

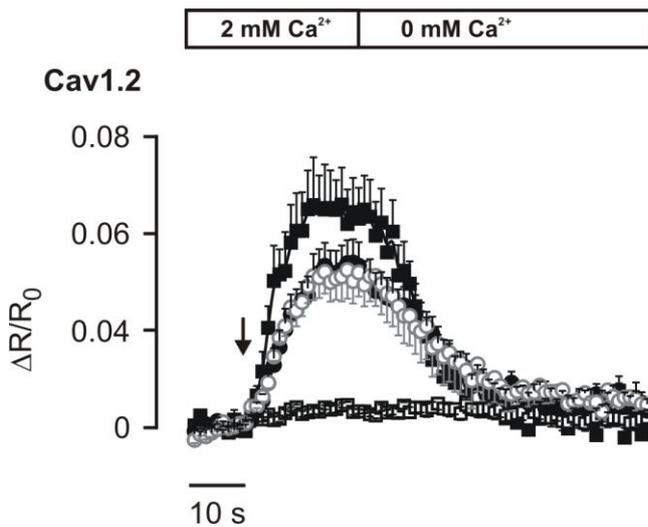
3.1.3 Kinetische FRET-Messungen: Einfluss von Calcium auf die Calmodulin-Bindung

Um den Einfluss von Calcium auf eine Calcium-abhängige Konformationsänderung von gebundenem Calmodulin zu untersuchen, wurden kinetische FRET-Messungen in der Gegenwart von Ionomycin durchgeführt und die zeitliche Änderung des FRET-Ratios ($\Delta R / R_0$) bestimmt (2.7)⁶²⁻⁶³. Ionomycin ist ein Ionophor, das Calciumionen im Verhältnis 1:1 komplexiert, und durch biologische Membranen transportiert; auf diese Weise erhöht es die intrazelluläre Calcium-Konzentration. Die Applikation der Ionomycin-Lösung erfolgte zunächst in Calcium-haltiger (2 mM), dann in nominal Calcium-freier Lösung (5 mM EGTA-Lösung).

Durchgeführt wurden diese kinetischen FRET-Messungen für den C-Terminus des Cav1.2 und des Cav1.4 mit insgesamt drei CaM-Varianten, der Wildtypform (CFP-wtCaM), der trunkierten Form (CFP227-CaM) und der zirkulären Permutation, bei der die CaM-Bindung über FRET für den Cav1.4 C-Terminus nachgewiesen werden konnte (CFPcp174-CaM, Abb. 3-3).

Eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führte sowohl im Falle des Cav1.2 als auch des Cav1.4 C-Terminus bei allen verwendeten CaM-Varianten zu einem signifikanten Anstieg des FRET-Ratios (Abb. 3-5). Entzog man dem System Calcium, durch die Perfusion einer 5 mM EGTA-Lösung, war der Effekt reversibel.

A



B

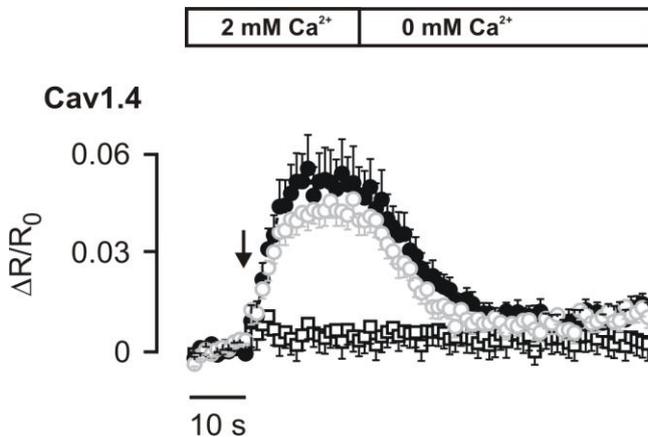


Abb. 3-5 Der Anstieg der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ erhöht das FRET-Ratio der CaM-Bindung für den Cav1.2 und Cav1.4 C-Terminus. Zeitverlauf der Änderung des FRET-Ratios ($\Delta R / R_0$) für die mit YFP gelabelten C-Termini des Cav1.2 (A) und des Cav1.4 (B). Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Beginn der Ionomycin-Applikation, 10 sec nach Start der Messung, zunächst in Anwesenheit von Calcium (2 mM), nach weiteren 20 sec in nominaler Abwesenheit von Calcium (Perfusion einer 5 mM EGTA-Lösung). **A** YFP-CT1.2 koexprimiert mit CFPcp174-CaM (schwarze Kreise, n = 15), CFP227-CaM (weiße Kreise, n = 4), CFP-wtCaM (schwarze Quadrate, n = 8) oder CFP-CaM₁₂₃₄ (weiße Vierecke, n = 6) als Negativkontrolle. **B** YFP-CT1.4 koexprimiert mit CFPcp174-CaM (schwarze Kreise, n = 12), CFP227-CaM (weiße Kreise, n = 14) oder CFPcp174-CaM₁₂₃₄ (weiße Vierecke, n = 25) als Negativkontrolle.

Bei der Koexpression einer Calcium-insensitiven CFP-CaM-Mutante (CaM₁₂₃₄)³⁵ als Negativkontrolle konnten keine Calcium-abhängigen Änderungen des FRET-Signals beobachtet werden. Für den Cav1.2 (Abb. 3-5 A) wurde als Negativkontrolle CFP-wtCaM₁₂₃₄ verwendet, da für die vergleichbare Calcium-bindende CaM-Variante (CFP-wtCaM) ein *steady-state*-FRET-Signal in den vorausgegangen Experimenten (Abb. 3-3 A) detektiert werden konnte. Zudem konnte bei der Koexpression von CFP-wtCaM und YFP-CT1.2 bei der Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ein signifikanter Anstieg des FRET-Signals beobachtet werden, was die Verwendbarkeit der entsprechenden Negativkontrolle unterstreicht. Für den C-Terminus des Cav1.4 wurde CFPcp174-CaM₁₂₃₄ als Negativkontrolle verwendet (Abb. 3-5 B). Eine *steady-state*-Bindung für dieses Konstrukt wurde ebenfalls bereits gezeigt (Abb. 3-4).

Die Änderungen des FRET-Ratios in Abhängigkeit von der intrazellulären Calcium-Konzentration deuten darauf hin, dass es in der Gegenwart von Calcium zu einer Konformationsänderung in der CaM-Bindung kommt, die FRET begünstigt.

3.1.4 Charakterisierung einer CaM-defizienten Variante des Cav1.4

3.1.4.1 Co-Immunpräzitations-Experimente zum Nachweis der fehlenden CaM-Bindung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Calmodulin am Cav1.4 gebunden ist. In dem Wissen, dass der retinale Calciumkanal keine CDI zeigt, stellt sich die Frage, welche Bedeutung Calmodulin in der Regulation des Cav1.4 spielt. Um diese Frage zu beantworten, haben wir eine Mutante des Cav1.4 kloniert, die keine CaM-Bindung zeigt (Cav1.4/5A) und diese elektrophysiologisch untersucht.

In der Kristallstruktur des CaM / Cav1.2 IQ-Komplexes nehmen vier Aminosäuren des, mit dem retinalen Kanal, nahe verwandten kardialen Calciumkanals eine wesentliche Rolle in der CaM-Bindung ein. Zwei der angesprochenen Aminosäuren sind das IQ selbst, zwei weitere sind hoch konservierte aromatische Anker⁵⁶⁻⁵⁷. Um die Bindung von CaM am C-Terminus zu verhindern, wurde der Bereich, der diese Aminosäuren umfasst, zu Alaninen mutiert (5A, Abb. 3-6).

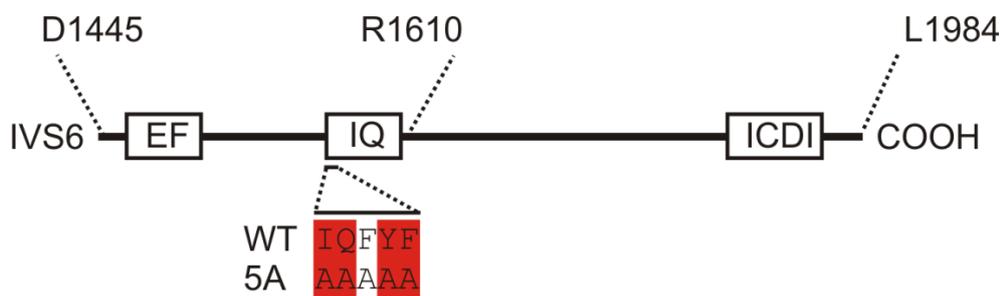


Abb. 3-6 Schematische Darstellung der CaM-defizienten Variante des Cav1.4. Cav1.4 C-Terminus, beginnend mit dem IVS6-Segment. Hoch konservierte Aminosäuren für die CaM-Bindung im Cav1.2 sind rot hervorgehoben. Fünf Aminosäuren des Cav1.4 Wildtyps (WT) wurden zu Alaninen mutiert (5A), um die CaM-Bindung im Cav1.4 zu verhindern.

Zum Nachweis der fehlenden CaM-Bindung *in vitro*, wurden Co-Immunpräzitationen durchgeführt (2.4.2). Dazu wurde der komplette C-Terminus des Cav1.4, der die 5A Mutationen enthielt bzw. eine nach dem IQ-Motiv trunkierte WT- oder 5A-Variante an das Myc-Epitop fusioniert. HEK293-Zellen wurden mit jeweils einem der aufgeführten C-terminalen Fragmente zusammen mit CaM₁₂₃₄, welches N-terminal einen Flag-Tag (*triple flag*) enthielt, transfiziert (2.3.3, 2.4.5). Für die Präzitation der Proteinlysate mit Protein-A-Sepharose konnte ein kommerziell erhältlicher anti-Myc-Antikörper verwendet werden, als Negativkontrolle wurde ein GST-Antikörper eingesetzt. Die Detektion der Proteine per Western Blot erfolgte mit einem anti-Flag-Antikörper.

Die Spuren, bei denen die Lysate direkt aufgetragen wurden (Abb. 3-7, Spur 1 und 2, oberer Blot und Spur 1, unterer Blot), zeigen, dass in den transfizierten HEK293-Zellen das Protein Flag-CaM₁₂₃₄ exprimiert wurde. In den Spuren, in denen Fragmente des C-Terminus immunpräzitiert wurden, ist nur im Falle der Positivkontrolle, der trunkierten Wildtyp-Sequenz (Spur 3, oberer Blot)⁵³, Calmodulin nachweisbar und nicht in den 5A-Konstrukten. Die Negativkontrollen (Spur 4 und 6, oberer Blot bzw. Spur 4, unterer Blot), bei denen mit dem anti-GST-Antikörper immunpräzitiert wurde, zeigen erwartungsgemäß keine Banden. Die Ergebnisse der Co-Immunpräzitation weisen nach, dass durch die im IQ-Motiv des Cav1.4 eingefügten Alanin-Mutationen (5A) die CaM-Bindung verhindert wird.

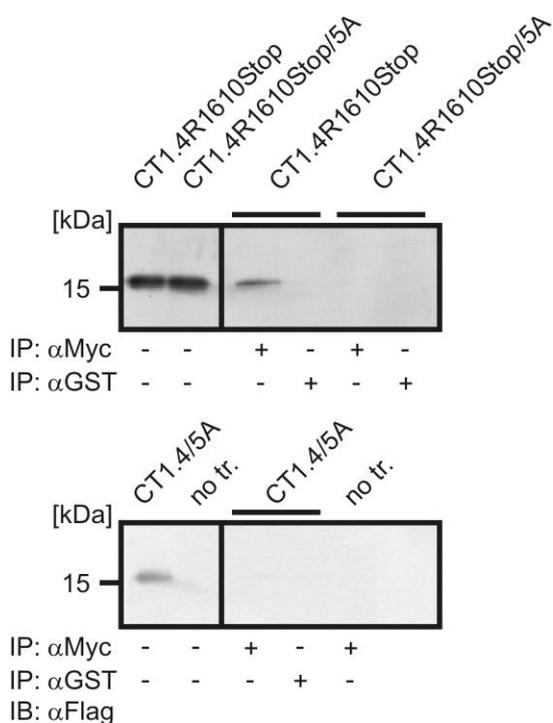


Abb. 3-7 Die Cav1.4/5A Mutante zeigt keine CaM-Bindung. Co-IP aus Lysaten transfizierter HEK293-Zellen. Die Immunpräzitation der Proteine erfolgte mit einem anti-Myc-Antikörper; als Negativkontrolle diente ein anti-GST-Antikörper. Für die Detektion der Proteine nach Western Blot wurde ein anti-Flag-Antikörper verwendet. Transfiziert wurde der an das Myc-Epitop fusionierte proximale bzw. komplette C-Terminus des Cav1.4 in der Wildtypform (CT1.4R1610Stop) oder nach Mutation von fünf Aminosäuren im IQ-Motiv (CT1.4R1610Stop/5A, CT1.4/5A) zusammen mit Flag-CaM₁₂₃₄.

3.1.4.2 Elektrophysiologische Untersuchungen der CaM-defizienten Variante

Die CaM-defiziente Cav1.4-Variante wurde im Anschluss elektrophysiologisch untersucht. Als Kontrollexperiment dienten die analoge Cav1.2/5A-Mutante bzw. die entsprechenden Wildtyp-Konstrukte. Eine CaM-defiziente Variante des kardialen Calciumkanals ist bereits in der Literatur beschrieben⁴³. Durch die fehlende ApoCaM-Bindung zeigt der Cav1.2-Kanal keine CDI mehr und weist zudem eine beschleunigte VDI auf. Diese Ergebnisse sollten in einem ersten Experiment reproduziert werden. HEK293 wurden mit der mutierten α_1 -Untereinheit Cav1.2/5A und den entsprechenden Untereinheiten β_{2a} und $\alpha_2\delta$ transfiziert (2.3.2.1); ca. 48 h danach erfolgten die Patch-Clamp-Messungen nach dem beschriebenen Standardprotokoll (2.5). Abbildung 3-8 A zeigt repräsentative Beispielstromspuren für Cav1.2/5A in Anwesenheit von Barium oder Calcium. Auffällig ist die stark beschleunigte VDI der Mutante in Anwesenheit von Barium (R_{300} für I_{Ba} Cav1.2/5A: $0,16 \pm 0,02$, $n = 12$) im Vergleich zum Cav1.2 Wildtyp (R_{300} für I_{Ba} Cav1.2: $0,58 \pm 0,04$, $n = 8$, Abb. 3-8 B). Die Inaktivierung der Barium- und Calciumspuren (R_{300} für I_{Ca} Cav1.2/5A: $0,10 \pm 0,02$, $n = 10$; Cav1.2: $0,15 \pm 0,04$, $n = 8$) ist nahezu identisch; es besteht kein signifikanter Unterschied in den R_{300} -Werten, dem fraktionellen Anteil des Peakstroms nach 300 ms (Abb. 3-8). Eine CDI wie sie für den Cav1.2 Wildtyp charakteristisch ist, liegt nicht vor.

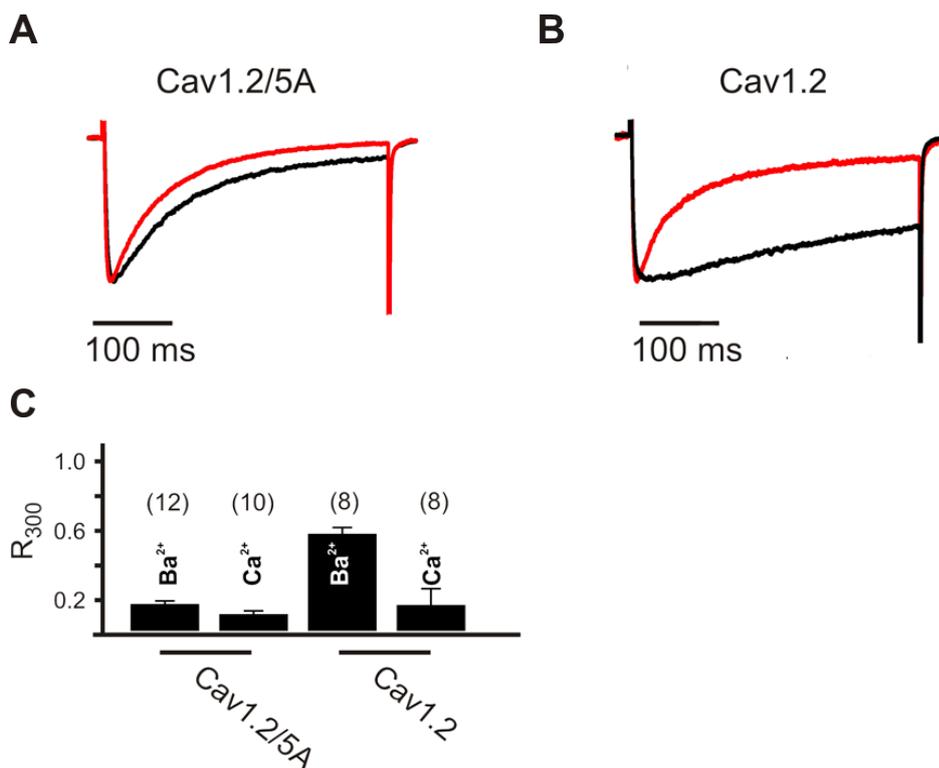


Abb. 3-8 CaM-defiziente Variante des Cav1.2 mit beschleunigter spannungsabhängiger und fehlender Calcium-abhängiger Inaktivierung **A** Repräsentative Stromspuren für I_{Ba} (schwarz) und I_{Ca} (rot) für Cav1.2/5A, normalisiert auf das Strommaximum. **B** Repräsentative Stromspuren für I_{Ba} (schwarz) und I_{Ca} (rot) für Cav1.2, normalisiert auf das Strommaximum. **C** Ratio der Inaktivierung für I_{Ba} und I_{Ca} während einem Testpuls von 300 ms bei V_{max} . R_{300} entspricht dem Anteil des verbleibenden Peakstroms nach 300 ms. Nummern in Klammern stehen für die Anzahl der Zellen.

Im Anschluss erfolgte die elektrophysiologische Charakterisierung des Cav1.4/5A-Kanals (Abb. 3-9). Auffällig war bei den Messungen zunächst vor allem die wesentlich kleinere Barium-Stromdichte ($-2,37 \pm 0,34$ pA / pF, $n = 17$) im Vergleich zum Wildtyp-Kanal ($-4,91 \pm 0,79$ pA / pF, $n = 12$, Abb. 3-9 B). Die halb-maximale Aktivierungsspannung $V_{0,5, act}$ war hingegen nicht verändert (Cav1.4/5A: $-13,2 \pm 0,90$ mV, $n = 15$; Cav1.4: $-13,16 \pm 1,27$ mV, $n = 13$). Wie der Wildtyp-Kanal zeigte auch die 5A-Variante erwartungsgemäß keine CDI. Allerdings konnte für die Bariumspur eine beschleunigte Inaktivierung festgestellt werden. Zur Quantifizierung der Inaktivierung wurden R_{5000} -Werte verwendet, da die VDI beim Cav1.4 charakteristischerweise ein äußerst langsamer Prozess ist und eine Inaktivierung nach 300 ms nicht vorhanden ist. Dementsprechend waren die R_{300} -Werte der beiden Konstrukte noch vergleichbar (R_{300} Cav1.4/5A: $0,98 \pm 0,005$, $n = 18$; Cav1.4: $0,99 \pm 0,004$, $n = 8$) und der Unterschied in der VDI zeigte sich erst im weiteren Verlauf der Inaktivierung und war nach 5 s hoch signifikant (R_{5000} Cav1.4/5A: $0,53 \pm 0,03$, $n = 19$; Cav1.4: $0,66 \pm 0,03$, $n = 10$, Abb. 3-9 C, D).

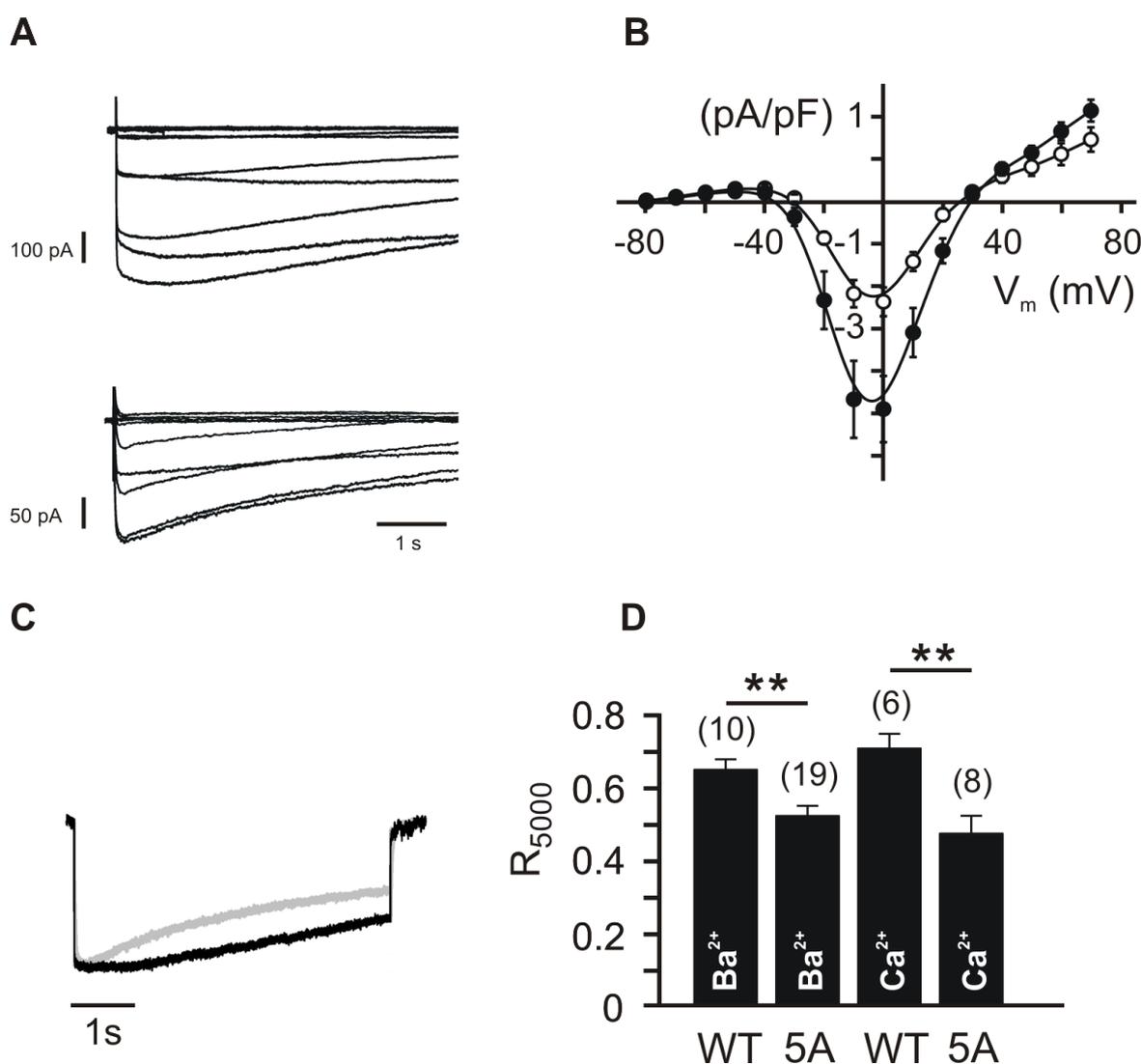


Abb. 3-9 CaM-defiziente Variante des Cav1.4 mit beschleunigter spannungsabhängiger Inaktivierung und reduzierter Stromdichte. **A** Exemplarische Bariumströme für Cav1.4 (oben) und Cav1.4/5A (unten). Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde die Spannung in 10 mV-Schritten von -80 mV auf +70 mV erhöht. Die Pulsdauer betrug dabei 5 s. **B** Mittlere I-V-Kurve für I_{Ba} für Cav1.4 (●, $n = 12$) und Cav1.4/5A (○, $n = 17$). **C** Repräsentative Stromspuren für I_{Ba} für Cav1.4 (schwarz) und Cav1.4/5A (grau, Protokoll siehe A), normalisiert auf das Strommaximum. **D** Ratio der Inaktivierung für I_{Ba} und I_{Ca} während einem Testpuls von 5 s bei V_{max} . R_{5000} entspricht dem Anteil des verbleibenden Peakstroms nach 5 s. Nummern in Klammern stehen für die Anzahl der Zellen; ** $p < 0,01$.

3.1.5 Einfluss einer CaM-Überexpression auf die Funktion der ICDI des Cav1.4

Die bisherigen Experimente zeigen, dass CaM trotz der fehlenden Calcium-abhängigen Inaktivierung mit dem Cav1.4 interagiert und eine wichtige Rolle in der Regulation der Stromdichte und der spannungsabhängigen Inaktivierung einnimmt. Um eine konkurrierende Bindung, in dem die ICDI CaM vom proximalen C-Terminus verdrängt, und eine gleichzeitige Bindung nicht stattfindet⁵⁴, gänzlich auszuschließen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Sollte dieses Modell korrekt sein, müsste es möglich sein, durch eine CaM-Überexpression die ICDI-Bindung kompetitiv zu hemmen. Als Folge dessen sollte der Kanal CDI zeigen.

Für diesen Versuch wurde der Cav1.4 zusammen mit CaM in HEK293-Zellen exprimiert und elektrophysiologisch untersucht (Abb. 3-10). Für die Identifikation Calmodulin exprimierender Zellen wurde das mit CFP gelabelte CaM (CFP-wtCaM) verwendet. Trotz der Koexpression von sehr hohen Mengen (bis zu 20 µg) CaM, konnte für den Cav1.4 keine CDI festgestellt werden. Der Anteil der Inaktivierung für die Barium- und Calciumspur nach 300 ms war identisch ($R_{300} I_{Ba}$ Cav1.4: $1,00 \pm 0,003$, $n = 6$; Cav1.4 + CaM, + high EGTA: $0,98 \pm 0,009$, $n = 39$; I_{Ca} Cav1.4: $0,98 \pm 0,012$, $n = 6$; Cav1.4 + CaM, + high EGTA: $0,96 \pm 0,009$, $n = 39$) und auch unabhängig von der Calcium-Pufferung. Während bei anderen HVA-Kanälen wie den R- und N-Typ-Calciumkanälen eine CaM-vermittelte CDI erst unter milder Calcium-Pufferung sichtbar wird⁵², hatte beim Cav1.4 selbst eine Reduktion der EGTA-Menge von 10 mM auf 0,5 mM (Cav1.4 + CaM, + low EGTA) und eine damit einhergehende Steigerung der intrazellulären Calcium-Konzentration keinen Einfluss auf das Inaktivierungsverhalten des Kanals ($R_{300} I_{Ba}$ $1,01 \pm 0,01$, $n = 9$; I_{Ca} $0,98 \pm 0,028$).

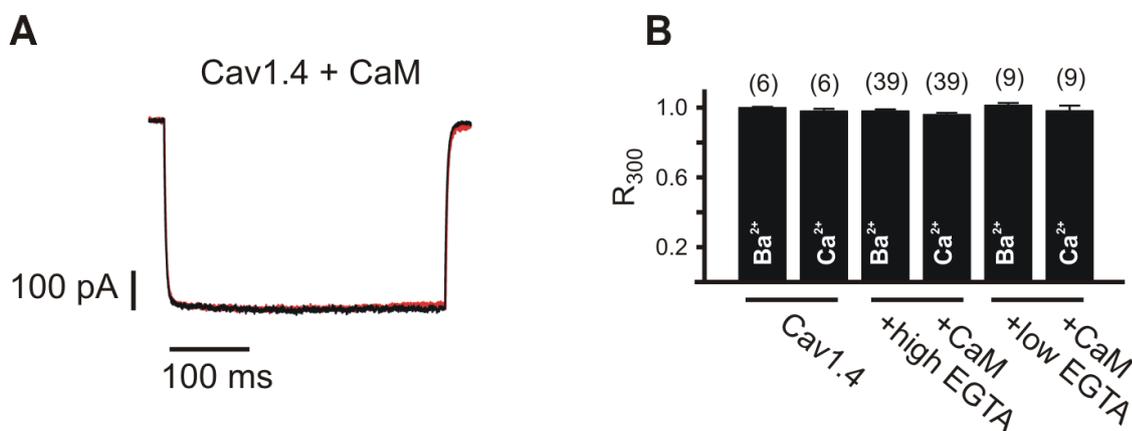


Abb. 3-10 Das Fehlen der CDI liegt nicht an einer kompetitiven Bindung von CaM und ICDI am Cav1.4. Überexpression von CaM induziert keine CDI beim Cav1.4. **A** Repräsentative Peak-Stromspuren mit Barium (schwarze Spur) oder Calcium (rote Spur) als leitendes Ion. Spannungspuls 350 ms. **B** R_{300} -Werte des Cav1.4 für I_{Ba} und I_{Ca} mit und ohne CaM-Überexpression unter hoher oder niedriger intrazellulärer Calcium-Pufferung (10 mM vs. 0,5 mM EGTA).

3.2 Interaktion der ICDI mit dem proximalen C-Terminus des Cav1.4

Die bisherigen Daten zeigen, dass CaM unabhängig von der ICDI am Cav1.4 gebunden ist. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Mechanismus der ICDI bzw. ihre exakte Bindungsdomäne am proximalen C-Terminus näher untersucht werden.

3.2.1 Intramolekulare FRET-Messungen: Aufklärung der Interaktion der ICDI mit dem proximalen C-Terminus des Cav1.4

Eine gleichzeitige Bindung von CaM und ICDI am C-Terminus des Cav1.4, spricht stark dafür, dass die jeweiligen Bindungsstellen unterschiedlich sind. Um die exakten Bindungsregionen näher einzugrenzen, wurden im weiteren Verlauf Interaktionsstudien mittels FRET durchgeführt.

Zunächst erfolgten einige intramolekulare Experimente, bei denen der komplette C-Terminus des Cav1.4 oder Teile davon N-terminal mit YFP und C-terminal mit CFP getagged wurden (Abb. 3-11). Das Tandem-Protein des kompletten C-Terminus ergab ein ausgesprochen großes FRET-Signal (FR = $6,60 \pm 0,21$, n = 48), das im Größenbereich von beschriebenen YFP-CFP-Dimeren lag⁶¹. Die Deletion der dem EF-Hand-Motiv nachgeschalteten Bereiche bis einschließlich dem IQ-Motiv, führte nur zu einer geringfügigen Reduktion des FRET Ratios ($5,32 \pm 0,09$, n = 38), was darauf hindeuten würde, dass dieser Bereich nur eine untergeordnete Rolle in der Bindung der ICDI spielt.

Generell gibt es zwei Hauptkomponenten, die einen Beitrag zum intramolekularen FRET leisten. Die eine Komponente ist die spezifische Bindung in unserem Fall z. B. zwischen proximalen C-Terminus und ICDI. Auf der anderen Seite kann auch die spezifische Faltung des Peptids den N- und C-Terminus und damit die FRET-Fluorophoren in eine räumliche Nähe zueinander bringen, die FRET begünstigt. Dieser Effekt könnte die FRET-Effizienz zusätzlich erhöhen. Dass bei den von uns verwendeten intramolekularen Konstrukten ein derartiger Effekt zum Tragen kommt, zeigt ein Konstrukt, das trotz der Deletion des kompletten proximalen C-Terminus immer noch ein beträchtliches FRET-Signal (FR = $3,03 \pm 0,12$, n = 26) aufweist. Da wir in der Vergangenheit allerdings biochemisch eine Bindung zwischen der ICDI und diesem Bereich des C-Terminus bereits ausgeschlossen hatten⁵³, ist es unwahrscheinlich, dass das erzielte FRET-Signal eine wirkliche Bindung widerspiegelt. Vielmehr könnte es das Ergebnis der räumlichen Faltung des C-Terminus sein.

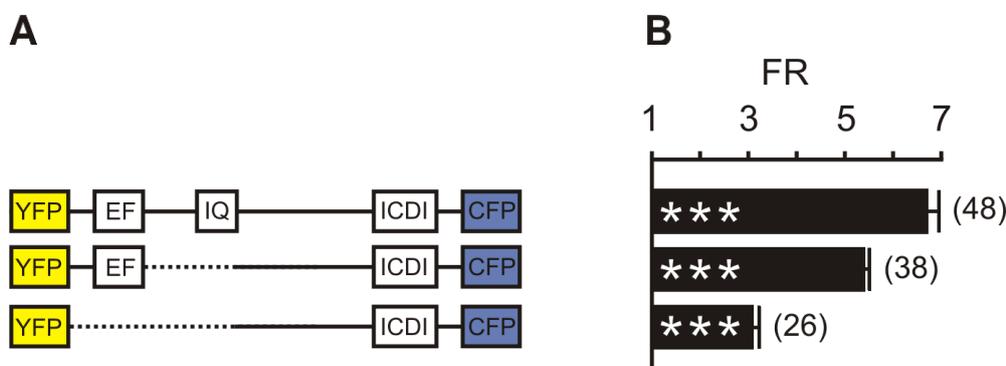


Abb. 3-11 Intramolekulares FRET zur Aufklärung der ICDI-Interaktion am proximalen C-Terminus
A Schematische Darstellung der intramolekularen FRET-Konstrukte. **B** FRs (von oben nach unten) für YFP-CT1.4-CFP ($6,60 \pm 0,21$, n = 48), YFP-CT1.4Δ1493-1609-CFP ($5,32 \pm 0,09$, n = 38) und YFP-CT1.4Δ1445-1609-CFP ($3,03 \pm 0,12$, n = 26). ***p < 0,001. Signifikanz getestet gegen Negativkontrollen (siehe Abb. 3-10).

3.2.2 Intermolekulare FRET-Messungen: Aufklärung der Interaktion der ICDI mit dem proximalen C-Terminus des Cav1.4

3.2.2.1 Identifikation der Bindungsregion innerhalb des proximalen C-Terminus des Cav1.4

Um die durch eine tatsächliche Bindung bedingte FRET-Komponente, getrennt von diesem unspezifischen Phänomen, betrachten zu können, haben wir die an YFP fusionierten C-terminalen Fragmente von dem an CFP klonierten ICDI-Bereich getrennt und in HEK293-Zellen koexprimiert (Abb. 3-12).

Tatsächlich, war das maximale intermolekulare FRET-Ratio zwischen YFP-CT1.4ΔICDI und ICDI-CFP im Vergleich zum analogen intramolekularen Konstrukt kleiner ($FR = 3,53 \pm 0,12, n = 40$ vs. $FR = 6,60 \pm 0,21, n = 48$). Eine Gegenüberstellung der FRET-Ratios lässt die Schlussfolgerung zu, dass etwa die Hälfte des intramolekularen FRET-Signals Folge einer spezifischen Bindung ist. Die Tatsache, dass sich für das nach dem IQ-Motiv trunkierte YFP-Konstrukt (YFP-CT1.4R1610Stop) ein nahezu identisches FR ($3,47 \pm 0,30, n = 14$) ergab, bestätigt außerdem die Ergebnisse früher Co-Immunitpräzipitationen in unserem Arbeitskreis, die zeigten, dass der Bereich nach dem IQ-Motiv keine essentielle Rolle für die ICDI-Interaktion spielt.

Die Koexpression von YFP-EF mit der ICDI führte zu einer Reduktion des FR, was auf eine Bindungs-Beteiligung anderer proximaler Bereiche neben der EF-Hand hinweist.

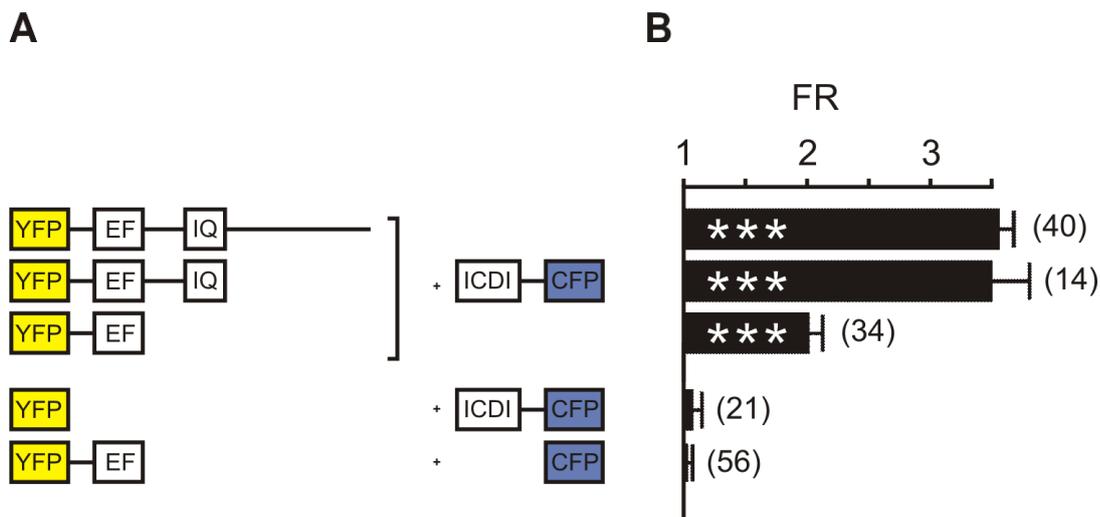


Abb. 3-12 Intermolekulares FRET zur Aufklärung der ICDI-Interaktion am proximalen C-Terminus
A Schematische Darstellung der Konstrukte für die Koexpression mit ICDI-CFP bzw. CFP. **B** FRs (von oben nach unten) für YFP-CT1.4ΔICDI ($3,53 \pm 0,12, n = 40$), YFP-CT1.4R1610Stop ($3,47 \pm 0,30, n = 14$) und YFP-EF ($2,00 \pm 0,11, n = 34$), koexprimiert mit ICDI-CFP, sowie für die beiden Negativkontrollen YFP und ICDI-CFP ($1,02 \pm 0,04, n = 56$) bzw. YFP-EF und CFP ($1,06 \pm 0,07, n = 21$). *** $p < 0,001$ gegenüber den Kontrollen.

3.2.2.2 Identifikation der Bindungsregion innerhalb der ICDI des Cav1.4

Als nächstes ging es darum, die für die Interaktion mit dem proximalen C-Terminus essentielle Bindungsregion innerhalb der ICDI näher einzugrenzen. Eine Verlängerung der ICDI in 5'-Richtung führte nicht zu einem weiteren Anstieg des FRET-Signals. Im Gegensatz dazu resultierte eine Dreiteilung der ICDI und eine anschließende Koexpression mit dem EF-Hand-Motiv, in einer signifikanten Reduktion des FRs verglichen mit der kompletten ICDI-Domäne (Abb. 3-13).

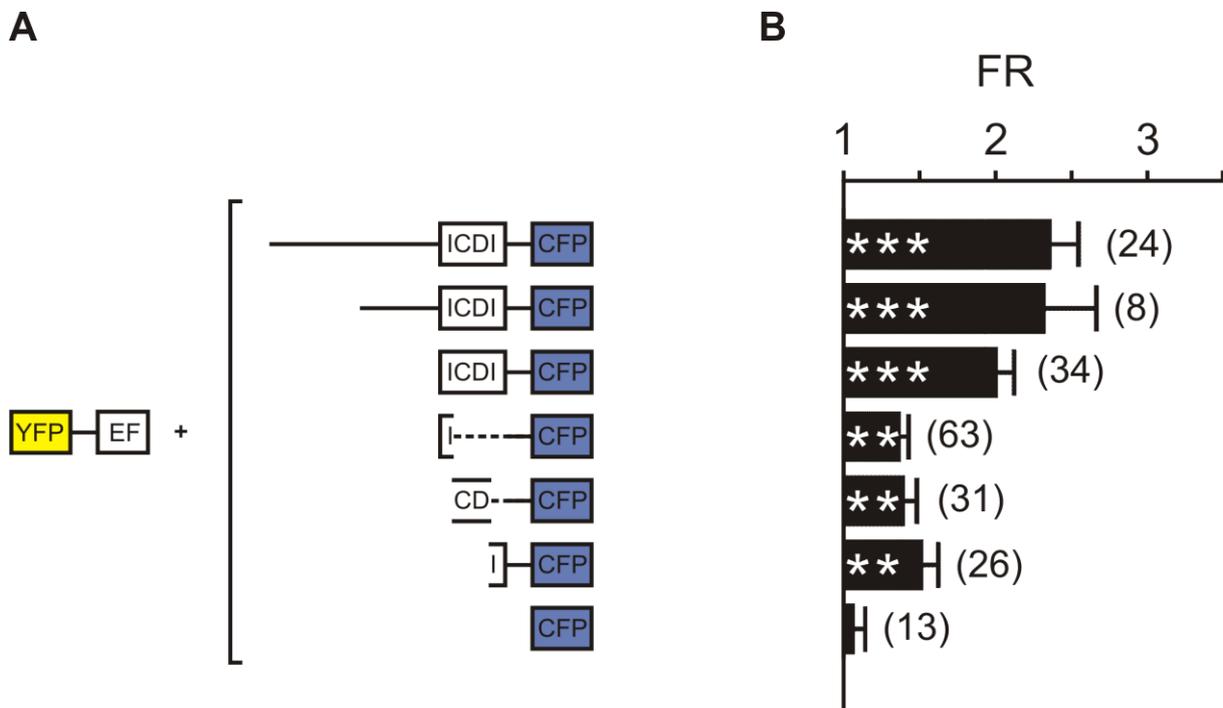


Abb. 3-13 Intermolekulares FRET zur Aufklärung der exakten Bindungsregion innerhalb der ICDI-Domäne
A Schematische Darstellung der ICDI-Konstrukte für die Koexpression mit YFP-EF. **B** FRs (von oben nach unten) für die Koexpression von YFP-EF mit XL-ICDI-CFP ($2,35 \pm 0,18$, $n = 24$), L-ICDI-CFP ($2,31 \pm 0,30$, $n = 8$) und ICDI-CFP ($2,00 \pm 0,11$, $n = 34$), sowie mit den verkürzten ICDI-Konstrukten proxICDI-CFP ($1,36 \pm 0,06$, $n = 63$), midICDI-CFP ($1,39 \pm 0,08$, $n = 31$) und distlICDI-CFP ($1,51 \pm 0,10$, $n = 26$) und der Negativkontrolle mit CFP ($1,06 \pm 0,07$, $n = 21$). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Signifikanz getestet gegen die entsprechende Negativkontrolle.

Diese Daten zeigen zum einen, dass die von uns definierte ICDI allein die essentielle Region für die Bindung am proximalen C-Terminus darstellt und zum anderen, dass alle drei Bereiche der ICDI einen Beitrag zur Interaktion leisten. Eine Stückelung der ICDI scheint diese Bindungsfähigkeit fast völlig zu zerstören.

Bestätigt wurde dies durch die Koexpression des Konstrukts YFP-CT1.4 Δ ICDI mit den verkürzten ICDI-Fragmenten. Obwohl die Koexpression der kompletten ICDI-Domäne mit dem trunktierten C-Terminus ein sehr viel höheres FR ($3,53 \pm 0,12$, $n = 40$) aufweist als mit dem EF-Hand-Motiv ($2,00 \pm 0,11$, $n = 34$), lieferte die Koexpression mit den verkürzten ICDI-Fragmenten sehr ähnliche Ergebnisse (Abb. 3-14).

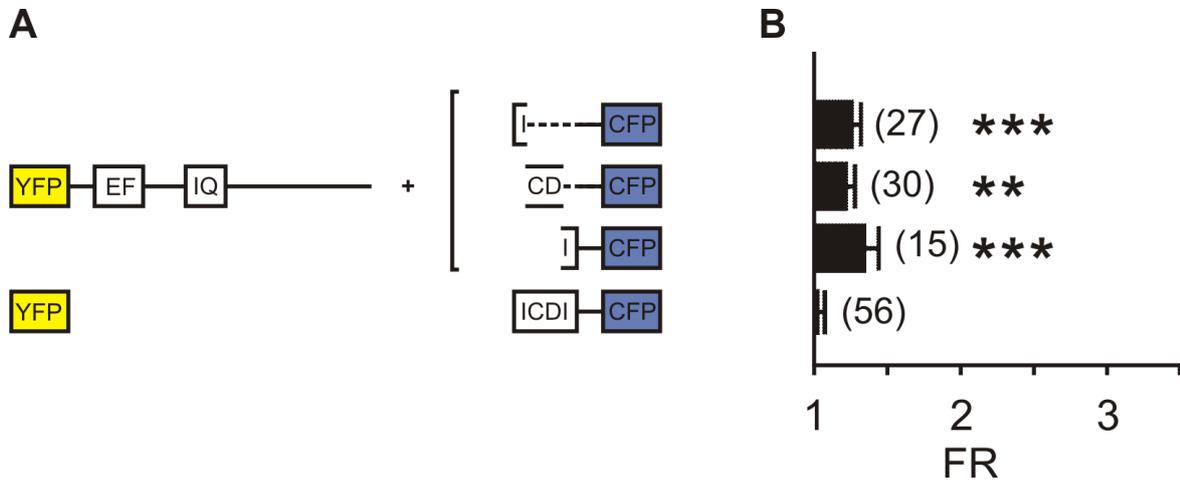


Abb. 3-14 Intermolekulares FRET zur Aufklärung der exakten Bindungsregion innerhalb der ICDI-Domäne
A Schematische Darstellung der ICDI-Konstrukte für die Koexpression mit YFP-CT1.4 Δ ICDI und YFP. **B** FRs (von oben nach unten) für die Koexpression von YFP-CT1.4 Δ ICDI mit proxICDI-CFP ($1,25 \pm 0,05$, $n = 27$), midICDI-CFP ($1,21 \pm 0,05$, $n = 30$) und distICDI-CFP ($1,34 \pm 0,09$, $n = 15$). Als Negativkontrolle diente die Koexpression von YFP mit ICDI-CFP ($1,02 \pm 0,04$, $n = 56$). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ gegenüber den Kontrollen.

3.2.3 Kinetische FRET-Messungen: Einfluss von Calcium auf die ICDI-Bindung

Als nächstes wurde der Einfluss von Calcium und die durch Ca^{2+} / CaM ausgelöste Konformationsänderung auf die ICDI-Bindung im Cav1.4 untersucht. Dazu wurden analog zu den Experimenten der CaM-Interaktion kinetische FRET-Messungen in der Gegenwart von Ionomycin durchgeführt und ebenso die zeitliche Änderung des FRET-Ratios ($\Delta R / R_0$) bestimmt (2.7)⁶²⁻⁶³. Der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Ionomycin-Applikation hatte in der Gegenwart von endogenem CaM keinen Einfluss auf das FRET-Signal zwischen YFP-CT1.4ΔICDI und ICDI-CFP (Abb. 3-15). Eine zusätzliche CaM-Überexpression resultierte lediglich in einer geringfügigen Reduktion von FRET (ca. 1 %).

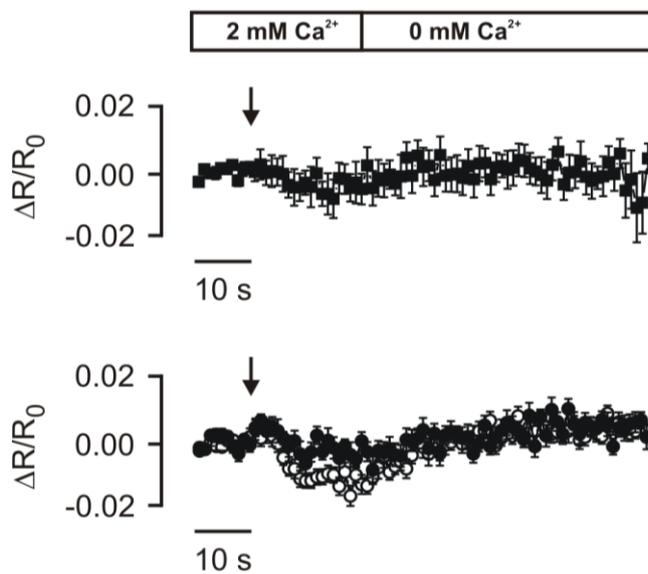


Abb. 3-15 Abhängigkeit des FRET-Signals zwischen der ICDI-Domäne und dem C-Terminus des Cav1.4 von der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$. Zeitverlauf der Änderung des FRET-Ratios ($\Delta R / R_0$) für YFP-CT1.4ΔICDI, koexprimiert mit ICDI-CFP in der Gegenwart von endogenem CaM (oben, schwarze Quadrate, n = 13) oder mit zusätzlicher Überexpression von CaM (unten, weiße Kreise, n = 23). Als Negativkontrolle diente die Überexpression mit Flag-CaM₁₂₃₄ (unten, schwarze Kreise, n = 15). Die Transfektionseffizienz der CaM-Varianten lag bei ca. 80 %.

Im Anbetracht des relativ hohen FR der *steady-state*-FRET-Messungen ($3,53 \pm 0,12$, n = 40) scheint es unwahrscheinlich, dass diese Veränderung funktionell relevant ist und die Calcium-abhängige Konformationsänderung überhaupt mit der ICDI-Bindung interferiert.

4 DISKUSSION

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, den genauen Mechanismus, wie die ICDI im Cav1.4 die Calcium-abhängige Inaktivierung unterbindet, aufzuklären. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob Calmodulin trotz des Fehlens der CDI am Kanal assoziiert ist oder ob die Interaktion mit der ICDI eine Bindung des Calciumsensors verhindert⁵³⁻⁵⁴. Zu diesem Zweck sollte auch die Interaktionsdomäne der ICDI am proximalen C-Terminus des Cav1.4 näher untersucht werden.

4.1 Bindung und Funktion von CaM am Calciumkanal Cav1.4

4.1.1 Nachweis der CaM-Bindung am Cav1.4 mittels FRET

Durch FRET-Experimente konnte gezeigt werden, dass CaM auch in Anwesenheit der ICDI am C-Terminus des Cav1.4 bindet. Während beim C-Terminus des Cav1.2 und Cav1.4 Δ ICDI eine CaM-Bindung, unabhängig von der verwendeten CFP-Variante (wt, 227, cp158, cp174) nachgewiesen werden konnte, wurde beim kompletten C-Terminus des Cav1.4 ein FRET-Signal nur mit CFPcp174-CaM und der entsprechenden Calcium-freien Form CFPcp174-CaM₁₂₃₄ detektiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CaM, sowohl in seiner Calcium-gebundenen Form als auch als ApoCaM am Cav1.4 assoziiert ist, wahrscheinlich allerdings in einer sterischen Konformation, die FRET, im Vergleich zum kardialen Kanal, erschwert. Eine für den Energie-Transfer ungeeignete räumliche Orientierung der FRET-Partner CFP / YFP scheint somit für das fehlende oder geringe Signal bei Verwendung der alternativen Donor-Varianten verantwortlich zu sein und nicht die fehlende CaM-Assoziation. Da diese Beobachtung nur beim kompletten C-Terminus des Cav1.4 und nicht beim Konstrukt Cav1.4 Δ ICDI auftrat, scheint die ICDI für die unterschiedliche Konformation des Kanal / CaM-Komplexes verantwortlich zu sein.

Diese Ergebnisse liefern auch eine mögliche Erklärung dafür, warum in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, eine CaM-Bindung am Cav1.4 oder einer chimären Kanalvariante des Cav1.3, in die die ICDI eingefügt wurde, mittels FRET nicht gezeigt werden konnte^{54,70}. Im Gegensatz dazu, belegen frühere biochemische Experimente anhand von Co-Immunpräzipitationen eine Interaktion zwischen dem C-Terminus und CaM und bestätigen somit, in einer unabhängigen Methode, die erzielten Ergebnisse unseres FRET-Assays⁵³. Die FRET-Ratios, die wir für die CaM-Interaktion (1.4 - 2.3) ermitteln konnten, liegen im Bereich entsprechender Daten für andere HVA-Kanäle^{43,61}. Zusammen mit den entsprechenden Negativkontrollen belegt dies, dass der hier verwendete FRET-Assay für Messungen der CaM-Bindung geeignet ist.

Das, durch die Interaktion zwischen CaM und dem C-Terminus des Cav1.4 erzeugte, FRET-Signal konnte, analog zum Cav1.2, durch einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration noch weiter erhöht werden. Dies wurde sowohl für die Koexpression der trunkierten CaM-Variante 227 als auch der zirkulären Permutation cp174 nachgewiesen; im Falle des Cav1.2 ebenso für die Wildtyp CFP-CaM-Variante (CFP-wtCaM). Der Zeitverlauf des FRET-Anstiegs war dabei für den C-Terminus des Cav1.4 und Cav1.2 identisch. Im Hinblick auf bereits beschriebene Calcium-abhängige Konformationsänderungen für präassoziiertes CaM^{9,43,47,71-72} bei anderen Kanälen, deuten auch diese Calcium-induzierten Änderungen im FRET-Signal eher auf ein derartiges Phänomen hin, anstatt einen wahren Anstieg in der CaM-Bindung wider zu spiegeln⁴³.

4.1.2 Funktionelle Bedeutung der CaM-Assoziation am Cav1.4

Die funktionelle Bedeutung der CaM-Assoziation am Cav1.4 konnte durch die Untersuchung der CaM-defizienten Kanalmutante Cav1.4/5A geklärt werden. In dieser Variante des retinalen Wildtyp-Kanals wurde ein Bereich von fünf Aminosäuren im IQ-Motiv zu Alaninen mutiert. Vier der mutierten Aminosäuren konnten über Strukturanalysen des nahe verwandten kardialen Calciumkanals Cav1.2 als für die CaM-Bindung essentielle Aminosäuren identifiziert werden⁵⁶⁻⁵⁷. Die Veränderungen im korrespondierenden Bereich des Cav1.4 resultierten in einem Verlust der CaM-Bindung, was anhand von Co-Immunpräzipitations-Experimenten belegt werden konnte. Elektrophysiologische Untersuchungen der CaM-defizienten Kanäle lieferten folgende Ergebnisse. Für den Cav1.2/5A konnte, wie für eine in der Literatur beschriebene vergleichbare Mutante, ein Verlust der CDI, sowie eine beschleunigte VDI festgestellt werden⁴³. Obwohl der Cav1.4 keine CDI aufweist, konnte gezeigt werden, dass die CaM-Bindung auch in diesem Kanal Einfluss auf die funktionelle Regulation nimmt. Wurde die CaM-Bindung unterbunden, kam es zu einer signifikanten Reduktion der Stromdichte. Ähnliche Beobachtungen gibt es für den Cav1.2; im kardialen Kanal wird durch die CaM-Interaktion mit dem IQ-Motiv ein ER-Retentionssignal maskiert⁷³ und dadurch die Oberflächenexpression verstärkt. Die Ursache für die Verminderung des Cav1.4-Stroms in der CaM-defizienten Kanalmutante könnte in einem vergleichbaren Mechanismus liegen. Allerdings kann auch eine Regulation durch Calmodulin auf Einzelkanalebene wie z. B. eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit anhand der durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin zeigte der Cav1.4/5A-Kanal eine beschleunigte VDI. Der Unterschied in diesem, im Vergleich zur CDI, von Natur aus langsameren Prozess war nach 5 s signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CaM eine Schlüsselrolle in der Regulation des Cav1.4 einnimmt. Insbesondere scheint es Einfluss auf den Transport der Kanäle zur Plasmamembran (*channel trafficking*) und die spannungsvermittelte Form der Inaktivierung zu nehmen.

4.2 Interaktion der ICDI mit dem Cav1.4

4.2.1 ICDI-Bindung an das EF-Hand-Motiv und weitere proximale Sequenzen des C-Terminus

Neben der CaM-Bindung konnte anhand von FRET-Experimenten auch die Bindung der ICDI am proximalen C-Terminus des Cav1.4 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der intra- und intermolekularen FRET-Messungen zeigen, dass dabei besonders das EF-Hand-Motiv von Bedeutung ist. Die zentrale Rolle des EF-Hand-Motivs im Kontext der CDI, spricht dafür, dass im Wesentlichen die Interaktion der ICDI mit dieser Domäne den Calcium-abhängigen Inaktivierungsmechanismus abschaltet. Allerdings scheinen auch, dem EF-Hand-Motiv nachgeschaltete Bereiche, wie das preIQ- und IQ-Motiv, eine wichtige Rolle in der Interaktion mit der ICDI zu spielen. Wie in der Literatur für andere Calciumkanäle der Cav-Familie beschrieben ist, liegen in den genannten Domänen Bindungsregionen für ApoCaM und Ca^{2+} / CaM. Eine zusätzliche Bindung der ICDI an diese Stellen könnte mit der Translokation von CaM von seiner Präassoziationsstelle zur Effektorstelle interagieren und dadurch die CDI unterbinden. Als alternative Erklärung für das Fehlen der CDI in Anwesenheit von CaM, könnte die ICDI-Interaktion mit dem proximalen C-Terminus CaM sterisch in seiner präassoziierten Form fixieren. Es ist denkbar, dass auf diese Weise entweder die Translokation zur Effektorstelle oder eine für die CDI erforderliche Konformationsänderung nicht stattfinden kann. All diesen Modellvorstellungen gemeinsam ist, dass CaM durch die Anwesenheit der ICDI im Cav1.4 in eine Position gedrängt wird, in der es sterisch fixierter ist als in Kanalvarianten, die keine ICDI aufweisen (Cav1.4 Δ ICDI, Cav1.2, Abb. 4-1). Es ist gut vorstellbar, dass diese sterische Fixierung der Grund für das Fehlen, der durch CaM vermittelten, CDI ist. Die Hypothese von einer leicht veränderten Struktur des CaM / Kanal-Komplexes im Cav1.4 wird weiterhin gestützt von den Ergebnissen des FRET-Assays, die, im Falle des retinalen Kanals und im Gegensatz zum kardialen Subtyp, eine kritische Abhängigkeit des FRET-Signals von der räumlichen Orientierung belegen.

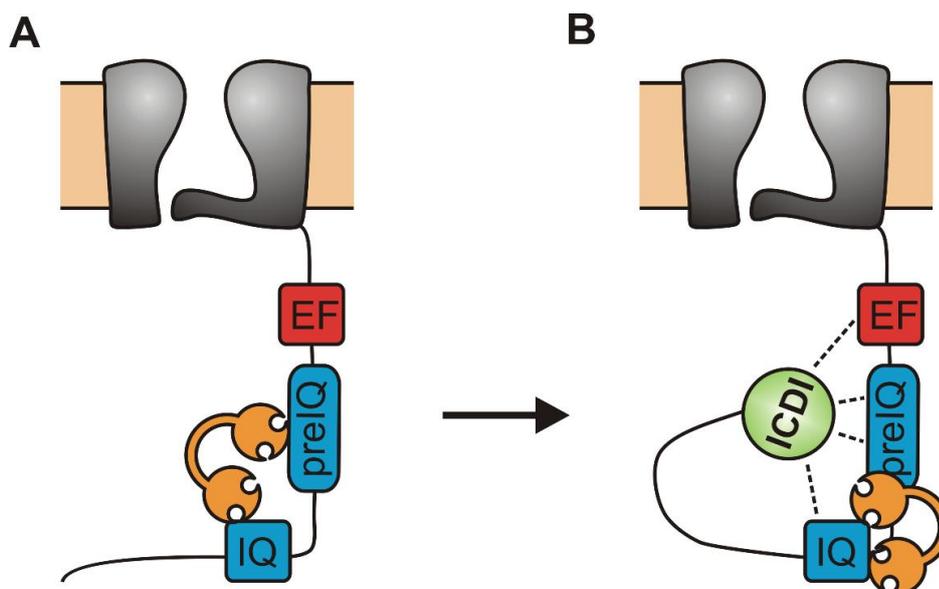


Abb. 4-1 Modell des CaM / Kanal-Komplexes. A In Abwesenheit der ICDI für Cav1.4 Δ ICDI bzw. Cav1.2. **B** In Anwesenheit der ICDI für Cav1.4. CaM und ICDI binden gleichzeitig an den C-Terminus des Cav1.4. Dadurch liegt der CaM / Kanal-Komplex in einer veränderten Form vor.

4.2.2 Identifikation der genauen Interaktionsdomäne im distalen C-Terminus

Neben der Identifikation relevanter Bindungsbereiche der ICDI im proximalen C-Terminus liefert die vorliegende Arbeit auch neue Erkenntnisse zur Interaktionsdomäne innerhalb der ICDI. Eine Erweiterung der ICDI in 5'-Richtung resultierte nicht in einem Anstieg von FRET zum EF-Hand-Motiv, was darauf schließen lässt, dass der durch die ICDI definierte Bereich für die Interaktion ausreichend ist. Eine Dreiteilung der ICDI führte zu einer signifikanten Reduktion des FRET-Signals verglichen zur ICDI in seiner Gesamtlänge. Das Ergebnis war zudem unabhängig davon, ob das EF-Hand-Motiv allein oder der komplette C-Terminus ohne ICDI (Cav1.4 Δ ICDI) koexprimiert wurde. Für die Interaktion der ICDI mit dem proximalen C-Terminus bedeutet dies, dass anscheinend alle drei Teile der ICDI zur Bindung beitragen und dass durch die Stückelung der ICDI die Fähigkeit zur Interaktion weitgehend verloren geht.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu kürzlich veröffentlichten Daten. Durch schrittweise eingefügte Trunkationen und anschließende elektrophysiologische Untersuchungen konnte dabei gezeigt werden, dass die ICDI weiter eingegrenzt werden kann. Für das Fehlen der CDI im Cav1.4 scheint eine regulatorische Domäne von 23 Aminosäuren innerhalb der ICDI verantwortlich zu sein⁵³⁻⁵⁴. In deren Anwesenheit zeigt der Cav1.4 keine CDI, wird die entsprechende Sequenz, die im Falle des FRET-Assays dem Konstrukt midICDI-CFP entspricht, jedoch deletiert, ändert sich in Folge die Inaktivierung des retinalen Calciumkanals und er weist den negativen Rückkopplungsmechanismus der CDI auf.

Im Zusammenhang mit den FRET-Ergebnissen lassen diese Beobachtungen zwei Schlüsse zu. Zum einen könnte ein Bereich der ICDI für die Bindung und ein anderer, nämlich die angesprochenen 23 Aminosäuren, für die Funktionalität der ICDI verantwortlich sein. Eine alleinige Vermittlung beider Effekte durch die angesprochene Domäne kann durch die FRET-Experimente ausgeschlossen werden. Die elektrophysiologische Charakterisierung der Cav1.4-Variante, die nach den 23 Aminosäuren trunziert wurde und eine dem Wildtyp ähnliche Inaktivierung aufweist, zeigt zumindest, dass der distale Bereich der ICDI funktionell nicht essentiell ist. Ob eine genauere Eingrenzung der Bindungsdomäne im vorderen Teil der ICDI möglich ist, bleibt zu diesem Zeitpunkt offen.

4.2.3 Keine konkurrierende Bindung zwischen ICDI und CaM

Die bisherigen Daten sprechen stark dafür, dass sowohl die ICDI als auch CaM am C-Terminus des Cav1.4 gebunden sind und unabhängig von einander bestimmte Funktionen übernehmen. So wird durch die ICDI-Bindung zwar die CDI ausgeschaltet, aber andere wichtige CaM-Effekte wie der Einfluss auf die Stromdichte und die VDI sehr wohl vermittelt.

Die Ergebnisse der kinetischen FRET-Messungen deuten außerdem darauf hin, dass die Bindung der ICDI durch Calcium bzw. durch die Calcium-abhängige Aktivierung von Calmodulin, wenn überhaupt, nur geringfügig beeinflusst wird. Es ist unwahrscheinlich, dass eine Reduktion des FRET-Signals von ca. 1 %, die lediglich unter Bedingungen, in denen CaM überexprimiert wurde, funktionell eine Rolle in der ICDI-Bindung spielt. Wahrscheinlicher ist, dass die Veränderung des FRs durch eine Konformationsänderung am C-Terminus bedingt ist. Funktionelle Experimente zur Frage einer konkurrierenden Bindung zwischen ICDI und CaM bestätigen diese Annahmen. Wäre das Modell einer sich ausschließenden gleichzeitigen bzw. konkurrierenden Bindung von ICDI und CaM am Cav1.4 korrekt, müsste es möglich sein, durch Überexpression von CaM, die ICDI von ihrer Bindungsstelle zu verdrängen. Als Folge sollte der Kanal daraufhin Calcium-abhängig inaktivieren. Die Tatsache, dass die CaM-Überexpression keine CDI induziert, unterstreicht das Modell einer gleichzeitigen Bindung von CaM und ICDI am Cav1.4 (Abb. 4-1).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der L-Typ Calciumkanal Cav1.4 spielt eine Schlüsselrolle in der retinalen Signaltransduktion. In Bändersynapsen der Photorezeptoren und Bipolarzellen vermittelt er, gesteuert über Licht induzierte Änderungen des Membranpotentials, den für die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat essentiellen Calcium-Einstrom^{1,6,20-21,24-29}.

Der Calciumkanal Cav1.4 unterscheidet sich von verwandten HVA-Kanälen durch das komplette Fehlen der Calcium-abhängigen Inaktivierung und die sehr langsame spannungsabhängige Inaktivierung⁵³⁻⁵⁴. Für die physiologische Funktion der Retina ist das besondere Inaktivierungsverhalten des Cav1.4 von grundlegender Bedeutung. Durch den dadurch vermittelten lang andauernden Calcium-Einstrom im Dunkeln kann eine kontinuierliche Glutamat-Ausschüttung an Bändersynapsen gewährleistet werden.

Frühere Studien konnten eine inhibitorische Domäne am Ende des C-Terminus identifizieren, die für das Fehlen der CDI verantwortlich ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die ICDI mit dem proximal liegenden EF-Hand-Motiv des C-Terminus interagiert⁵³⁻⁵⁴.

Wie die ICDI nun mehr die CDI abschaltet, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht geklärt. Ziel der Doktorarbeit war es, neue Einblicke in den genauen Mechanismus der ICDI zu liefern.

Im ersten Teil der Arbeit konnte zunächst die Frage geklärt werden, ob in Anwesenheit der ICDI der Calciumsensor Calmodulin, der in anderen HVA-Kanälen die CDI vermittelt, am Kanal gebunden ist oder nicht. FRET-Experimente belegen eine CaM- und ApoCaM-Bindung am C-Terminus des Cav1.4. Die Verwendung von verschiedenen CFP-Varianten deutet allerdings auf eine im Vergleich zum Cav1.2 veränderte Konformation des Kanal / CaM-Komplexes in Gegenwart der ICDI hin.

Durch die elektrophysiologische Untersuchung einer CaM-defizienten Cav1.4-Mutante konnte zudem gezeigt werden, dass CaM ein funktioneller Regulator des retinalen Calciumkanals ist. Es fördert die Oberflächenexpression (Erhöhung der Stromdichte) und verlangsamt die VDI.

Es ist vorstellbar, dass durch die CaM-Präassoziation noch weitere physiologische Funktionen des Cav1.4 wie z. B. die Genexpression reguliert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte die Interaktionsdomäne der ICDI innerhalb des proximalen C-Terminus näher charakterisiert werden. Die durchgeführten Studien belegen neben der CaM-Assoziation auch die ICDI-Bindung am proximalen C-Terminus des Cav1.4. Die Ergebnisse von intra- und intermolekularen FRET-Messungen heben dabei das EF-Hand-Motiv als bedeutenden Bindungspartner der ICDI hervor, aber auch weitere proximale Domänen wie das preIQ- und IQ-Motiv sind an der Interaktion beteiligt.

Für den Mechanismus der ICDI lassen sich aus diesen Ergebnissen die folgenden Rückschlüsse ziehen. Zum einen wird die CDI im Cav1.4 verhindert, indem durch die Interaktion der ICDI mit dem EF-Hand-Motiv eine für die Inaktivierung nötige Konformationsänderung verhindert wird. Eine alternative bzw. zusätzliche Möglichkeit besteht darin, dass durch die Interaktion der ICDI mit dem preIQ- und IQ-Motiv CaM in eine räumliche Position gebracht wird, die eine Vermittlung der CDI unmöglich macht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sowohl die ICDI als auch CaM gleichzeitig, an unterschiedliche Stellen im proximalen C-Terminus des Cav1.4 binden und unabhängig voneinander agieren. Die ICDI kann man dabei als eine Art funktioneller Filter bezeichnen, der manche CaM-Effekte wie z. B. die Vermittlung der CDI verhindert, andere wie den Einfluss auf die Stromdichte und die VDI bewahrt.

6 ANHANG

6.1 Sequenzvergleich der C-Termini des Cav1.2 und Cav1.4

Cav1.2	DNFDYLTRDWSILGPHHLDEFKRIWAEYDPEAKGRIKHLDVVLLLRRIQPPLGFGKLCPH	1561
Cav1.4	DNFDYLTRDWSILGPHHLDEFKRIWSEYDFGAKGRIKHLDVVALLRRIQPPLGFGKLCPH	1504
<hr/>		
Cav1.2	RVACKRLVSMNPLNSDGTVMFNATLFAVVRTAIFIKTEGNIHQANEELRAI IKKIWKRI	1621
Cav1.4	RVACKRLVAMNPLNSDGTVMFNATLFAVVRTISLKIKTEGNLDQANQELRMV LKKIWKRI	1564
<hr/>		
Cav1.2	SMKLLDQVMPAGDDEVTVGKFYATFLIQEYFRKFYFRKKEGLVGVKPSQRNALSLQAGL	1680
Cav1.4	KCKLLDEVIPEPDEFEVTVGKFYATFLIQDYFRKFRFRKEKGLLGRFAETSTSSALQAGL	1624
Cav1.2	RILHDIGPEIRPAISGDIITAEETLDKAMKEAVSAASEDDIFRRAGGLFGNHVSYMQSDSR	1740
Cav1.4	RSIQDILGPEIROALTYDTEFEFEFEAVGQEAEEFEAE.....INPEPYKDSI	1672
Cav1.2	SAFPCIFFTTORPLHISKAGNNOGDTESSPSHEKIMDSIFTPSSYSSTGSMANINNANNIAL	1800
Cav1.4	LSQPOSRWNSR...LSVS.....LVREKLPDSISTGPSDDGLAFNSRQPSVICA	1720
<hr/>		
Cav1.2	GRLPRPAGYFSTVSTVMEGHGSPLSPAVRAQEAAWKLSRKRCHSQESQIAMACQEGASQDD	1860
Cav1.4	GSQPHRRSSGMFMFTIPEEGS.....IQLKGTQGDN.....QNEEQEVP	1760
<hr/>		
Cav1.2	NYDVRITGEDAECCSEPSLI STEMLSYODDENRQLAPPEEEKRDIRLSPKKGFLRSASIGR	1920
Cav1.4	DWIPDILDEQAGTFSNFMVLLPFWHS..QOHVNGHVE.....RRRLLPHTFAGR	1806
Cav1.2	RASFHIECLKRQKNQGGDISCKTVLPLFLMHQALAVAGLSPLLQRSHSPTSLIHPCAIIP	1980
Cav1.4	KPSFTIQCLQRQ.....GSCEDLPFGTMRG.....ETSGPSRAQGSWAAP	1848
Cav1.2	PAIPGSRGWEPQPIPTLRLEGADSSSEKINSFSPFHCGSWGENSEPCRGDSSAARRARPV	2040
Cav1.4	ECKGRILLYAPLLVVEESTVGEGYLGLGGELRTEFD.....	1884
Cav1.2	SIIVPSCAGACGRQFHGSASSLVEAVLISEGLGQFAQDPKFEVTTIQELADACDLTIEM	2100
Cav1.4	.LQVPGAHPNESHKRKGSADSLVEAVLISEGLGLFAQDHEVALAKQEIADACHLTIIDEM	1943
Cav1.2	ENAAADDITSGGARQSPNGTLLPFVNRDRDGRDRAGONEQDASGACAPGCGQSEEALADR	2159
Cav1.4	LSAASDILA.....QRTTSIYSLEF.....SILSRFDEEDLIGDE	1977
Cav1.2	RAGVSSI	2166
Cav1.4	MACVHAI	1984

6.2 Verwendete Primer

6.2.1 PCR-Primer für FRET-Konstrukte

6.2.1.1 PCR-Primer zur Generierung monomerer GFPs

Name	5'-Sequenz-3'	Länge	Konstrukt
A206Kfor	CAG TCC AAG CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC	42 bp	Diverse Konstrukte, z.B. pECFP A206K, pEYFP A206K
A206Krev	GTG ATC GCG CTT CTC GTT GGG GTC TTT GCT CAG CTT GGA CTG	42 bp	Diverse Konstrukte, z.B. pECFP A206K, pEYFP A206K

6.2.1.2 PCR-Primer für Cav1.4-Konstrukte

Name	5'-Sequenz-3'	Länge	Konstrukt
Cav1.4sau_for	GTC GGA AGC CCT CCT TCA C	19 bp	YFP-CT1.4-CFP
Xho_YFP_r	CCG CTC GAG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	32 bp	
OL_1610_EFf	GTT GCC CTG CTG AGA CGC ATC AGA GAG GCC CCA ACA AGC AC	41 bp	YFP-CT1.4Δ1493-1609-CFP
OL_EF_1610r	GTG CTT GTT GGG GCC TCT CTG ATG CGT CTC AGC AGG GCA AC	41 bp	
OL_ab1610_YFPf	CTG TAC AAG GCA GCC GCG AGA GAG GCC CCA ACA AGC AC	38 bp	YFP-CT1.4Δ1445-1609
OL_YFP_ab1610r	GTG CTT GTT GGG GCC TCT CTC GCG GCT GCC TTG TAC AG	38 bp	
OLf_GFP14	GGA CGA GCT GTA CAA GGC AGC CGC GGA TAA CTT TGA	36 bp	YFP-CT1.4, YFP-CT1.4-CFP
olr_GFP14	GTT AGG TAA TCA AAG TTA TCC GCG GCT GCC TTG TAC	36 bp	
Cav1.4IQ1610Stop	CCG CTC GAG TCA TCC TAG TAG CCC CTT TTC	30 bp	YFP-CT1.4R1610Stop
OL_CFP_1884f	GCC CAC TGC GTA CCT TCA CCG CCG CCG CCA TGG TGA GC	38 bp	YFP-CT1.4ΔICDI
OL_1884_CFP_r	GCT CAC CAT GGC GGC GGC GGT GAA GGT ACG CAG TGG GC	38 bp	
A-ICDI-CFP_for	CGG GAT CCG CCG CCA CCA TGA GAG AGG CCC CAA CAA GC	38 bp	XL-ICDI-CFP
postAICDI-CFPfor	CGG GAT CCG CCG CCA CCA TGA TTC AGC TCA AGG GAA CTC	39 bp	L-ICDI-CFP
invitrodongF	CGG GAT CCG CCG CCA CCA TGC TGC AAG TGC CTG GAG	36 bp	ICDI-CFP
1.4_EF_Stop	CCG CCG CTC GAG TTA GAT GCG TCT CAG CAG GGC AAC	36 bp	YFP-EF

Name	5'-Sequenz-3'	Länge	Konstrukt
OL_vor23_CFP_rev	GCT CAC CAT GGC GGC GGC CTT GGC CAG GGC CAC AAA TC	38 bp	proxICDI-CFP
OL_CFP_vor23_for	GAT TTG TGG CCC TGG CCA AGG CCG CCG CCA TGG TGA GC (38 bp)	38 bp	
23aa_BamHI_for	CGG GAT CCG CCG CCA CCA TGC AGG AGA TTG CGG ATG C	37 bp	midICDI-CFP
post23aaBamHIfor	CGG GAT CCG CCG CCA CCA TGC AGA GAA CCA CCT CCC TTT AC	41 bp	distICDI-CFP

6.2.1.3 PCR-Primer für Cav1.2-Konstrukte

Name	5'-Sequenz-3'	Länge	Konstrukt
Olf_YFPCT12	GGA CGA GCT GTA CAA GGC AGC CGC GGA CAA CTT TGA	36 bp	YFP-CT1.2
OLr_YFPCT12	CAG GTA GTC AAA GTT GTC CGC GGC TGC CTT GTA CAG	36 bp	

6.2.1.4 PCR-Primer für CaM-Konstrukte

Name	5'-Sequenz-3'	Länge	Konstrukt
CaM_DKOZAKF	ACC GAG CTC GGA TCC GCC TCC TTT ATG GTG AGC AAG GGC GAG	42 bp	CFP-wtCaM bzw. CFP-wtCaM ₁₂₃₄
CaM_DKOZAKR	CTC GCC CTT GCT CAC CAT AAA GGA GGC GGA TCC GAG CTC GGT	42 bp	
OL-CaMfor-CFP	GGA CGA GCT GTA CAA GGC AGC CGC GAT GGC TGA CCA ACT G	40 bp	
OL-CaMrev-CFP	CAG TTG GTC AGC CAT GCG GGC TGC CTT GTA CAG CTC GTC C	40 bp	
CFP228StopCaMfor	GAG TTC GTG ACC GCC GCC CGC ATG GCT GAC CAA CTG AC	38 bp	CFP227-CaM
CFP228StopCaMrev	GTC AGT TGG TCA GCC ATG CGG GCG GCG GTC ACG AAC TC	38 bp	
cp158_Ba_Koz_for	CGG GAT CCG CCT CCT TTA TGA AGA ACG GCA TCA AGG CC	38 bp	CFPcp158-CaM
OLcp158endCaMrev	CAG TCA GTT GGT CAG CCA TCT GCT TGT CGG CGG TGA TAT AG	41 bp	
OLCaMcp158endfor	CTA TAT CAC CGC CGA CAA GCA GAT GGC TGA CCA ACT GAC TG	41 bp	

Name	5'-Sequenz-3'	Länge	Konstrukt
cp174_Ba_Koz_for	CGG GAT CCG CCT CCT TTA TGG GCA GCG TGC AGC TC	36 bp	CFPcp174-CaM bzw. CFPcp174-CaM ₁₂₃₄
OLcp174endCaMrev	CAG TCA GTT GGT CAG CCA TGT CCT CGA TGT TGT GGC GG	38 bp	
OLCaMcp174endfor	CCG CCA CAA CAT CGA GGA CAT GGC TGA CCA ACT GAC TG	38 bp	

6.2.2 PCR-Primer für Elektrophysiologie-Konstrukte

Name	5'-Sequenz-3'	Länge	Konstrukt
1.2_5A_FWD_B	TTC CTG GCC GCA GCG GCC GCC CGG AAA TTC AAG AAG CGC AAA GAG CAA GG	50 bp	Cav1.2/5A
1.4_5A_fwd_n	TTC CTG GCC GCA GCT GCT GCC CGA AAA TTC CGG AGA AGG AAA GAA AAG GGG C	52 bp	Cav1.4/5A

6.2.3 Allgemeine PCR-Primer

Name	5'-Sequenz-3'	Länge
pcDNA3_for	CTA GAG AAC CCA CTG CTT	18 bp
pcDNA3_rev	GCA CAG TCG AGG CTG ATC	18 bp
PIRESfor	CGG TGG GAG GTC TAT ATA AG	20 bp
pIRES_egfp_rev2	CTT CGG CCA GTA ACG TTA GG	20 bp

6.3 Zusammenstellung der elektrophysiologischen Messdaten

Konstrukte (Kotransfektion mit $\alpha_2\delta$ und β_2a)	charge carrier [mM]	$V_{0.5, act}$ [mV]	k_{act}	V_{max} [mV]	R_{300}
Cav1.2 (pcDNA3)	10 Ba ²⁺	-6,81 ($\pm 2,00$, n = 9)	4,83 ($\pm 0,21$, n = 9)	7,5 ($\pm 3,13$, n = 8)	0,58 ($\pm 0,04$, n = 8)
	10 Ca ²⁺	-3,97 ($\pm 2,10$, n = 9)	7,22 ($\pm 0,41$, n = 9)	13,75 ($\pm 1,83$, n = 8)	0,15 ($\pm 0,04$, n = 8)
Cav1.2/5A (pcDNA3)	10 Ba ²⁺	-1,33 ($\pm 1,93$, n = 8)	6,03 ($\pm 0,33$, n = 8)	11,25 ($\pm 2,27$, n = 8)	0,16 ($\pm 0,02$, n = 12)
	10 Ca ²⁺	4,59 ($\pm 1,28$, n = 8)	7,03 ($\pm 0,27$, n = 8)	17,5 ($\pm 1,64$, n = 8)	0,10 ($\pm 0,02$, n = 10)
Cav1.4 (pcDNA3)	10 Ba ²⁺	-13,86 ($\pm 0,50$, n = 5)	5,96 ($\pm 0,14$, n = 5)	1,67 ($\pm 0,00$, n = 5)	1,00 ($\pm 0,00$, n = 6)
	10 Ca ²⁺	-1,29 ($\pm 1,02$, n = 5)	7,48 ($\pm 0,38$, n = 5)	11,67 ($\pm 1,67$, n = 6)	0,98 ($\pm 0,01$, n = 6)
Cav1.4 (pcDNA3) + CaM, + high EGTA	10 Ba ²⁺	-10,02 ($\pm 0,71$, n = 38)	6,37 ($\pm 0,13$, n = 38)	2,63 ($\pm 0,90$, n = 38)	0,98 ($\pm 0,01$, n = 39)
	10 Ca ²⁺	0,91 ($\pm 0,53$, n = 35)	8,01 ($\pm 0,14$, n = 35)	14,74 ($\pm 0,82$, n = 38)	0,96 ($\pm 0,01$, n = 39)
Cav1.4 (pcDNA3) + CaM, + low EGTA	10 Ba ²⁺	-12,21 ($\pm 1,43$, n = 9)	7,06 ($\pm 0,25$, n = 9)	0 ($\pm 2,36$, n = 9)	1,01 ($\pm 0,01$, n = 9)
	10 Ca ²⁺	-1,26 ($\pm 1,03$, n = 8)	9,29 ($\pm 0,65$, n = 8)	12,5 ($\pm 2,5$, n = 8)	0,98 ($\pm 0,02$, n = 9)
Cav1.4/5A (pIRES)	10 Ba ²⁺	-13,20 ($\pm 0,90$, n = 15)	5,09 ($\pm 0,21$, n = 15)	-1,76 ($\pm 0,95$, n = 17)	0,98 ($\pm 0,01$, n = 18) R_{5000} 0,53 ($\pm 0,00$, n = 19)
Cav1.4 (pIRES)	10 Ba ²⁺	-13,16 ($\pm 1,27$, n = 13)	4,70 ($\pm 0,19$, n = 13)	-1,88 ($\pm 1,36$, n = 16)	0,99 ($\pm 0,00$, n = 8) R_{5000} 0,66 ($\pm 0,03$, n = 10)

6.4 Zusammenstellung der FRET-Messdaten

6.4.1 FR für die CaM-Interaktion

Donor	Akzeptor	FR	Signifikanz zur Negativkontrolle
CFP-wtCaM	YFP-CT1.4	1,08 (\pm 0,12, n = 9)	n.s.
	YFP-CT1.2	1,66 (\pm 0,12, n = 20)	***
CFP227-CaM	YFP-CT1.4	1,16 (\pm 0,05, n = 120)	n.s.
	YFP-CT1.4 Δ ICDI	1,43 (\pm 0,08, n = 64)	**
	YFP-CT1.2	1,79 (\pm 0,08, n = 74)	***
	YFP	1,00 (\pm 0,02, n = 28)	-
CFPcp158-CaM	YFP-CT1.4	0,91 (\pm 0,06, n = 57)	n.s.
	YFP-CT1.4 Δ ICDI	1,29 (\pm 0,07, n = 31)	**
	YFP-CT1.2	2,37 (\pm 0,12, n = 28)	***
CFPcp174-CaM	YFP-CT1.4	1,39 (\pm 0,07, n = 32)	***
	YFP-CT1.4 Δ ICDI	1,46 (\pm 0,09, n = 106)	*
	YFP-CT1.2	1,84 (\pm 0,07, n = 58)	***
	YFP	1,07 (\pm 0,02, n = 28)	-
CFPcp174-CaM ₁₂₃₄	YFP-CT1.4	1,34 (\pm 0,06, n = 30)	***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

6.4.2 FR für die ICDI-Interaktion

6.4.2.1 Intramolekulare FRET-Messungen

Donor / Akzeptor	FR	Signifikanz zur Negativkontrolle
YFP-CT1.4-CFP	6,60 (\pm 0,21, n = 48)	***
YFP-CT1.4 Δ 1493-1609-CFP	5,32 (\pm 0,09, n = 38)	***
YFP-CT1.4 Δ 1445-1609-CFP	3,03 (\pm 0,12, n = 26)	***

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

6.4.2.2 Intermolekulare FRET-Messungen

Donor	Akzeptor	FR	Signifikanz zur Negativkontrolle	
ICDI-CFP	YFP-CT1.4 Δ ICDI	3,53 (\pm 0,12, n = 40)	***	
	YFP-CT1.4R1610Stop	3,47 (\pm 0,30, n = 14)	***	
	YFP-EF	2,00 (\pm 0,11, n = 34)	***	
	YFP	1,02 (\pm 0,04, n = 56)	-	
CFP	YFP-EF	1,06 (\pm 0,07, n = 21)	-	
XL-ICDI-CFP		2,35 (\pm 0,18, n = 24)	***	
L-ICDI-CFP		2,31 (\pm 0,34, n = 8)	***	
proxICDI-CFP		1,36 (\pm 0,06, n = 63)	**	
midICDI-CFP		1,39 (\pm 0,08, n = 31)	**	
distICDI-CFP		1,51 (\pm 0,10, n = 26)	**	
proxICDI-CFP		YFP-CT1.4 Δ ICDI	1,25 (\pm 0,05, n = 27)	***
midICDI-CFP		1,21 (\pm 0,05, n = 30)	**	
distICDI-CFP	1,34 (\pm 0,09, n = 15)	***		

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

6.5 Verwendete Antikörper

6.5.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörper	aus Spezies	Firma
Myc-tag	Anti-Myc	Maus	Cell Signaling Technology
Flag-tag	Anti-Flag	Maus	Sigma
GST-tag	Anti-GST	Maus	Amersham

6.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	gegen Spezies	aus Spezies	Firma
HRP anti-mouse	Maus	Esel	Amersham

7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Corey, D. P., Dubinsky, J. M. & Schwartz, E. A. The calcium current in inner segments of rods from the salamander (*Ambystoma tigrinum*) retina. *J Physiol* **354**, 557-575 (1984).
- 2 Juusola, M., French, A. S., Uusitalo, R. O. & Weckstrom, M. Information processing by graded-potential transmission through tonically active synapses. *Trends Neurosci* **19**, 292-297 (1996).
- 3 Wilkinson, M. F. & Barnes, S. The dihydropyridine-sensitive calcium channel subtype in cone photoreceptors. *J Gen Physiol* **107**, 621-630 (1996).
- 4 Schmitz, Y. & Witkovsky, P. Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience* **78**, 1209-1216 (1997).
- 5 Thoreson, W. B., Nitzan, R. & Miller, R. F. Reducing extracellular Cl⁻ suppresses dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ currents and synaptic transmission in amphibian photoreceptors. *J Neurophysiol* **77**, 2175-2190 (1997).
- 6 Thoreson, W. B. Kinetics of synaptic transmission at ribbon synapses of rods and cones. *Mol Neurobiol* **36**, 205-223 (2007).
- 7 Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P. & Striessnig, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 411-425 (2005).
- 8 Hofmann, F., Biel, M. & Flockerzi, V. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* **17**, 399-418, doi:10.1146/annurev.ne.17.030194.002151 (1994).
- 9 Van Petegem, F. & Minor, D. L. The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochem Soc Trans* **34**, 887-893 (2006).
- 10 Yu, F. H. & Catterall, W. A. The VGL-channome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* **2004**, re15 (2004).
- 11 Striessnig, J. *et al.* L-type Ca²⁺ channels in Ca²⁺ channelopathies. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1341-1346 (2004).
- 12 Splawski, I. *et al.* Ca(V)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119**, 19-31 (2004).
- 13 Splawski, I. *et al.* Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8089-8096; discussion 8086-8088 (2005).
- 14 Liao, P., Yong, T. F., Liang, M. C., Yue, D. T. & Soong, T. W. Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles. *Cardiovasc Res* **68**, 197-203 (2005).
- 15 Seisenberger, C. *et al.* Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem* **275**, 39193-39199 (2000).
- 16 Schulla, V. *et al.* Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective Ca(v)_{1.2} Ca²⁺ channel null mice. *EMBO J* **22**, 3844-3854, doi:10.1093/emboj/cdg389 (2003).
- 17 Platzer, J. *et al.* Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* **102**, 89-97 (2000).
- 18 Firth, S. I., Morgan, I. G., Boelen, M. K. & Morgans, C. W. Localization of voltage-sensitive L-type calcium channels in the chicken retina. *Clin Experiment Ophthalmol* **29**, 183-187 (2001).

- 19 Doering, C. J., Peloquin, J. B. & McRory, J. E. The Ca(v)1.4 calcium channel: more than meets the eye. *Channels (Austin)* **1**, 3-10 (2007).
- 20 Bech-Hansen, N. T. *et al.* Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* **19**, 264-267 (1998).
- 21 Mansergh, F. *et al.* Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina. *Hum Mol Genet* **14**, 3035-3046 (2005).
- 22 Jalkanen, R. *et al.* X linked cone-rod dystrophy, CORDX3, is caused by a mutation in the CACNA1F gene. *J Med Genet* **43**, 699-704 (2006).
- 23 Jalkanen, R. *et al.* A novel CACNA1F gene mutation causes Aland Island eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 2498-2502 (2007).
- 24 Strom, T. M. *et al.* An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* **19**, 260-263 (1998).
- 25 Taylor, W. R. & Morgans, C. Localization and properties of voltage-gated calcium channels in cone photoreceptors of *Tupaia belangeri*. *Vis Neurosci* **15**, 541-552 (1998).
- 26 Morgans, C. W. Localization of the alpha(1F) calcium channel subunit in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2414-2418 (2001).
- 27 Doering, C. J., Hamid, J., Simms, B., McRory, J. E. & Zamponi, G. W. Cav1.4 encodes a calcium channel with low open probability and unitary conductance. *Biophys J* **89**, 3042-3048 (2005).
- 28 Haeseleer, F. *et al.* Essential role of Ca²⁺-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function. *Nat Neurosci* **7**, 1079-1087 (2004).
- 29 Barnes, S. & Kelly, M. E. Calcium channels at the photoreceptor synapse. *Adv Exp Med Biol* **514**, 465-476 (2002).
- 30 Ball, S. L. *et al.* Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1595-1603 (2002).
- 31 Specht, D. *et al.* Effects of presynaptic mutations on a postsynaptic *Cacna1s* calcium channel colocalized with mGluR6 at mouse photoreceptor ribbon synapses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 505-515 (2009).
- 32 Hope, C. I. *et al.* 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**, 129-136 (2005).
- 33 Hemara-Wahanui, A. *et al.* 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**, 7553-7558 (2005).
- 34 Zhou, J. *et al.* Feedback inhibition of Ca²⁺ channels by Ca²⁺ depends on a short sequence of the C terminus that does not include the Ca²⁺ -binding function of a motif with similarity to Ca²⁺ -binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2301-2305 (1997).
- 35 Xia, X. M. *et al.* Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **395**, 503-507 (1998).
- 36 Zuhlke, R. D. & Reuter, H. Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3287-3294 (1998).

- 37 Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P. & Yue, D. T. Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* **22**, 549-558 (1999).
- 38 Qin, N., Olcese, R., Bransby, M., Lin, T. & Birnbaumer, L. Ca²⁺-induced inhibition of the cardiac Ca²⁺ channel depends on calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2435-2438 (1999).
- 39 Zuhlke, R. D., Pitt, G. S., Deisseroth, K., Tsien, R. W. & Reuter, H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399**, 159-162 (1999).
- 40 Pate, P. *et al.* Determinants for calmodulin binding on voltage-dependent Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **275**, 39786-39792 (2000).
- 41 Romanin, C. *et al.* Ca(2+) sensors of L-type Ca(2+) channel. *FEBS Lett* **487**, 301-306 (2000).
- 42 Pitt, G. S. *et al.* Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **276**, 30794-30802 (2001).
- 43 Erickson, M. G., Liang, H., Mori, M. X. & Yue, D. T. FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca²⁺ channel CaM preassociation. *Neuron* **39**, 97-107 (2003).
- 44 Mori, M. X., Vander Kooi, C. W., Leahy, D. J. & Yue, D. T. Crystal structure of the CaV2 IQ domain in complex with Ca²⁺/calmodulin: high-resolution mechanistic implications for channel regulation by Ca²⁺. *Structure* **16**, 607-620 (2008).
- 45 Bernatchez, G., Talwar, D. & Parent, L. Mutations in the EF-hand motif impair the inactivation of barium currents of the cardiac alpha1C channel. *Biophys J* **75**, 1727-1739 (1998).
- 46 Peterson, B. Z. *et al.* Critical determinants of Ca(2+)-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca(2+) channels. *Biophys J* **78**, 1906-1920 (2000).
- 47 Kim, J., Ghosh, S., Nunziato, D. A. & Pitt, G. S. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Neuron* **41**, 745-754 (2004).
- 48 Stotz, S. C., Hamid, J., Spaetgens, R. L., Jarvis, S. E. & Zamponi, G. W. Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem* **275**, 24575-24582 (2000).
- 49 Cens, T., Restituito, S., Galas, S. & Charnet, P. Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J Biol Chem* **274**, 5483-5490 (1999).
- 50 Bernatchez, G., Berrou, L., Benakezouh, Z., Ducay, J. & Parent, L. Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca(V)2.3 channel. *Biochim Biophys Acta* **1514**, 217-229 (2001).
- 51 Chin, D. & Means, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* **10**, 322-328 (2000).
- 52 Liang, H. *et al.* Unified mechanisms of Ca²⁺ regulation across the Ca²⁺ channel family. *Neuron* **39**, 951-960 (2003).
- 53 Wahl-Schott, C. *et al.* Switching off calcium-dependent inactivation in L-type calcium channels by an autoinhibitory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006).
- 54 Singh, A. *et al.* C-terminal modulator controls Ca²⁺-dependent gating of Ca(v)1.4 L-type Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci* **9**, 1108-1116 (2006).
- 55 Baumann, L., Gerstner, A., Zong, X., Biel, M. & Wahl-Schott, C. Functional characterization of the L-type Ca²⁺ channel Cav1.4alpha1 from mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 708-713 (2004).

- 56 Van Petegem, F., Chatelain, F. C. & Minor, D. L., Jr. Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca²⁺/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 1108-1115 (2005).
- 57 Fallon, J. L., Halling, D. B., Hamilton, S. L. & Quijcho, F. A. Structure of calmodulin bound to the hydrophobic IQ domain of the cardiac Ca(v)1.2 calcium channel. *Structure* **13**, 1881-1886 (2005).
- 58 Biel, M. *et al.* Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* **269**, 409-412 (1990).
- 59 Hullin, R. *et al.* Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *Embo J* **11**, 885-890 (1992).
- 60 Ellis, S. B. *et al.* Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* **241**, 1661-1664 (1988).
- 61 Erickson, M. G., Alseikhan, B. A., Peterson, B. Z. & Yue, D. T. Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca(2+) channels revealed by FRET in single living cells. *Neuron* **31**, 973-985 (2001).
- 62 Miyawaki, A. *et al.* Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887 (1997).
- 63 Mank, M. *et al.* A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat Methods* **5**, 805-811 (2008).
- 64 Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. & Tsien, R. Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-916 (2002).
- 65 Tsien, R. Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-544 (1998).
- 66 Mank, M. *et al.* A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J* **90**, 1790-1796 (2006).
- 67 Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11241-11246 (1999).
- 68 Topell, S., Hennecke, J. & Glockshuber, R. Circularly permuted variants of the green fluorescent protein. *FEBS Lett* **457**, 283-289 (1999).
- 69 Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. & Miyawaki, A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10554-10559 (2004).
- 70 Singh, A. *et al.* Modulation of voltage- and Ca²⁺-dependent gating of CaV1.3 L-type calcium channels by alternative splicing of a C-terminal regulatory domain. *J Biol Chem* **283**, 20733-20744 (2008).
- 71 Halling, D. B., Aracena-Parks, P. & Hamilton, S. L. Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. *Sci STKE* **2005**, re15 (2005).
- 72 Fallon, J. L. & Quijcho, F. A. A closed compact structure of native Ca(2+)-calmodulin. *Structure* **11**, 1303-1307 (2003).
- 73 Michelsen, K., Yuan, H. & Schwappach, B. Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep* **6**, 717-722 (2005).

8 PUBLIKATIONEN

Wahl-Schott, C., Baumann, L., Cuny, H., Eckert, C., **Griessmeier, K.**, Biel, M., Switching off calcium-dependent inactivation in L-type calcium channels by an autoinhibitory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006).

Griessmeier, K., Cuny, H., Rötzer, K., Griesbeck, O., Harz, H., Wahl-Schott, C. and Biel, M., Calmodulin is a functional regulator of Cav1.4 L-type Ca²⁺ channels, *J Biol Chem* (28. August 2009, Manuskript akzeptiert).

9 DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Biel bedanke ich mich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung der Arbeit und die stets offene Tür für Probleme und Fragen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott für die gute Betreuung, für die zahlreichen anregenden Diskussionen und die stete Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit. Vor allem möchte ich mich bei ihm für die fundierte Einarbeitung in die Elektrophysiologie und die gemeinsame Entdeckungsreise FRET bedanken. Danke, Christian, für aufbauende Worte, wenn sie nötig waren und Deinen grenzenlosen Optimismus.

Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an die Doktoren Hartmut Cuny, Ludwig Baumann und Christian Eckert für die Einarbeitung in die Grundlagen des molekularbiologischen Arbeitens und der Elektrophysiologie zu Beginn meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen zwei Lieblings-TAs Melanie Gebhard und Katrin Rötzer. Meli, danke für die Unterstützung am Anfang meiner Arbeit und Katrin, danke für den heißen Endspurt. Ohne Euch und Eure super Klonierungsarbeit hätte diese Arbeit wohl etwas länger gedauert...☺

Ich danke außerdem Dr. Hartmann Harz und John-Christian Eilert für ihre Unterstützung in Sachen FRET und die Bereitstellung ihres Messstandes.

Danke auch an Dr. Oliver Griesbeck für seine Unterstützung und die Überlassung einiger Vektoren.

Für das sehr gute Arbeitsklima und den meist recht lustigen Laboralltag danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern unseres Arbeitskreises. Ohne Euch hätte die Doktorarbeit nur halb so viel Spaß gemacht! An dieser Stelle auch danke an viele schöne, oft feucht-fröhliche, gemeinsame Erinnerungen: Partys, Grillfeste, Oktoberfestbesuche, Retreats...

Schön, dass ich neben den zwei Buchstaben mehr, auch das Glück hatte, die Bekanntschaft vieler netter Menschen zu machen und neue Freundschaften zu finden.

Danke der „bösen“ Heidi und ihrem Lugg für viele gemeinsame, lustige Unternehmungen wie z. B. unser Franken-We, meinen ersten 2000er, Open-Air-Kino-Besuche usw. Nach anfänglich zaghaften Beschnupperungsversuchen verband uns später zwar nicht mehr der Laboralltag, aber dafür viel mehr.

Danke, Ecki, für die sehr schöne gemeinsame Zeit in und außerhalb der Uni.

Verena, schön dass es Dich gibt. Unser meist konsequent durchgezogener wöchentlicher Schwimmtermin, gemeinsame Shopping-, See- und Kochaktionen haben immer viel Spaß gemacht!

Katrin, danke für die lustigen Singstar-Abende, die stets ausgezeichnete kulinarische Verwöhnung und vieles mehr. Du bist unschlagbar!

Steffi, schön, dass ich eine Verbündete in Sachen Mädchen-Kram hatte, bleib weiter dran ☺! Und auch wenn Du nicht im Acknowledgment stehst: Ein riesen Dank für Deine Hilfe beim JBC-Submitting-Marathon!

Elvir, danke für den tollen Bosnien-Abenteuer-Urlaub und dafür, dass ich mich immer auf Dich verlassen konnte. Prakti, danke für viele lustige Anekdoten. Michi, Du wirst bestimmt noch viele Gipfel erklimmen, also pass auf Dich auf! Christos und Andi, schön, dass wir uns noch kennengelernt haben.

Andi und Verena, vielen Dank für's Korrektur lesen.

Mein Dank geht außerdem an meine „alte“ Würzburger Mädelsgruppe: Anja, Bea, Beli und Tini! Schön, dass es Euch gibt und wir Freunde fürs Leben sind! Unsere gemeinsame Studienzeit wird mir immer unvergessen bleiben!

Last but not least danke ich meinen Eltern und meiner Schwester Kerstin, ohne deren Liebe und Unterstützung nichts von alledem möglich geworden wäre. Ihnen gehört ein ganz besonderer Platz in meinem Herzen.

10 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Kristina Maria Grießmeier
Geburtsdatum 03. Januar 1981
Geburtsort Roth
Staatsangehörigkeit : deutsch

Schule

09 / 87 - 06 / 91 Grunds chule, Georgensgmünd
09 / 91 - 06 / 00 Gymnasium Roth
Juni 2000 Abschluss Abitur

Studium

10 / 00 - 10 / 04 **Studium der Pharmazie**
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

04 / 03 **1. Staatsexamen**

10 / 04 **2. Staatsexamen**

Praktische Ausbildung

11 / 04 - 04 / 05 **Novartis Consumer Health**, München

05 / 05 - 10 / 05 **Franken-Apotheke**, Büchenbach

12 / 05 **3. Staatsexamen**

12 / 05 Erteilung der **Approbation als Apothekerin**

Wissenschaftliche Tätigkeit

01 / 06 – 12 / 09 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Doktorandin**
Ludwig-Maximilians-Universität München
Department Pharmazie
Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaften
Prof. Dr. Martin Biel