

**Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,  
Berlin-Buch**

**Direktor: Prof. Dr. med. Detlev Ganten**

**Interaktionen der  $\beta_2$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals mit der ionenleitenden  
 $\alpha_1\text{C}$ -Untereinheit und dem Riesenprotein Ahnak: Funktionelle Analyse und  
Charakterisierung von Bindungsdomänen**

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Grades Doctor rerum medicarum**

**des Fachbereichs**

**Humanmedizin**

**der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von Annette Hohaus**

**aus Berlin**

Referent: Prof. Dr. med. H.D. Schmidt

Korreferent: Priv.-Doz. Dr.T.D. Plant

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien  
Universität Berlin

Promoviert am: 17.05.2002

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
1.1	<b>Elektrophysiologische Eigenschaften spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle</b> .....	<b>7</b>
1.1.1	Struktur von L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanälen.....	<b>11</b>
1.1.2	Der kardiale L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal: Aufbau und Interaktionspartner.....	<b>12</b>
1.2	<b>Regulation des L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals durch die akzessorische β-Untereinheit</b> .....	<b>14</b>
1.2.1	Funktionelle Modulation der α1-Untereinheit durch das β-Protein.....	<b>14</b>
1.2.2	Rolle der β-Untereinheit beim Targeting des Kanalkomplexes zur Plasmamembran.....	<b>15</b>
1.3	<b>Charakterisierung von Ahnak</b> .....	<b>16</b>
1.4	<b>Interaktion zwischen der β2-Untereinheit des kardialen L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals und Ahnak</b> .....	<b>17</b>
1.5	<b>Fragestellung</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL und METHODEN</b> .....	<b>22</b>
2.1	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1.1	Zellkultur.....	<b>22</b>
2.1.2	Transiente Transfektion der HEK293-Zellen mit der β2a-Untereinheit...	<b>22</b>
2.2	<b>Elektrophysiologische Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.2.1	Grundlagen der Patch-Clamp-Technik.....	<b>23</b>
2.2.2	Aufbau des Patch-Clamp-Meßplatzes.....	<b>25</b>
2.2.3	Ableitung von Einzelkanalströmen in der Cell-Attached- und Inside-Out Konfiguration.....	<b>26</b>

<b>2.3 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.3.1 Präparation von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen.....	29
2.3.2 Herstellung der AID-Beads.....	29
2.3.3 Bindung der $\beta$ 2-Untereinheit an die AID-Beads.....	30
2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Transfer.....	30
2.3.5 Immunofärbung der Proteine nach dem Western-Transfer.....	31
2.3.6 Phosphorylierung der $\beta$ 2a-Fusionsproteine.....	32
2.3.7 Overlay-Bindungsversuche.....	32
2.3.8 Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Pull-Down-Assay.....	33
<b>2.4 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.4.1 Präparation von DNA für die Klonierung in den pGEX-Vektor.....	33
2.4.2 Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
2.4.3 Klonierung von cDNA-Abschnitten in den Fusionsvektor pGEX-4T1.....	35
2.4.4 Transformation von kompetenten E.coli-Zellen (DH5 $\alpha$ ).....	36
2.4.5 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	37
2.4.6 Expression von GST-Fusionsproteinen.....	38
2.4.7 Isolierung und Reinigung der Fusionsproteine aus den Bakterienzellen.....	39
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1 Die Modulation der <math>\alpha</math>1C-b-Untereinheit des glattmuskulären L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals durch das <math>\beta</math>2a-Protein: Rolle der <math>\alpha</math>1-Interaktionsdomäne (AID)</b> .....	<b>40</b>
3.1.1 Die $\beta$ 2a-Untereinheit steigert die Offenwahrscheinlichkeit der $\alpha$ 1C-b-Kanäle.....	40
3.1.2 Das synthetische AID-Peptid bindet an die native $\beta$ 2-Untereinheit und antagonisiert die Bindung zwischen $\alpha$ 1C- und $\beta$ 2-Untereinheit.....	46
3.1.3 Die Applikation des AID-Peptids blockiert die $\alpha$ 1C-b- $\beta$ 2a-Interaktion.....	48
<b>3.2 Die Interaktion der <math>\beta</math>2a-Untereinheit des kardialen L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals mit Ahnak</b> .....	<b>50</b>
3.2.1 Die C-terminalen 382-Aminosäuren (Ahnak-C2) von Ahnak binden an die $\beta$ 2a-Untereinheit.....	51
3.2.2 Die $\alpha$ 1C-Untereinheit und Ahnak besetzen unterschiedliche Bindungsstellen auf der $\beta$ 2a-Untereinheit.....	53

3.2.3	Die $\beta$ 2a-Untereinheit besitzt zwei Bindungsstellen für Ahnak-C2.....	54
3.2.4	Die $\beta$ 2a-Untereinheit bindet zwei Ahnak-C2-Moleküle mit unterschiedlichen Affinitäten.....	56
3.2.5	Native $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalkomplexe interagieren mit Ahnak-C2 .....	58
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung des Schaltverhaltens des glattmuskulären L-Typ-<math>\text{Ca}^{2+}</math>-Kanals: Rolle der <math>\alpha</math>1-Interaktionsdomäne (AID) als Target des <math>\beta</math>-Proteins in der Kanalmodulation</b> .....	<b>60</b>
4.1.1	Die $\beta$ 2a-Untereinheit kontrolliert das schnelle Schaltverhalten ( $P_o$ ) der $\alpha$ 1C-b-Untereinheit.....	60
4.1.2	Das $\beta$ -Protein moduliert den $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal über die Bindung zur $\alpha$ 1-Interaktionsdomäne (AID).....	62
<b>4.2</b>	<b>Interaktion zwischen Ahnak und der <math>\beta</math>2-Untereinheit des kardialen L-Typ-<math>\text{Ca}^{2+}</math>-Kanals: Lokalisation von Interaktionsstellen und Charakterisierung der Bindungseigenschaften</b> .....	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	

## Abkürzungen

AID	$\alpha$ 1-Interaktionsdomäne
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BID	$\beta$ -Interaktionsdomäne
BrCN	Bromcyanosepharose
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD8	T-Cytotoxic/ Suppressor
CHAPS	Cholamidopropyltrimethylammoniumpropansulfonsäure
DHP	Dihydropyridin
DPM	Zerfall pro Minute
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GST	Glutathion-S-Transferase
HVA	High-Voltage-Activated
i	Einzelkanalamplitude
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kd	Dissoziationskonstante
LVA	Low-Voltage-Activated
N	Anzahl aktiver Kanäle
N·Po	Mittlere Anzahl der offenen Kanäle ( $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalaktivität )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Patch	Membranbereich unter der Mikropipette/ Patchpipette
Patchpipette	Glaspipette, über die der Kontakt zur Zelle hergestellt wird
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	$\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Po	Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle
Ps	Verfügbarkeit der Kanäle
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S.E.M	Standard Error of Mean
SH3	Src-Homologie-Domäne
TBS	Tris-Buffered-Saline
TBST	Tris-Buffered-Saline + Tween 20
TEACl <sub>2</sub>	Tetraethylammoniumchlorid
WGA-Sepharose	Wheat Germ Agglutinin-Sepharose

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die  $\beta 2a$ -Untereinheit stellt das Verbindungsprotein zwischen der ionenleitenden  $\alpha 1C$ -Untereinheit des L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanals und dem Riesenprotein Ahnak ( $\sim 700$  kDa) dar. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der funktionelle Einfluß der  $\beta 2a$ -Untereinheit auf die Kanalmodulation des  $\alpha 1C$ -b-Proteins als auch die Interaktion zwischen Ahnak und der  $\beta 2a$ -Untereinheit studiert.

Die funktionellen Untersuchungen erfolgten am Expressionssystem (Human Embryonic Kidney Cells) mit klonierten Kanalproteinen auf Einzelkanalebene. Die Koexpression der  $\beta 2a$ -Untereinheit führte einerseits zu einer erhöhten Insertion von  $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanälen in die Plasmamembran und andererseits zu einer signifikanten Erhöhung (3-fachen) der Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) der glattmuskulären  $\alpha 1C$ -b-Kanäle, die mit dem Auftreten von sehr langlebigen Kanalöffnungen (Offenzeit  $> 10$  ms) verbunden war. Dieser starke Wechsel im schnellen Schaltverhalten von  $\alpha 1C$ -b-Kanälen durch die  $\beta 2a$ -Untereinheit wurde sowohl in der Cell-Attached- als auch in der Inside-Out-Konfiguration erhalten.

Die Beeinflussung der Interaktion beider Kanaluntereinheiten erfolgte mit Hilfe eines synthetischen Peptids, das die  $\alpha 1$ -Interaktionsdomäne (AID) auf der  $\alpha 1C$ -Untereinheit imitiert. *In vitro* Bindungsversuche mit dem AID-Peptid bestätigten eine spezifische Affinität zur nativen  $\beta 2$ -Untereinheit. Die Applikation des AID-Peptids ( $10 \mu M$ ) auf die zytoplasmatische Seite von Inside-Out-Patches verursachte einen drastischen Wechsel im schnellen Schaltverhalten der  $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanäle, indem die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) und die für die  $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanäle charakteristischen Fraktionen von sehr langlebigen Kanalöffnungen signifikant reduziert wurden. Das Peptid induzierte einen Wechsel im schnellen Schaltverhalten der  $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ - Kanäle, der mit der Aufhebung der  $\beta 2a$ -abhängigen Kanalmodulation übereinstimmte und mit dem Schaltverhalten der  $\alpha 1C$ -b-Kanäle vergleichbar war. Das AID-Peptid übte weder einen Effekt auf die Funktion von  $\alpha 1C$ -b-Kanälen aus, noch wurde mit einem entsprechenden Kontroll-Peptid ein verändertes Schaltverhalten der  $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanäle beobachtet.

Die Ergebnisse demonstrieren die Reversibilität der  $Ca^{2+}$ -Kanalmodulation durch die  $\beta 2$ -Untereinheit und lassen die Aufhebung der  $\alpha 1C$ - $\beta 2$ -Interaktion als möglichen Mechanismus der Kanalregulation erscheinen. Einen wichtigen Angriffspunkt für die gezielte

Beeinflussung der Kanalaktivität stellt die AID dar, wobei das synthetische AID-Peptid eine Möglichkeit bietet, die *in vivo* Modulation von L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanälen zu modifizieren.

Die Identifikation und Charakterisierung von Interaktionsstellen zwischen der kardialen  $\beta$ 2-Untereinheit und dem hochmolekularen Protein Ahnak erfolgte mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen. Overlay-Bindungsexperimente wie auch Sedimentations-Gleichgewichts-Analysen demonstrierten eindeutig, daß Ahnak spezifisch und mit hoher Affinität über seine C-terminalen 382-Aminosäuren (Ahnak-C2, AS 5262-5643) an die  $\beta$ 2a-Untereinheit bindet. In der  $\beta$ 2a-Untereinheit wurden zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten ( $K_{d1}=53$  nM,  $K_{d2}=212$  nM) für Ahnak-C2 nachgewiesen. Mit trunkierten  $\beta$ 2a-Proteinen, die jeweils eine der beiden für die  $\beta$ 2-Untereinheit bekannten konservierten Domänen enthielt, zeigte sich, daß die hochaffine Bindungsstelle für Ahnak-C2 in der C-terminalen Region ( $\beta$ 2a-C,  $K_d=55$  nM) und die niederaffine Bindungsstelle in der N-terminalen Region ( $\beta$ 2a-N,  $K_d=328$  nM) der  $\beta$ 2a-Untereinheit lokalisiert ist.

Desweiteren konnte aus nativem Herzhomogenat mit Hilfe von Ahnak-C2-Beads die  $\alpha$ 1C-Untereinheit über ihre Interaktion mit der  $\beta$ 2-Untereinheit angereichert werden. Dies traf in gleicher Weise für die Skelettmuskel  $\alpha$ 1S-Untereinheit zu, die mit den Ahnak-C2-Beads über die Interaktion mit ihrer korrespondierenden  $\beta$ 1a-Untereinheit aus dem Skelettmuskelhomogenat angereichert wurde. Diese Ergebnisse verdeutlichen einerseits, daß die Bindung von Ahnak-C2 nicht nur auf die kardiale  $\beta$ 2-Isoform beschränkt ist, sondern konservierte Bindungsstellen -zumindest in den beiden untersuchten  $\beta$ -Untereinheiten- die Interaktion mit Ahnak-C2 vermitteln. Andererseits demonstrieren die Ergebnisse, daß die  $\beta$ -Untereinheit die  $\alpha$ 1-Untereinheit und Ahnak-C2 über voneinander verschiedene Bindungsdomänen bindet.

Auch wenn die physiologische Bedeutung der Interaktion zwischen der  $\beta$ 2-Untereinheit des L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals und Ahnak noch nicht geklärt ist, so liefern die Ergebnisse einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der molekularen Details dieser Interaktion. Die  $\beta$ 2-Untereinheit besitzt eine Schlüsselstellung in dem Proteinkomplex aus ionenleitender und spannungsabhängiger  $\alpha$ 1C-Untereinheit des L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanals und dem hochmolekularen Phosphoprotein Ahnak. Sie verbindet externe Signale über Änderungen des



Membranpotentials mit internen Signaltransduktionswegen, wobei wahrscheinlich weitere Bindungspartner in den Proteinkomplex einbezogen sind.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann MD, Clapham D. (1997): Ion channels- basic science and clinical disease, *New England Journal Medicine*. 336: 1575-86

Bean B. (1990): Calcium channels. Gating for the physiologist, *Nature*. 348: 192-3

Behlke J, Ristau O, Schonfeld HJ. (1997): Nucleotide-dependent complex formation between the *Escherichia coli* chaperonins GroEL and GroES studied under equilibrium conditions, *Biochemistry*. 36: 5149-56

Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. (2000): The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit, *Neuron*. 25: 177-90

Bichet D, Lecomte C, Sabatier JM, Felix R, De Waard M. (2000): Reversibility of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha(1)-beta subunit interaction, *Biochem Biophys Res Commun*. 277: 729-35.

Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stuhmer W, Flockerzi V, Hofmann F. (1990): Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett*. 69: 409-12

Campbell DL, Strauss HC. (1995): Regulation of calcium channels in the heart, *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 30: 25-88

Castellano A, Perez-Reyes E. (1994): Molecular diversity of Ca<sup>2+</sup> channel beta subunits, *Biochem Soc Trans*. 22: 483-8

Catterall WA. (2000): Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels, *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16: 521-55

Chien AJ, Zhao X, Shirokov RE, Puri TS, Chang CF, Sun D, Rios E, Hosey MM. (1995): Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca<sup>2+</sup> channels, *J Biol Chem*. 270: 30036-44

Chien AJ, Gao T, Perez-Reyes E, Hosey MM. (1998): Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the beta 2a subunit. *J Biol Chem*. 273: 23590-7

Collin T, Wang JJ, Nargeot J, Schwartz A. (1993): Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel beta subunit from normal human heart, *Circ Res*. 72: 1337-44

Costantin J, Noceti F, Qin N, Wei X, Birnbaumer L, Stefani E. (1998): Facilitation by the beta2a subunit of pore openings in cardiac Ca<sup>2+</sup> channels, *J Physiol*. 507: 93-103

- De Waard M, Campbell KP. (1995): Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca<sup>2+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes, *J Physiol.* 485: 619-34
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. (1994): Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain, *Neuron.* 13: 495-503
- De Waard M, Scott VE, Pragnell M, Campbell KP. (1996): Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, *FEBS Lett.* 380: 272-6
- De Waard M, Witcher DR, Pragnell M, Liu H, Campbell KP. (1996): Properties of the alpha1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem.* 270: 12056-64
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. (2000): Nomenclature of voltage-gated calcium channels, *Neuron.* 25: 533-5
- Gao T, Puri TS, Gerhardstein BL, Chien AJ, Green RD, Hosey MM. (1997): Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylatcyclase in cardiac myocytes, *J Biol Chem.* 272: 19401-7
- Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD, Hosey MM. (1997): cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits, *Neuron.* 19: 185-96
- Gao T, Chien AJ, Hosey MM. (1999): Complexes of the alpha1C and beta subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels, *J Biol Chem.* 274: 2137-44
- Gao T, Hosey MM. (2000): Association of L-type calcium channels with a vacuolar H(+)-ATPase G2 subunit, *Biochem Biophys Res Commun.* 277: 611-6
- Gentil BJ, Delphin C, Mbele GO, Deloulme JC, Ferro M, Garin J, Baudier J. (2001): giant protein ahnak is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein. Potential implications for Ca<sup>2+</sup>-homeostasis regulation by S100B, *J Biol Chem.* 276: 23253-61
- Gerhardstein BL, Gao T, Bunemann M, Puri TS, Adair A, Ma H, Hosey MM. (2000): Proteolytic processing of the C terminus of the alpha1C subunit of L-type calcium channels and the role of a proline-rich domain in membrane tethering of proteolytic fragments, *J Biol Chem.* 275: 8556-63
- Gerster U, Neuhuber B, Groschner K, Striessnig J, Flucher BE. (1999): Current modulation and membrane targeting of the calcium channel alpha1C subunit are

independent functions of the beta subunit, *J Physiol.* 517: 353-68.

Gollasch M, Nelson MT. (1997): Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in arterial smooth muscle cells, *Kidney Blood Press Res.* 20: 355-71

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol.* 36: 59-74

Haase H, Striessnig J, Holzhauser M, Glossmann H. (1991): A rapid procedure for the purification of cardiac 1,4- dihydropyridine receptors from porcine heart, *Eur J Pharmacol.* 207: 51-59

Haase H, Karczewski P, Beckert R, Krause EG. (1993): Phosphorylation of the L-type calcium channel beta subunit is involved in beta-adrenergic signal transduction in canine myocardium, *FEBS Lett.* 335: 217-22

Haase H, Kresse A, Hohaus A, Schulte HD, Maier M, Osterziel KJ, Lange PE, Morano I. (1996): Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium, *J Mol Med.* 74: 99-104

Haase H, Podzuweit T, Lutsch G, Hohaus A, Kostka S, Lindschau C, Kott M, Kraft R, Morano (1999): Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK, *FASEB J.* 13: 2161-72

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflugers Arch.* 391: 85-100

Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol.* 166: 557-80

Hashimoto T, Amagai M, Parry DA, Dixon TW, Tsukita S, Tsukita S, Miki K, Sakai K, Inokuchi Y, Kudoh J. (1993): Desmoyokin, a 680 kDa keratinocyte plasma membrane-associated protein, is homologous to the protein encoded by human gene AHNAK, *J Cell Sci.* 105: 275-86

Hashimoto T, Gamou S, Shimizu N, Kitajima Y, Nishikawa T. (1995): Regulation of translocation of the desmoyokin/AHNAK protein to the plasma membrane in keratinocytes by protein kinase, C. *Exp Cell Res.* 217: 258-66

Hess P, Lansman JB, Tsien RW. (1984): Different modes of  $\text{Ca}^{2+}$  channel gating behaviour favoured by dihydropyridine C a agonists and antagonists, *Nature.* 311: 538-44

Hieda Y, Tsukita S, Tsukita S. (1989): A new high molecular mass protein showing unique localization in desmosomal plaque, *J Cell Biol.* 109: 1511-8

- Hoffman EP, Brown RH J, Kunkel LM. (1987): Dystrophin the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus, *Cell*. Dec 51: 919-28
- Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. (1999): Voltage-dependent calcium channels: from structure to function, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 139: 33-87
- Hosey M, Chien AJ, Puri TS. (1996): Structure and regulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, Elsevier Science Inc.6 (8): 265-72
- Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V. (1992): Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain, *EMBO J*. 11: 885-90
- Kameyama A, Shearman MS, Sekiguchi K, Kameyama M. (1996): Cyclic AMP-dependent protein kinase but not protein kinase C regulates the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channel through phosphorylation of its alpha1 subunit, *J Biochem. (Tokyo)* 120: 170-6
- Kamp TJ, Perez-Garcia MT, Marban E. (1996): Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel beta 1A subunit with alpha 1C subunit in a human embryonic kidney cell line, *J Physiol*. 492: 89-96
- Kamp TJ, Hell JW. (2000): Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C, *Circ Res*. 87: 1095-102
- Keller TC. (1995): Structure and function of titin and nebulin, *Curr Opin Cell Biol*. 7: 32-8
- Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F. (1999): Molecular diversity of the calcium channel alpha 2 delta subunit, *J Neurosci*. 19: 684-91
- Kudoh J, Wang Y, Minoshima S, Hashimoto T, Amagai M, Nishikawa T, Shtivelman E, Bishop JM, Shimizu N. (1995): Localization of the human AHNAK/desmoyokin gene (AHNAK) to chromosome band 11q12 by somatic cell hybrid analysis and fluorescence in situ hybridization, *Cytogenet Cell Genet*. 70: 218-20
- Labeit S, Barlow DP, Gautel M, Gibson T, Holt J, Hsieh CL, Francke U, Leonard K, Wardale J, Whiting A. (1990): A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin, *Nature*. 345: 273-6
- Laemmli UK. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227: 680-5
- Lowry OH, Roesbrough NJ, Randall RJ. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem*. 193: 265-257

- Meyers MB, Puri TS, Chien AJ, Gao T, Hsu PH, Hosey MM, Fishman GI. (1998): Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, *J Biol Chem.* 273: 18930-5
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. (1989): Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel, *Nature.* Jul 340: 230-3.
- Morel N, Buryi V, Feron O, Gomez JP, Christen MO, Godfraind T. (1998): The action of calcium channel blockers on recombinant L-type calcium channel  $\alpha$ 1-subunits, *Br J Pharmacol.* 125: 1005-12
- Mullis KB, Faloona FA. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.* 155: 335-50
- Neher E, Sakmann B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, *Nature.* 260: 799-802
- Neher E, Sakmann B. (1992): The patch clamp technique, *Sci Am.* 266: 44-51
- Nie Z, Ning W, Amagai M, Hashimoto T. (2000): C-Terminus of desmoyokin/AHNAK protein is responsible for its translocation between the nucleus and cytoplasm, *J Invest Dermatol.* 114: 1044-9
- Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp-Technik, Spektrum Verlag, Berlin 1996
- Parent L, Schneider T, Moore CP. (1997): Subunit regulation of the human brain  $\alpha$ 1E calcium channel, *J Memb Biol.* 160: 127-40
- Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda AE, Wei XY, Birnbaumer L. (1992): Nucleotide Cloning and expression of a cardiac/brain beta subunit of the L-type calcium channel, *J Biol Chem.* 267: 1792-7
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT. (1999): Calmodulin is the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels, *Neuron.* 22: 549-58
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. (1994): Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit, *Nature.* 368: 67-70
- Reimer D, Huber IG, Garcia ML, Haase H, Striessnig J. (2000): Beta subunit heterogeneity of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in smooth muscle tissues, *FEBS Lett.* 467: 65-9
- Romanin C, Grosswagen P, Schindler H. (1991): Calpastatin and nucleotides stabilize cardiac calcium channel activity in excised patches, *Plügers Arch.* 418, 86-92
- Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW. (1993): Distinctive

biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha subunits. *Neuron*, 11: 291-303

Schuhmann, Klaus: Regulation von glattmuskulären L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, Dissertation, Graz 1995

Sekiya F, Bae YS, Jhon DY, Hwang SC, Rhee SG. (1999): AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C-gamma1 in the presence of arachidonic acid, *J Biol Chem*. 274: 13900-7

Shistik E, Ivanina T, Puri T, Hosey M, Dascal N. (1995):  $\text{Ca}^{2+}$  current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha1 protein level, *J Physiol*. 489: 55-62

Shistik E, Ivanina T, Blumenstein Y, Dascal N. (1998): Crucial role of N terminus in function of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel and its modulation by protein kinase C, *J Biol Chem*. 273: 17901-9

Shtivelman E, Cohen FE, Bishop JM. (1992): A human gene (AHNAK) encoding an unusually large protein with a 1.2-microns polyionic rod structure, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 5472-6

Shtivelman E, Bishop JM. (1993): The human gene AHNAK encodes a large phosphoprotein located primarily in the nucleus, *J Cell Biol*. 120: 625-30

Striessnig. (1999): Structure and function of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, *Cell J. Pharmacology* 9: 242-69

Tareilus E, Roux M, Qin N, Olcese R, Zhou J, Stefani E, Birnbaumer L. (1997): A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 1703-8

Trautwein W, Cavalie A, Allen TJ, Shuba YM, Pelzer S, Pelzer D. (1990): Direct and indirect regulation of cardiac L-type calcium channels by beta-adrenoreceptor agonists, *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 24: 45-50

Walker D, Bichet D, Campbell KP, De Waard M. (1998): A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel alpha 1A subunit, *J Biol Chem*. 273: 2361-7

Walker D, Bichet D, Geib S, Mori E, Cornet V, Snutch TP, Mori Y, De Waard M. (1999): A new beta subtype-specific interaction in alpha1A subunit controls P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation, *J Biol Chem*. 274: 12383-90

Wang K. (1996): Titin/connectin and nebulin: giant protein rulers of muscle structure and function, *Adv Biophys*. 33: 123-34

Weiner M, Anderson C, Jerpseth B, Wells S, Johnson-Browne B. (1994): Strategies. 7: 41-43

Whyman, J. and Gill, S. J. (1990) Binding and Linkage, University Science Books.

Wiser O, Trus M, Hernandez A, Renstrom E, Barg S, Rorsman P, Atlas D. (1999): The voltage sensitive Lc-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel is functionally coupled to the exocytotic machinery, Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 248-53

Witcher DR, De Waard M, Liu H, Pragnell M, Campbell KP. (1995): Association of native  $\text{Ca}^{2+}$  channel beta subunits with the alpha 1 subunit interaction domain, J Biol Chem. 270: 18088-93

Yamaguchi H, Hara M, Strobeck M, Fukasawa K, Schwartz A, Varadi G. (1998): Multiple modulation pathways of calcium channel activity by a beta subunit. Direct evidence of beta subunit participation in membrane trafficking of the alpha1C subunit, J Biol Chem. 273:19348-56

Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. (1995): The S100 protein family: history, function, and expression, Brain Res Bull. 37: 417-29



## Veröffentlichungen

Submitted:

**Hohaus, A.**, Person, V., Behlke, J., Schaper, J., Morano, I., Haase, H. The C-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and the actin-based cytoskeleton. FASEB

Submitted:

Haase, H., **Hohaus, A.**, Ritter, O., Pieske, B., Pfitzmaier, B., Striessnig, J., Schulte, H.D., Morano, I. Molecular characterization of the human  $\text{Ca}^{2+}$  channel in normal heart and in patients with cardiomyopathies. J. Mol. Medicine

**Hohaus, A.**, Poteser, M., Romanin, C., Klugbauer, N., Hofmann, F., Morano, I., Haase, H., Groschner, K. Modulation of the smooth-muscle L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha 1$  subunit ( $\alpha 1C$ -b) by the  $\beta 2a$  subunit: a peptide which inhibits binding of  $\beta$  to the I-II linker of  $\alpha 1$  induces functional uncoupling. (2000) Biochem. J. 348, 657-65

Haase, H., Podzuweit, T., Lutsch, G., **Hohaus, A.**, Kostka, S., Lindschau, C., Kott, M., Kraft, R., Morano, I. Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK. FASEB J. (1999) 13, 2161-72

Luther, H.P., Haase, H., **Hohaus, A.**, Beckmann, G., Reich, J., Morano, I. Characterization of naturally occurring myosin heavy chain antisense mRNA in rat heart. (1998) J. Cell. Biochem. 70, 110-20

Haase, H., Kresse, A., **Hohaus, A.**, Schulte, H.D., Maier, M., Osterziel, K.J., Lange, P.E., Morano, I. Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium. (1996) J. Mol. Medicine 74, 99-104,

## **Danksagung**

Diese Arbeit entstand am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. I. Morano des Bereichs Molekulare Muskelphysiologie.

Prof. Dr. Ingo Morano gilt als Initiator dieser Arbeit mein besonderer Dank. Seine wertvollen Ratschläge und konstruktiven Kritiken waren unverzichtbare Hilfen bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. Hannelore Haase, die mich wissenschaftlich betreute, möchte ich mich für die zahlreichen Ideen, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre wertvollen Hinweise, die zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beitrugen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. H.D. Schmidt, Freie Universität Berlin, danke ich für die Übernahme meiner Doktorarbeit.

Die Patch-Clamp-Experimente habe ich bei Prof. Dr. Klaus Groschner an der Universität Graz durchgeführt. Ich bin ihm zu großem Dank verpflichtet und möchte ihm für seine Unterstützung sowie seine wertvollen Ratschlägen bedanken. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Michael Poteser, Universität Graz, für seine Hilfe und Unterstützung bei der Bearbeitung des gemeinsamen Projekts bedanken.

Herrn Prof. Dr. Behlke (MDC-Berlin) danke ich für seine wertvollen Hinweise, die über das Thema Protein-Protein-Interaktionen weit hinausreichten und natürlich für die Durchführung der Sedimentations-Gleichgewichtsanalysen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Christel Kemsies für ihre Unterstützung und ihr Engagement während gemeinsamer Arbeiten.