

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)
Berlin-Buch

DISSERTATION

Untersuchung der Funktion von Ahnak1
in der Regulation des kardialen L-Typ-Ca²⁺-Kanals

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dipl. Ing. (FH) Ines Pankonien
aus Karlsburg

Gutachter: 1.: Prof. Dr. I. Morano

2.: Prof. Dr. A. Arner, MD, PhD

3.: Priv.-Doz. Dr. med. R. Vetter

Datum der Promotion: 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 1

Abstract..... 3

Einleitung 4

Zielstellung..... 6

Methoden..... 7

 Herstellung rekombinanter Proteine..... 7

 Herstellung von Antikörpern..... 7

 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot 7

 Mutationsscreening 7

 PKA-Phosphorylierung 7

 Massenspektrometrie 7

 Interaktionsstudien 7

 Immunassays 8

 Pull-Down 8

 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie..... 8

 Immunzytochemie..... 8

 Patch-Clamp-Technik..... 8

 Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff 8

 Statistik 8

Ergebnisse 9

 Ahnak1-Defizienz führt zu reduzierter Amplitude des I_{CaL} 9

 Ahnak1-Fragment des distalen C-Terminus verzögert die Inaktivierung des Cav1.2 9

 Polymorphismen im Ahnak1-Gen..... 10

 Ahnak1-Peptid des proximalen C-Terminus hemmt I_{CaL} nach β -adrenerger Stimulation .. 10

 Ahnak1 und die β_2 -Untereinheit kolokalisieren in den T-Tubuli von Kardiomyozyten..... 11

 Die SH3-HOOK-GK-Region in der β_2 -Untereinheit interagiert mit Ahnak1 11

 PKA-Phosphorylierung von Ser-296 an der β_2 -Untereinheit erhöht die Bindungsaffinität zu Ahnak1 11

Diskussion 12

Referenzen 17

Anteilerklärung 20

<i>Ausgewählte Publikationen</i>	22
<i>Lebenslauf</i>	57
<i>Komplette Publikationsliste</i>	58
<i>Selbständigkeitserklärung</i>	59
<i>Danksagung</i>	60

Abkürzungsverzeichnis

A	Adrenalin
AC	Adenylatzyklase
AID	α -Interaktionsdomäne
AKAP	A-Kinase-Ankerprotein
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
β -AR	β -adrenerger Rezeptor
Ba^{2+}	Bariumionen
Ca^{2+}	Kalziumionen
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav1.2	kardialer L-Typ- Ca^{2+} -kanal
CD	Circulardichroismus
CDI	Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung
Cm	Membrankapazität
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
$G\alpha_s$	stimulatorisches G-Protein
GK	Guanylatkinase
GST	Glutathion-S-Transferase
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
I_{CaL}	Ca^{2+} -Einstrom durch den L-Typ- Ca^{2+} -kanal
IgG	Immunglobulin G
ISO	Isoprenalin
IQ-Motiv	Isoleucin-Glutamin-Motiv
KO	Knock-Out
LVP	systolischer linksventrikulärer Druck
MAGUK	membranassoziierte Guanylatkinasen
NA	Noradrenalin
Na^+	Natriumionen
NCX	Na^+/Ca^{2+} -Austauscher
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
$Q_{Ca^{2+}}$	Ladungsmenge an Ca^{2+}
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	Scr-Homologie-3-Domäne

SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SSCP	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus
τ_{fast}	Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung
τ_{slow}	Zeitkonstante der langsamen Inaktivierung
UE	Untereinheit
VDI	spannungsabhängige Inaktivierung

Abstract

Einleitung: Im Herzen ist der spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (Cav1.2) für den kontrollierten Ca^{2+} -Einstrom (I_{CaL}) in die Zelle und die damit verbundene Erregungs-Kontraktions-Kopplung verantwortlich. Die Interaktion der β_2 -Untereinheit (β_2 -UE) mit der porenbildenden α_{1C} -Untereinheit ist sowohl für den Transport des Kanals zur Zellmembran als auch für die Aktivierung und Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals essentiell. Ahnak1 ist ein 700 kDa großes Gerüstprotein, welches mit der β_2 -UE des kardialen Ca^{2+} -Kanals interagiert. Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Ahnak1 eine Rolle in der Regulation des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals spielt. In dieser Arbeit wurde die Funktion von Ahnak1 in der Regulation des Ca^{2+} -Kanals auf struktureller und funktioneller Ebene untersucht.

Methodik: Ca^{2+} - und Ba^{2+} -Ströme durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal wurden mittels der Patch-Clamp-Technik an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten gemessen. An diesen isolierten Zellen wurden Ahnak1 und die β_2 -UE immunzytochemisch lokalisiert. Zur Untersuchung der Herzfunktion von Ahnak1-Knock-Out (KO)-Mäusen wurde die Methode des isoliert perfundierten Herzens nach Langendorff angewandt. Interaktionen zwischen Ahnak1 und der β_2 -UE des Ca^{2+} -Kanals wurden mittels Ultrazentrifugation, Oberflächen-Plasmon-Resonanz und Immunassays studiert. Die strukturellen Analysen wurden mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektroskopie und der Massenspektrometrie durchgeführt.

Ergebnisse: Die morphologische Untersuchung von Ahnak1-KO-Kardiomyozyten ergab eine signifikante Verkürzung der Zellen. Ahnak1-defiziente Kardiomyozyten wiesen einen reduzierten I_{CaL} und eine beschleunigte Inaktivierung des Ca^{2+} -Stroms auf. Damit übereinstimmend zeigten weitere Ca^{2+} - und Ba^{2+} -Strommessungen an Wildtyp-Kardiomyozyten, dass die intrazelluläre Perfusion mit einem Fragment des distalen C-Terminus von Ahnak1 die Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals verzögert. In Ahnak1-KO-Kardiomyozyten hingegen wurde die Inaktivierung durch die Ahnak1-Perfusion nicht modifiziert. Am gesamten Herzen im Langendorff-Modell zeigten sich keine Unterschiede zwischen Ahnak1-KO und dem Wildtyp. Die Herzen von Ahnak1-KO-Mäusen konnten genauso stark durch Adrenalin stimuliert werden wie die des Wildtyps. Auch Ahnak1-KO-Kardiomyozyten zeigten eine intakte Isoprenalin (ISO)-Stimulation. Die Perfusion von Wildtyp-Kardiomyozyten mit einem Peptid P4984 des proximalen C-Terminus von Ahnak1 hatte jedoch eine reduzierte Antwort auf den β -adrenergen Rezeptor-Agonisten ISO zur Folge. Auch dieser modulatorische Effekt (auf die Kanalaktivität) wurde, ähnlich wie für die Inaktivierung beobachtet, in Ahnak1-KO-Kardiomyozyten nicht gefunden.

Erstmals konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Ahnak1 und die β_2 -UE in den T-Tubuli isolierter Kardiomyozyten koloalisieren. Interaktionsstudien zwischen Ahnak1 und der β_2 -UE zeigten, dass zwei im C-Terminus von Ahnak1 lokalisierte PxxP-Motive wichtig für die hochaffine Bindung zwischen beiden Proteinen sind. Weiterhin wurde in der β_2 -UE die zentrale Region, bestehend aus einer SH3 (Scr-Homologie-3)-Domäne, einer HOOK- und einer Guanylatkinase (GK)-Domäne, als Interaktionsregion für den C-Terminus von Ahnak1 kartiert. Innerhalb der GK-Domäne der β_2 -UE konnte Ser-296 als neue Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase A (PKA) identifiziert werden. Die PKA-vermittelte Phosphorylierung von Ser-296 an der β_2 -UE erhöhte zudem die Bindungsaffinität zu Ahnak1.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Ahnak1 als positiver Regulator des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals wirkt. Ahnak1-Defizienz und Applikation von Ahnak1-Fragmenten modulierten neben basaler Stromdichte und Inaktivierungskinetik auch die β -adrenerge Regulation des I_{CaL} .

Einleitung

Der kardiale L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (Cav1.2) spielt eine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung der physiologischen Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle und die damit verbundene Erregungs-Kontraktions-Kopplung im Herzen. Nach einer Depolarisation der Zellmembran öffnen sich die Ca^{2+} -Kanäle in den T-Tubuli und erlauben den Einstrom extrazellulärer Kalziumionen (Ca^{2+}) in die Zelle. Dadurch wird eine weitere Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) ausgelöst, was zur Kontraktion der Herzmuskelzelle führt [1,2]. Das Öffnungsverhalten der Kanäle kann durch Hormone und Pharmaka moduliert werden [3,4]. Eine Vielzahl von Studien zeigen, dass eine Fehlfunktion der Ca^{2+} -Kanäle zu kardialen Erkrankungen wie Arrhythmien, dem Brugada-Syndrom oder dem Timothy-Syndrom führen kann [5,6,7].

Cav1.2 ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus der porenbildenden α_{1C} -Untereinheit (α_{1C} -UE) und den zwei akzessorischen Untereinheiten β_2 (β_2 -UE) und $\alpha_2\delta$ (Abb. 1) [3,8]. Die α_{1C} -UE ist aus vier homologen Domänen aufgebaut, die sich aus je sechs Transmembransegmenten zusammensetzen. Im jeweils vierten Segment ist der Spannungssensor lokalisiert [9]. Des Weiteren befinden sich an der α_{1C} -UE die Bindungsstellen für Kalziumkanalblocker [4]. Der distale C-Terminus der α_{1C} -UE wird an der Aminosäureposition 1820 proteolytisch gespalten und bleibt vermutlich als auto-inhibitorische Domäne erhalten [10]. Im proximalen C-Terminus befindet sich ein für die Inaktivierung wichtiges Isoleucin-Glutamin (IQ)-Motiv (AS 1654-1665). Das Schließen des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals erfolgt über zwei verschiedene Wege: Einerseits durch die lang anhaltende Depolarisation, die so genannte spannungsabhängige Inaktivierung (VDI) und andererseits durch die Ca^{2+} -abhängige schnelle Inaktivierung (CDI) [8,11].

Die intrazelluläre β_2 -UE des Cav1.2 spielt eine wesentliche Rolle für den Transport der α_{1C} -UE an und den Einbau in die Zellmembran sowie für die Aktivierung und Inaktivierung des Kanals. Sie interagiert mit der α_{1C} -UE über die α -Interaktionsdomäne (AID) in der ersten intrazellulären Schleife (α_{1C} -I-II-Linker), welche Domäne eins und zwei miteinander verbindet (Abb. 1) [9,12,13]. In der β_2 -UE findet man Strukturelemente der MAGUK (membranassoziierte Guanylatkinasen)-Familie. Diese umfassen eine SH3 (Src-Homologie-3)- und eine Guanylatkinase (GK)-Domäne, die durch eine variable Domäne (HOOK) verbunden sind (Pankonien et. al 2012, Abb. 2A) [14,15].

Während so genannter „Fight-or-Flight“ Reaktionen (Stressreaktionen) erfolgt die Regulation des Cav1.2 über die Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung. Die sympathische Stimulation des β -adrenergen Rezeptors durch die Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin führt über stimulierende G-Proteine ($G\alpha_s$) zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), welche vermehrt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) produziert. Die daraufhin durch cAMP aktivierte PKA phosphoryliert u.a. den spannungsgesteuerten L-Typ- Ca^{2+} -Kanal. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und damit zum erhöhten Ca^{2+} -Einstrom (I_{CaL}) in das Zellinnere, wo eine weitere Ca^{2+} -induzierte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR zu einer gesteigerten Kontraktionskraft und -rate des Herzens führt [1,2]. Für diese Regulation muss die PKA direkt über das A-Kinase-Ankerprotein (AKAP) an den C-Terminus der α_{1C} -UE gebunden sein [16]. Abbildung 1 zeigt den Aufbau von Cav1.2 und die Regulation über den β -adrenergen Signalweg.

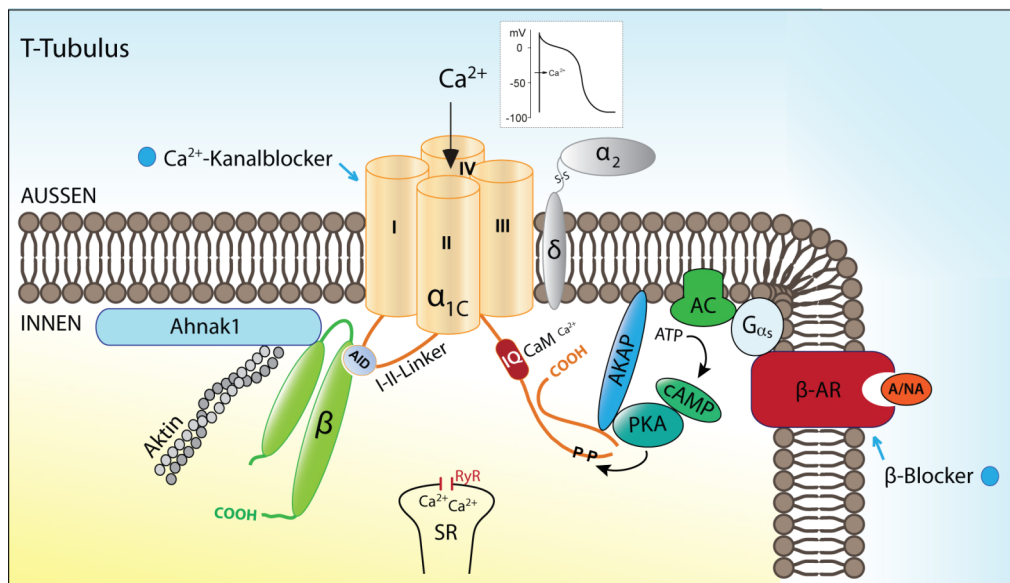


Abb. 1: Schematische Darstellung des spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals und dessen Regulation über die Proteinkinase A (PKA) im Herzen. Die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren (β -AR) durch Adrenalin (A) oder Noradrenalin (NA) führt über G-Proteine (G_{α_s}) zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), die vermehrt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) produziert. Die daraufhin über cAMP aktivierte PKA-Phosphorylierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals führt zum erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Dieser wiederum löst eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) aus und führt in Folge dessen zu einer gesteigerten Kontraktionskraft des Herzens. Abkürzungen: AID = α -Interaktionsdomäne, AKAP = A-Kinase-Ankerprotein, ATP = Adenosintriphosphat, CaM = Calmodulin, IQ = Isoleucin-Glutamin-Motiv, RyR = Ryanodinrezeptor

Wo sich die für die Ca^{2+} -Kanalregulation entscheidenden PKA-Phosphorylierungsstellen in Cav1.2 und/oder in dessen Untereinheiten oder Interaktionspartnern befinden, war bis zum Beginn dieser Arbeit unklar. Bisher wurde angenommen, dass die PKA-Phosphorylierung von Ser-1928 im distalen C-Terminus der α_{1C} -UE die Aktivität des Ca^{2+} -Kanals reguliert [10,17]. Daneben gelten aber auch Ser-478 und Ser-479 in der β_2 -UE als potentielles Ziel der PKA-Phosphorylierung in der Regulation des I_{CaL} [18]. Ahnak1, ein 700 kDa großes Gerüstprotein, spielt in einer Vielzahl biologischer Prozesse eine Rolle [19,20,21]. In unserer Arbeitsgruppe wurde Ahnak1 einerseits durch Kopräzipitation als Interaktionspartner der β_2 -UE des kardialen Ca^{2+} -Kanals identifiziert [22]. Andererseits wurde herausgefunden, dass Ahnak1 auch mit Aktin assoziiert ist [23]. Ahnak1 besteht aus einer großen zentralen Domäne mit konservierten repetitiven Sequenzen, flankiert von einem kurzen N-Terminus und einem ≈ 1000 Aminosäuren großen C-Terminus (Pankonien et. al 2011, Abb. 1a) [22,24]. Ahnak1 interagiert über mehrere Bindungsstellen in seinem C-Terminus mit der β_2 -UE und wird ebenfalls durch PKA phosphoryliert [22,23]. Bisherige Befunde schrieben Ahnak1 eine Rolle bei der Inaktivierung und der β -adrenergen Regulation des Ca^{2+} -Kanals zu [19,25,26]. Die Kartierung der funktionellen Interaktionsdomänen und die damit verbundene Aufklärung der Funktion von Ahnak1 in der Regulation des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals im Herzen bilden den Schwerpunkt der vorliegenden Forschungsarbeit.

Zielstellung

Das gemeinsame Ziel der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Publikationen bestand darin, die Interaktionen zwischen Ahnak1 und der β_2 -UE des spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals im Herzen auf struktureller und funktioneller Ebene zu untersuchen. In den vorliegenden Veröffentlichungen wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen.

1. Publikation: Wie unterscheiden sich Ahnak1-KO-Kardiomyozyten vom Wildtyp hinsichtlich ihrer Morphologie und des I_{CaL} ? Welche Rolle spielt der distale C-Terminus von Ahnak1 in der Inaktivierungskinetik von Cav1.2?

2. Publikation: Hat der proximale C-Terminus von Ahnak1 einen Einfluss auf die β -adrenerge Regulation von I_{CaL} ? Unterscheidet sich die Herzfunktion von Ahnak1-KO-Mäusen vom entsprechenden Wildtyp hinsichtlich der β -adrenergen Regulation?

3. Publikation: Wo liegen die funktionell bedeutsamen Interaktionsstellen von Ahnak1 in der β_2 -UE? Existieren weitere PKA-Phosphorylierungsstellen in der β_2 -UE mit Bedeutung für die Bindung an Ahnak1 und/oder den $\alpha_{1\text{C}}$ -I-II-Linker des Cav1.2?

Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die angewandten Methoden kurz erläutert. Eine detaillierte Beschreibung ist in den Publikationen zu finden.

Herstellung rekombinanter Proteine

Der C-Terminus sowie die C-terminalen Fragmente von Ahnak1, β_2 -UE, α_{1C} -I-II-Linker, α_{1C} -II-III-Linker wurden als GST- bzw. HIS-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt. Mutationen wurden mit Hilfe eines Mutagenese-Kits eingeführt.

Herstellung von Antikörpern

Die Antikörper gegen den C-Terminus von Ahnak1, β_2 -pSer-296 und β_2 -pSer-p478/pSer-479 wurden in Kaninchen hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte über Bromcyan-aktivierte Sepharose-Säulen, gekoppelt mit GST-Ahnak1-C-Terminus bzw. den synthetischen Peptiden SNTRS-pS-LAEVQ und QHRS-pSpS-SAPH aus der Proteinsequenz der β_2 -UE.

SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in 6% bzw. 10% SDS-Polyacrylamidgelen. Die Proteine wurden entweder mit Coomassie-Blau angefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membranen mit spezifischen Antikörpern gefolgt vom zweiten Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-Antikörper und anschließender Chemilumineszenzreaktion.

Mutationsscreening

192 unabhängige Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie 96 Kontrollpersonen wurden genotypisiert. Insgesamt wurden 7 überlappende Fragmente, die den C-Terminus des Ahnak1-Gens umfassen, mittels PCR und anschließender SSCP (Einzelstrang-Konformationspolymorphismus) durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Vera Regitz-Zagrosek (Charité) analysiert.

PKA-Phosphorylierung

Für die *in vitro* Phosphorylierung wurde die rekombinante GST- β_2 -UE für 10 min bei 30°C mit ATP, Mg^{2+} und isolierter katalytischer Untereinheit der PKA inkubiert.

Massenspektrometrie

Die PKA-phosphorylierte β_2 -UE wurde in Kooperation mit Dr. Albrecht Otto (MDC, Proteinchemie) massenspektrometrisch (NanoLC-MS/MS) analysiert.

Interaktionsstudien

Mit der Ultrazentrifugation wurde der Sedimentationsvorgang der β_2 -UE mit dem distalen C-Terminus von Ahnak1 optisch in einer Ultrazentrifuge untersucht, um Aussagen über deren Molekulargewicht sowie deren Komplexbildung/Interaktion zu erhalten. Mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Spektroskopie wurden Polymorphismen im C-Terminus von Ahnak1 hinsichtlich der Interaktion mit der β_2 -UE untersucht. Die Phosphorylierung der β_2 -UE im Bezug auf die Bindung zum α_{1C} -I-II-Linker und Ahnak1 wurde auch mittels SPR analysiert. Hierbei wird ein Protein als Ligand an einen Sensorchip kovalent gebunden, während der Interaktionspartner als Analyt über den Chip fließt und die Interaktion (Assoziation und Dissoziation) in Echtzeit gemessen wird.

Immunassays

Mittels eines Enzymimmunoassays wurden die Bindungsaffinitäten der mutierten C-terminalen Ahnak1-Proteine zur β_2 -UE bestimmt. Die Ahnak1-Proteine wurden an Mikrotiterplatten immobilisiert und mit verschiedenen Konzentrationen der β_2 -UE inkubiert. Für die Detektion wurde ein β_2 -Antikörper verwendet. In einem zweiten Assay wurden die Interaktionsstellen der β_2 -UE an Ahnak1 kartiert, wobei die verkürzten β_2 -Konstrukte an die Mikrotiterplatten immobilisiert wurden und die C-terminale Domäne von Ahnak1 als Analyt diente. Der Nachweis erfolgte im Western Blot mit einem Ahnak1-Antikörper.

Pull-Down

Ventrikuläre Gewebeproben vom Ratten- und Mauserz wurden in Puffer homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 100000 x g erhielt man die zytosolische Fraktion. Für die kardiale Membranfraktion wurde das Gewebe zweimal in Kaliumchlorid-Puffer homogenisiert und in Niedrig-Salz-Puffer aufgenommen. Der GST- α_{1C} -I-II-Linker wurde an eine mit Glutathion-Sepharose gepackte Säule gebunden und mit den zytosolischen Fraktionen vom Ratten- und Mauserz inkubiert. In SDS-Probenpuffer aufgenommen wurden die Proteine mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die Auswirkung des Aminosäureaustausches A4984P im proximalen C-Terminus von Ahnak1 wurde hinsichtlich Struktur und Stabilität mit Hilfe der CD-Spektroskopie analysiert. CD-Spektren wurden bei $\lambda=180-260$ nm (25 °C) und thermische Entfaltungskurven bei $\lambda=220$ nm mit ansteigender Temperatur (4-94 °C) im J-720 Spektrometer gemessen.

Immunzytochemie

Isolierte Mauskardiomyozyten wurden auf lamininbeschichteten Deckgläsern ausgesät. Für die Färbung wurden Maus-anti-Ahnak1-NT und Kaninchen-anti- β_2 als Primärantikörper mit Ziege-anti-Maus-IgG Alexa488 und Ziege-anti-Kaninchen-IgG Alexa568 als sekundäre Antikörper eingesetzt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Fluoreszenz-Lasermikroskop.

Patch-Clamp-Technik

Ca^{2+} - und Ba^{2+} - Ströme wurden mit der Ganzzell-Konfiguration an isolierten Kardiomyozyten aus Rattenherzen und Ahnak1-KO-Mauserzen (6 bzw. 3 Monate) gemessen. Zur intrazellulären Perfusion mit Ahnak1-Fragmenten und -Peptiden wurden diese über die Patch-Pipette appliziert. Bestimmt wurden u.a. die Amplitude von I_{CaL} in pA, die Membrankapazität (Cm) in pF, Inaktivierungszeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} in ms, die Ladungsmenge an Ca^{2+} ($Q_{\text{Ca}^{2+}}$) in pC/pF und die Strom-Spannungs-Beziehung.

Isoliert perfundiertes Herz nach Langendorff

Isolierte Herzen von 3 Monate alten Ahnak1-KO-Mäusen und entsprechendem Wildtyp wurden nach Langendorff auf ihre kardialen Parameter hin untersucht.

Statistik

Für statistische Analysen wurden der gepaarte sowie der ungepaarte T-Test und die Analyse nach ANOVA herangezogen. Statistisch signifikant waren Werte ab $p < 0,05$.

Ergebnisse

1. Publikation: Untersuchung von Ahnak1-Knock-Out-Kardiomyozyten und die Rolle des distalen C-Terminus von Ahnak1 in der Inaktivierungskinetik

Ahnak1-Defizienz führt zu reduzierter Amplitude des I_{CaL}

Der Vergleich von isolierten Ahnak1-KO-Kardiomyozyten mit den entsprechenden Wildtyp-Kardiomyozyten von Mäusen (6 Monate alt) ergab, dass Ahnak1-KO Kardiomyozyten kürzer sind, aber die gleiche Querstreifung und Sarkomerlänge aufweisen (Alvarez et. al 2010, Abb. 4). Auch eine verminderte Membrankapazität (C_m) der Ahnak1-KO-Kardiomyozyten konnte gemessen werden. Des Weiteren führte Ahnak1-KO zu einem reduzierten maximalen I_{CaL} (reduzierte Amplitude des Ca^{2+} -Stroms) und zu einer beschleunigten Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals. Die schnellere Inaktivierung zeigte sich in einer signifikant reduzierten Inaktivierungszeitkonstante τ_{fast} des Ca^{2+} -Kanals in Ahnak1-KO-Kardiomyozyten. Folglich strömten weniger Ca^{2+} -Ionen ($Q_{Ca^{2+}}$) in die Zelle. (Alvarez et. al 2010, Tab. 2, Abb. 5). Eine Veränderung in der Strom-Spannungs-Beziehung ist durch Ahnak1-KO nicht entstanden.

Aufgrund der Unterschiede der Ahnak1-KO-Mauskardiomyozyten zum entsprechenden Wildtyp wurde die Proteinexpression der α_{1C} - und β_2 -UE im Herzen untersucht. Ahnak1-KO sowie der Wildtyp wiesen gleiche Proteinmengen der α_{1C} - und β_2 -UE in der Membranfraktion von Herzhomogenaten auf. Jedoch wurde zwischen den Spezies Maus und Ratte eine voneinander abweichende Expression der β_2 -UE festgestellt. Neben der 80 kDa β_2 -Isoform in der Maus, zeigte sich eine weitere Isoform mit einer Größe von 95 kDa in der Ratte (Alvarez et. al 2010, Abb. 8).

Ahnak1-Fragment des distalen C-Terminus verzögert die Inaktivierung des Cav1.2

Im distalen C-Terminus (188 AS) von Ahnak1, welches von Position 5592 bis 5595 ein PxxP-Motiv aufweist (188-PSTP), wurden eine nieder- (60 nM) und eine hochaffine (300 nM) Bindungsstelle für die β_2 -UE identifiziert. Mit einer Substitution der beiden Proline des PxxP-Motivs zu Alanin (188-ASTA) wurde eine der zwei Bindungsstellen eliminiert. Die verbliebene Bindung zur β_2 -UE zeigte eine deutlich schwächere Affinität (1 μ M) (Alvarez et. al 2010, Abb. 1). Die intrazelluläre Perfusion adulter Kardiomyozyten der Ratte (6 Monate alt) mit dem distalen Ahnak1-Fragment 188-PSTP (100 nM) erhöhte die Inaktivierungszeitkonstante τ_{fast} des Ca^{2+} -Kanals um 10% bei Messungen mit Ca^{2+} als Ladungsträger. Die Perfusion mit dem Ahnak1-Fragment 188-ASTA (ab 5 μ M) erhöhte beide Zeitkonstanten τ_{fast} und τ_{slow} der Inaktivierung. Mit verzögerter Inaktivierung war somit die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und damit der Einstrom an Ca^{2+} erhöht. (Alvarez et. al 2010, Abb. 3). In Anwesenheit von Ba^{2+} als Ladungsträger führte die Perfusion mit den Ahnak1-Fragmenten auch zu einer signifikant verzögerten Inaktivierung (τ_{fast} und τ_{slow}) und damit zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Ca^{2+} -Kanals (Alvarez et. al 2010, Abb. 3).

Im Gegensatz dazu blieben die Parameter des I_{CaL} von Ahnak1-KO-Kardiomyozyten nach intrazellulärer Perfusion mit den Ahnak1-Fragmenten unverändert (Alvarez et. al 2010, Abb. 6, 7).

2. Publikation: Die Rolle des proximalen C-Terminus von Ahnak1 in der β -adrenergen Regulation des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals

Polymorphismen im Ahnak1-Gen

In einer vorhergehenden Studie stellte sich der Polymorphismus I5483T im Ahnak1-Gen hinsichtlich der Bindung zur β_2 -UE und der β -adrenergen Modulation als funktionell bedeutend heraus. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Interaktion von Ahnak1 mit der β_2 -UE und der Regulation des I_{CaL} besteht, indem Ahnak1 durch seine Bindung an die β_2 -UE den I_{CaL} hemmt. Durch PKA-Phosphorylierung wurde die Bindung gelockert und ging mit einem ansteigenden I_{CaL} einher [19,26]. Diese Hypothese führte zu einer Untersuchung von weiteren Ahnak1-Polymorphismen. Ein unbekannter Polymorphismus T5796M und zwei bekannte Polymorphismen G5242R und V5075M wurden im C-terminalen Ahnak1-Gen von Patienten mit dilatativer und hypertropher Kardiomyopathie sowie Kontrollpersonen identifiziert (Pankonien et. al 2011, Abb. 1a) und hinsichtlich der Interaktion mit der β_2 -UE untersucht. M5796, lokalisiert im distalen C-Terminus von Ahnak1, zeigte wie das entsprechende Wildtyp-Protein mit T5796 eine intakte Bindung mit zwei Bindungsstellen für die β_2 -UE. Die beiden im proximalen C-Terminus von Ahnak1 lokalisierten Polymorphismen G5242R und V5075M hatten nur einen geringen bzw. keinen Effekt auf die Bindung zur β_2 -UE. Die verminderte Affinität von Ahnak1-R5242 zur β_2 -UE, gemessen mit der SPR-Spektroskopie, konnte in der Ultrazentrifugation nicht bestätigt werden (Pankonien et. al 2011, Abb. 1b, c). Daher wurden diese Polymorphismen nicht weiter untersucht.

Ahnak1-Peptid des proximalen C-Terminus hemmt I_{CaL} nach β -adrenerger Stimulation

Eine Diskrepanz in zwei Datenbankeinträgen des proximalen C-Terminus von Ahnak1 führte zur Untersuchung eines Aminosäureaustausches von Alanin zu Prolin an Position 4984 (A4984P), welches mit Prolin an Position 4987 ein PxxP-Motiv bildet. In Bindungsstudien der SPR-Spektroskopie und in Immunassays zeigte Ahnak1-P4984 eine erhöhte Affinität zur β_2 -UE (Pankonien et. al 2011, Abb. 2). Daraufhin wurde der proximale C-Terminus von Ahnak1, jeweils mit Alanin und Prolin an Position 4984, strukturell mittels CD-Spektroskopie untersucht. Beide Proteine wiesen die gleiche Konformation mit 26% α -Helix, 23% β -Faltblatt und 54% zufällig gefaltet, auf. Innerhalb der Denaturierung stellte sich das Ahnak1-P4984-Protein mit einem Schmelzpunkt von 58°C im Vergleich zu 61°C jedoch als instabilere Variante heraus (Pankonien et. al 2011, Abb. 3).

Um A4984P hinsichtlich des I_{CaL} an Mauskardiomyozyten zu untersuchen wurden diese intrazellulär mit dem proximalen Ahnak1-Peptid P4984 perfundiert. P4984 verkürzte die Inaktivierungszeit (Zeitkonstante τ_{slow} reduziert), wodurch der Kanal schneller inaktivierte. Weiterhin hemmte das Ahnak1-Peptid den ansteigenden Ca^{2+} -Einstrom nach β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin (ISO) um 80%. Im Gegensatz dazu ließen sich Ahnak1-KO-Kardiomyozyten gleich stark durch ISO stimulieren und die Stimulation konnte durch das Ahnak1-Peptid nicht moduliert werden (Pankonien et. al 2011, Abb. 4). Daraufhin wurden Langendorff-Messungen an isolierten Mausherzen von Ahnak1 und Ahnak1-KO untersucht. Ahnak1-KO-Herzen (3 Monate alte Mäuse) zeigten im Vergleich zu ihrem entsprechenden Wildtyp keinen Unterschied im systolisch linksventrikulären Druck (LVP) unter basalen und mit Adrenalin stimulierten Bedingungen. Auch die Werte der Kontraktions- und Relaxationsrate unterschieden sich nicht wesentlich (Pankonien et. al 2011, Abb. 5).

3. Publikation: Identifizierung und Charakterisierung von Ser-296 als neue PKA-Phosphorylierungsstelle in der β_2 -Untereinheit

Ahnak1 und die β_2 -Untereinheit kolokalisieren in den T-Tubuli von Kardiomyozyten

In immunzytochemischen Untersuchungen an isolierten ventrikulären Mauskardiomyozyten zeigten die β_2 -UE des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals und Ahnak1 jeweils eine punktierte und quergestreifte intrazelluläre Färbung. Beide kolokalisieren in den T-Tubuli der Kardiomyozyten. Weiterhin konnte eine Kolokalisation um den Zellkern herum beobachtet werden, während Ahnak1 allein auch an der Zellmembran lokalisiert wurde (Pankonien et. al 2012, Abb. 1).

Die SH3-HOOK-GK-Region in der β_2 -Untereinheit interagiert mit Ahnak1

Mit rekombinanten Fragmenten der β_2 -UE, welche die konservierten und nicht-konservierten Domänen umfassen, wurde die Bindung an den proximalen C-Terminus von Ahnak1 untersucht. Das Konstrukt der β_2 -UE, welches die SH3-, HOOK- und GK-Domäne umfasst, zeigte die gleiche Bindung wie die gesamte β_2 -UE. In Abwesenheit der GK-Domäne war die Bindung minimal reduziert. Die GK-Domäne allein band nur sehr schwach. Der C- und N-Terminus der β_2 -UE spielten keine Rolle in der Bindung an Ahnak1 (Pankonien et. al 2012, Abb. 2).

PKA-Phosphorylierung von Ser-296 an der β_2 -Untereinheit erhöht die Bindungsaffinität zu Ahnak1

Auf der Suche nach weiteren PKA-Phosphorylierungsstellen in der β_2 -UE, die eine Rolle in der β -adrenergen Regulation spielen könnten, wurde Ser-296 innerhalb der GK-Domäne identifiziert. Eine bereits bekannte Phosphorylierungsstelle Ser-479 [18,27] wurde ebenfalls gefunden. Mit der Herstellung phosphospezifischer Antikörper gegen Ser-296 und Ser-479 wurde die Spezifität der Phosphorylierung nachgewiesen.

Die PKA-Phosphorylierung der gesamten β_2 -UE (Ser-296 und Ser-479) wurde in SPR-Bindungsstudien hinsichtlich der Interaktion zum proximalen C-Terminus von Ahnak1 untersucht. Die Phosphorylierung veränderte die Bindung an Ahnak1 maßgeblich. Die Affinität der beiden Proteine zueinander erhöhte sich, wohingegen sich die Kapazität der Bindung von Ahnak1 an die β_2 -UE reduzierte. Die Substitution von Ser-296 zu Glu-296, zur Imitation der Phosphorylierung, veränderte die Bindung an Ahnak1 in gleicher Weise wie die phosphorylierte β_2 -UE. Die Bindungsaffinität erhöhte sich und die Kapazität reduzierte sich (Pankonien et. al 2012, Abb. 3).

Da die β_2 -UE mit ihrer Bindung an den α_{1C} -I-II-Linker wichtige Funktionen erfüllt [13], wurde die PKA-Phosphorylierung von Ser-296 auch hinsichtlich dieser Interaktion untersucht. Die Interaktionsversuche ergaben, dass die Phosphorylierung von Ser-296 keinen Einfluss auf die Bindung der β_2 -UE an den α_{1C} -I-II-Linker hat (Pankonien et. al 2012, Abb. 4).

Diskussion

Ahnak1 interagiert mit seinem C-Terminus über multiple Bindungsstellen mit der β_2 -UE des kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals (Cav1.2) [22,23,25]. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass Ahnak1 die Aktivität des Ca^{2+} -Kanals modulieren kann [25,26]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Ahnak1 in der Regulation des kardialen Cav1.2 auf struktureller und funktioneller Ebene untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Ahnak1 neben der Erhöhung des I_{CaL} und der Verzögerung der Inaktivierung des I_{CaL} auch die β -adrenerge Regulation beeinflusst. Damit scheint Ahnak1 ein positiver Regulator des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals im Herzen zu sein.

Ahnak1 wurde in Herzmuskelzellen an der Plasmamembran lokalisiert [23]. Auch die β_2 -UE liegt intrazellulär am Sarkolemm vor [28]. Die in dieser Studie immunzytochemisch erzielten Ergebnisse sind ein weiteres Indiz für die Assoziation der beiden Proteine. Ahnak1 und die β_2 -UE kolokalisieren in den t-tubulären Strukturen der Plasmamembran, zeigen aber auch eine gemeinsame Lokalisation um den Zellkern herum, die bisher noch nicht beschrieben wurde. Ahnak1 allein ist auch an der Außenseite des Sarkolemm zu finden. Dort ist es vermutlich über Dysferlin am Membrankomplex beteiligt [20,29]. Es ist anzunehmen, dass die Interaktion von Ahnak1 mit der β_2 -UE des Ca^{2+} -Kanals herzspezifisch ist, denn im Skelettmuskel präsentiert sich Ahnak1 nur in den Costameren der äußeren Zellmembran [30]. Während der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal für die Erregungs-Kontraktions-Kopplung im Herzen essentiell ist, wird er für die Kontraktion im Skelettmuskel nicht vorausgesetzt [31,32]. Die Funktion, die Ahnak1 am Ca^{2+} -Kanal im Herzen übernimmt, scheint nicht bedeutend für den Ca^{2+} -Kanal im Skelettmuskel zu sein. Diese Erkenntnis deutet auf eine unterstützende Funktion von Ahnak1 in der Aktivierung des kardialen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals hin.

Morphologische und funktionelle Untersuchungen an Kardiomyozyten von 6 Monate alten Ahnak1-KO-Mäusen [33,34] und dem entsprechenden Wildtyp ergaben wesentliche Unterschiede. Ahnak1-KO-Kardiomyozyten sind kürzer im Vergleich zum Wildtyp. Da die Sarkomerlänge jedoch keine Veränderung zeigte, kann die Verkürzung der Ahnak1-KO-Zellen nicht auf eine erhöhte Kontraktion zurückgeführt werden.

In Ahnak1-KO-Kardiomyozyten wurde ein signifikant reduzierter I_{CaL} im Vergleich zu den Wildtyp-Kardiomyozyten gemessen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Ahnak1 im Herzen zu einer Erhöhung des I_{CaL} führt. Der verminderte I_{CaL} in Ahnak1-KO-Kardiomyozyten geht einher mit Ergebnissen über Ahnak1-defiziente-Osteoblasten und -T-Lymphozyten [35,36]. In Osteoblasten stabilisiert Ahnak1 den Komplex aus Plasmamembran, Ca^{2+} -Kanal und β_2 -Untereinheiten und trägt darüber zum erhöhten I_{CaL} in die Zelle bei. In T-Lymphozyten ist Ahnak1 über seine Bindung an die β_2 -UE für den Einbau des Kanals in die Membran verantwortlich und an der Aktivierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals beteiligt [35].

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch keine Unterschiede in der Expression der α_{1C} -UE in der Membran von Ahnak1-KO-Herzen im Vergleich zum Wildtyp. Vermutlich ist Ahnak1 demnach nicht für den Einbau der α_{1C} -UE in die Membran von Kardiomyozyten verantwortlich, was aber nicht ausschließt, dass Ahnak1 über die Interaktion mit der β_2 -UE an der Aktivierung des kardialen Ca^{2+} -Kanals beteiligt ist.

In Ahnak1-KO-Kardiomyozyten wurde eine beschleunigte Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals festgestellt. Insbesondere die Zeitkonstante τ_{fast} war signifikant reduziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Ahnak1 nicht nur den maximalen I_{CaL} beeinflusst, sondern vermutlich auch die Inaktivierungskinetik des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals reguliert. Befunde einer früheren Arbeit schrieben dem distalen C-Terminus von Ahnak1 bereits eine Rolle in der Inaktivierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals zu [25]. In der vorliegenden Arbeit führte eine intrazelluläre Perfusion von Kardiomyozyten mit Fragmenten des distalen C-Terminus von Ahnak1 auch zu einer verzögerten Inaktivierung von Cav1.2. Dahingegen führte die intrazelluläre Perfusion von Kardiomyozyten mit einem Peptid des proximalen C-Terminus von Ahnak1 zu einer beschleunigten Inaktivierung. Diese Effekte geben einen weiteren indirekten Hinweis darauf, dass Ahnak1 an der Regulation der Inaktivierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals beteiligt ist. Jedoch sind diese Effekte nicht in Ahnak1-KO-Kardiomyozyten beobachtet worden. Ahnak1 spielt hier vermutlich eine permissive Rolle.

Beim Cav1.2 existieren zwei komplexe Prozesse der Inaktivierung: die schnelle Ca^{2+} -abhängige (CDI) und die langsame spannungsabhängige (VDI) Inaktivierung, beruhend auf einem negativen Rückkopplungsmechanismus, der die Zelle vor einem Überschuss an intrazellulärem Ca^{2+} schützt [11,37]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass im Ahnak1-KO-Modell die schnelle CDI (τ_{fast}) verändert ist. Jedoch gab es auch indirekte Hinweise darauf (Perfusion mit Ahnak1-Fragment), dass Ahnak1 die VDI beeinflussen kann. Die genauen Mechanismen der VDI und CDI sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Die CDI wird vor allem über das CaM-bindene IQ-Motiv im C-Terminus der $\alpha_{1\text{C}}$ -UE gesteuert [38]. Nach einer Depolarisation einströmendes Ca^{2+} bindet an CaM, welches daraufhin mit dem IQ-Motiv assoziiert und die Inaktivierung über den C-Terminus und/oder über den I-II-Linker ausgelöst wird [39,40]. Es wurde gezeigt, dass in beiden Prozessen der Inaktivierung die β_2 -UE- $\alpha_{1\text{C}}$ -I-II-Linker Verbindung eine Rolle spielt und es wird angenommen, dass der intrazelluläre $\alpha_{1\text{C}}$ -I-II-Linker als „hinged-lid“ zur Inaktivierung die Pore verschließt [38]. Ahnak1 könnte hierbei über die Interaktion mit der β_2 -UE die Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals regulieren. Bisherige Studien zeigten, dass die β -Isoformen über die Bindung an die AID im I-II-Linker der $\alpha_{1\text{C}}$ -UE maßgeblich an der Inaktivierung beteiligt sind. Die unterschiedlichen Spleißvarianten der β_2 -UE haben jedoch unterschiedliche Effekte auf die Inaktivierung. Während die Spleißvarianten 2a, b und e mit einem kurzen N-Terminus die Inaktivierung verzögern, beschleunigen die β_2 Varianten 2c und d mit einem langen N-Terminus die Inaktivierung [41,42]. Bisher ist nicht bekannt, welche der Isoformen bevorzugt von Ahnak1 gebunden werden. Bei den im Western Blot detektierten β -Varianten in der kardialen Membranfraktion handelt es sich vermutlich um die Varianten mit dem kurzen N-Terminus. Da die GK-Domäne in β_2 für eine verzögerte Inaktivierung verantwortlich sein soll [43], könnte man annehmen, dass Ahnak1 über eine Disinhibierung der GK-Domäne auch zu einer verlangsamten Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals führt. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass Ahnak1 über die multiplen Interaktionsstellen zur β_2 -UE in seinem C-Terminus die Inaktivierung des Ca^{2+} -Kanals unterschiedlich regulieren kann und so als positiver Modulator auf die Ca^{2+} -Kanalaktivität wirkt.

Mit der Reduzierung des Ca^{2+} -Stroms in Ahnak1-KO würde man erwarten, dass dieser zu einer geringeren Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR und damit zu einer negativen Inotropie (verminderte Kontraktion des Herzmuskels) führt. Langendorff-Perfusions-

messungen an isolierten Herzen von 3 Monate alten Ahnak1-KO-Mäusen zeigten allerdings keine Unterschiede in der Kontraktion der Herzen. Der Effekt des reduzierten I_{CaL} scheint durch Kompensationsmechanismen am ganzen Herzen ausgeglichen zu werden. Es wurde bereits vermutet, dass Ahnak2 die Funktion von Ahnak1 kompensieren könnte [33,34]. Beide Proteine weisen jedoch in ihrem C-Terminus, über den die Ahnak1 Bindung an die β_2 -UE erfolgt, keine Homologie auf. Damit ist diese Annahme eher unwahrscheinlich.

Da die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR für eine intakte Kontraktion des Herzens verantwortlich ist, kann man davon ausgehen, dass dieser Prozess in Ahnak1-KO nicht gestört ist. Wahrscheinlicher ist die Annahme einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei Ahnak1-defizienten-Kardiomyozyten, die zum reduzierten I_{CaL} und schnellerem Schließen des Kanals führt. Der Na^{2+}/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) ist an der Kalziumhomöostase in der Zelle beteiligt und transportiert Ca^{2+} nach der Kontraktion in den extrazellulären Raum zurück. Studien zeigen, dass in NCX-Knock-Out-Mäusen der I_{CaL} reduziert ist, während bei Überexpression von NCX der I_{CaL} erhöht ist [44,45]. Vermutet werden könnte, dass ein verminderter I_{CaL} eine reduzierte NCX Aktivität zur Folge hat und dadurch die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle erhöht ist, die wiederum zu einer Steigerung der Erregungs-Kontraktions-Kopplung führt [46].

Ein reduzierter I_{CaL} kann aber auch durch eine gesteigerte sympathische Stimulation und eine höhere Ca^{2+} -Freisetzung über den Ryanodinrezeptor kompensiert werden, um die Erregungs-Kontraktions-Kopplung zu verbessern. Diese Kompensation führte jedoch in α_{1C} -heterozygoten Mäusen zur Hypertrophie [47].

Da die Studien zum I_{CaL} an Kardiomyozyten von 6 Monate alten Mäusen und die Untersuchung der kardialen Funktion isolierter Herzen an 3 Monate alten Mäusen durchgeführt wurde, könnte die Altersabhängigkeit eine weitere Erklärung für die unveränderte Funktion der Ahnak1-KO-Herzen sein. Neueste Untersuchungen ergaben z.B., dass das Entfernen der essentiellen β_2 -UE in adulten Kardiomyozyten toleriert wird und nur einen moderat reduzierten I_{CaL} nach sich zieht, während die Genablation der β_2 -UE embryonal letal ist [48,49]. Eventuell tritt bei Ahnak1-KO erst mit zunehmendem Alter eine veränderte kardiale Funktion auf. Um die Altersabhängigkeit aufzuklären, müssen weitere Untersuchungen an Ahnak1-KO-Mäusen unterschiedlichen Alters durchgeführt werden.

Weiterhin wurde die Funktion von Ahnak1 während der β -adrenergen Regulation untersucht. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass auch Ahnak1 während der β -adrenergen Stimulation phosphoryliert wird [22]. In dieser Arbeit konnten Ahnak1-KO-Kardiomyozyten und isolierte Ahnak1-KO-Herzen genauso stark wie die der Wildtypen durch ISO stimuliert werden. Daraus lässt sich schließen, dass Ahnak1 in der β -adrenergen Regulation keine Rolle spielt. Allerdings wurden indirekte Hinweise gefunden, dass Ahnak1 die β -adrenerge Regulation modulieren kann. Die Perfusion von Kardiomyozyten mit einem Ahnak1-Peptid des proximalen C-Terminus führten zu einer signifikant reduzierten Ca^{2+} -Stromantwort nach β -adrenerger ISO-Stimulation. In einer vorhergehenden Studie wurde gezeigt, dass ein mutiertes (I5483T) Ahnak1-Peptid durch intrazelluläre Perfusion den Effekt der β -adrenergen Stimulation in Kardiomyozyten imitierte [26]. Die Ergebnisse deuteten auf einen Zusammenhang zwischen der Bindung von Ahnak1 mit der β_2 -UE und der β -adrenergen Regulation des I_{CaL} hin. Es wurde vermutet, dass Ahnak1 durch seine Bindung an die β_2 -UE den I_{CaL} hemmt und diese

Hemmung durch PKA-Phosphorylierung nach β -adrenerger Stimulation aufgehoben wird und gleichzeitig zu einem erhöhten I_{CaL} führt [19,26]. Diese Hypothese kann durch die Ergebnisse in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der inhibierende Effekt auf die β -adrenerge Stimulation in Wildtyp-Kardiomyozyten zeigt jedoch, dass Ahnak1 permissiv wirkt und indirekt die β -adrenerge Regulation des Ca^{2+} -Kanals beeinflussen kann.

Bisher konnte noch nicht vollständig geklärt werden, wo sich die relevanten PKA-Phosphorylierungsstellen in Cav1.2, der β_2 -UE beziehungsweise in deren Interaktionspartnern befinden, die zum erhöhten I_{CaL} nach der β -adrenergen Stimulation führen. Neuste Ergebnisse zeigen, dass über die PKA-Phosphorylierung von Ser-1700 und Thr-1704 im proximalen C-Terminus der α_{1C} -UE, die Inhibition des I_{CaL} durch den proteolytisch gespaltenen distalen C-Terminus, aufgehoben wird [50]. Da jedoch andere Arbeiten die Translokation des distalen C-Terminus der α_{1C} -UE in den Zellkern beschrieben, ist nicht ausgeschlossen [51,52], dass es auch alternative Regulationsmechanismen gibt.

Ser-478/79 in der β_2 -UE wurden bereits als potentielle Phosphorylierungsstellen für die Regulation des I_{CaL} beschrieben [18,27], jedoch in einer neueren Arbeit widerlegt [53]. Wir suchten daher nach weiteren PKA-Phosphorylierungsstellen in der β_2 -UE und konnten Ser-296 in der GK-Domäne als solche identifizieren (Abb. 2 und 3). Die PKA-Phosphorylierung von Ser-296 an der β_2 -UE erhöhte die Bindungsaffinität zu Ahnak1. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die PKA-Phosphorylierung von Ser-296 an der β_2 -UE über die Interaktion zu Ahnak1 zu einer erhöhten Ca^{2+} -Kanalaktivität des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals beitragen kann.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion von Ahnak1 mit der β_2 -UE. Zwei im proximalen und distalen C-Terminus von Ahnak1 vorkommende PxxP-Motive (AS 5592-5595 und 4984-4987) spielen dabei eine entscheidende Rolle für die Interaktion mit der β_2 -UE. In Bindungsstudien stellte sich heraus, dass durch die Proline jeweils eine hochaffine Bindung zustande kommt, während die Substitution mit Alanin zu einer Abschwächung führt.

Die genannten PxxP-Motive sind Bindungsmotive die vorrangig mit SH3-Domänen assoziieren [54]. Die β_2 -UE, die zur MAGUK-Familie gehört, enthält eine konservierte SH3-Domäne. Neben dieser besitzt sie noch eine weitere konservierte GK-Domäne sowie eine variable HOOK-Region, die beide miteinander verbindet [9]. Weitere Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben, dass die Bindung des C-Terminus von Ahnak1 an die β_2 -UE über die Zentralregion der β_2 -UE, bestehend aus SH3-HOOK-GK in kooperativer Weise abläuft. Der C- und N-Terminus der β_2 -UE sind für die Bindung an Ahnak1 nicht relevant. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht nur die SH3-Domäne allein, sondern das kooperative Modul aus SH3, GK und HOOK der β_2 -UE an der multiplen Bindung an den C-Terminus von Ahnak1 beteiligt ist.

In einem von uns vorgeschlagenen Modell bindet Ahnak1 als Gerüstprotein die β_2 -UE des Cav1.2 (Pankonien et. al 2011, Abb. 6) und reguliert darüber vermutlich auch die Zugänglichkeit anderer Interaktionspartner oder Signale, welche die Inaktivierung und/oder den I_{CaL} des Kanals beeinflussen können. Gerüstproteine organisieren den Zusammenhalt von Signalproteinen zu einem Proteinkomplex und regulieren die Signalübertragung innerhalb des Signalwegs [55]. Da Ahnak1 mit seinem C-Terminus

auch an Aktin bindet und Studien zeigten, dass der I_{CaL} auch über das Zytoskelett reguliert wird [56,57], könnte Ahnak1 als stabilisierende Verbindung zwischen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal und Zytoskelett den I_{CaL} aktivieren. Wenn dieser Komplex durch Ahnak1-KO an Stabilität verliert, könnte das ein Auslöser für den reduzierten I_{CaL} sein.

Zusammenfassend machen die Resultate dieser Arbeit deutlich, dass Ahnak1 als wichtiger Regulator des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals im Herzen wirkt. Ahnak1 bindet als Gerüstprotein dessen β_2 -UE und scheint darüber den Ca^{2+} -Einstrom und die Inaktivierung zu modulieren. Indirekte Hinweise deuten zusätzlich auch auf eine Beteiligung von Ahnak1 an der β -adrenergen Regulation des Ca^{2+} -Kanals hin.

Referenzen

- [1] D.M. Bers, Cardiac excitation-contraction coupling, *Nature* 415 (2002) 198-205.
- [2] A. Fabiato, F. Fabiato, Calcium and cardiac excitation-contraction coupling, *Annu Rev Physiol* 41 (1979) 473-484.
- [3] E. Perez-Reyes, T. Schneider, Molecular biology of calcium channels, *Kidney Int* 48 (1995) 1111-1124.
- [4] J. Striessnig, Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels, *Cell Physiol Biochem* 9 (1999) 242-269.
- [5] I. Splawski, K.W. Timothy, L.M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P.J. Schwartz, R.M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S.G. Priori, M.C. Sanguinetti, M.T. Keating, Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism, *Cell* 119 (2004) 19-31.
- [6] C. Napolitano, R. Bloise, N. Monteforte, S.G. Priori, Sudden cardiac death and genetic ion channelopathies: long QT, Brugada, short QT, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and idiopathic ventricular fibrillation, *Circulation* 125 (2012) 2027-2034.
- [7] P. Liao, T.W. Soong, CaV1.2 channelopathies: from arrhythmias to autism, bipolar disorder, and immunodeficiency, *Pflugers Arch* 460 (2010) 353-359.
- [8] W.A. Catterall, Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels, *Annu Rev Cell Dev Biol* 16 (2000) 521-555.
- [9] Y.H. Chen, M.H. Li, Y. Zhang, L.L. He, Y. Yamada, A. Fitzmaurice, Y. Shen, H. Zhang, L. Tong, J. Yang, Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels, *Nature* 429 (2004) 675-680.
- [10] J.T. Hulme, R.E. Westenbroek, T. Scheuer, W.A. Catterall, Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac CaV1.2 channels during beta1-adrenergic regulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 16574-16579.
- [11] L. Lacinova, F. Hofmann, Ca²⁺- and voltage-dependent inactivation of the expressed L-type Ca(v)1.2 calcium channel, *Arch Biochem Biophys* 437 (2005) 42-50.
- [12] H.M. Colecraft, B. Alseikhan, S.X. Takahashi, D. Chaudhuri, S. Mittman, V. Yegnasubramanian, R.S. Alvania, D.C. Johns, E. Marban, D.T. Yue, Novel functional properties of Ca(2+) channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells, *J Physiol* 541 (2002) 435-452.
- [13] C. Canti, A. Davies, N.S. Berrow, A.J. Butcher, K.M. Page, A.C. Dolphin, Evidence for two concentration-dependent processes for beta-subunit effects on alpha1B calcium channels, *Biophys J* 81 (2001) 1439-1451.
- [14] Z. Buraei, J. Yang, The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels, *Physiol Rev* 90 (2010) 1461-1506.
- [15] A.C. Dolphin, Beta subunits of voltage-gated calcium channels, *J Bioenerg Biomembr* 35 (2003) 599-620.
- [16] J.T. Hulme, T.W. Lin, R.E. Westenbroek, T. Scheuer, W.A. Catterall, Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 13093-13098.
- [17] M.A. Davare, J.W. Hell, Increased phosphorylation of the neuronal L-type Ca(2+) channel Ca(v)1.2 during aging, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 16018-16023.
- [18] M. Bunemann, B.L. Gerhardstein, T. Gao, M.M. Hosey, Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit, *J Biol Chem* 274 (1999) 33851-33854.
- [19] H. Haase, Ahnak, a new player in beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel, *Cardiovasc Res* 73 (2007) 19-25.
- [20] Y. Huang, S.H. Laval, A. van Remoortere, J. Baudier, C. Benaud, L.V. Anderson, V. Straub, A. Deelder, R.R. Frants, J.T. den Dunnen, K. Bushby, S.M. van der Maarel, AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration, *FASEB J* 21 (2007) 732-742.
- [21] D. Matza, R.A. Flavell, Roles of Ca(v) channels and AHNAK1 in T cells: the beauty and the beast, *Immunol Rev* 231 (2009) 257-264.

- [22] H. Haase, T. Podzuweit, G. Lutsch, A. Hohaus, S. Kostka, C. Lindschau, M. Kott, R. Kraft, I. Morano, 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 (1999) 2161-2172.
- [23] A. Hohaus, V. Person, J. Behlke, J. Schaper, I. Morano, H. Haase, The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca²⁺ channels and the actin-based cytoskeleton, *FASEB J* 16 (2002) 1205-1216.
- [24] E. Shtivelman, F.E. Cohen, J.M. Bishop, 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 (1992) 5472-5476.
- [25] J. Alvarez, J. Hamplova, A. Hohaus, I. Morano, H. Haase, G. Vassort, Calcium current in rat cardiomyocytes is modulated by the carboxyl-terminal ahnak domain, *J Biol Chem* 279 (2004) 12456-12461.
- [26] H. Haase, J. Alvarez, D. Petzhold, A. Doller, J. Behlke, J. Erdmann, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek, G. Vassort, I. Morano, Ahnak is critical for cardiac Ca(V)_{1.2} calcium channel function and its beta-adrenergic regulation, *FASEB J* 19 (2005) 1969-1977.
- [27] B.L. Gerhardstein, T.S. Puri, A.J. Chien, M.M. Hosey, Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the beta 2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels, *Biochemistry* 38 (1999) 10361-10370.
- [28] A.J. Chien, T. Gao, E. Perez-Reyes, M.M. Hosey, Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the beta2a subunit, *J Biol Chem* 273 (1998) 23590-23597.
- [29] A. Rezvanpour, L. Santamaria-Kisiel, G.S. Shaw, The S100A10-annexin A2 complex provides a novel asymmetric platform for membrane repair, *J Biol Chem* (2011).
- [30] A. Marg, H. Haase, T. Neumann, M. Kouno, I. Morano, AHNAK1 and AHNAK2 are costameric proteins: AHNAK1 affects transverse skeletal muscle fiber stiffness, *Biochem Biophys Res Commun* 401 (2010) 143-148.
- [31] C.M. Armstrong, F.M. Bezanilla, P. Horowicz, Twitches in the presence of ethylene glycol bis(-aminoethyl ether)-N,N'-tetracetic acid, *Biochim Biophys Acta* 267 (1972) 605-608.
- [32] J. Nakai, T. Tanabe, T. Konno, B. Adams, K.G. Beam, Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling, *J Biol Chem* 273 (1998) 24983-24986.
- [33] A. Komuro, Y. Masuda, K. Kobayashi, R. Babbitt, M. Gunel, R.A. Flavell, V.T. Marchesi, The AHNAKs are a class of giant propeller-like proteins that associate with calcium channel proteins of cardiomyocytes and other cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 4053-4058.
- [34] M. Kouno, G. Kondoh, K. Horie, N. Komazawa, N. Ishii, Y. Takahashi, J. Takeda, T. Hashimoto, Ahnak/Desmoyokin is dispensable for proliferation, differentiation, and maintenance of integrity in mouse epidermis, *J Invest Dermatol* 123 (2004) 700-707.
- [35] D. Matza, A. Badou, K.S. Kobayashi, K. Goldsmith-Pestana, Y. Masuda, A. Komuro, D. McMahon-Pratt, V.T. Marchesi, R.A. Flavell, A scaffold protein, AHNAK1, is required for calcium signaling during T cell activation, *Immunity* 28 (2008) 64-74.
- [36] Y. Shao, K.J. Czymmek, P.A. Jones, V.P. Fomin, K. Akanbi, R.L. Duncan, M.C. Farach-Carson, Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (2009) C1067-1078.
- [37] I. Bodi, G. Mikala, S.E. Koch, S.A. Akhter, A. Schwartz, The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on, *J Clin Invest* 115 (2005) 3306-3317.
- [38] T. Cens, M. Rousset, J.P. Leyris, P. Fesquet, P. Charnet, Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca(2+) channels, *Prog Biophys Mol Biol* 90 (2006) 104-117.
- [39] B.Z. Peterson, C.D. DeMaria, J.P. Adelman, D.T. Yue, Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels, *Neuron* 22 (1999) 549-558.
- [40] J.P. Benitah, J.L. Alvarez, A.M. Gomez, L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes, *J Mol Cell Cardiol* 48 (2010) 26-36.

- [41] S. Herzig, I.F. Khan, D. Grundemann, J. Matthes, A. Ludwig, G. Michels, U.C. Hoppe, D. Chaudhuri, A. Schwartz, D.T. Yue, R. Hullin, Mechanism of Ca(v)1.2 channel modulation by the amino terminus of cardiac beta2-subunits, *FASEB J* 21 (2007) 1527-1538.
- [42] S.X. Takahashi, S. Mittman, H.M. Colecraft, Distinctive modulatory effects of five human auxiliary beta2 subunit splice variants on L-type calcium channel gating, *Biophys J* 84 (2003) 3007-3021.
- [43] G. Gonzalez-Gutierrez, E. Miranda-Laferte, D. Nothmann, S. Schmidt, A. Neely, P. Hidalgo, The guanylate kinase domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels suffices to modulate gating, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 14198-14203.
- [44] M.C. Jordan, S.A. Henderson, T. Han, M.C. Fishbein, K.D. Philipson, K.P. Roos, Myocardial function with reduced expression of the sodium-calcium exchanger, *J Card Fail* 16 (2010) 786-796.
- [45] H. Reuter, T. Han, C. Motter, K.D. Philipson, J.I. Goldhaber, Mice overexpressing the cardiac sodium-calcium exchanger: defects in excitation-contraction coupling, *J Physiol* 554 (2004) 779-789.
- [46] C. Pott, K.D. Philipson, J.I. Goldhaber, Excitation-contraction coupling in Na⁺-Ca²⁺ exchanger knockout mice: reduced transsarcolemmal Ca²⁺ flux, *Circ Res* 97 (2005) 1288-1295.
- [47] S.A. Goonasekera, K. Hammer, M. Auger-Messier, I. Bodi, X. Chen, H. Zhang, S. Reiken, J.W. Elrod, R.N. Correll, A.J. York, M.A. Sargent, F. Hofmann, S. Moosmang, A.R. Marks, S.R. Houser, D.M. Bers, J.D. Molkenin, Decreased cardiac L-type Ca(2)(+) channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice, *J Clin Invest* 122 (2012) 280-290.
- [48] M. Meissner, P. Weissgerber, J.E. Londono, J. Prenen, S. Link, S. Ruppenthal, J.D. Molkenin, P. Lipp, B. Nilius, M. Freichel, V. Flockerzi, Moderate calcium channel dysfunction in adult mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the cacnb2 gene, *J Biol Chem* 286 (2011) 15875-15882.
- [49] P. Weissgerber, B. Held, W. Bloch, L. Kaestner, K.R. Chien, B.K. Fleischmann, P. Lipp, V. Flockerzi, M. Freichel, Reduced cardiac L-type Ca²⁺ current in Ca(V)beta2^{-/-} embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation, *Circ Res* 99 (2006) 749-757.
- [50] M.D. Fuller, M.A. Emrick, M. Sadilek, T. Scheuer, W.A. Catterall, Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response, *Sci Signal* 3 (2010) ra70.
- [51] N. Gomez-Ospina, F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu, R. Dolmetsch, The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor, *Cell* 127 (2006) 591-606.
- [52] E. Schroder, M. Byse, J. Satin, L-type calcium channel C terminus autoregulates transcription, *Circ Res* 104 (2009) 1373-1381.
- [53] J. Miriyala, T. Nguyen, D.T. Yue, H.M. Colecraft, Role of CaVbeta subunits, and lack of functional reserve, in protein kinase A modulation of cardiac CaV1.2 channels, *Circ Res* 102 (2008) e54-64.
- [54] A. Zarrinpar, R.P. Bhattacharyya, W.A. Lim, The structure and function of proline recognition domains, *Sci STKE* 2003 (2003) RE8.
- [55] A.S. Shaw, E.L. Filbert, Scaffold proteins and immune-cell signalling, *Nat Rev Immunol* 9 (2009) 47-56.
- [56] Q. Cheng, R.S. Ross, K.B. Walsh, Overexpression of the integrin beta(1A) subunit and the beta(1A) cytoplasmic domain modifies the beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca(2+)current, *J Mol Cell Cardiol* 36 (2004) 809-819.
- [57] A.S. Lader, D.J. Kwiatkowski, H.F. Cantiello, Role of gelsolin in the actin filament regulation of cardiac L-type calcium channels, *Am J Physiol* 277 (1999) C1277-1283.

Anteilserklärung

Die Promovendin Ines Pankonien hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

1. Publikation:

Alvarez JL, Petzhold D, **Pankonien I**, Behlke J, Kouno M, Vassort G, Morano I, Haase H. Ahnak1 modulates L-type Ca^{2+} channel inactivation of rodent cardiomyocytes. Pflugers Arch. 2010 Sep;460(4):719-30. Epub 2010 Jul 7.

Anteil: 20%

Beitrag im Einzelnen: Bei dieser Publikation habe ich die Interaktionsmessungen mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz durchgeführt und analysiert. Bei der Erstellung der Abbildungen der Publikation habe ich mitgewirkt.

2. Publikation:

Pankonien I, Alvarez JL, Doller A, Köhncke C, Rotte D, Regitz-Zagrosek V, Morano I, Haase H. Ahnak1 is a tuneable modulator of cardiac Ca(v)1.2 calcium channel activity. J Muscle Res Cell Motil. 2011 Dec;32(4-5):281-90. Epub 2011 Oct 29.

Anteil: 45%

Beitrag im Einzelnen: Mein Anteil in dieser Veröffentlichung umfasst die Planung und Durchführung der Mutagenese der Ahnak1-Polymorphismen sowie die Expression der rekombinanten Proteine. Die Bindungsversuche mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz und die CD-spektroskopischen Messungen habe ich durchgeführt und analysiert. Bei der Durchführung der Patch-Clamp Messungen habe ich mitgewirkt und an der Erstellung der Abbildungen und der Verfassung des Manuskripts war ich maßgeblich beteiligt.

3. Publikation:

Pankonien I, Otto A, Dascal N, Morano I, Haase H. Ahnak1 interaction is affected by phosphorylation of Ser-296 on $\text{Cav}\beta_2$. Biochem Biophys Res Commun. 2012 May 4;421(2):184-9. Epub 2012 Apr 4.

Anteil: 70%

Beitrag im Einzelnen: Für diese Publikation habe ich die Planung und Durchführung der Mutagenese übernommen. Die Planung, Durchführung und Analyse der Interaktionsstudien mittels Immunassays und Oberflächen-Plasmon-Resonanz erfolgte zum großen Teil durch mich. Weiterhin habe ich die Abbildungen für die Publikation und das Manuskript angefertigt.

Durch ein gemeinsames Forschungsprojekt, welches von der German-Israeli-Foundation gefördert wurde, verbrachte ich vier Monate im Labor von Prof. Dr. Nathan Dascal am Institut für Physiologie und Pharmakologie der Universität Tel Aviv, Israel. Dort führte ich in Zusammenarbeit mit Shimrit Oz (Doktorandin von Prof. Dr. Nathan Dascal) Strommessungen an Oocyten mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durch, um die Funktion von Ahnak1, der Phosphorylierung der β_2 -Untereinheit und der Deletion des distalen C-Terminus von Cav1.2 zu untersuchen. Die dort gewonnenen Ergebnisse sind bisher noch nicht veröffentlicht, aber für eine zukünftige Publikation vorgesehen.

Prof. Dr. Ingo Morano (Betreuer)

Ines Pankonien (Promovendin)

Ausgewählte Publikationen

Die Seiten 23 bis 56 umfassen folgende Originalartikel:

1. Publikation:

Alvarez JL, Petzhold D, **Pankonien I**, Behlke J, Kouno M, Vassort G, Morano I, Haase H. Ahnak1 modulates L-type Ca^{2+} channel inactivation of rodent cardiomyocytes. Pflugers Arch. 2010 Sep;460(4):719-30. Epub 2010 Jul 7.
IF: 4,463

2. Publikation:

Pankonien I, Alvarez JL, Doller A, Köhncke C, Rotte D, Regitz-Zagrosek V, Morano I, Haase H. Ahnak1 is a tuneable modulator of cardiac Ca(v)1.2 calcium channel activity. J Muscle Res Cell Motil. 2011 Dec;32(4-5):281-90. Epub 2011 Oct 29.
IF: 1,981

3. Publikation:

Pankonien I, Otto A, Dascal N, Morano I, Haase H. Ahnak1 interaction is affected by phosphorylation of Ser-296 on $\text{Cav}\beta_2$. Biochem Biophys Res Commun. 2012 May 4;421(2):184-9. Epub 2012 Apr 4.
IF: 2,484

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

Alvarez JL, Petzhold D, **Pankonien I**, Behlke J, Kouno M, Vassort G, Morano I, Haase H. Ahnak1 modulates L-type Ca^{2+} channel inactivation of rodent cardiomyocytes. Pflugers Arch. 2010 Sep;460(4):719-30. Epub 2010 Jul 7.

Pankonien I, Alvarez JL, Doller A, Köhncke C, Rotte D, Regitz-Zagrosek V, Morano I, Haase H. Ahnak1 is a tuneable modulator of cardiac Ca(v)1.2 calcium channel activity. J Muscle Res Cell Motil. 2011 Dec;32(4-5):281-90. Epub 2011 Oct 29.

Pankonien I, Otto A, Dascal N, Morano I, Haase H. Ahnak1 interaction is affected by phosphorylation of Ser-296 on $\text{Cav}\beta_2$. Biochem Biophys Res Commun. 2012 May 4;421(2):184-9. Epub 2012 Apr 4.

Abstracts/Poster/Vorträge

Pankonien I, Rotte D, Petzhold D, Doller A, Perrot A, Regitz-Zagrosek V, Morano I, Haase H. Ahnak1 polymorphism A4984P affects L-type calcium channel interaction. XXXVII European Muscle Conference (EMC 2008) Oxford, England (Abstract und Poster)

Pankonien I, Petzhold D, Doller A, Regitz-Zagrosek V, Morano I, Haase H. Ahnak1 polymorphism Ala4984Pro affects L-type calcium channel interaction. PhD Retreat MDC/FMP 2009, Kremmen, Deutschland (Abstract und Poster)

Pankonien I, Oz S, Dascal N, Morano I, Haase H. PKA phosphorylation of L-type calcium channel β_2 subunit ($\text{Cav}\beta_2$) alters its interaction with ahnak1. XXXIX European Muscle Conference (EMC 2010) Padua, Italien (Abstract und Poster)

Pankonien I, Lutter S, Otto A, Morano I, Dascal N, Haase H. Phosphorylation of Ser-296 on $\text{Cav}\beta_2$ by PKA alters its interaction with ahnak1. 40th European Muscle Conference (EMC 2011) Berlin, Deutschland (Abstract und Poster)

Pankonien I. The role of ahnak1 in the regulation of the cardiac L-Type Ca^{2+} channel. Wollenberger Seminar - MDC Berlin-Buch (2012) Berlin, Deutschland (Vortrag)

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Ines Pankonien, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Untersuchung der Funktion von Ahnak1 in der Regulation des kardialen L-Typ-Ca²⁺-Kanals** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Ingo Morano bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und die fachliche Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. Hannelore Haase für die außerordentlich gute Betreuung während meiner Doktorarbeit, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die Unterstützung bei der Möglichkeit einen Teil der Arbeit im Labor von Prof. Nathan Dascal in Tel Aviv durchzuführen.

Ein großes Dankeschön geht an Karin Karczewski, Steffen Lutter, Petra Domaing und Dr. med. Clemens Köhncke für ihre hervorragende und tatkräftige Unterstützung im Labor sowie die gute Zusammenarbeit.

Danken möchte ich weiterhin allen Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Manuela Kaada, Petra Sakel, Dr. Janine Lossie, Dr. Christiane Look, Dr. Daria Petzhold und Lena Martin für die freundliche Arbeitsatmosphäre und immerwährende Hilfsbereitschaft.

Speziell Romy möchte ich für die schöne gemeinsame Promotionszeit und ihre Freundschaft danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Julio Alvarez für die Einführung in die Patch-Clamp Technik und die angenehme Zusammenarbeit. Muchas gracias Julio!

Prof. Nathan Dascal danke ich ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die interessanten und wissenschaftlichen Diskussionen während meines Forschungsaufenthaltes in seinem Labor an der Universität Tel Aviv. Bei Shimrit Oz möchte ich mich für die Einführung in die TEVC-Technik und die tolle freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Toda raba Shimrit!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre liebevolle, fortwährende Unterstützung.

Robert, dir danke ich für deine Unterstützung, Motivation und Geduld während der gesamten Zeit. Vielen lieben Dank!

Nicht vergessen möchte ich meine Freunde, vor allem Martin, Michi und Lisa für die angenehmen und unterhaltsamen Stunden fern ab von der Arbeit.