

4 DISKUSSION

4.1 Charakterisierung des Schaltverhaltens des glattmuskulären L-Typ-Ca²⁺-Kanals: Rolle der α 1-Interaktionsdomäne (AID) als Target des β -Proteins in der Kanalmodulation

Der L-Typ-Ca²⁺-Kanal stellt eine zentrale Schaltstelle der elektromechanischen Kopplung zwischen der Erregungsleitung und der Kontraktion des Herzmuskels dar. Für das Verstehen seiner Regulation sind Einsichten in seine strukturellen Eigenschaften und in die molekularen Mechanismen der Interaktionen der Kanaluntereinheiten untereinander sowie mit anderen Proteinen eine wesentliche Voraussetzung.

4.1.1 Die β 2a-Untereinheit kontrolliert das schnelle Schaltverhalten (P_o) der α 1C-b-Untereinheit

Im Herzmuskel- und im glatten Muskelgewebe werden zwei verschiedene Spleißformen des α 1C-Gens (siehe Punkt 1.1.2) exprimiert, die beide mit der β 2-Untereinheit funktionelle Ca²⁺-Kanalkomplexe bilden. Die Modulation der kardialen α 1C-a-Untereinheit durch das β 2a-Protein auf Einzelkanalebene wurde von Costantin und Mitarbeitern (1998) beschrieben. Im Gegensatz dazu gab es bislang keine Studie, die den Einfluß der β 2a auf das kinetische Verhalten der glattmuskulären α 1C-b-Untereinheit charakterisierte. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand deshalb darin, den Einfluß der akzessorischen β 2a-Untereinheit auf das Schaltverhalten der glattmuskulären α 1C-b-Untereinheit zu analysieren.

In Expressionssystemen führte die Koexpression der β -Untereinheit mit dem α 1-Protein sowohl zu einem erhöhten Ca²⁺-Strom als auch zu einem veränderten kinetischen Verhalten in Abhängigkeit von den exprimierten Kanalisofomen (De Waard 1996, Perez-Reyes 1992). Diese Effekte wurden zum Teil mit einem Konformationswechsel der Kanalpore durch Einfluß der akzessorischen β -Untereinheit erklärt. Damit soll eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für den Kanal, in einen offenen Zustand zu schalten (Offenwahrscheinlichkeit P_o), verbunden sein (Shistik 1995, Costantin 1998). Unsere

Ergebnisse sprechen für diese Beobachtung, denn die ermittelte Offenwahrscheinlichkeit (P_o) der $\alpha 1C$ - $\beta 2a$ -Kanäle zeigte sich gegenüber der von $\alpha 1C$ - β -Kanälen auf das Dreifache erhöht. Außerdem wurde die durch die β -Untereinheit induzierte Erhöhung des Ca^{2+} -Stroms im Zusammenhang mit einem erhöhten Einbau funktioneller Kanäle ($\alpha 1 \cdot \beta$ -Komplexe) in die Plasmamembran diskutiert (Gao 1999, Yamaguchi 1998). Unsere Ergebnisse lieferten ebenfalls Hinweise auf eine erhöhte Inkorporation von $\alpha 1C$ - $\beta 2a$ -Kanälen in die Zellmembran als Folge der Koexpression beider Untereinheiten. So wurde sowohl in der Cell-Attached- als auch in der Inside-Out-Konfiguration eine erhöhte Anzahl funktioneller Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran der mit der $\beta 2a$ kotransfizierten Zellen registriert, im Vergleich zu Zellen, die nur mit der $\alpha 1C$ - β -Untereinheit transfiziert wurden. Bislang gibt es eine kontroverse Diskussion darüber, ob die erhöhte Insertion von Kanälen in die Zellmembran und die Modulation der Stromeigenschaften zwei unabhängige Funktionen der β -Untereinheit sind, oder die Erhöhung der Stromdichte ein direktes Ergebnis der $\alpha 1 \cdot \beta$ -Komplexbildung ist (Gerster 1999). Kürzlich wurde die akzessorische β -Untereinheit als essentielles Protein für den effizienten Einbau der $\alpha 1C$ -Untereinheit in die Plasmamembran beschrieben (Gerster 1999, Bichet 2000). Ein Retentionssignal auf dem $\alpha 1$ -Protein, das den Transport des $\alpha 1$ -Proteins aus dem Endoplasmatischen Retikulum verhindert, wird durch die Bindung der β -Untereinheit maskiert. Somit kann das $\alpha 1$ -Protein erst nach Bindung der β -Untereinheit - als $\alpha 1C \cdot \beta$ -Komplex - zur Plasmamembran transportiert werden (Bichet 2000).

Die Koexpression der $\beta 2a$ -Untereinheit führte zu einer signifikanten Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit (P_o) der $\alpha 1C$ - β -Kanäle aufgrund eines erhöhten Auftretens sehr langlebiger Kanalöffnungen ($\tau > 10$ ms). Dieser starke Wechsel im schnellen Schaltverhalten der $\alpha 1C$ - β -Kanäle wurde sowohl in der Cell-Attached- als auch in der Inside-Out-Konfiguration erhalten. Der Vergleich dieses Befundes mit dem Ergebnis von Costantin und Mitarbeitern (1998), die die Modulation des $\beta 2a$ -Proteins auf das Schaltverhalten der kardialen $\alpha 1C$ - β -Untereinheit analysierten, zeigte ebenfalls einen Wechsel im schnellen Schaltverhalten der $\alpha 1C$ - β -Kanäle, der mit dem Auftreten eines sehr langen Offenzustandes assoziiert war.

Strukturelle Unterschiede zwischen der kardialen und der glattmuskulären Spleißvariante bestehen in den Amino-Termini, in den Transmembransegmenten IS6 sowie

IVS3 und in einem Insert in der intrazellulären Schleife zwischen Domäne I und II (Mikami 1989, Biel 1999). Die funktionelle Bedeutung dieser Unterschiede für das Schaltverhalten der Ca^{2+} -Kanäle ist jedoch bislang noch offen (Gollasch 1997, Morel 1998). Shistik und Mitarbeiter (1998) diskutierten in diesem Zusammenhang den Einfluß des N-Terminus der kardialen $\alpha 1\text{C-a}$ -Untereinheit auf die $\alpha 1\text{C-a-}\beta 2\text{a}$ -Interaktion. Sie nahmen an, daß der N-Terminus der $\alpha 1\text{C-a}$ -Untereinheit die $\beta 2\text{a}$ -abhängige Kanalmodulation kontrolliert. Da der N-Terminus des glattmuskulären $\alpha 1\text{C-b}$ -Proteins gegenüber dem der $\alpha 1\text{C-a}$ -Untereinheit verkürzt ist, könnte daher auch eine unterschiedliche Modulation beider Spleißprodukte durch die $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit erfolgen. Im Gegensatz dazu demonstrierten die hier vorgestellten Resultate, daß die glattmuskuläre Spleißvariante der $\alpha 1\text{C}$ -Untereinheit in einer dem kardialen Spleißprodukt vergleichbaren Weise durch die $\beta 2\text{a}$ -Untereinheit moduliert wird (Vergleich Punkt 3.1.1 und Costantin 1998). Unsere Ergebnisse richten sich deshalb gegen die Hypothese von Shistik und Mitarbeitern, daß der N-Terminus der $\alpha 1\text{C-a}$ -Untereinheit die funktionelle Kanalmodulation kontrolliert.

4.1.2 Das β -Protein moduliert den Ca^{2+} -Kanal über die Bindung zur $\alpha 1$ -Interaktionsdomäne (AID)

Die Assoziation zwischen $\alpha 1$ - und β -Untereinheit könnte in mehreren Teilschritten ablaufen (Bichet und Lecomte 2000). Zuerst bindet die β -Untereinheit an die AID, die Bindungsdomäne mit der höchsten Affinität. In weiteren Teilschritten erfolgt die Assoziation an niederaffine (sekundäre) Bindungsstellen, die den Kanal in eine neue funktionelle Konformation bringen. Die Existenz sekundärer Bindungsstellen ist für einige wenige Kanalisofmen bekannt (Tarelius 1997, Walker 1998, 1999). Es ist schwierig, die Bedeutung der AID und die weiterer, teilweise noch hypothetischer Interaktionsstellen für die funktionelle Modulation des Kanals durch die β -Untereinheit zu bestimmen. Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war es deshalb, die $\alpha 1\text{C-b-}\beta 2\text{a}$ -Interaktion über einen neuen, komplementären Ansatz im Inside-Out-Patch zu untersuchen.

Mit einem synthetisch hergestellten AID-Peptid, das der AID auf der $\alpha 1$ -Untereinheit entspricht, wurde gezielt in den molekularen Mechanismus der Interaktion eines funktionell stabilen $\alpha 1\text{C-b-}\beta 2\text{a}$ -Kanals eingegriffen. Die hier vorgestellten *in-vitro*-Bindungsergebnisse

bestätigten, daß das synthetisierte AID-Peptid eine starke Affinität zur nativen, kardialen β 2-Untereinheit besitzt (siehe Punkt 3.1.2). Die Applikation des AID-Peptids auf die zytoplasmatische Seite von Inside-Out-Patches verursachte einen drastischen Wechsel im schnellen Schaltverhalten der α 1C-b β 2a-Kanäle. Das AID-Peptid reduzierte die durchschnittliche Offenzeit der Kanäle und die Häufigkeit der für die α 1C-b β 2a-Kanäle charakteristischen besonders langlebigen Kanalöffnungen. Die registrierten Ströme unter Einfluß des Peptids ähnelten denen von α 1C-b-Kanälen. Folglich induzierte das Peptid einen Wechsel im schnellen Schaltverhalten der α 1C-b β 2a-Kanäle, der mit der Aufhebung der β 2a-abhängigen Kanalmodulation übereinstimmte. Das AID-Peptid übte weder einen Effekt auf die Funktion von α 1C-b-Kanälen aus, noch wurde mit einem Kontroll-Peptid ein verändertes Schaltverhalten der α 1C-b β 2a-Kanäle beobachtet. Die Annahme, diese Reduktion der Ca^{2+} -Kanalaktivität wurde durch eine Aufhebung bzw. eine Zerstörung der Interaktion zwischen α 1- und β -Untereinheit verursacht, scheint deshalb begründet. In der Inside-Out-Konfiguration war in Abwesenheit des Peptids das Schaltverhalten der α 1C-b β 2a-Kanäle bis zu 30 Minuten relativ stabil, trotz eines kompletten Wash-Out der zytoplasmatischen β 2a-Proteine. Folglich mußte die Bindungsaffinität der interagierenden Proteine entsprechend hoch sein. Tatsächlich findet unsere Annahme durch *in vitro* Bindungsversuche von De Waard und Mitarbeitern (1995) mit GST-AID-Fusionsproteinen und rekombinanter β 2-Untereinheit Bestätigung, in denen eine Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen GST-AID und β 2a von ~ 5 nM kalkuliert wurde. Die Interaktion zwischen β -Untereinheit und α 1-Untereinheit erfolgt also primär über die AID. Die beobachtete schnelle Eliminierung der β 2a-induzierten Kanalmodulation im Inside-Out-Patch durch das überschüssige AID-Peptid (siehe Punkt 3.1.3) wurde demnach durch eine verringerte Bindungsaffinität zwischen α 1C-b- und β 2a-Untereinheit verursacht, die offenbar auf einer beschleunigten Dissoziationsrate basierte. Der Wechsel in der Dissoziationsrate ist nicht mit einer klassischen kompetitiven Interaktion auf der Basis einer Bindungsstelle nach dem Prinzip eines Rezeptor-Liganden-Komplexes erklärbar, weil freie β 2a-Proteine effektiv durch die Perfusion entfernt wurden und damit kein Bindungsgleichgewicht mehr vorlag. Ein klassischer Kompetitor kann die Dissoziationsgeschwindigkeit eines Komplexes nur auf der Grundlage eines Bindungsgleichgewichts beeinflussen, es sei denn, er besitzt die Fähigkeit,

über multiple Interaktionsstellen an diesen Komplex selbst zu binden und damit einen instabilen Zwischenkomplex aus drei Komponenten zu bilden. Das AID-Peptid besitzt offensichtlich dieses Potential und forcierte über einen Zwischenkomplex, bestehend aus dem $\alpha 1C$ - $\beta 2a$ -Kanal und dem AID-Peptid die Dissoziation der Interaktionspartner, folglich wurde die mit dem AID-Peptid gebundene $\beta 2a$ -Untereinheit über die Perfusion ausgewaschen. Dieses Konzept impliziert, daß prinzipiell ein Austausch von β -Untereinheiten über einen „Step by Step“ Bindungsmechanismus in funktionellen Kanälen, *in vivo* möglich ist. Die Vorstellung, daß die Applikation von AID-Peptid auf die zytoplasmatische Seite der Inside-Out-Patches die $\beta 2a$ -Untereinheit schnell und quantitativ von der $\alpha 1C$ - β -Untereinheit entfernte, wurde durch eine weitere Beobachtung unterstützt: Nach der Eliminierung der $\beta 2a$ -abhängigen Kanalmodulation konnte durch Auswaschen des AID-Peptids keine Wiederherstellung der ursprünglichen Kanalfunktion registriert werden (unveröffentlichte Ergebnisse Hohaus und Groschner). Es ist unklar, ob die angenommenen multiplen Interaktionsstellen zwischen $\beta 2a$ - und $\alpha 1C$ - β -Untereinheit in der AID selbst oder außerhalb dieser Bindungsstelle lokalisiert sind. Shistik und Mitarbeiter (1998) konnten keine Bindung zwischen der $\beta 2a$ -Untereinheit und dem N-Terminus der $\alpha 1C$ - β -Untereinheit nachweisen. Von den Autoren wurde weiterhin eine physikalische Interaktion der $\beta 2a$ -Untereinheit mit dem C-Terminus des $\alpha 1C$ - β -Proteins ausgeschlossen. Diesen Ergebnissen stehen neue Befunde entgegen. Gerhardtstein und Mitarbeiter (2000) demonstrierten eine Interaktion zwischen einer prolinreichen Domäne im C-Terminus der kardialen $\alpha 1C$ -Untereinheit und dem $\beta 2a$ -Protein. Da diese prolinreiche Domäne in der glattmuskulären $\alpha 1C$ -Isoform komplett konserviert ist, scheint es begründet, auch für den C-Terminus des $\alpha 1C$ - β -Proteins eine Interaktion mit der $\beta 2a$ -Untereinheit anzunehmen. Interessant ist der Befund von Gerster und Mitarbeitern (1999). Diese zeigten, daß eine Punktmutation in der AID des $\alpha 1C$ - β -Proteins (Y467S) den Transport des $\alpha 1C$ - $\beta 2a$ -Komplexes zur Plasmamembran stört, ohne aber die funktionelle Kanalmodulation durch die $\beta 2a$ -Untereinheit zu beeinflussen. Diese Resultate wurden ebenfalls mit multiplen Interaktionsstellen zwischen $\alpha 1C$ - β - und $\beta 2a$ -Untereinheit erklärt. Offensichtlich verringerte die beschriebene Punktmutation die Affinität der β -Untereinheit zur AID. Die Existenz einer zweiten niederaffinen Interaktionsstelle außerhalb dieser Domäne ist deshalb wahrscheinlich. Eine potentielle Stelle könnte die o.g. prolinreiche

Domäne im C-Terminus der $\alpha 1C$ -Untereinheit sein. Anzunehmen ist, daß die niederaffine Bindungsstelle mit zytosolischer, freier β -Untereinheit interagieren kann. Diese Interaktion ermöglicht die funktionelle Modulation des Kanals, ohne einen stabilen Komplex zu bilden.

Die Eliminierung der Interaktion zwischen der $\alpha 1$ -Interaktionsdomäne und der $\beta 2a$ -Untereinheit durch das AID-Peptid resultierte in einer schnellen Aufhebung der β -abhängigen Kanalmodulation. Für die Stabilisierung des Untereinheiten-Komplexes ist die Bindung der β -Untereinheit an die $\alpha 1$ -Untereinheit über die AID essentiell. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären, inwieweit die AID die funktionelle Kanalmodulation determiniert. Die Ergebnisse demonstrieren die Reversibilität der Ca^{2+} -Kanalmodulation durch die β -Untereinheit und lassen die Aufhebung der $\alpha 1 \cdot \beta$ -Interaktion oder einen Austausch von β -Untereinheiten als möglichen Mechanismus der Kanalregulation erscheinen.

4.2 Interaktion zwischen Ahnak und der β 2-Untereinheit des kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals: Lokalisation von Interaktionsstellen und Charakterisierung der Bindungsaffinitäten

Die kardiale β 2-Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals ist neben ihrer Interaktion mit der α 1C-Untereinheit mit Ahnak, einem „Riesenprotein“ (700 kDa) mit bislang unbekannter Funktion, assoziiert. Dieses Protein wurde kürzlich in Kopräzipitationsexperimenten mit Antikörpern gegen die β 2-Untereinheit ausgefällt (Haase 1999). Bislang gab es über die molekularen Details dieser Interaktion keinerlei Angaben.

Das humane Ahnak besteht aus 5643 Aminosäuren und kann in drei strukturelle Hauptregionen untergliedert werden: Dem N-Terminus mit 251 AS, einer zentralen Region mit multiplen Repeats (4300 AS) und dem C-Terminus (1002 AS). Wir fanden in Overlay-Bindungsversuchen mit GST-Ahnak-Fusionsproteinen und radioaktiv markierter β 2a-Untereinheit Hinweise für eine spezifische Bindung der letzten 382-Aminosäuren des Ahnak-C-Terminus (Ahnak-C2, AS 5262-5643) mit der kardialen β 2a-Untereinheit. Dieses Ergebnis konnte in Sedimentations-Gleichgewichts-Analysen verifiziert werden. Überdies bestätigten die Sedimentations-Gleichgewichts-Ergebnisse nicht nur die Interaktion zwischen Ahnak-C2 und β 2a-Untereinheit, es zeigte sich außerdem, daß in der β 2-Untereinheit zwei Bindungsstellen für Ahnak-C2 vorliegen. Dieses Ergebnis fand in Overlay-Bindungs-Experimenten mit zwei trunkierten β 2a-Proteinen Bestätigung. Die trunkierten β 2a-Proteine wurden als GST-Fusionsproteine mit jeweils einer der beiden für die β 2-Untereinheit bekannten konservierten Domänen konstruiert. Der Vergleich der ermittelten Dissoziationskonstanten für Komplexe aus Ahnak-C2 und β 2a-Untereinheit und aus Ahnak-C2 und N- bzw. C-terminalem β 2a-Fragment (β 2a-N und β 2a-C) läßt folgende Schlußfolgerung zu: Die hochaffine Bindungsstelle für Ahnak ist offensichtlich in der C-terminalen Region der β 2a-Untereinheit lokalisiert, da der K_d -Wert des Ahnak- β 2a-C-Komplexes (55 nM) mit dem der hochaffinen Bindungsstelle im Ahnak- β 2a-Komplex (53 nM) weitgehend übereinstimmte. Der K_d -Wert des Ahnak- β 2a-N-Komplexes lag mit 328 nM im Bereich des K_d -Wertes der niederaffinen Bindungsstelle im Ahnak- β 2a-Komplex (212 nM). Vermutlich befindet sich die niederaffine Bindungsstelle in der N-terminalen Region der β 2a-Untereinheit. Die Differenz der beiden K_d -Werte könnte auf eine eingeschränkte

Zugänglichkeit der Bindungsstelle im N-terminalen Fragment aufgrund der Dimerisierung des Proteins in Lösung zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien demonstrierten eindeutig, daß die C-terminalen 382-Aminosäuren von Ahnak (Ahnak-C2) für die Interaktion mit der β 2a-Untereinheit des kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals verantwortlich sind.

Ausgehend von der hier näher charakterisierten Interaktion zwischen der β 2a-Untereinheit und Ahnak sowie dem Potential von Ahnak, zwischen Zytoplasma und Zellmembran zu translozieren (Hashimoto 1995, Nie 2000), läßt sich über eine Rolle des Proteins im Transport des Ca^{2+} -Kanalkomplexes zur Plasmamembran spekulieren. Alternativ könnte auch die β -Untereinheit für den Transport von Ahnak zur Zellmembran verantwortlich sein. Die Bedeutung der β -Untereinheit beim Transport des α 1 β -Komplexes zur Zellmembran wurde bereits unter Punkt 4.1.1 ausführlich diskutiert. Sicher ist, daß die Bindung zwischen der β 2a-Untereinheit und dem Ahnak-C-Terminus ausreichend stark ist, um funktionelle Relevanz zu besitzen.

α 1- und β -Untereinheiten des Ca^{2+} -Kanals liegen -wie schon in Punkt 4.1.2 diskutiert- in nativen Geweben über komplementäre, hochaffine Bindungsstellen (AID und BID; $K_d \sim 5$ nM) miteinander in Assoziation vor (De Waard 1995). Unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß die β 2a-Untereinheit die α 1C-Untereinheit und Ahnak-C2 über voneinander verschiedene Bindungsdomänen bindet. So führte die Vorinkubation der β 2a-Untereinheit mit dem AID-Peptid in Overlay-Bindungsversuchen mit Ahnak-C2 nicht zu einem Verlust der Interaktion, sondern verbesserte im Gegenteil die Bindung zwischen beiden Proteinen. Dies könnte auf eine Stabilisierung der β 2a-Untereinheit durch die Bindung des AID-Peptids zurückzuführen sein. Bindungsversuche mit nativen Ca^{2+} -Kanalkomplexen und Ahnak-C2 bestätigten die Annahme, daß Ahnak-C2 und die α 1C-Untereinheit über verschiedene Bindungsdomänen mit der β 2a-Untereinheit interagieren. Wir konnten aus Herzhomogenat mit Hilfe von Ahnak-C2-Beads die α 1C-Untereinheit über ihre Interaktion mit der β 2-Untereinheit anreichern. Ein Befund, der die Bedeutung der β 2-Untereinheit als Verbindungsprotein zwischen Ahnak und der α 1C-Untereinheit heraushebt. Weitere Experimente mit nativen Ca^{2+} -Kanalkomplexen aus Skelettmuskel entsprachen diesem Resultat. So wurde mit Ahnak-C2-Beads die β 1a-Untereinheit des Skelettmuskels ebenfalls zusammen mit ihrer korrespondierenden α 1S-Untereinheit aus dem nativen Skelettmuskelhomogenat angereichert. Die Bindung von Ahnak

ist demnach nicht nur auf die kardiale $\beta 2$ -Isoform beschränkt. Wir gehen deshalb davon aus, daß konservierte Bindungsstellen zumindest in den beiden untersuchten β -Untereinheiten die Interaktion mit Ahnak vermitteln. Die Vermutung liegt nahe, daß die Bindung von Ahnak durch die β -Untereinheit in der L-Typ- Ca^{2+} -Kanalfamilie weit verbreitet sein könnte. Für eine direkte Interaktion zwischen Ahnak und der $\alpha 1$ -Untereinheit gibt es keinerlei Hinweise.

Unsere Ergebnisse belegen eindeutig, daß Ahnak spezifisch und mit hoher Affinität über seine C-terminalen 382-Aminosäuren an die $\beta 2$ -Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals bindet, wobei die Interaktion für verschiedene β -Isoformen konserviert ist.

Charakteristisch für das Riesenprotein Ahnak ist eine große mittlere Domäne (~4300 AS) mit repetitiven konservierten Sequenzen, die von einer N- und einer C-terminalen Region flankiert wird. Für diese von Shtivelman und Mitarbeitern als stabartig beschriebene Domäne wurde eine Länge von 1,2 μm kalkuliert (Shtivelman 1992). Auf zwei andere Riesenproteine, die als bedeutende Komponenten der Sarkomermatrix im Muskelgewebe vorkommen – Titin (~3000 kDa) und Nebulin (~700 kDa) – trifft ebenfalls eine solche Repeatstruktur zu. Die Länge beider Proteine wurde von Wang (1996) mit 0,9 bis 1,2 μm angegeben. Während Titin die Myosinfilamente mit den Z-Scheiben der Sarkomere verbindet, ist Nebulin im Skelettmuskel mit den dünnen Aktinfilamenten assoziiert und über seinen C-Terminus ebenfalls an die Z-Scheiben gebunden.

Für die $\alpha 1\text{C}$ - und die $\beta 2$ -Untereinheit wurde eine Lokalisation im T-Tubulussystem gezeigt (Gao 1997). Diese Einstülpungen der Plasmamembran sind den Z-Scheiben der Sarkomere benachbart. Interessanterweise konnte auch für kardiales Ahnak eine Assoziation mit dem T-Tubulussystem nachgewiesen werden (Abb. 17 von Frau Dr. Person, Bad Nauheim, freundlicherweise zur Verfügung gestellt). Diese Assoziation unterstreicht die physiologische Bedeutung der eigenen Befunde. Auch die Adenylatzyklase soll im T-Tubulussystem von Herzmyozyten lokalisiert sein (Gao 1997). Eine Interaktion zwischen der ionenleitenden und spannungsabhängigen $\alpha 1$ -Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals mit Ahnak über das β -Protein könnte somit externe Signale (Änderungen des Membranpotentials) mit internen Signaltransduktionswegen verbinden.

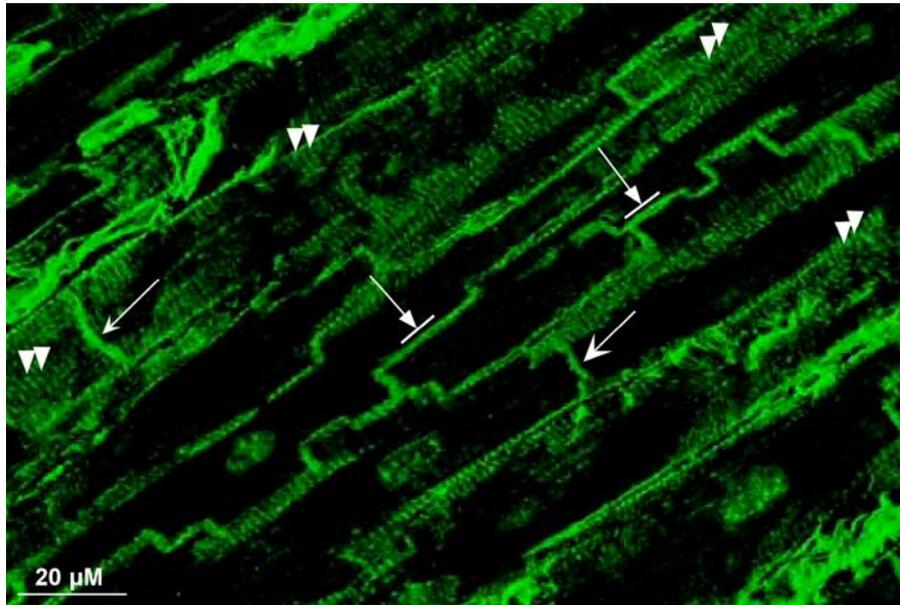


Abb.17: Lokalisation von Ahnak mit dem T-Tubulussystem im humanen Myokard; Immunfluoreszenzaufnahme, Längsschnitt. Das Experiment wurde mit einem Ahnak-Antikörper, der gegen die gesamte Ahnak-C2-Region gerichtet war, durchgeführt. Gezeigt sind drei Komponenten des Sarkolemma (SL): Freies SL \rightarrow , die transversalen-Tubuli \blacktriangledown und die Intercalationsscheiben \rightarrow . Die Pfeilköpfe kennzeichnen die Assoziation Ahnak's mit den transversalen-Tubuli.

Ahnak wurde von Sekiya und Mitarbeitern 1999 als Protein charakterisiert, daß an Phospholipase C- γ 1 bindet und diese aktiviert. In diesem ersten Bericht über eine Interaktion von Ahnak überhaupt wiesen die Autoren eine spezifische Bindung zwischen Phospholipase C- γ 1 und den Ahnak-Repeats nach. Da ein einzelnes Ahnak-Repeat für die Bindung von Phospholipase C- γ 1 ausreicht, sind multiple Interaktionen eines Moleküls Ahnak mit mehreren Molekülen Phospholipase C- γ 1 wahrscheinlich. Die Aktivierung von Phospholipase C- γ 1 über repetitive Ahnak-Domänen führte in den Versuchen von Sekiya und Mitarbeitern *in vitro* zur Synthese von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3)- und Diacylglycerol. Beide Moleküle können *in vivo* als Second-Messengers den intrazellulären Ca^{2+} -Fluß kontrollieren. IP3 diffundiert dabei ins Cytosol und kann durch die Bindung an den Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor (InsP3Rs) Ca^{2+} -Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum freisetzen.

Weiterhin konnte Ahnak kürzlich als bedeutendes Target-Protein für S100B identifiziert werden (Gentil 2001). S100B gehört zur Klasse der *EF-hand* Ca^{2+} -bindenden Proteine, zu denen auch Calmodulin gehört. Es kann nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen mit anderen intrazellulären Proteinen interagieren, wodurch es in eine Vielzahl zellulärer Funktionen, einschließlich Zell-Zell-Kommunikationen, Kontraktion und intrazellulären Signaltransduktions-Prozessen involviert ist (Zimmer 1995). Auch die Interaktion zwischen repetitiven Ahnak-Domänen und S100B wurde als Ca^{2+} -abhängig beschrieben, so daß Ahnak eventuell einer Ca^{2+} -abhängigen Regulation durch S100B unterliegt. Zudem war in S100B-Bindungsversuchen die Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen für die Interaktion mit Ahnak notwendig. S100B interagiert auch mit dem C-Terminus des Riesenproteins, ebenfalls in Ca^{2+} - und Zn^{2+} -abhängiger Weise. Bisher gibt es keine Angaben darüber, an welche Stelle S100B im Ahnak-C-Terminus bindet.

Die Interaktionen von Ahnak mit S100B, Phospholipase C- γ 1 sowie dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal deuten auf eine Rolle des Proteins als Regulatorprotein in der Ca^{2+} -Homöostase. Erst kürzlich wurde über eine wichtige Rolle von S100B in der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase in Astrozyten berichtet (Xiong 2000). In diesem Zusammenhang spekulierten Gentil und Mitarbeiter (2001) über eine Funktion des Proteins als Regulator für die Interaktion von Ahnak und Ca^{2+} -Kanal in Astrozyten. Die Modulation der Interaktion von Ahnak und β 2-Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals durch S100B wäre sicher ein interessanter Aspekt in einer weiterführenden Untersuchung zur Regulation dieser Interaktion.

Zellbiologische Daten unterstützen eine wichtige Rolle der Kalzium-Regulation der Ahnak-Interaktionen: So zeigte Ahnak bei veränderter Ca^{2+} -Konzentration in verschiedenen Zellen eine veränderte subzelluläre Verteilung (Hashimoto 1995, Nie 2000). In diesen Experimenten migrierte Ahnak nach Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration oder nach Zusatz von Proteinkinase C aus dem Zellkern heraus und zur Plasmamembran. Nie und Mitarbeiter (2000) demonstrierten in Keratinozyten, HeLa- und Cos-7-Zellen, daß der C-Terminus des Ahnak-Proteins für die Translokation zwischen den Kompartimenten Zellkern, Zytoplasma und Plasmamembran verantwortlich ist. Für den Transport von Ahnak in den Zellkern scheinen putative Kernlokalisationssequenzen im C-Terminus des Proteins verantwortlich zu sein (Shtivelman 1992). Außerdem enthält der C-Terminus eine sogenannte Leucin-Zipper-Sequenz, die in Genregulatorproteinen nachgewiesen wurde (Gentil 2001). Diese

strukturellen Eigenschaften deuten auf eine Funktion von Ahnak in der Signaltransduktion zwischen Plasmamembran und Zellkern.