

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Modulation der $\alpha 1C$ -b-Untereinheit des glattmuskulären L-Typ- Ca^{2+} -Kanals durch das $\beta 2a$ -Protein: Rolle der $\alpha 1$ -Interaktionsdomäne (AID)

Die funktionellen Untersuchungen zum Studium der $\beta 2a$ -abhängigen Kanalmodulation auf die glattmuskuläre $\alpha 1C$ -b-Untereinheit wurden am heterologen Expressionssystem mit klonierten Kanalproteinen durchgeführt. Dazu erfolgte die Expression der Kanalproteine in einer Zelllinie, die natürlicherweise nicht über diese Proteine verfügt. Die Zellen translatieren die über stabile bzw. transiente Transfektion eingebrachte cDNA und bauen funktionelle Ionenkanäle in ihre Zellmembran ein. In dieser Arbeit kamen HEK-293 Zellen (Human Embryonic Kidney Cells) zum Einsatz, die stabil die glattmuskuläre Spleißvariante des kardialen $\alpha 1C$ -Gens ($\alpha 1C$ -b) exprimierten. Für die Untersuchung der β -abhängigen Kanalmodulation wurden die Zellen transient mit cDNA des kardialen $\beta 2a$ -Gens und mit der cDNA des CD8-Rezeptors kotransfiziert. Die Expression des CD8-Antigens diente als Marker zum Nachweis der positiv transfizierten Zellen. Diese wurden mit CD8-Antikörper-Beads visuell erfaßt. Die Transfektionseffizienz lag durchschnittlich zwischen 40 und 50 %.

3.1.1 Die $\beta 2a$ -Untereinheit steigert die Offenwahrscheinlichkeit der $\alpha 1C$ -b-Kanäle

Charakterisierung der Kanalmodulation in der Cell-Attached-Konfiguration

Die Ableitung von L-Typ- Ca^{2+} -Strömen erfolgte zunächst in der Cell-Attached-Konfiguration („On-Cell“). Zur Aktivierung der Kanäle wurden Depolarisationssprünge von -70 mV (Haltepotential) auf 0 mV in einer Dauer von 500 ms auf die Zelle appliziert. Auffällig war, daß die mit der $\beta 2a$ koexprimierten Zellen in der Mehrheit der Experimente eine erhöhte Anzahl von funktionellen Kanälen ($4 \pm 0,3$ Kanäle, $n=20$) im Patch den Zellen gegenüber aufwiesen, die nur die $\alpha 1C$ -b-Kanäle exprimierten ($2 \pm 0,4$ Kanäle, $n=15$). Offensichtlich kam es ohne die $\beta 2a$ -Untereinheit zu einer verminderten Inkorporation funktioneller Kanäle in die Zellmembran.

Für die Charakterisierung des Schaltverhaltens von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen wurde die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) und die Verfügbarkeit (P_s) bestimmt. Die Analyse verdeutlicht,

daß die Koexpression der $\beta 2a$ -Untereinheit zu einer signifikant erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der individuellen Kanäle führte (Tab. 2). Das bedeutet, während einer Depolarisation war der zeitliche Anteil, in dem sich ein $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanal im offenen Zustand befand, auf das Dreifache gegenüber dem eines $\alpha 1C$ -b-Kanals erhöht. Die Datenanalyse verdeutlicht, daß die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit (P_o) der koexprimierten Kanäle mit einer signifikanten Erhöhung der durchschnittlichen Offenzeit assoziiert war (Tab. 2). Im Gegensatz dazu wurde die Verfügbarkeit (P_s) der Kanäle durch die Expression der $\beta 2a$ -Untereinheit nicht signifikant beeinflusst (Tab. 2).

Die Kinetik eines Ionenkanals läßt sich durch die Bestimmung der Offenzeitverteilungen genauer beschreiben. Die Ableitung der Offenzeitverteilungen sowie die Berechnung der Zeitkonstanten ist auf Messungen limitiert, die im Patch einen einzigen Kanal enthalten. Abbildung 7 zeigt dieser Voraussetzung entsprechende Einzelkanalaufzeichnungen von $\alpha 1C$ -b- und $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanälen. Der obere Teil der Abbildung demonstriert stellvertretend für das kinetische Schema des jeweiligen Kanals konsekutive Stromregistrierungen. In den beiden unteren Diagrammen sind die Offenzeitkonstanten ($\tau 1$ - $\tau 3$) und die dazugehörigen Anteile ($P1$ - $P3$), die der Kanal in der entsprechenden Offenzeit zugebracht hat, wiedergegeben. Beide Kanäle sind durch 2 Offenzustände mit einer kurzen ($\tau 1$, Mode-1 Verhalten) und einer langen Offenzeit ($\tau 2$, Mode-2 Verhalten) gekennzeichnet. Der $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanal erreichte im Mode 2 eine Zeitkonstante von 14,79 ms, die im Gegensatz zur Zeitkonstante des $\alpha 1C$ -b-Kanals ($\tau 2=3,63$ ms) auf das Vierfache erhöht war. Darüberhinaus schaltete der $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanal in einen besonders langlebigen Offenzustand ($\tau > 10$ ms), der von den $\alpha 1C$ -b-Kanälen nicht erreicht wurde. Die Zeitkonstante dieses Offenzustandes ($\tau 3$) betrug 48,21 ms und der Anteil, den der Kanal in diesem Offenzustand verbrachte, lag bei 10 %. Besonders langlebige Offenzustände wurden ausschließlich an den Kanälen der Zellen detektiert, die die $\beta 2a$ koexprimierten. Der durchschnittliche Anteil dieser Offenzustände betrug $35 \pm 11,4$ %, ($n=10$), (Tab. 2). Die Größe der Einzelkanalamplitude veränderte sich durch die Koexpression der $\beta 2a$ -Untereinheit nicht.

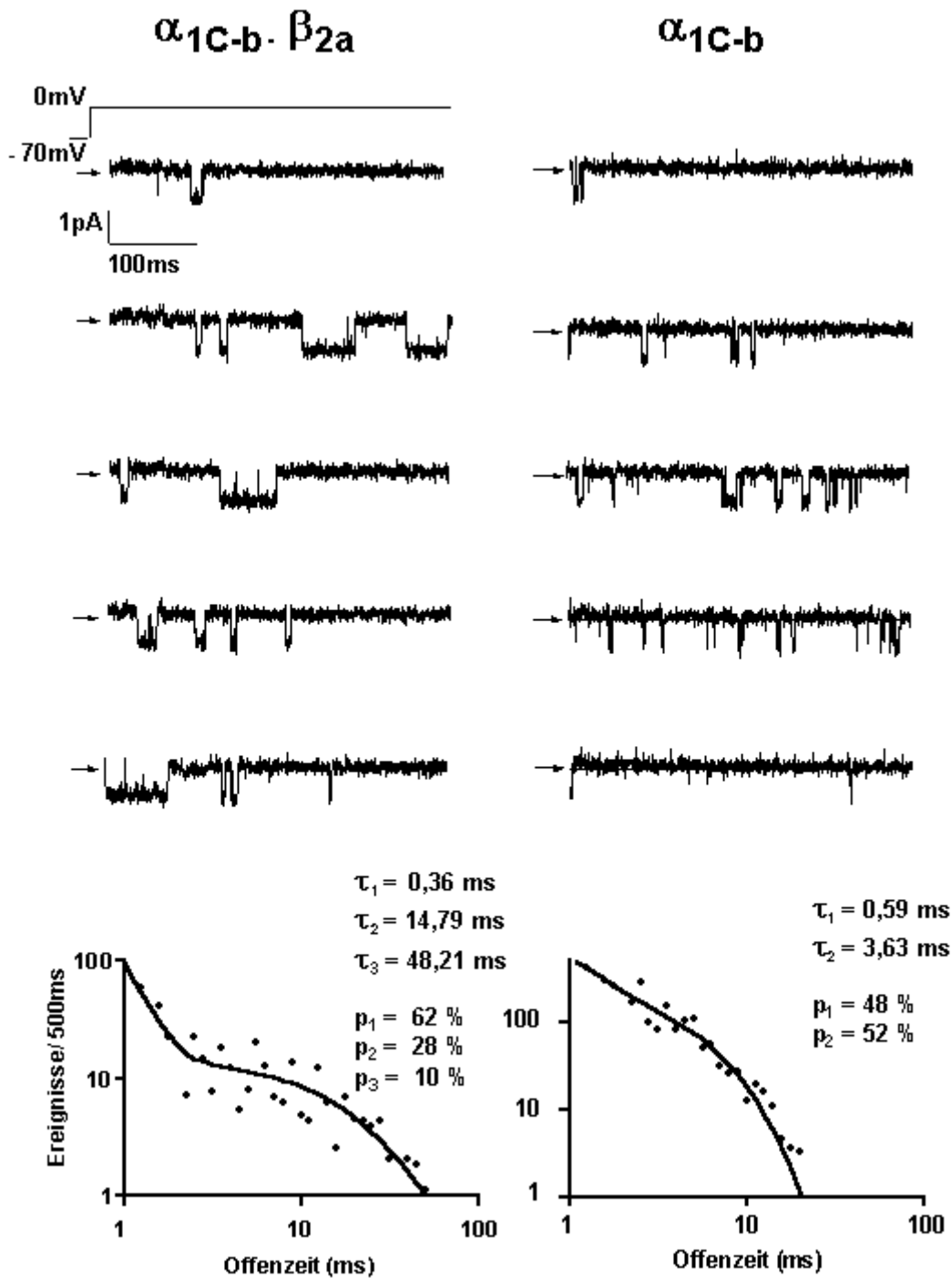


Abb. 7: Die β_{2a} -Untereinheit erhöht die Offenwahrscheinlichkeit der α_{1C-b} -Kanäle in der Cell-Attached-Konfiguration. Oben: Konsekutive Stromregistrierungen der α_{1C-b} - und $\alpha_{1C-b}\beta_{2a}$ -Kanäle. Die Pfeile markieren den geschlossenen Kanalzustand. Unten: Die Verteilung der Offenzeiten. Die Offenzeitkonstanten (τ_1 - τ_3) mit den zugehörigen Wahrscheinlichkeiten (P_1 - P_3) der entsprechenden Offenzustände sind angegeben.

	Po (%)	Ps (%)	durchschnittliche Offenzeit (ms)	Anteil von besonders langlebigen Öffnungen ($\tau > 10\text{ms}$)
<i>Cell-Attached</i>				
$\alpha 1\text{C-b}$ (n = 5-7)	3,3 \pm 0,7	42,2 \pm 8,2	2,3 \pm 0,3	nicht detektierbar
$\alpha 1\text{C-b}\cdot\beta 2\text{a}$ (n = 10)	11,1 \pm 1,9*	48,3 \pm 2,2	9,3 \pm 2,2*	35,0 \pm 11,4
<i>Inside-Out</i>				
$\alpha 1\text{C-b}$ (n = 8)	3,6 \pm 1,0	50,1 \pm 2,2	3,5 \pm 0,4	6,0 \pm 4,5
$\alpha 1\text{C-b}\cdot\beta 2\text{a}$ (n = 8-10)	7,3 \pm 0,7*	56,9 \pm 2,5	6,2 \pm 1,0*	15,1 \pm 5,1

Tab. 2: Effekte der $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit auf das Schaltverhalten der $\alpha 1\text{C-b}$ -Kanäle. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm S.E.M. für die ausgewiesene Anzahl von Experimenten (n) in der Cell-Attached- und Inside-Out-Konfiguration angegeben. Statistische Signifikanz wird durch einen Stern gekennzeichnet.

Charakterisierung der Kanalmodulation in der Inside-Out-Konfiguration

Das Kanalverhalten des glattmuskulären Ca^{2+} -Kanals wurde desweiteren in der Inside-Out-Konfiguration, also am isolierten Patch studiert. L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle unterliegen nach Bildung eines Inside-Out-Patches einem irreversiblen Verlust der Ca^{2+} -Kanalaktivität („Run Down“). Welche Mechanismen für den Run Down verantwortlich sind, ist bislang ungeklärt. Die Stabilisierung der Kanalaktivität gelingt jedoch mit einer Calpastatin- und ATP-haltigen Lösung (Romanin 1991). Für die Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle im isolierten Patch wurde dasselbe Spannungsprotokoll wie in der Cell-Attached-Konfiguration (Depolarisationen von -70 mV auf 0 mV) verwendet. Unterschiede im Schaltverhalten zwischen $\alpha 1\text{C-b}\cdot\beta 2\text{a}$ - und $\alpha 1\text{C-b}$ -Kanälen zeigten sich erneut und in vergleichbarer Weise. Die Koexpression der $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit führte zu einer signifikanten (zweifachen) Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit ($P_o=7,3\pm 0,7$ ms) der Kanäle im Vergleich zu den $\alpha 1\text{C-b}$ -Kanälen ($P_o=3,6\pm 1,0$ ms), (Tab. 2). Die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit war mit einer signifikanten Verlängerung der durchschnittlichen Offenzeiten verbunden (Tab. 2). Ein Unterschied in der

Verfügbarkeit (P_s) der Kanäle wurde nicht registriert. Die Offenzeiten verteilten sich ähnlich wie bei den Cell-Attached-Ableitungen. In diesen Experimenten wurden an Kanälen kotransfizierter Zellen ebenfalls besonders langlebige Offenzustände detektiert. Deren durchschnittlicher Anteil betrug $15,1 \pm 5,1$ % ($n=8-10$). Aber auch an den Kanälen der nur mit dem $\alpha 1C$ -b-Gen transfizierten Zellen zeigten sich besonders langlebige Offenzustände, wobei deren durchschnittlicher Anteil nur $6,0 \pm 4,5$ % ($n=8$) ausmachte. Zwei repräsentative Experimente sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Zeitkonstanten und die korrespondierenden Verteilungen für das Mode-1- und Mode-2-Verhalten beider Kanäle sind mit den in der Cell-Attached-Konfiguration ermittelten Werte vergleichbar. Der Unterschied zwischen $\alpha 1C$ -b- und $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -transfizierten Zellen bestand wiederum im Auftreten von sehr langen Offenzeiten des $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanals ($\tau_3=10,51$ ms, $P_3=8,0\%$), die beim $\alpha 1C$ -b-Kanal in diesem Experiment nicht detektiert werden konnten.

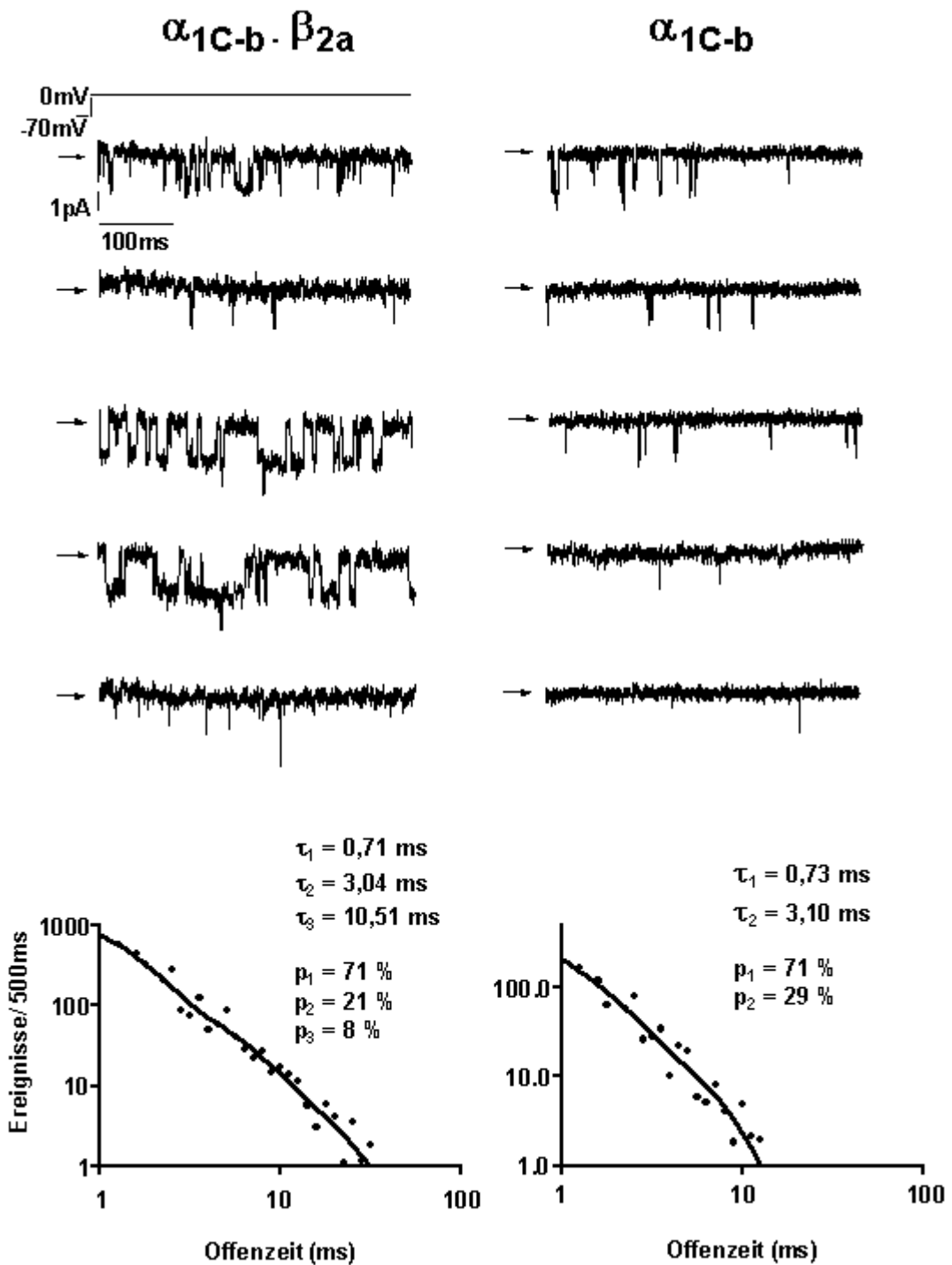


Abb. 8: Die β_{2a} -Untereinheit erhöht die Offenwahrscheinlichkeit der α_{1C-b} -Kanäle in der Inside-Out-Konfiguration. Oben: Konsekutive Stromregistrierungen der α_{1C-b} - und $\alpha_{1C-b} \cdot \beta_{2a}$ -Kanäle. Die Pfeile markieren den geschlossenen Kanalzustand. Unten: Die Verteilungen der Offenzeiten. Die Offenzeitkonstanten (τ_1 - τ_3) mit den zugehörigen Wahrscheinlichkeiten (P_1 - P_3) der entsprechenden offenen Zustände sind angegeben.

Im Inside-Out-Patch waren die Einzelkanalamplitude, die Offenwahrscheinlichkeit und die Verfügbarkeit der individuellen Kanäle über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten annähernd konstant. Die Interaktion zwischen $\alpha 1C$ -b- und $\beta 2a$ -Untereinheit konnte somit als funktionell stabil eingestuft werden, eine Voraussetzung für weitere Untersuchungen, deren Ziel es sein sollte, die Interaktion zwischen $\alpha 1C$ -b- und $\beta 2a$ -Untereinheit mit dem AID-Peptid zu inhibieren.

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

Die $\alpha 1$ -Interaktionsdomäne (AID) repräsentiert die primäre Bindungsstelle für die β -Untereinheit auf der $\alpha 1$ -Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals. Diese konservierte Domäne besteht aus 18 Aminosäuren und ist in der ersten zytoplasmatischen Schleife der $\alpha 1$ -Untereinheiten lokalisiert. In einem Initialversuch wurde zunächst *in vitro* getestet, ob das synthetisch hergestellte Peptid, welches die AID imitiert, an native $\beta 2$ -Proteine binden kann. Das AID-Peptid wurde dazu kovalent an eine Agarosegel-Matrix (AID-Affinity-Beads) gebunden. Die anschließende Inkubation der AID-Affinity-Beads erfolgte mit solubilisiertem Homogenat aus Rattenherz. An die Affinity-Beads gebundene $\beta 2$ -Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mittels $\beta 2$ -isoform-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis einer repräsentativen Immunoblot-Analyse und beweist, daß die $\beta 2$ -Untereinheit spezifisch an die AID-Affinity-Beads (Position 2), nicht aber an die Agarose-Beads (Position 1) binden konnte. Die Bindung des 85 kDa großen $\beta 2$ -Proteins an die AID-Affinity-Beads ließ sich durch Zugabe von freiem AID-Peptid (10 μM) inhibieren (Positionen 3 und 4), jedoch nicht mit dem Kontroll-Peptid (10 und 20 μM), (Positionen 5 und 6).

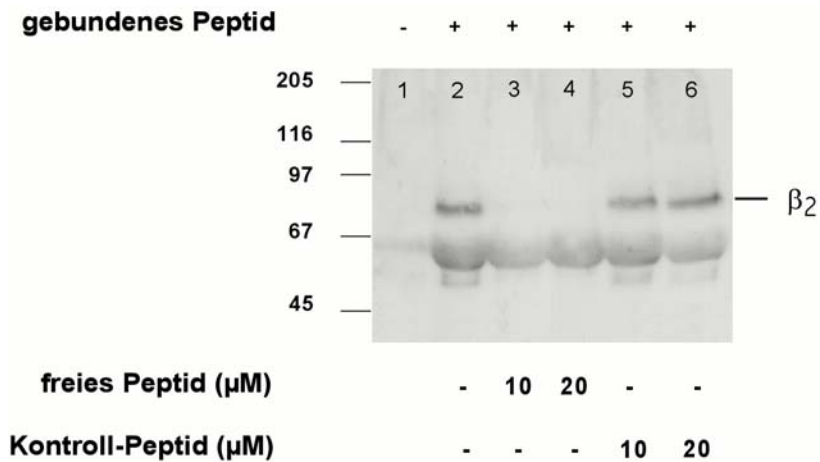


Abb. 9: Die native β_2 -Untereinheit bindet an das AID-Peptid. AID-Affinity-Beads wurden durch kovalente Bindung des AID-Peptids an ω -Aminoethylagarose hergestellt. Die Inkubation der AID-Affinity-Beads erfolgte mit Rattenherzhomogenat (0,5 mg); ohne (Position 2) bzw. mit (Positionen 3, 4) freiem AID-Peptid bzw. mit dem Kontroll-Peptid (Positionen 5, 6). In Position 1 wurde mit Agarose-Beads inkubiertes Rattenherzhomogenat aufgetragen. Nach SDS-PAGE und Transfer der gebundenen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte der immunologische Nachweis mit β_2 -isoform-spezifischen Antikörpern.

Zusätzlich zur β_2 -Untereinheit mit 85 kDa detektierten die Antikörper ein Protein mit einem Molekulargewicht von circa 60 kDa, welches ebenfalls spezifisch an die AID-Affinity-Beads binden konnte. Reprobing der Nitrocellulosemembran mit anti- β_3 -Antikörpern sollte Aufschluß darüber geben, ob es sich möglicherweise um die β_3 -Untereinheit handelt. Die Expression des β_3 -Proteins im Herzen wird diskutiert (Hullin 1992, Witcher 1995). Die β_3 -Antikörper führten jedoch zu keiner Reaktion.

3.1.3 Die Applikation des AID-Peptids blockiert die $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Interaktion

Die $\alpha 1$ -Interaktionsdomäne (AID) bestimmt primär die Interaktion zwischen $\alpha 1$ - und β -Untereinheit. Zur Untersuchung der funktionellen Rolle der Interaktionsdomäne wurde der Einfluß des AID-Peptids auf das Schaltverhalten der $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanäle im Inside-Out-Patch analysiert. Die Applikation des AID-Peptids (10 μ M) erfolgte auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran. In 5 von 6 Experimenten wurde nach Zugabe des Peptids ein dramatischer Wechsel im Schaltverhalten der $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanäle registriert. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Inside-Out-Versuches. Das Diagramm (Teil A) gibt den Zeitverlauf der Ca^{2+} -Kanalaktivität, angegeben als mittlere Anzahl der offenen Kanäle ($N \cdot P_o$), wieder. Die $N \cdot P_o$ verringerte sich innerhalb von 2 bis 3 Minuten in Anwesenheit des AID-Peptids dramatisch, während in Kontrollexperimenten die Kanalaktivität der $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanäle für 30 Minuten relativ unverändert blieb (Abb. 10, Insert). Die durchschnittliche Offenwahrscheinlichkeit (P_o) der $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanäle wurde durch das AID-Peptid signifikant von $9,3 \pm 1,5\%$ auf $6,3 \pm 1,4\%$ ($N=6$) herabgesetzt. Das Peptid übte keinen Effekt auf die Verfügbarkeit (P_s) der Kanäle aus. Die Verringerung der Ca^{2+} -Kanalaktivität ($N \cdot P_o$) ging darüberhinaus mit einer Verringerung der durchschnittlichen Offenzeiten und des Anteils besonders langlebiger Offenzustände der Kanäle einher. Dies zeigte sich deutlich in den Experimenten, die eine Analyse der Offenzeitverteilungen ($N=2$) zuließen (Abb. 10 B). Der besonders langlebige Offenzustand des $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanals ($\tau_3=14,5$ ms, $P_3=10,0$ %) konnte unter dem Einfluß des AID-Peptids nicht aufrecht erhalten werden. Stattdessen war das Kanalverhalten von überwiegend kurzen Offenzuständen ($\tau_1=1,4$ ms, $P_1=90,0$ %) gekennzeichnet. Dieser Wechsel im Schaltverhalten der $\alpha 1C$ -b- $\beta 2a$ -Kanäle unter dem Einfluß des Peptids war mit dem Kanalverhalten von $\alpha 1C$ -b-Kanälen, die nicht die $\beta 2a$ -Untereinheit koexprimierten, vergleichbar. Die β -induzierte Kanalmodulation wurde somit durch das AID-Peptid aufgehoben bzw. ausgesetzt.

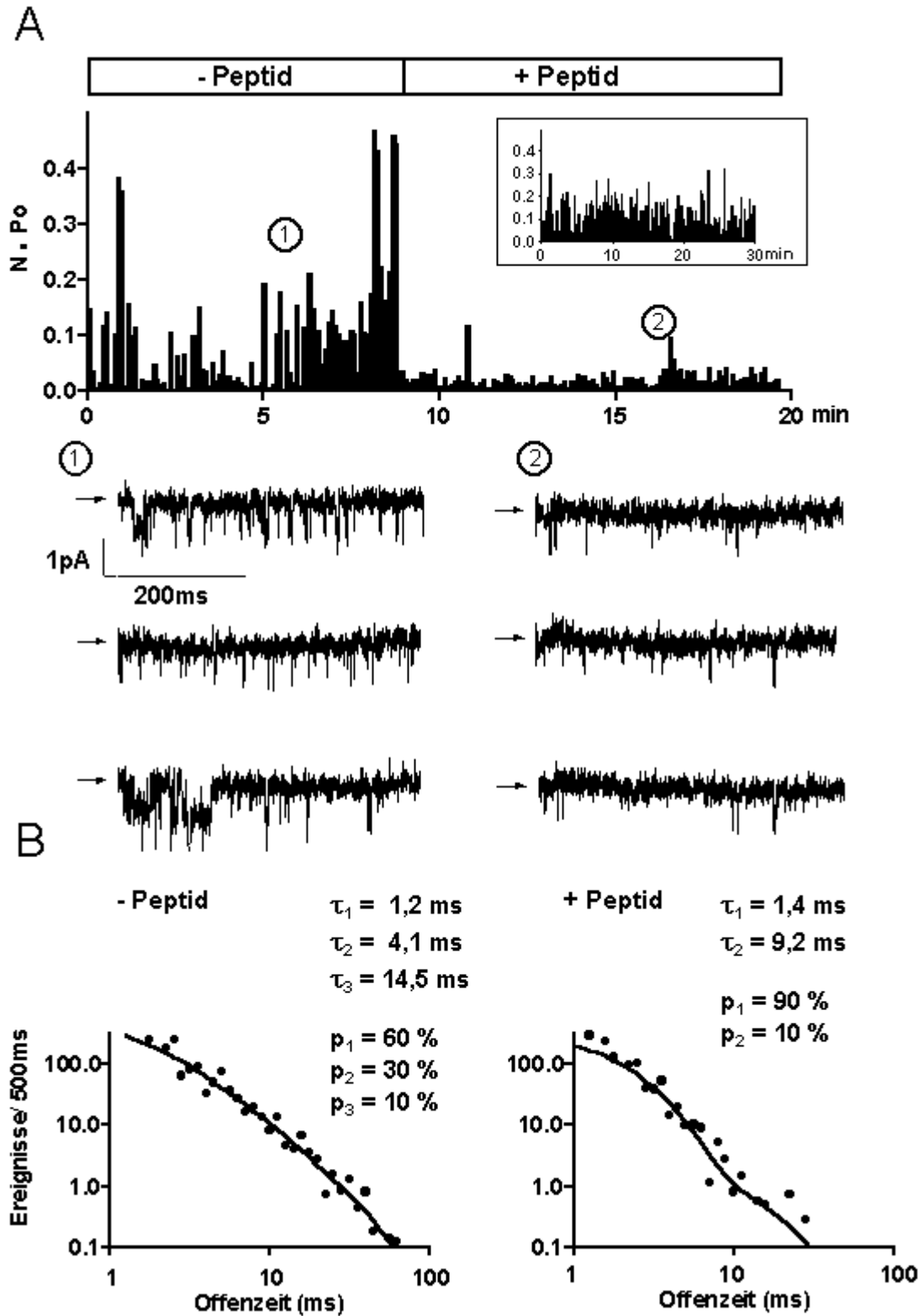


Abb. 10: Das AID-Peptid verringerte die Ca^{2+} -Kanalaktivität durch Aufhebung der Interaktion zwischen $\alpha 1\text{C-b-}$ und $\beta 2\text{a-}$ Untereinheit. A: Zeitverlauf der Ca^{2+} -Kanalaktivität in der Inside-Out-Konfiguration in Anwesenheit des AID-Peptids ($10\mu\text{M}$) und ohne AID-Peptid (Insert). Die Säulen repräsentieren die Kanalaktivität während der depolarisierenden

Spannungssprünge, angegeben als mittlere Zahl der offenen Kanäle ($N \cdot P_o$). Im mittleren Bereich sind konsekutive Stromregistrierungen für die entsprechenden im Teil A gekennzeichneten Bereiche angegeben. Das Stromniveau des geschlossenen Zustands ist durch Pfeile markiert. B: Die Verteilung der Offenzeiten. Die Offenzeitkonstanten (τ_1 - τ_3) mit den zugehörigen Wahrscheinlichkeiten (P_1 - P_3) der entsprechenden offenen Zustände sind angegeben.

Kontrollexperimente mit einem entsprechenden AID-Kontroll-Peptid (Scrambled-Peptid) bestätigten die Ergebnisse. Die Kanalaktivität der α_1C -b- β_2a -Kanäle wurde durch die Applikation (10 μ M) dieses Kontroll-Peptids nicht beeinflusst ($n=2$). Desweiteren zeigten Versuche an Zellen mit α_1C -b-Kanälen kein verändertes Kanalverhalten nach Applikation des AID-Peptids ($N=3$).

3.2 Die Interaktion der β_2a -Untereinheit des kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals mit Ahnak

Die β_2 -Untereinheit beeinflusst nicht nur die funktionellen und strukturellen Eigenschaften (Hofmann 1999) kardialer Ca^{2+} -Kanäle, sie ist darüberhinaus mit dem hochmolekularen Protein Ahnak assoziiert (Haase 1999). Dieses 700-kDa-Protein wurde kürzlich in Kopräzipitationsversuchen mit Antikörpern gegen die β_2 -Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals ausgefällt. Das Ziel der hier im folgenden beschriebenen Untersuchungen war es, Interaktionsstellen auf beiden Proteinen, der kardialen β_2a -Untereinheit und Ahnak, zu identifizieren und deren Bindungseigenschaften zu charakterisieren.

3.2.1 Die C-terminalen 382-Aminosäuren (Ahnak-C2) von Ahnak binden an die β 2a-Untereinheit

Für die Bindungsstudien wurden Fusionsproteine hergestellt. Das erfolgte über die Klonierung der entsprechenden Abschnitte der Ahnak-cDNA *in frame* hinter eine cDNA von Glutathion-S-Transferase (GST) in einem entsprechenden Vektor (Abb. 11 oben). Die Details der Klonierungen sind unter 2.4.3 im Teil Material und Methoden beschrieben. Eine schematische Darstellung von Ahnak und die Lokalisierung der als GST-Fusionsproteine präparierten und in *E.coli*-Zellen exprimierten Fragmente Ahnak-N (AS 1-257), Ahnak-R1 (3740-3882), Ahnak-R4 (3817-4412), Ahnak-C1 (4646-5288) und Ahnak-C2 (5262-5643) zeigt Abbildung 11 (unten). Die Expression der β 2a-Untereinheit erfolgte ebenfalls als GST-Fusionsprotein.

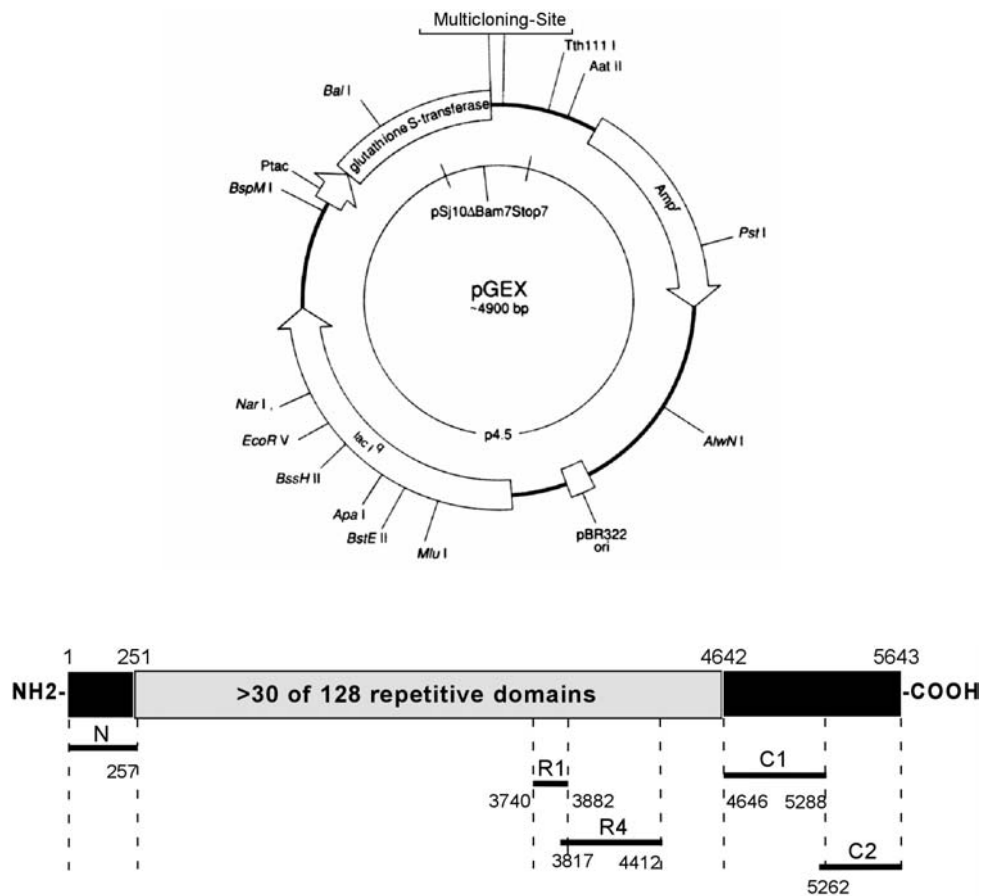


Abb. 11: Oben die Darstellung des GST-Fusions-Vektors. Unten die Schematische Darstellung von Ahnak mit Lokalisierung der als GST-Fusionsproteine präparierten

Fragmente. Die Aminosäuresequenz wurde von der genomischen Ahnak-Sequenz (AC004230) abgeleitet.

Für Overlay-Bindungsversuche wurden die gereinigten Ahnak-Fusionsproteine (120 pMole) elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und anschließend mit der ^{32}P -markierten $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit (30 nM) inkubiert. Die autoradiographische Analyse (Abb. 12B) demonstrierte, daß die $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit spezifisch mit der carboxyl-terminalen Region von Ahnak, bestehend aus den letzten 382 AS (Ahnak-C2) interagiert. Im Gegensatz dazu konnte mit äquimolaren Mengen der Fusionsproteine Ahnak-N, Ahnak-R1, Ahnak-R4, Ahnak-C1 sowie eines GST-Kontrollproteins keine Bindung zur $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit nachgewiesen werden.

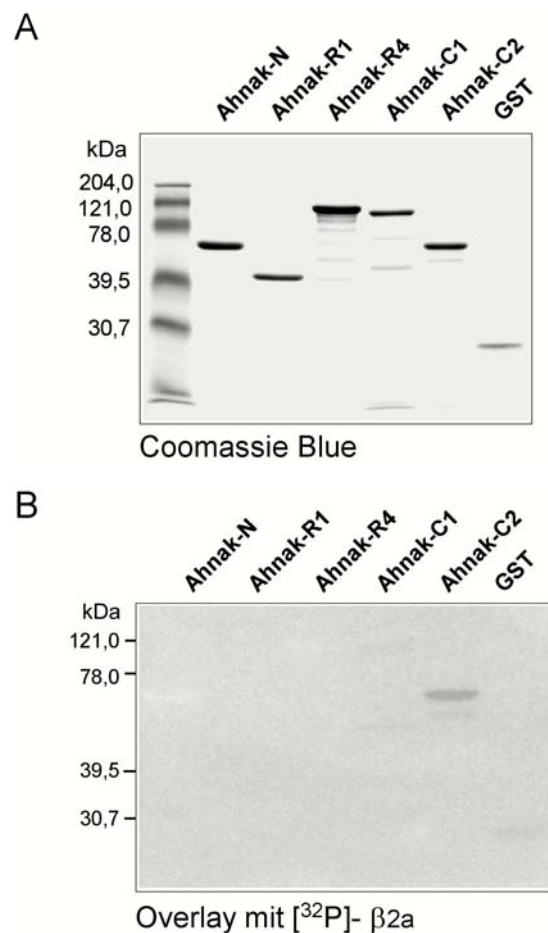


Abb. 12: Identifikation der Interaktionsstelle zwischen Ahnak und der $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit.

A: Gezeigt sind die als GST-Fusionsproteine exprimierten Ahnak-Fragmente. Für die SDS-Gelelektrophorese (10%) wurden jeweils 10 μg der GST-Ahnak-Fusionsproteine aufgetragen.

Die anschließende Anfärbung des Gels erfolgte mit Coomassie-Blau. B: Autoradiogramm eines repräsentativen Overlay-Bindungsversuchs. Ahnak-Fusionsproteine (120 pMole) wurden elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulosemembran geblottet und 3 Stunden mit ^{32}P -markierter GST- β 2a (30 nM) inkubiert.

3.2.2 Die α 1C-Untereinheit und Ahnak besetzen unterschiedliche Bindungsstellen auf der β 2a-Untereinheit

Ca^{2+} -Kanal α 1- und β -Untereinheiten interagieren über konservierte, komplementäre Interaktionsdomänen (AID-BID) miteinander. Wie die *in vitro* Bindungsversuche unter Punkt 3.1.2 demonstrierten, bindet das synthetische AID-Peptid an die β 2-Untereinheit und blockiert die Interaktion. Daher wurde untersucht, ob α 1C-Untereinheit und Ahnak um die gleiche Bindungsstelle auf der β 2-Untereinheit (BID) konkurrieren. Overlay-Bindungsversuche sollten deshalb Aufschluß darüber geben, ob durch Vorinkubation des β 2a-Proteins mit dem AID-Peptid (10 μM) die Interaktion zwischen β 2a-Protein und Ahnak beeinträchtigt wird. Die gewählten Bedingungen sollten die Verhältnisse im nativen System imitieren. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Overlay-Versuchs. Die Sättigung der β 2a-Untereinheit durch das AID-Peptid resultierte nicht in einem Verlust der Interaktion zwischen Ahnak-C2 und der β 2a-Untereinheit. Interessanterweise verbesserte das AID-Peptid die Bindung zwischen beiden Proteinen, denn auch mit Ahnak-C1 wurde eine Bindung unter diesen modifizierten Bedingungen erhalten (Abb. 13). Die β -Bindungsdomäne (BID) ist demnach offensichtlich nicht in die Interaktion mit Ahnak-C2 involviert.

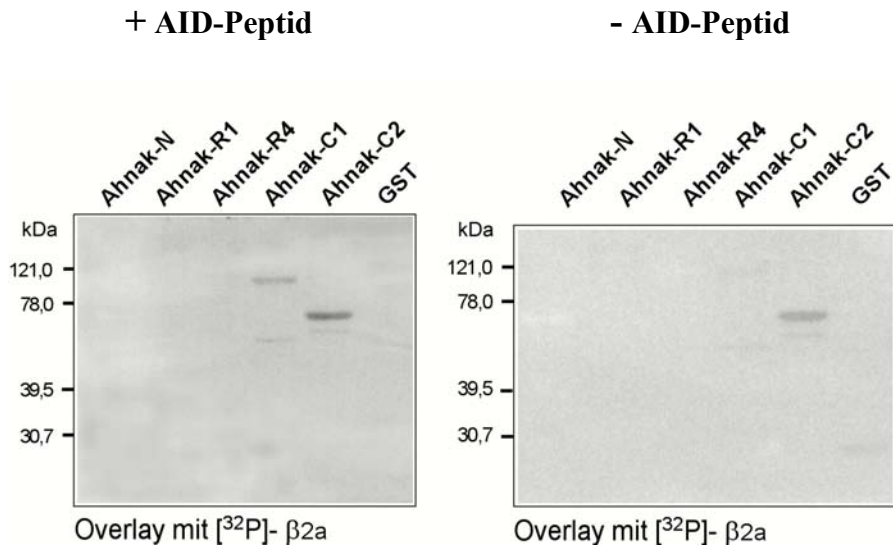
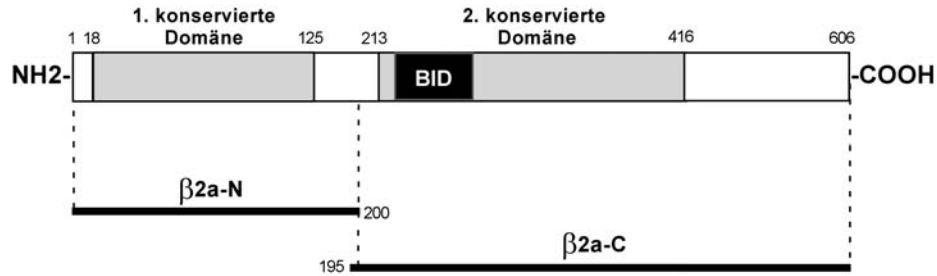


Abb. 13: Wirkung des AID-Peptids auf die Interaktion zwischen Ahnak und der β 2-Untereinheit. Autoradiogramm repräsentativer Overlay-Bindungsversuche. Ahnak-Fusionsproteine (120 pMole) wurden elektrophoretisch (10%ige SDS-PAGE) aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Die für 90 Minuten mit dem AID-Peptid (10 μ M) vorinkubierte 32 P-markierte β 2a-Untereinheit (30 nM) und die ohne Peptid behandelte β 2a-Untereinheit wurden anschließend 3 Stunden mit den geblotteten Ahnak-Fusionsproteinen inkubiert.

3.2.3 Die β 2a-Untereinheit besitzt zwei Bindungsstellen für Ahnak-C2

Für die Eingrenzung der Interaktionsstellen auf der β 2a-Untereinheit wurden zwei weitere GST-Fusionsproteine benutzt: β 2a-N (1-200) und β 2a-C (195-606), (Abb. 14A). Beide trunkierten Proteine zeigten im Overlay-Experiment eine Reaktion mit dem C-terminalen Ahnak-Fragment, wobei das β 2a-C-Fragment wesentlich stärker mit Ahnak-C2 interagiert als β 2a-N (Abb. 14B). In beiden Fällen konnte keine Reaktion mit dem Kontroll-GST-Protein detektiert werden. Die Ergebnisse ließen vermuten, daß im β 2a-Protein zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten für Ahnak-C2 existieren. Die Resultate sollten in Sedimentations-Gleichgewichts Experimenten verifiziert und quantifiziert werden.

A



B

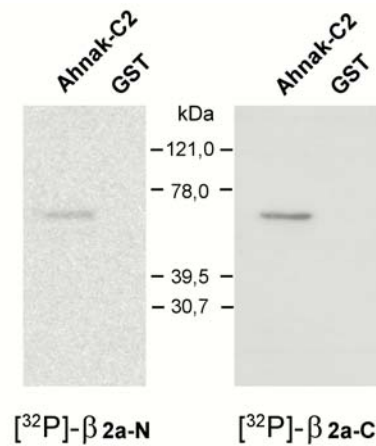


Abb. 14: Interaktion zwischen den trunktierten β 2a-Proteinen und Ahnak-C2. A: Schematische Darstellung der β 2a-Untereinheit (X64297). Gezeigt werden die Lokalisation der zwei konservierten Domänen, das BID-Motiv und die als GST-Fusionsprotein eingesetzten Fragmente β 2a-N und β 2a-C. B: Autoradiogramm repräsentativer Overlay-Bindungsversuche. Ahnak-C2 und das GST-Kontrollprotein (120 pMole) wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran geblottet und mit den ^{32}P -markierten Fragmenten β 2a-N und β 2a-C (jeweils 30 nM) für 3 Stunden inkubiert.

3.2.4 Die β 2a-Untereinheit bindet zwei Ahnak-C2-Moleküle mit unterschiedlichen Affinitäten

Die analytischen Ultrazentrifugationen wurden von Prof. Joachim Behlke, MDC Berlin, durchgeführt. Die analytische Ultrazentrifugation fraktioniert im Schwerfeld unterschiedliche Komponenten nach Teilchengröße, Teilchendichte und Form. Der Sedimentationsprozeß wird optisch detektiert, so daß ein orts aufgelöstes Konzentrationsprofil über den radialen Verlauf der Meßzelle erhalten wird. Aus den erhaltenen Konzentrationsprofilen wurden die Molmassen der einzelnen Komponenten sowie der gebildeten Assoziante abgeleitet und daraus nach Whyman und Gill (1990) die Dissoziationskonstanten ermittelt.

Für das rekombinante β 2a-Protein wurde eine molekulare Masse von 95 kDa bestimmt, für das Ahnak-C2-Fragment ein Wert von 65 kDa. Das bedeutet, daß beide Proteine in Lösung als Monomere vorliegen. Steigende Mengen von Ahnak-C2 wurden mit 0.13 μ M der β 2a-Untereinheit versetzt und bis zur Einstellung des Sedimentations-Gleichgewichtes zentrifugiert. Die Analyse der gebildeten Assoziante basierte auf der Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 15A dargestellt. Das Molekulargewicht des Komplexes erhöhte sich mit steigendem Betrag an Ahnak-C2. Bis zu einem molaren Verhältnis von eingesetztem Ahnak-C2 zum β 2a-Protein von 2 lag ein 1:1-Komplex vor. Die weitere Erhöhung dieses Verhältnisses führte zur Bindung eines zweiten Moleküls Ahnak-C2 an das β 2a-Molekül (Abb. 15A). Zwei Ahnak-C2-Bindungsstellen in der β 2a-Untereinheit wurden auch in den Overlay-Experimenten mit den trunkierten β 2a-Fragmenten detektiert. Die errechnete Dissoziationskonstante für das erste gebundene Ahnak-C2-Molekül betrug 53 ± 6 nM ($n=9$), während das zweite Molekül mit einer wesentlich geringeren Affinität von 212 nM an die β 2a-Untereinheit gebunden wurde. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, erfolgten weitere Analysen mit den trunkierten β 2a-Fragmenten. Das C-terminale Protein, β 2a-C, lag in Lösung als monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 73 kDa vor. Es konnte Ahnak-C2 mit hoher Affinität binden. Der ermittelte Kd-Wert betrug 55 ± 11 nM ($n=8$, Abb.15B), der mit der Dissoziationskonstante der hochaffinen Bindungsstelle im gesamten β 2a-Protein vergleichbar war. Im Gegensatz dazu lag das N-terminale β 2a-Fragment (β 2a-N) in Lösung

als dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 97 kDa vor. Als dimeres Protein ($\beta 2a-N$)₂ konnte es 2 Moleküle Ahnak-C2 mit einer Affinität von jeweils 328 ± 24 nM ($n = 7$) binden (Abb. 15C). Weitere niederaffine Bindungsstellen für Ahnak-C2 im dimeren Protein ($\beta 2a-N$)₂ wurden beobachtet (Abb. 15C), scheinen jedoch aufgrund ihrer extrem geringen Affinität von untergeordneter Relevanz zu sein.

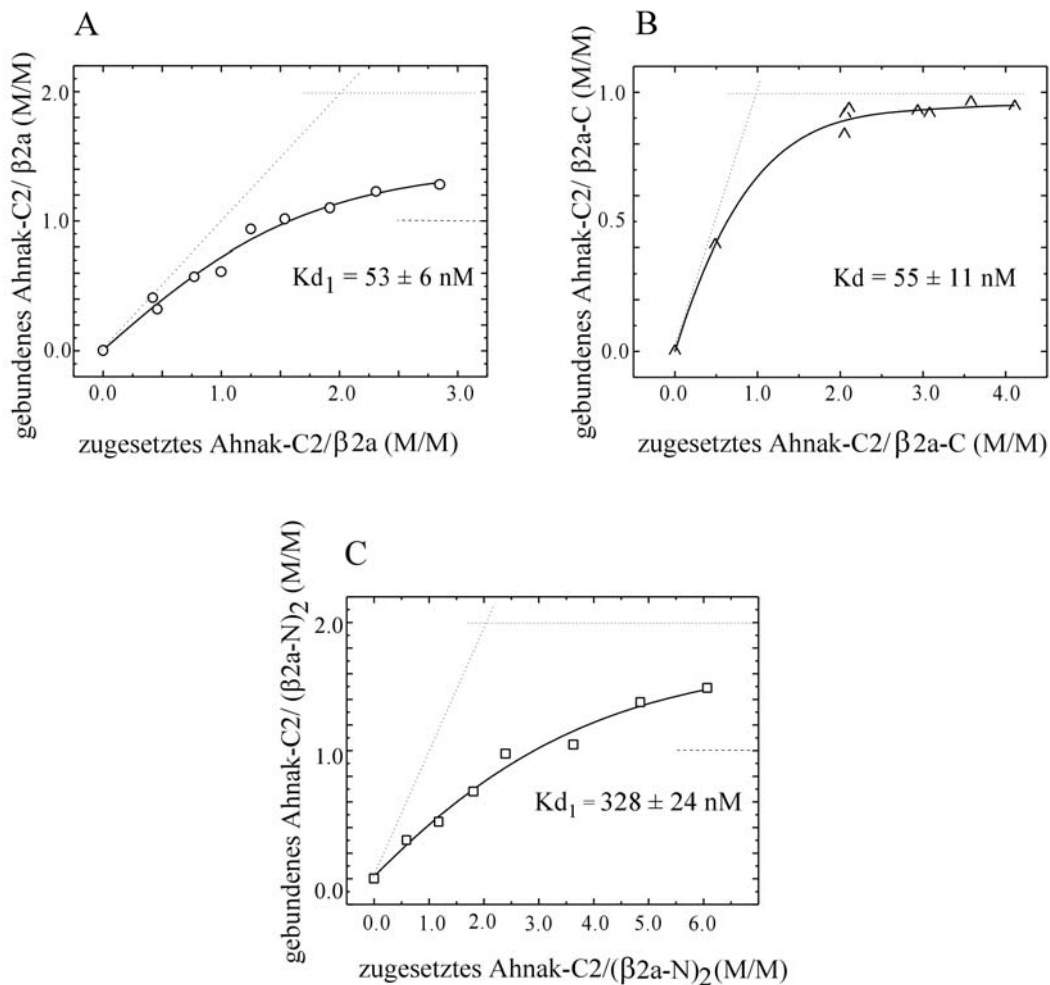


Abb. 15: Interaktionen von Ahnak-C2 mit der $\beta 2a$ -Untereinheit und ihren trunktierten Proteinen, bestimmt durch analytische Ultrazentrifugation. Analyse der Interaktion von Ahnak-C2 mit der gesamten $\beta 2a$ -Untereinheit (A), dem Fragment $\beta 2a-C$ (B) bzw. mit dem Fragment $\beta 2a-N$ (C) in HEPES-Puffer (pH 7,4) bei 10°C . Für die Analyse wurden $0,13 \mu\text{M}$ der $\beta 2a$ -Untereinheit, $0,47 \mu\text{M}$ des $\beta 2a-C$ - und $0,27 \mu\text{M}$ des $\beta 2a-N$ -Fragments eingesetzt. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte mit dem Programm Polymole (Behlke 1997).

3.2.5 Native Ca^{2+} -Kanalkomplexe interagieren mit Ahnak-C2

Im Verlauf weiterer Untersuchungen sollte geklärt werden, ob das mit der rekombinanten $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit interagierende Ahnak-C2-Protein fähig ist, an native β -Untereinheiten des Ca^{2+} -Kanals zu binden. Ahnak-C2 wurde dazu kovalent an BrCN-Sepharose gebunden (Ahnak-C2-Beads) und mit Extrakten von Ca^{2+} -Kanälen aus solubilisiertem Herz- und Skelettmuskel inkubiert. Nach Elution der gebundenen Proteine, elektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Blotten auf Nitrocellulose erfolgte der Immunnachweis. Dazu wurden $\beta 2$ -isoformspezifische Antikörper für die Detektion der kardialen $\beta 2$ -Untereinheit und $\beta 1$ -Antikörper zur Detektion der $\beta 1\text{a}$ -Untereinheit des Skelettmuskels eingesetzt. Abbildung 16 demonstriert das Ergebnis dieser Immunblot-Analyse und beweist, daß sowohl die $\beta 2$ -Untereinheit (oberer Blot, Position 3) als auch die $\beta 1\text{a}$ -Untereinheit aus dem Skelettmuskel (oberer Blot, Position 6) spezifisch an die Ahnak-C2-Beads binden konnten, während von den GST-Kontroll-Beads keine Proteine zurückgehalten wurden (oberer Blot, Positionen 2, 5). Positionen 1 und 4 im selben Blot zeigen das eingesetzte Ausgangsmaterial. Dieses wurde aus kardialem Sarcolemma bzw. mikrosomalen Skelettmuskel-Membranen präpariert und enthält neben den β -Proteinen auch die an die β -Proteine gebundenen korrespondierenden $\alpha 1$ -Untereinheiten. Das kardiale $\beta 2$ -Protein interagiert mit der $\alpha 1\text{C}$ - Untereinheit und die Skelettmuskel- $\beta 1\text{a}$ -Untereinheit mit dem $\alpha 1\text{S}$ -Protein. Nach Reprobing der Nitrocellulosemembran mit $\alpha 1$ -Antikörpern sollte nachgewiesen werden, ob über die Ahnak-C2-Beads die β -Proteine mit ihrer korrespondierenden $\alpha 1$ -Untereinheit isoliert worden sind. Die Immunreaktion zeigt, daß über die Ahnak-C2-Beads spezifisch das $\beta 2$ -Protein mit der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit bzw. das $\beta 1\text{a}$ -Protein mit der $\alpha 1\text{S}$ -Untereinheit aus den Ca^{2+} -Kanalpräparationen angereichert werden konnte (Abb. 16 unten, Positionen 3 und 6), was mit den GST-Kontroll-Beads nicht möglich war. Diese Resultate belegen die Interaktion von Ahnak-C2 mit nativen L-Typ- Ca^{2+} -Kanalkomplexen. Die β -Untereinheit fungiert dabei als Brücke zwischen Ahnak-C2 und dem $\alpha 1$ -Protein.

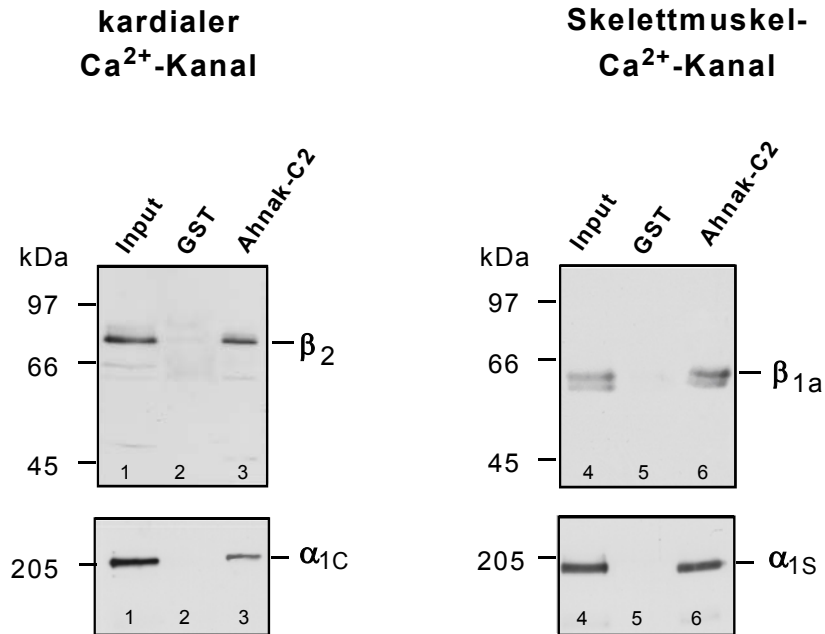


Abb. 16: Interaktion von Ahnak-C2 mit nativen Ca^{2+} -Kanalkomplexen. GST oder GST-Ahnak-C2 wurde kovalent an aktivierte BrCN-Sepharose gebunden und mit solubilisiertem Herz- und Skelettmuskel Ca^{2+} -Kanalextrakt inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden eluiert, in der SDS-PAGE (8%) aufgetrennt und durch Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen die β_2 -Untereinheit (oberer Blot, Positionen 1-3) und die β_{1a} -Untereinheit (oberer Blot, Positionen 4-6) nachgewiesen. Die Nitrocellulosemembranen wurden nach dieser Reaktion mit einer 15%igen H_2O_2 -Lösung gewaschen und erneut einer Immunanalyse mit Antikörpern gegen die α_{1C} -Untereinheit (unterer Blot, Positionen 1-3) und die α_{1S} -Untereinheit (unterer Blot, Positionen 4-6) unterzogen. Auf Positionen 1 der Blots sind jeweils das Ausgangsmaterial für die Extraktion des Herz- bzw. des Skelettmuskel- Ca^{2+} -Kanals aufgetragen. Es reflektiert 3 % der für die Inkubation der Affinity-Beads eingesetzten Ca^{2+} -Kanalextrakte.