

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Dihydropyridinrezeptors:
Molekulare Determinanten der
Dihydropyridinrezeptor-Calmodulin-Interaktion**

**Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades**

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. Barbara Ritter (geb. Eckhart)
geboren am 07.10.1979 in Klagenfurt / Österreich**

2007

Referent: Prof. Dr. Symeon Papadopoulos

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 29.11.07

ZUSAMMENFASSUNG

Interaktionen von carboxyterminalen Bereichen spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanäle mit Calmodulin (CaM) spielen die entscheidende Rolle für die Inaktivierungskinetiken der betreffenden Calciumströme. Angesichts der vielfältigen, z.T. cytotoxischen Wirkungen von intrazellulärem Calcium erscheint eine Begrenzung des Ca^{2+} -Einstroms durch Kanalinaktivierung physiologisch besonders sinnvoll. Allerdings sind die molekularen Vorgänge der calciumabhängigen Inaktivierung noch weitgehend ungeklärt. Während sich der Schwerpunkt der Forschung auf diesem Gebiet vor allem auf Studien mit der kardialen Calciumkanal-Isoform des Dihydropyridinrezeptors mit seiner porenbildenden Untereinheit α_{1C} bezieht, bestand das Ziel dieser Arbeit darin die Calmodulin-Interaktion mit dem stark homologen Carboxyterminus der skelettmuskulären Isoform α_{1S} zu untersuchen.

Zunächst wurden hierfür unterschiedlich lange, carboxyterminale Abschnitte von α_{1S} und α_{1C} in *E. coli* rekombinant hergestellt und in löslicher Form aufgereinigt. Alle Fragmente beinhalten drei diskrete Bereiche, die bei der kardialen Isoform an CaM-Interaktionen beteiligt zu sein scheinen. Insbesondere befindet sich unter ihnen auch eine wichtige Calmodulin-Bindedomäne, ein sog. IQ-Motiv. Eine experimentelle Herausforderung bestand darin, die schwer löslichen Fragmente in stabiler aber dennoch möglichst nativer Form herzustellen um sie in den relativ langwierigen Bindestudien einsetzen zu können. Zwei experimentelle Systeme wurden für die Bindestudien verwendet: ein "Reagenzglassystem", um Interaktionen von rekombinantem CaM mit carboxyterminalen Kanalbereichen mittels nativen "Gelshift-Assays" zu untersuchen, und ein Zellsystem, bei dem die Bindungsassays für die Reaktionspartner nach deren Expression innerhalb intakter Muskelzellen stattfanden. Trotz hoher Sequenzhomologie des proximalen Carboxyterminus von α_{1S} und α_{1C} zeigte sich in beiden experimentellen Ansätzen, dass skelettmuskuläre Bereiche in Anwesenheit von Calcium keine Interaktion mit Calmodulin eingehen, während kardiale Isoformen unter diesen Bedingungen einen stabilen Komplex mit CaM bilden. Lassen sich diese profunden Unterschiede im CaM-Bindevverhalten der beiden Isoformen tatsächlich auf einige wenige, unterschiedlich besetzte Positionen innerhalb des IQ-Motivs zurückführen?

Um diese Vermutung zu untersuchen wurden unterschiedlich besetzte Aminosäurepositionen mittels zielgerichteter Mutagenese nach und nach einem reziprokem Austausch unterzogen, d.h. skelettmuskuläre Bereiche wurden schrittweise "kardialer", kardiale Bereiche "skelettmuskulärer". Auch an diesem Material wurden entsprechende CaM-Bindestudien durchgeführt. Innerhalb des

IQ-Motivs wurden zwei Aminosäurenpositionen identifiziert, welche das CaM-Bindungsverhalten signifikant beeinflussen: Während die kardiale Isoform diese Positionen mit Tyrosin und Lysin besetzt, weist die skelettmuskuläre Isoform hier Histidin und Methionin auf. Ein reziproker Austausch dieser Aminosäuren führte zu einer partialen Umkehr des isoformspezifischen CaM-Bindungsverhaltens: Skelettmuskuläre Fragmente konnten CaM nun binden, während die CaM-Interaktion kardialer Fragmente deutlich abgeschwächt war.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass einige wenige, evolutionär konservierte Sequenzunterschiede zwischen Calciumkanälen des Herzens und denen des Skelettmuskels die Interaktion mit dem wichtigen Calciumsensor CaM massiv beeinflussen. Die im Rahmen dieser Studien gewonnenen Erkenntnisse werden zum Verständnis der molekularen Ursachen für das sehr unterschiedliche elektrophysiologische Verhalten dieser wichtigen Calciumkanäle beitragen.

Schlüsselwörter: spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal, Dihydropyridinrezeptor, Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung, Calmodulin, IQ-Motiv

ABSTRACT

Interactions of defined regions within the intracellular, carboxyl terminal region of voltage gated L-type calcium channels with calmodulin (CaM) have a strong impact on the electrophysiological properties, especially on the inactivation kinetics of the respective Ca^{2+} currents. This self-limiting mechanism of calcium dependent channel inactivation is of eminent importance in view of the vast, at times deleterious, intracellular effects of calcium. Since the emphasis in previous experiments mainly lay on CaM interactions with the cardiac isoform of the dihydropyridine receptors pore forming subunit α_{1C} we aimed to investigate the carboxyl terminus of the highly homologous skeletal muscle isoform α_{1S} in terms of CaM binding.

Different regions of the α_{1C} and α_{1S} carboxyl terminus were expressed in *E. coli* and were then purified in soluble form. All regions include three non-contiguous regions implicated in CaM binding, among them a calmodulin binding domain of the so called IQ-motif type. Because of the limited solubility of the expressed constructs, the challenge was to establish experimental conditions under which the constructs remained stable during the CaM binding studies which lasted for several hours. Two experimental systems were used for binding studies: First, interaction of recombinant CaM with carboxyl terminal channel constructs was tested via gelshift-assays and second, CaM binding was determined in living myotubes, when it was coexpressed with carboxyl terminal regions of the two isoforms. The studies document the absence of complex formation between CaM and the skeletal muscle type carboxyl terminus in the presence of calcium, while cardiac isoforms robustly interact with CaM under these conditions. Thus, besides the high sequence homology of α_{1S} and α_{1C} , especially within the proximal carboxyl terminal region interacting with CaM, there are differences in the calmodulin binding behaviour. Those are likely to arise from the few amino acids that differ in both isoforms, but so far were not regarded as significant determinants with respect to CaM binding.

To test the above assumption, the aberrant residues were progressively exchanged between the isoforms using site directed mutagenesis. So, basically, the skeletal muscle isoform gradually became more "cardiac", while the *vice versa* is true for the cardiac isoform. Again, interactions with calmodulin were tested using gelshift-assays. Two positions with significant impact on the CaM binding affinity were identified this way. They are located within the critical IQ-motif and are

occupied by tyrosine and lysine in the cardiac isoform while in the skeletal muscle isoform histidine and methionine are present at the respective positions. Reciprocal exchange of these residues between the isoforms confers to the skeletal muscle isoform the ability to bind CaM while it decreases the CaM affinity of the cardiac isoform.

It is shown in the present work that a few, evolutionary conserved sequence differences within homologous regions of α_{1C} and α_{1S} give rise to significant deviations in interactions with CaM. Those differences are very likely to contribute to the distinct electrophysiological characteristics of the two channels.

Keywords: voltage gated L-type calcium channel, dihydropyridine receptor, Ca²⁺-dependent inactivation, Calmodulin, IQ-motif

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Ionenkanalproteine.....	1
1.2.	Calcium.....	2
1.3.	Spannungsabhängige Calciumkanäle.....	3
1.4.	"Gating" von spannungsabhängigen Calciumkanälen.....	4
1.5.	Molekulare Bestandteile und Funktion von spannungsabhängigen Calciumkanälen.....	5
1.6.	Funktionelle und strukturelle Charakteristika von Skelett- und Herzmuskel.....	6
1.7.	Die elektromechanische Kopplung.....	7
1.8.	Ca ²⁺ -abhängige Inaktivierung von spannungsabhängigen Ca ²⁺ -Kanälen.....	9
1.9.	Fragestellung.....	10
2.	Material und Methoden.....	13
2.1.	PCR.....	13
2.2.	Restriktion und CIAP-Verdau.....	13
2.3.	DNA-Aufreinigung mit horizontaler Agarose-Gelelektrophorese und dem Qiaex II Kit.....	14
2.4.	Ligation.....	14
2.5.	Herstellung kompetenter Bakterien.....	15
2.6.	Transformation.....	15
2.7.	Plasmid-Präparation.....	15
2.8.	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	16
2.9.	Restriktionsanalyse.....	16
2.10.	Herstellung von Bakterienstammlösungen.....	17
2.11.	Klonieren von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Plasmid-Vektoren.....	17
2.11.1.	Klonierung in den Expressionsvektor pRSFDuet-1.....	18
2.11.2.	Klonierung in den Expressionsvektor pETM60-NusA.....	20
2.11.3.	Klonieren mit den Vektoren pCyPet und pYPet.....	22
2.12.	Reziproker Austausch definierter Aminosäurereste innerhalb von CT1 mittels Mutagenese.....	23
2.13.	Rekombinante Protein-Herstellung.....	27
2.14.	Metallaffinitätschromatographie / Proteinreinigung mit HisTag.....	27
2.14.1.	Proteinaufreinigung mit Talon Metal Affinity Resin (BD Biosciences Clontech).....	28
2.14.2.	Proteinaufreinigung mit Protino Ni-TED 2000 packed columns (Macherey-Nagel).....	28
2.15.	Dialyse.....	29
2.16.	Aufreinigung durch Ionenaustausch.....	29
2.17.	Proteinkonzentrierung.....	30
2.18.	Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	30
2.19.	Aufreinigung von rekombinantem Calmodulin.....	31
2.20.	Aufreinigung rekombinanter TEV-Protease.....	31

2. 21.	Solubilisierung und Aufreinigung von nicht löslichen DHPR-Konstrukten mittels konzentrierter (8 M) Harnstofflösung.....	31
2. 22.	Lösliche DHPR-Konstrukte als Fusionsprotein mit NusA.....	32
2. 23.	SDS-PAGE.....	33
2. 24.	Native PAGE.....	34
2. 25.	Ca ²⁺ -abhängige Interaktion von Calmodulin mit dem DHPR.....	35
2.25.1.	DHPR-Konstrukte nach Rückfaltung durch Dialyse.....	35
2.25.2.	DHPR-Fragmente und CaM, koexprimiert mit pRSFDuet1.....	35
2.25.3.	NusA-Fusionsproteine.....	36
2. 26.	Massenspektrometrie.....	36
2. 27.	Zellkultur.....	37
2. 28.	cDNA Microinjektion.....	38
2. 29.	FRET (Fluorescence resonance energy transfer).....	38
3.	Ergebnisse.....	40
3. 1.	Klonieren von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Plasmid-Vektoren.....	40
3. 2.	Klonierung in den Expressionsvektor pRSFDuet-1.....	40
3. 3.	Klonierung in den Expressionsvektor pETM60-NusA.....	41
3. 4.	Klonierung in den Vektor pCyPet und pYPet.....	43
3. 5.	Mutagenese.....	43
3. 6.	Aufreinigung von rekombinanten Calmodulin für den Einsatz in CaM-Bindestudien	44
3.6.1.	Native PAGE mit CaM.....	45
3. 7.	Aufreinigung von rekombinanter TEV-Protease.....	46
3. 8.	Herstellung, Solubilisierung und Aufreinigung von nicht löslichen CT3 aus pET19b.....	46
3.8.1.	Native PAGE mit CT3 (α_{1S}).....	47
3.8.2.	Ca ²⁺ -abhängige Interaktion von zurückgefaltetem CT3 (α_{1S}) mit CaM?.....	48
3.9.1.	Herstellung kürzerer DHPR-Fragmente mit dem Vektor pRSFDuet1.....	48
3.9.2.	Interaktion von DHPR-Fragmenten, exprimiert mittels pRSFDuet, mit CaM.....	50
3. 10.	Herstellung und Aufreinigung von löslichen DHPR-Fragmenten durch Fusion mit NusA.....	51
3.10.1.	Abspaltung der DHPR-Fragmente von NusA durch die TEV-Protease.....	52
3.10.2.	Ca ²⁺ -abhängige Interaktion von CaM mit DHPR-Fragmenten nach Abspaltung von NusA.....	52
3. 11.	Massenspektrometrie.....	56
3. 12.	Einfluss reziproker Aminosäureaustausche innerhalb der IQ-Region beider CT1-Isoformen auf die CaM-Affinität.....	59

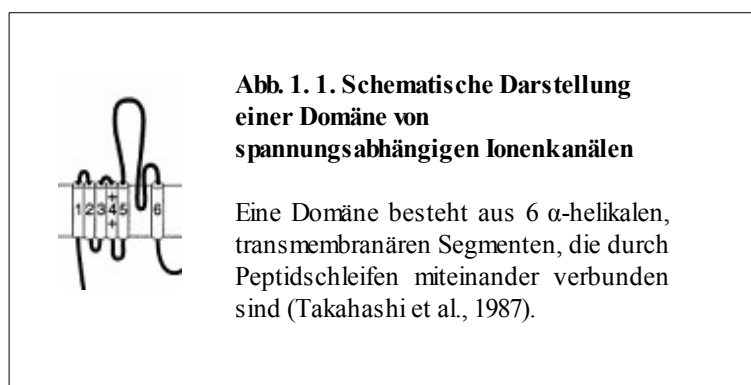
3. 14.	cDNA-Microinjektion.....	62
3. 15.	FRET-Messungen.....	62
4.	Diskussion.....	65
4. 1.	Expression umfangreicher carboxyterminaler DHPR-Fragmente.....	65
4. 2.	Darstellbarkeit von CT-Bereichen mittels nativer Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE).....	67
4. 3.	Bindet der skelettmuskuläre DHPR Calmodulin?	68
4. 4.	Molekulare Determinanten des unterschiedlichen CaM- Bindungsverhaltens.....	69
4. 5.	Funktionelle Bedeutung des unterschiedlichen CaM-Bindungsverhaltens.....	73
4. 6.	Ausblick.....	75
4. 7.	Zusammenfassung.....	78
4. 8.	Perspektiven.....	78
5.	Literaturverzeichnis.....	80
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	89
7.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	94
8.	Danksagung.....	99
9.	Eidesstattliche Erklärung.....	100
10.	Lebenslauf.....	101
11.	Wissenschaftliche Publikationen.....	102

1. EINLEITUNG

1. 1. Ionenkanalproteine

Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die es Ionen ermöglichen, die Zellmembran durch Poren hindurch zu durchqueren. Neben Aufnahme und Abgabe von Ionen (z.B. bei der Exkretion oder zur Steuerung von Osmose) besteht eine wichtige Funktion der Ionenkanäle darin, ein Membranpotential zu generieren, das für die Signaltransduktion genutzt wird. Es gibt aktive und passive Ionenkanäle. Passive Kanäle sind stets geöffnet, ihnen liegt das Ruhepotential zugrunde. Aktive Kanäle können mit Hilfe von Toren ("Gates") offen bzw. geschlossen gehalten werden. Ihre Regulation erfolgt bei ligandenregulierten Kanälen z.B. durch Neurotransmitter oder cyclisches GMP, bei spannungsregulierten Kanälen durch das aktuelle Membranpotential. Weitere Ionenkanäle können durch mechanische Reize (z.B. Druck, Vibration) aktiviert werden.

Die spannungsregulierten Calcium-, Natrium- und Kaliumkanäle sind Glycoproteine und gehören zu einer Großfamilie von Membranproteinen mit Molekulargewichten von 250 bis 300 kD und weisen gemeinsame Architekturmerkmale auf (Tanabe et al., 1987). Sie bestehen aus einer Abfolge hydrophiler und hydrophober Abschnitte, wobei die hydrophoben Abschnitte als α -Helices die Doppellipidschicht der Zellmembran durchspannen, während sich die hydrophilen Abschnitte, einschließlich der N- und C-terminalen Enden der α -Helices, im wässrigen Milieu des Intra- und Extrazellulärraums befinden. Die Polypeptidkette von Natrium- und Calciumkanälen besteht aus etwa 2000 Aminosäuren, welche in 4 homologe Domänen aufgeteilt ist, die jeweils 6 α -helikale transmembranäre Segmente (S_1 - S_6) enthält (Abb. 1.1.).



Nach dem gegenwärtigen Stand der Kanalforschung bilden jeweils die Helices S₅ und S₆ der vier Domänen zusammen mit der sie verbindenden Peptidschleife die Innenseite der Pore, durch die die Ionen selektiv den offenen Kanal durchdringen. Das Segment 4 enthält viele Aminosäuren mit positiv geladener Seitenkette und dient als Spannungssensor, der seine Konformationsänderung bei Veränderungen des Membranpotentials erfährt (Hofmann et al., 1999).

1. 2. Calcium

Calcium ist ein lebenswichtiges Ion in Organismen und ist der mengenmäßig am stärksten vertretene Mineralstoff im menschlichen Körper. Calcium besitzt eine Fülle von biochemischen Funktionen. Das Knochengewebe, in dem sich 99 % des Körpercalciums befinden, dient als Speicher für Calciumionen. Als "freies" extrazelluläres Ion ist Calcium durch Bildung von Komplexen mit Phospholipiden und Gerinnungsfaktoren an der Regulation der Blutgerinnung beteiligt. Außerdem dient es der Stabilisierung von Biomembranen sowie als Signal bei der Zellaktivierung.

Calcium reguliert eine Vielzahl zellulärer Funktionen, z.B. Muskelkontraktion, Zustand des Zytoskeletts, Regulation von Enzymen des Intermediärstoffwechsels (z.B. Glykogenabbau), Expression von Genen, die für die Zellproliferation wichtig sind, Aktivierung von Enzymen, die Apoptose auslösen können sowie Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran und damit die Ausschüttung von Neurotransmittern und Hormonen.

90 % des Zellcalciums sind nicht ionisiert, sondern befinden sich als Calciumphosphatkomplexe in den Mitochondrien oder an Proteine gebunden im endoplasmatischen Reticulum. Bei den meisten Säugetierzellen beträgt die Konzentration von freien Calciumionen im Extrazellulärraum $1,7 \times 10^{-3}$ mol/l, im Cytosol hingegen nur 10^{-7} mol/l, was einen 10.000 fachen Calciumgradienten zwischen diesen beiden Kompartimenten bedeutet. Aus der Vielzahl von Ca²⁺-abhängigen Zellfunktionen wird meist nur ein kleiner Teil in einer Zelle realisiert. Die Spezifität der Ca²⁺-Wirkungen wird durch die gleichzeitig auf die Zelle einwirkenden externen Signale und die vorhandene Ausstattung mit Effektormolekülen eingeschränkt. Darüber hinaus kommt der zeitlichen Abfolge der Ca²⁺-Signale eine entscheidende Bedeutung zu. Eine kurzfristige Steigerung der intrazellulären Ca²⁺-

Konzentration zeigt z.B. andere Wirkungen als eine langfristige intrazelluläre Konzentrationserhöhung (Dolmetsch et al., 2001).

Bei der Zellaktivierung werden Zellen zur Ausübung einer bestimmten Funktion stimuliert, wie z.B. Kontraktion, Biosynthese und Sekretion von Substanzen, transzellulärer Transport von Ionen, Bereitstellung von Glucose, Photorezeption usw. Im Allgemeinen wird bei der Zellaktivierung die cytosolische Calciumkonzentration von 10^{-7} mol/l auf 10^{-5} mol/l erhöht (Dolmetsch et al., 2001). Dies geschieht entweder durch Einstrom aus Calciumspeichern im endoplasmatischen Reticulum, durch liganden-regulierte Calciumkanäle oder durch spannungsabhängige Calciumkanäle.

1. 3. Spannungsabhängige Calciumkanäle

Spannungsabhängige Calciumkanäle vermitteln als Antwort von Membran-Depolarisation einen Calciumeinstrom und regulieren somit intrazelluläre Prozesse. Sie sind verantwortlich für eine Vielzahl von Zellfunktionen, wie Signaltransduktion, elektromechanische Kopplung, Neurotransmitter-Sekretion, Hormonsekretion und Genexpression. Es wurden bis zum heutigen Zeitpunkt 5 Typen von spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanälen klassifiziert (Tab.1.1), welche durch die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften ihrer Ca^{2+} -Ströme charakterisiert sind: L-, P/Q-, N-, R- und T-Typ. (Bean 1989; Hess 1990; Llinás et al., 1992; Tsien et al., 1988).

In verschiedenen Zelltypen können diverse Ca^{2+} -Ströme gemessen werden. Diese besitzen unterschiedliche physiologische und pharmakologische Eigenschaften (Bean 1989; Tsien et al., 1988).

Ca^{2+} -Ströme vom L-Typ benötigen für ihre Aktivierung eine relativ starke Depolarisation, sie sind länger anhaltend (L für "long"), haben eine große Einzelkanal-Leitfähigkeit, zeigen eine mehr oder weniger geringe spannungsabhängige Inaktivierung und werden durch Ca^{2+} -Antagonisten wie Dihydropyridine, Phenylalkylamine und Benzothiazepine gehemmt (Reuter, 1983). L-Typ-Ströme können in Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur, sowie in endokrinen Zellen und Neuronen nachgewiesen werden. Eine Regulation erfolgt z.B. durch sekundäre Botenstoff-aktivierte Protein Phosphorylierung (Arreola et al., 1987; Schmid et al., 1985).

Tab 1. 1. Spannungsabhängige Calciumkanäle (nach Caterall 2000)

Kanal-Gen	Strom-typ	α_1 -Unter-einheit	Lokalisierung	Zelluläre Funktionen
Ca _v 1.1	L	α_{1S}	Skelettmuskel, transversale Tubuli	Elektromechanische Kopplung
Ca _v 1.2	L	α_{1C}	Myocyten, Endokrine Zellen, Neuronale Zellkörper, Proximale Dendriten	Elektromechanische Kopplung, Hormonabgabe, Regulation der Transkription, Synaptische Integration
Ca _v 1.3	L	α_{1D}	Endokrine Zellen, Neuronale Zellkörper, Dendriten	Hormonabgabe, Regulation der Transkription, Synaptische Integration
Ca _v 1.4	L	α_{1F}	Retina	Neurotransmitterabgabe von Stäbchen und bipolaren Zellen
Ca _v 2.1	P/Q	α_{1A}	Nervenenden, Dendriten	Neurotransmitterabgabe
Ca _v 2.2	N	α_{1B}	Nervenenden, Dendriten	Neurotransmitterabgabe
Ca _v 2.3	R	α_{1E}	Neuronale Zellkörper, Dendriten	"Repetitive firing"
Ca _v 3.1	T	α_{1G}	Neuronale Zellkörper, Dendriten, Myocyten	Schrittmacher, "Repetitive firing"
Ca _v 3.2	T	α_{1H}	Neuronale Zellkörper, Dendriten, Myocyten	Schrittmacher, "Repetitive firing"
Ca _v 3.3	T	α_{1I}	Neuronale Zellkörper, Dendriten	Schrittmacher, "Repetitive firing"

1. 4. "Gating" von spannungsabhängigen Calciumkanälen

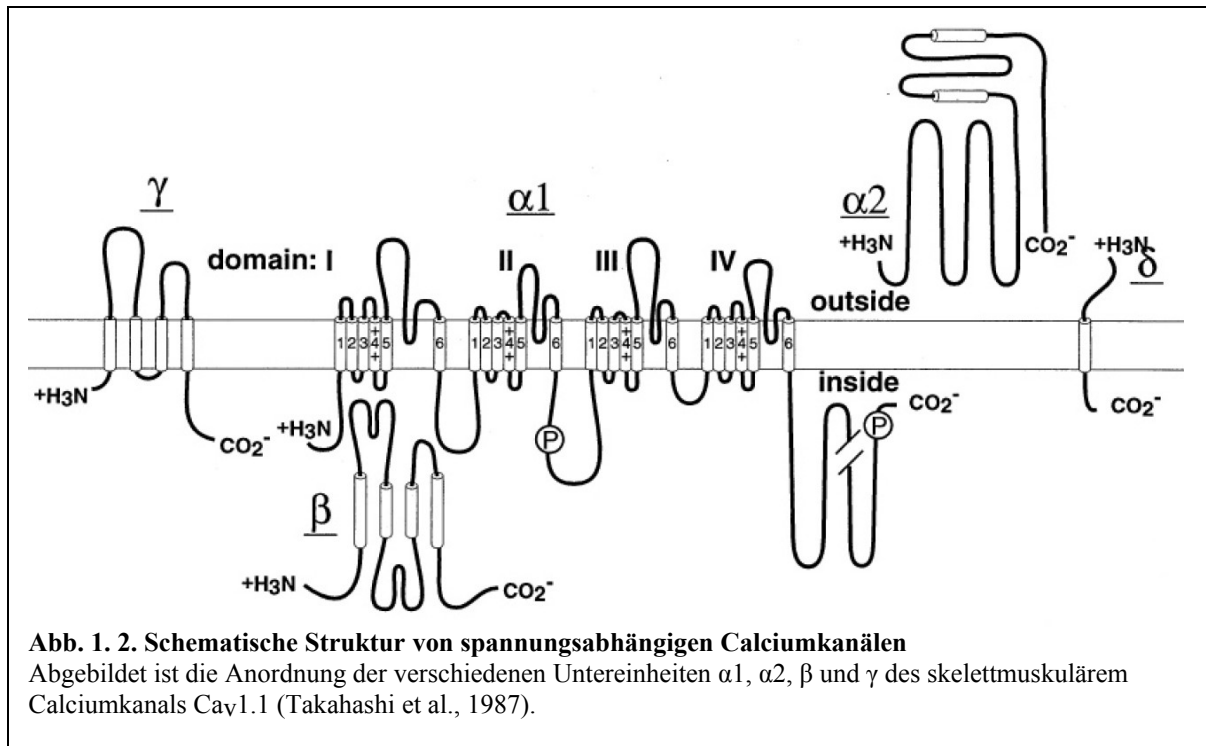
Der Vorgang des "Öffnens" und "Schließens" ("Gating") von spannungsabhängigen Calciumkanälen besteht aus mehreren Prozessen: Aktivierung, Deaktivierung und bei einigen Kanälen auch Inaktivierung. Die Kanäle müssen zum Öffnen der Pore aktiviert und zum Schließen deaktiviert werden. Bei der Aktivierung wird durch eine Depolarisation eine Kaskade von Konformationsänderungen in Bewegung gesetzt und dadurch die Pore geöffnet. Zunächst wird die erregungsbedingte Umpolarisierung vom Spannungssensor (S₄-Segment) erfasst, welcher schließlich eine Drehung der porenformenden S₅- und S₆-Segmente bewirkt und so eine Aufweitung der Kanalpore hervorruft (Caterall 2000). Der durch Depolarisation geöffnete Kanal kann durch Repolarisierung der Membranspannung wieder geschlossen (deaktiviert) werden. Der Prozess der Deaktivierung verläuft im wesentlichen entgegengesetzt zur Aktivierung. Durch eine Verlagerung des S₄-Segmentes zur Membraninnenseite werden die porenformenden Segmente reorganisiert und die Pore wird geschlossen. Bei einigen spannungsabhängigen Calciumkanälen bleiben die Kanalporen nach ihrer Aktivierung trotz anhaltender Depolarisierung der Membran nicht im geöffneten Zustand. Das Schließen des Kanals bei bestehender Depolarisation, das wie die Aktivierung in wenigen Millisekunden abläuft, wird als Inaktivierung bezeichnet. Hierbei blockieren Inaktivierungsdomänen den offenen Kanal und limitieren somit den Calciumeintritt ins Zellinnere.

1. 5. Molekulare Bestandteile und Funktion von spannungsabhängigen Calciumkanälen

Abb.1.2. zeigt die schematische Struktur von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Derartige Calciumkanäle bestehen aus mehreren Untereinheiten, wobei die ~ 200 kD große α_1 -Untereinheit das eigentliche Kanalprotein mit Pore, Spannungssensor und Bindungsstellen für Ca^{2+} -Antagonisten darstellt (Catterall 2000). Vergesellschaftet mit α_1 findet sich regelmäßig eine ~ 170 kD große $\alpha_2\delta$ Untereinheit. Als weitere Bestandteile treten die intrazelluläre, 55 kD große β - und, zumindest im Skelettmuskel, die transmembranäre 33 kD große γ -Untereinheit auf (Takahashi et al., 1987). Die α_1 - und β - Untereinheiten dienen als Substrate für cAMP-abhängige Proteinphosphorylierung (Curtis und Catterall, 1984).

Die α_1 -Untereinheit besteht aus ca. 2000 Aminosäureresten und weist bezüglich ihrer Struktur Parallelen zur α_1 -Untereinheit von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen auf (Tanabe et al., 1987). Die vier baugleichen Domänen (I-IV) bestehen jeweils aus sechs transmembranären Segmenten (S_1 - S_6) und einer membranassoziierten Schleife zwischen den Segmenten S_5 und S_6 . Die intrazelluläre β -Untereinheit besteht aus zwei zentral liegenden konservierten Domänen, die durch einen variablen Sequenzabschnitt verbunden sind und von einem variablen N- und C-Terminus flankiert werden. Ihre Anwesenheit ist essentiell für die funktionelle Expression von α_1 und als wichtiges α_1 -Regulatorprotein moduliert sie die elektrophysiologischen Eigenschaften des Ca^{2+} -Kanals (Hofmann et al., 1994). Die β -Untereinheit weist α -Helices und keine Transmembransegmente auf (Ruth et al., 1989), wohingegen die γ -Untereinheit ein Glycoprotein ist und aus vier Transmembransegmenten besteht (Jay et al., 1990). Die α_2 -Untereinheit wird durch ein einziges Gen kodiert. Nach der Translation entstehen durch Proteolyse α_2 und δ , welche im kompletten Kanalkomplex über eine Disulfidbrückenbindung verbunden sind (Gurnett et al., 1996). Die δ -Untereinheit enthält ein einzelnes hydrophobes Segment, worüber die Assoziation mit α_1 erfolgt.

Die spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle $\text{Ca}_v1.1$ und $\text{Ca}_v1.2$ übernehmen eine wichtige Rolle in Skelettmuskelfasern und Herzmuskelzellen. Im Rahmen der elektromechanischen Kopplung sind sie von größter Bedeutung für die Übersetzung des Spannungssignals in ein intrazelluläres, in seiner Intensität abstufbares, Calciumsignal.



1. 6. Funktionelle und strukturelle Charakteristika von Skelett- und Herzmuskel

Skelettmuskelfasern sind sehr lange, zylindrisch aufgebaute und vielkernige Zellen, welche durch gut definierte motorische Endplatten innerviert werden (Abb.1.3.). Eine Skelettmuskelfaser repräsentiert eine vielkernige Zelle (Synzytium), die durch Fusion von Myoblasten gebildet wird. Die Zellkerne befinden sich randständig direkt unter der Sarkolemma-Plasmamembran. Die Aktivierung von Skelettmuskelfasern erfolgt durch Nervenzell-Impulse über die motorische Endplatte. Die Kontraktion der Muskelfaser setzt ein, wenn das Aktionspotential längst abgeklungen ist. Das bedeutet, dass die Faser während einer Kontraktion zur fort dauernden Kontraktion angeregt werden kann (Abb.1.4). Skelettmuskelzellen sind tetanisierbar; mit zunehmender Reizfrequenz verschmelzen und überlagern sich die Einzelzuckungen. Mit Änderung der Reizstärke ändert sich auch die Kontraktionsstärke.

Die Muskulatur des Arbeitsmyokards besteht aus einzelnen, z.T. Y-förmigen verzweigten Cardiomyozyten mit zentralen Zellkernen (Abb.1.3.). Im Gegensatz zu den Myoblasten der Skelettmuskulatur fusionieren die Myokardvorläuferzellen nicht zu einem Synzytium, sondern bleiben Einzelzellen. Sie sind an ihren Enden über Glanzstreifen mechanisch und über elektrische Verbindungen, sog. "gap junctions" miteinander verbunden und stellen eine

elektrische Einheit dar. Grundsätzlich bedarf die rhythmische Erregung des Herzens keiner neuronalen Aktivität; Die Myozyten werden durch Schrittmacherzellen des Reizgenerierungs- bzw. Reizleitungssystems aktiviert, wobei die Reizübertragung über "gap junctions" erfolgt. Normalerweise erfasst eine Erregung immer das gesamte Herz, welches sich dann wie ein "funktionelles Synzytium" verhält. Das Aktionspotential der Myokardzelle ist, verglichen mit dem Aktionspotential des Skelettmuskels, ungewöhnlich lang, es enthält eine Plateauphase der Repolarisation von 200-400ms, welche in der Hauptsache von spannungsabhängigen Calciumkanälen (L-Typ) verursacht wird. Die Systole fällt in diese Plateauphase, wobei die Zelle während dieser Zeit normalerweise nicht wiedererregbar ist, sondern erst wieder nach Ende der Repolarisation (Abb.1.4.). Durch diese lange Refraktärphase ist die Myokardzelle nicht tetanisierbar.

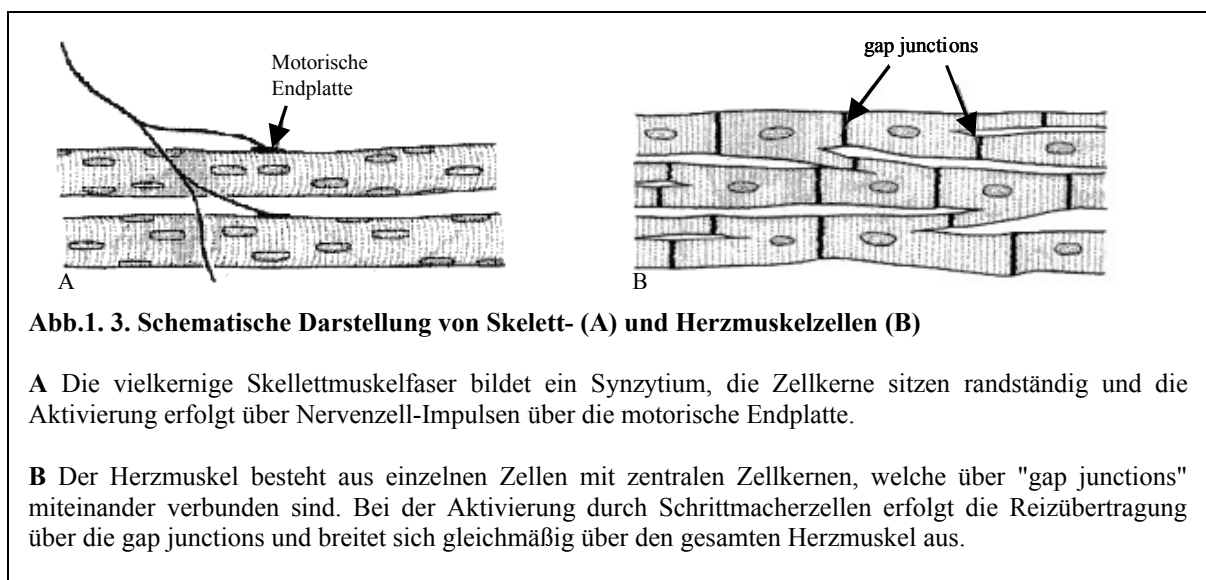


Abb.1. 3. Schematische Darstellung von Skelett- (A) und Herzmuskelzellen (B)

A Die vielkernige Skellettmuskelfaser bildet ein Synzytium, die Zellkerne sitzen randständig und die Aktivierung erfolgt über Nervenzell-Impulsen über die motorische Endplatte.

B Der Herzmuskel besteht aus einzelnen Zellen mit zentralen Zellkernen, welche über "gap junctions" miteinander verbunden sind. Bei der Aktivierung durch Schrittmacherzellen erfolgt die Reizübertragung über die gap junctions und breitet sich gleichmäßig über den gesamten Herzmuskel aus.

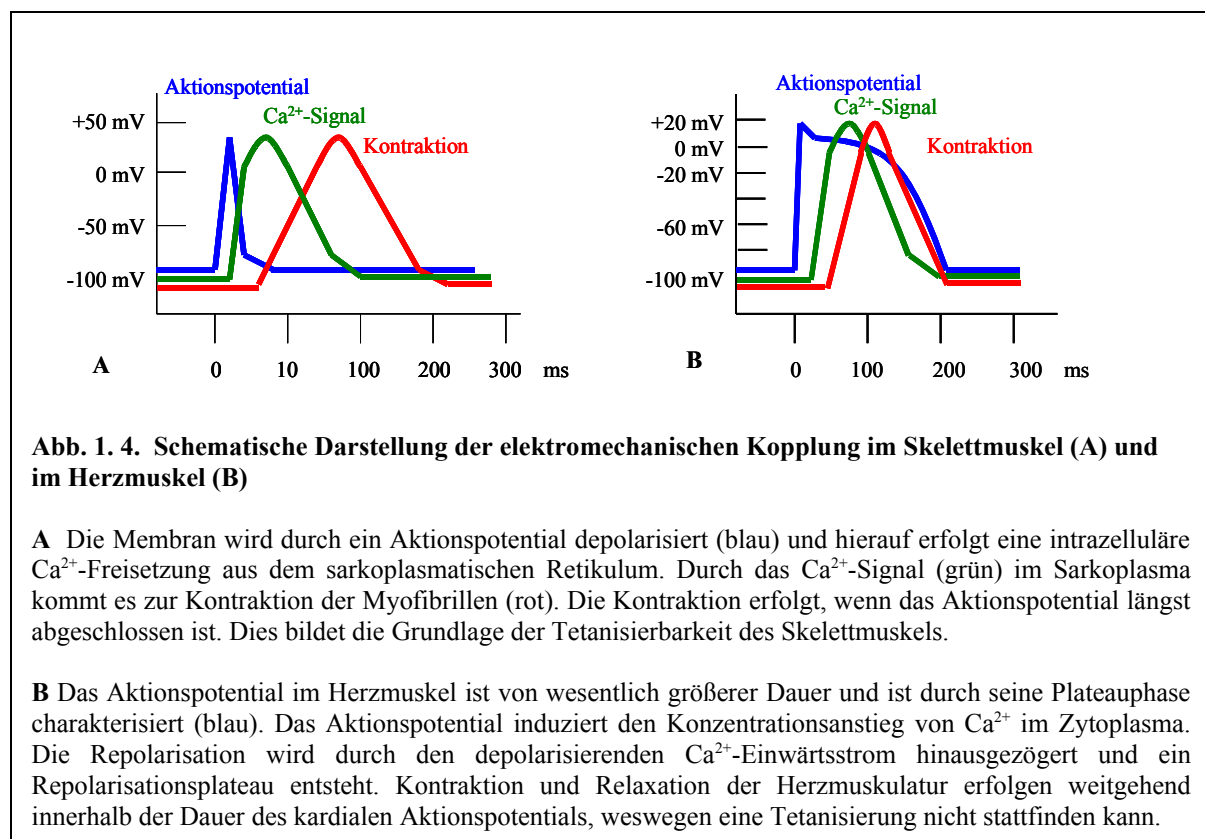
1. 7. Die elektromechanische Kopplung

Als elektromechanische Kopplung wird der Prozess bezeichnet, bei dem nach der Erregung der Muskelzellmembran Ca^{2+} -Ionen im Sarkoplasma freigesetzt werden und letztlich zur Kontraktion führen.

Beim Skelettmuskel verändert sich durch die Depolarisation der Membran der T-Tubuli die Konformation der Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR). Dies sind spannungsgesteuerte L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ($Ca_v1.1$), welche als Sensoren für die Veränderung der elektrischen Spannung fungieren. Die DHPR treten in Kontakt mit den Ryanodinrezeptoren (RyR_1) des SR (Adams und Beam, 1990; Catterall 1991), welche sich hierauf öffnen und Ca^{2+} ins

Sarkoplasma entlassen. Innerhalb von wenigen Millisekunden kommt es zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf bis zu ca. 10^{-5} mol/l, was über weitere Schritte zum Ineinandergreifen der Myofibrillen führt (Abb. 1.4). Wegen der direkten Kopplung von DHPR und RyR1 wird für die Aktivierung des RyR1 im Skelettmuskel kein extrazelluläres Ca^{2+} benötigt (Armstrong et al., 1972). Der Muskel erschlafft, sobald die Ca^{2+} -Ionen durch die Ca^{2+} -ATPase ins SR zurückgepumpt wurden und die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol auf ca. 10^{-7} mol/l sinkt. Die molekularen Strukturen, welche für die Interaktion von DHPR und RyR₁ verantwortlich sind, sind noch nicht genau bekannt.

Wesentliche Unterschiede hierzu bestehen bei der elektromechanischen Kopplung im Herzmuskel: Die kardiale Ryanodinrezeptor-Isoform, RyR₂, steht nicht in direktem Kontakt mit dem herzmuskulären DHPR ($\text{Ca}_v1.2$). Für die Aktivierung von RyR₂ muss zunächst extrazelluläres Calcium durch den DHPR in das Zellinnere gelangen. Ca^{2+} diffundiert dann zu den RyR₂ und bewirkt deren Öffnung, worauf eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern folgt. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration steigt hierbei auf ca. 10^{-6} mol/l, worauf die Kontraktion einsetzt (Abb. 1.4.). Dieser Prozess wird Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) genannt und tritt nur in geringen Maße auch beim Skelettmuskel auf.



1. 8. Ca²⁺-abhängige Inaktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen

Kardiale L-Typ-Ca²⁺-Kanäle (α_{1C}) werden stark von extrazellulärem Ca²⁺, das durch den Kanal in die Zelle gelangt, reguliert. Die lokale Anhäufung von einströmendem Ca²⁺ inaktiviert den Kanal, was im Sinne einer negativen Rückkopplung einen Abfall des Ca²⁺-Einstromes noch während eines depolarisierenden Impulses hervorruft (Lee et al., 1985). Studien belegen, dass für die Ca²⁺-abhängige Inaktivierung des Kanals eine konstitutive Assoziation von Calmodulin (CaM) mit dem Carboxyterminus des Kanals Voraussetzung ist (Soldatov et al., 1997, 1998; Zühlke und Reuter, 1998). CaM ist ein Ca²⁺-bindendes Protein, dessen Sequenz im Tierreich sehr konserviert ist. Mit seinen vier EF-Hand-Motiven ist CaM ein Mitglied der EF-Hand-Familie von Ca²⁺-Sensorproteinen und besitzt eine Schleife mit hoher und eine Schleife mit niedriger Affinität zu Ca²⁺ (Chin und Means, 2000).

Ein definierter Bereich innerhalb des Carboxyterminus der α_{1C} -Untereinheit (Aminosäurereste 1609-1685; Nummerierung der Reste für die Kaninchen-Isoform) beinhaltet Sequenzbereiche, welche, zumindest in Form synthetischer Peptide, alle CaM zu binden vermögen. Die am besten untersuchte und funktionell wohl auch bedeutendste CaM-Bindungsstelle ist eine im proximalen Carboxyterminus gelagerte Sequenz (Reste 1655-1665) mit starker Ähnlichkeit zu einem typischen, CaM-bindenden IQ-Motiv (IQxxxRGxxxR). Zwar belegen mehrere Studien die wesentliche Rolle dieses Bereiches bei der Inaktivierung (Adams und Tanabe, 1997; Quin et al., 1999; Zühlke et al., 1999, 2000; Pitt et al., 2001; Erickson et al. 2003), doch sind die genauen molekularen Mechanismen noch ungeklärt. Proximal der IQ-Region wurden zwei weitere Sequenzabschnitte identifiziert, welche als Peptide Bindestellen für CaM (genauer: Ca²⁺-CaM) darstellen. Entsprechend werden diese Abschnitte in der Literatur "A"- und "C"-Peptid genannt (Pitt et al., 2001). Die Bedeutung dieser Bindestellen für die Regulation der Ca²⁺-Kanalströme ist noch ungeklärt.

Der proximale Carboxyterminus der skelettmuskulären Isoform, Ca_v1.1 bzw. α_{1S} , weist einen hohen Grad an Sequenzhomologie zur kardialen Isoform auf, nur einige wenige Positionen sind mit verschiedenen Aminosäureresten besetzt. Aufgrund dieser Homologie könnte man erwarten, dass die Regulation durch CaM bei beiden Isoformen sehr ähnlich verläuft. Obwohl diese Annahme nicht bestätigt wurde, vermittelt die Literatur den Eindruck einer Äquivalenz von kardialer und skelettmuskulärer CaM-Interaktion (van Petegem et al., 2005; Tang et al., 2003). Auf der anderen Seite weisen skelettmuskuläre Ca²⁺-Kanäle vom L-Typ nicht die für α

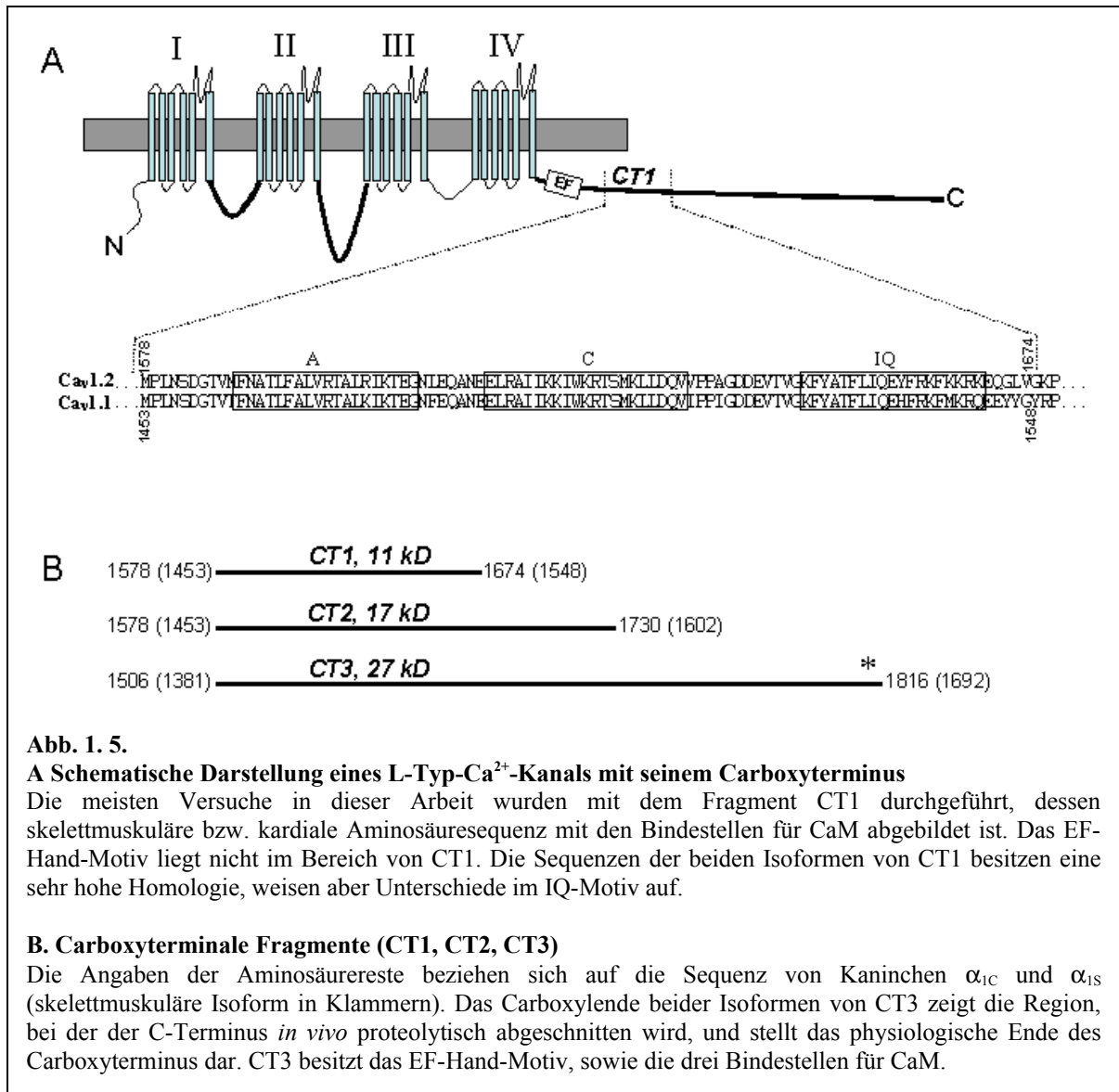
α_{1C} typische, Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung ihrer Ströme auf. Diese Kanäle ($Ca_v1.1$) inaktivieren kaum bzw. nur recht langsam (Beam und Knudson, 1988; Adams und Beam, 1989). Inwieweit eine α_{1C} -äquivalente Interaktion mit Calmodulin auch am skelettmuskulären DHPR stattfindet, bleibt also noch zu klären.

1. 9. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die molekularen Determinanten der Interaktion spannungsabhängiger Calciumkanäle mit dem wichtigen Calciumsensor Calmodulin zu charakterisieren. Dies soll durch vergleichende Untersuchungen an einer gut untersuchten Interaktion, α_{1C}/CaM , und einer bislang aufgrund von Sequenzhomologie nur angenommenen Interaktion, α_{1S}/CaM , erfolgen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Bedeutung des proximalen Carboxyterminus beider Kanalisofomen, welcher neben zwei putativen CaM-Bindungsstellen auch ein funktionell wichtiges IQ-Motiv beherbergt. Es soll untersucht werden, ob minimale Sequenzunterschiede innerhalb dieser Region die CaM-Bindung beeinflussen können. Ist dies der Fall, sollen weitergehende Arbeiten klären, ob Unterschiede in den Interaktionen mit CaM zu den lange bekannten elektrophysiologischen Unterschieden zwischen beiden Isoformen (Garcia et al., 1994) beitragen.

Zwei experimentelle Systeme sollen für die Bindungsstudien eingesetzt werden: Ein "Reagenzglassystem", bei dem Interaktionen von rekombinanten CaM und carboxyterminalen Kanalbereichen mittels nativer Gelelektrophorese untersucht werden (Gelshift-Assays) und ein "Zellsystem", bei dem die Bindungsassays innerhalb von in Kultur gehaltener Muskelzellen und unter Verwendung darin exprimierter Reaktionspartner stattfinden.

Im Gegensatz zu den Arbeiten einiger anderer Gruppen sollen die Gelshift-Studien nicht an kleinen, synthetischen Peptiden vorgenommen werden, da eine derart reduzierte Betrachtung in der Vergangenheit zu einigen widersprüchlichen Befunden geführt hat. Vielmehr sollen für die Bindungsstudien der vorliegenden Arbeit zunächst drei unterschiedlich lange, carboxyterminale Bereiche (CT1, CT2, CT3) der skelettmuskulären Isoform, α_{1S} , sowie der kardialen Isoform, α_{1C} , rekombinant in Bakterien hergestellt und aufgereinigt werden (Abb.1.5).



Jedoch besteht hierbei eine experimentelle Herausforderung, die darin liegt, die CT-Bereiche in möglichst nativer, aber dennoch stabiler Form darzustellen um sie in den langwierigen Bindungsstudien einsetzen zu können. Vorangegangene Studien dieses Labors sowie Arbeiten anderer Arbeitsgruppen dokumentieren die Schwierigkeiten im Umgang mit längeren Abschnitten des nativen Carboxyterminus, welche sich durch die sehr geringe Löslichkeit der Proteine ergeben. Zunächst sollen also molekularbiologische und biochemische Protokolle für die reproduzierbare Darstellung geeigneten Materials etabliert werden.

An diesem Material, skelettmuskuläre bzw. kardiale CT-Bereiche, soll dann untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen es zur Komplexbildung mit CaM kommt.

Insbesondere soll hierbei die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Assoziation getestet werden, da bestehende Studien eine Abhängigkeit der CaM-Affinität zu carboxyterminalen α_1 -Peptiden von dessen Ca^{2+} -Sättigung dokumentieren. In weiterführenden Versuchen sollen mittels gezielter Mutagenese reziproke Aminosäureaustausche an solchen CT-Positionen vorgenommen werden, welche trotz hoher Homologie bei den beiden Isoformen unterschiedlich besetzt sind. Auch an diesem Material werden entsprechende CaM-Bindungsstudien durchgeführt, um die Bedeutung diskreter Reste für die CaM-Bindung zu klären.

Im Rahmen der zellbasierten Bindungsexperimente sollen sowohl CaM als auch die skelettmuskuläre / kardiale CT1-Isoform als jeweils fluoreszenzmarkierte Proteine innerhalb eines eher "physiologischen" Reaktionsraums exprimiert werden. Für diese Versuche sollen primäre Muskelzellkulturen von Mäusen verwendet werden, welche mit CaM- und CT1-Expressionsvektoren kotransfiziert werden. Eine intrazelluläre Komplexbildung könnte dann ggf. mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischer Methodik (FRET, s.u.) nachgewiesen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2. 1. PCR

Zunächst wurden von allen Primern und Templates Arbeitskonzentrationen hergestellt.

	Stammlösung	Arbeitslösung
Primer	500 µM in Tris/HCl, pH 8,0 Lagerung bei -20°C	50 µM 2 µl Stammlsg. + 18 µl ddH ₂ O
Template		1 ng/µl

Der PCR-Ansatz wurde auf Eis in 500 µl Reaktionsgefäße (Eppendorf) pipettiert:

- ddH ₂ O	40,3	µl
- 10 x PCR-Puffer + 15 mM MgCl ₂ (Fermentas)	5	µl
- 10 mM dNTP-Mix (Fermentas)	1,2	µl
- 50 µM Forward Primer (Invitrogen)	1	µl
- 50 µM Reverse Primer (Invitrogen)	1	µl
- 5 u / µl Taq-DNA-Polymerase (Fermentas)	0,5	µl
- 1 ng / µl Template	1	µl

PCR-Laufbedingungen:

	Temp.	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	1 x
Denaturierung	94°C	30 sec	} 27 x
Anlagerung	59°C	45 sec	
Verlängerung	72°C	50 sec	
Finale Verlängerung	72°C	7 min	1 x
Kühlen	4°C	∞	∞

2. 2. Restriktion und CIAP-Verdau

2 µg Vektor-DNA sowie das PCR-Produkt wurden mit je 2 µl Restriktionsenzym und 6 µl Restriktionsenzym-Puffer von New England Biolabs (NEB) versetzt. Für ein Gesamtvolumen von 60 µl wurde mit ddH₂O aufgefüllt und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Um das Schließen des Vektors nach der Restriktion zu verhindern, wurden zur Vektor-DNA 2 µl calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP; NEB) dazugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Hierbei katalysierte die Phosphatase die Hydrolyse freier Phosphatgruppen.

Tab. 2.1. Restriktionsenzyme und Puffer, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Restriktionsenzyme (NEB):	Puffer (NEB):
Age I	Puffer 1
Afl II	Puffer 2 + BSA
BamH I	Puffer BamH I + BSA
Bgl II	Puffer 3
Bpu1102 I	Puffer 2
Dpn I	-
EcoR I	Puffer EcoR I
Hind III	Puffer 2
Nco I	Puffer 4
Nde I	Puffer 4
Pst I	Puffer 3 + BSA
Sal I	Puffer 3 + BSA
Xho I	Puffer 2 + BSA

2. 3. DNA-Aufreinigung mit horizontaler Agarose-Gelelektrophorese und dem Qiaex II Kit

Nach der Restriktion und dem CIAP-Verdau wurden die DNA-Proben mit Probenpuffer im Verhältnis 6 : 1 vermischt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Transeluminator aus dem Agarosegel geschnitten und abgewogen. Zur Aufreinigung der DNA-Proben wurde das Qiaex II Kit (Qiagen) verwendet. Hierbei wurde exakt nach Hersteller-Protokoll vorgegangen. Anschließend wurde die Konzentration der DNA am Photometer bei 260/280 nm ermittelt (s.u).

Agarosegel:	0,3 g Agarose wurden in 30 ml ddH ₂ O gelöst und bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Anschließend wurden 3 µl einer Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) hinzugegeben
Laufpuffer:	1 x TAE-Puffer (10 x Rotiphoresepuffer (Roth) wurde mit ddH ₂ O verdünnt)
Probenpuffer:	6 x Orange Loading Dye (Fermentas)
DNA-Marker:	1 kb DNA-Ladder, O'Gene Ruler™ (Fermentas)
Laufbedingungen:	30 min bei 100 V (10 V/cm))

2. 4. Ligation

Nach der Herstellung eines Reaktionsansatzes folgte eine Inkubation über Nacht bei 16°C.

Reaktionsansatz:	
Vektor-DNA	30 fmol
Insert-DNA	90 fmol
T4-Ligase (400 U/ml, NEB)	2 µl
Ligasepuffer (10 x, NEB)	2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

2. 5. Herstellung kompetenter Bakterien

Bei der Beschreibung der Vorgehensweise wird auf folgende Lösungen Bezug genommen:

- SOB-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, ad 1 l ddH₂O, pH 7.0 mit 5 N NaOH einstellen, autoklavieren, vor Gebrauch 5 ml 2 M MgCl₂ (steril) und 5 ml 2 M MgSO₄ (steril) zufügen.
- Transformationspuffer (TP): 10 mM Hepes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, ad 1 l ddH₂O, pH 6.7 mit 1N KOH einstellen, 55 mM MnCl₂, sterilfiltrieren.

Der für chemische Transformationen kompetent zu machende Bakterienstamm wurde auf eine LB-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. 10 bis 12 große Kolonien wurden in 20 ml SOB aufgelöst (OD₆₀₀ ~ 0,01 - 0,03), anschließend in 230 ml SOB-Medium (1-Liter-Schikanekolben) überführt und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (KS250 basic, IKA Labortechnik) bei 150 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,94 - 1,0 inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 2500 g und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml eiskaltem TP resuspendiert, auf 80 ml mit TP aufgefüllt und 10 min. auf Eis inkubiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wie oben beschrieben wiederholt, das Sediment in 10 ml eiskaltem TP resuspendiert und auf 20 ml aufgefüllt. Unter Schwenken wurden dann 1,4 ml DMSO hinzugegeben und 10 min. auf Eis inkubiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) à 200 µl aliquotiert, rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2. 6. Transformation

Für den Plasmid-Transfer in Bakterien wurde der kompetente *E.coli*-Stamm DH5a verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl der Bakteriensuspension wurden in ein 13 ml Röhrchen (Sarstedt) vorgelegt, mit 10 µl der Plasmidlösung (100 µg/ml) versetzt und 30 min. auf Eis gekühlt. Anschließend inkubierte man den Ansatz 45 Sekunden lang bei 42°C und stellte dann das Röhrchen für 2 min. auf Eis. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium wurden die Bakterien unter Schütteln (200 Upm; 37°C) 1 h inkubiert, bevor 200 µl der Suspension auf eine vorgewärmte Agarplatte ausgestrichen wurden. Diese enthielt das für die Selektion notwendige Antibiotikum. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2. 7. Plasmid-Präparation

Um die Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren, wurden einzelne Kolonien auf der Agarplatte gepickt, in jeweils 6 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt

und über Nacht im Schüttelinkubator bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1ml der Bakteriensuspension für die Herstellung von Bakterienstammlösungen abgenommen. Die restlichen 5 ml wurden zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien mit der Plasmid-DNA wurden unter Verwendung eines Plasmidpräparations-Kits (Qia-Prep-Spin Mini-Prep Kit; Qiagen) aufgeschlossen. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2. 8. Konzentrationsbestimmung der DNA

Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Verwendung einer Mikro-Quarzküvette (Hellma): Vorgelegt wurden 147 µl ddH₂O, welche als Leerwert dienen. Zu diesen wurden 3 µl DNA hinzugegeben und gut durchmischt. Damit ergab sich ein Verdünnungsfaktor von 1 : 50, welcher bei der Berechnung der DNA-Konzentration (µg/ml) berücksichtigt wurde.

2. 9. Restriktionsanalyse

Jedes neu hergestellte DNA-Konstrukt wurde einem Testverdau unterzogen um zunächst (a) die Anwesenheit und (b) die Orientierung der übertragenen DNA-Sequenz zu bestätigen. Hierzu wurden mittels einer Software (DS-Gene der Firma Accelrys) Restriktionsenzyme ausgewählt, an deren Restriktionsmuster (= die verschiedenen Fragmentgrößen) der Erfolg einer Klonierung bestätigt werden konnte.

Testverdau-Ansatz:

Plasmid-DNA:	5 µl
Restriktionsenzym:	jeweils 0,5 µl
Restriktionsenzymspuffer:	2 µl
ddH ₂ O:	auf 20 µl Gesamtvolumen auffüllen

Die Inkubation betrug mindestens 1 h bei 37°C. Anschließend wurde der Ansatz mit 3 µl Probenpuffer vermischt und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 30 min bei 100 V wurden die Banden auf dem UV-Transeluminator auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Richtig befundene Konstrukte wurden zur endgültigen Bestätigung einer DNA-Sequenzierung (MWG Biotech) unterzogen.

2. 10. Herstellung von Bakterienstammlösungen

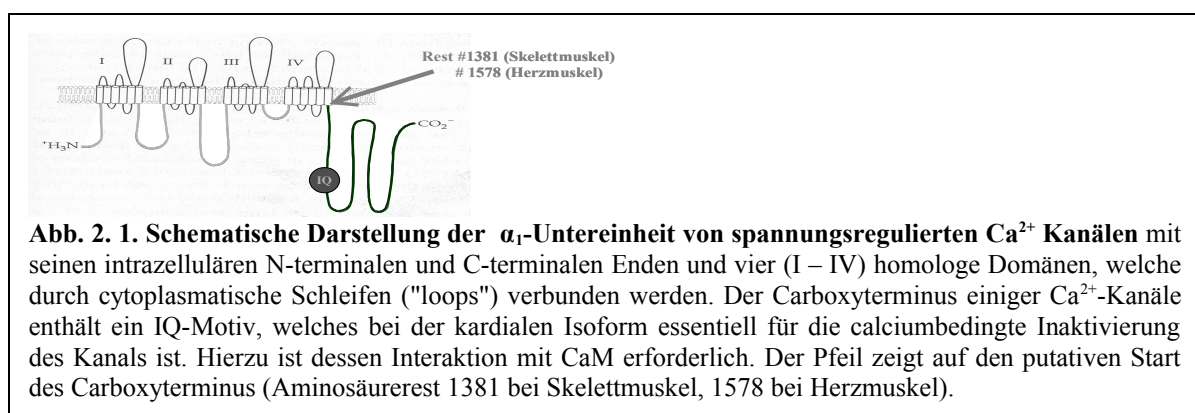
1 ml der Bakteriensuspension (siehe 2.7.) wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen pelletiert, das Sediment in 500 µl Einfriermedium (s.u.) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

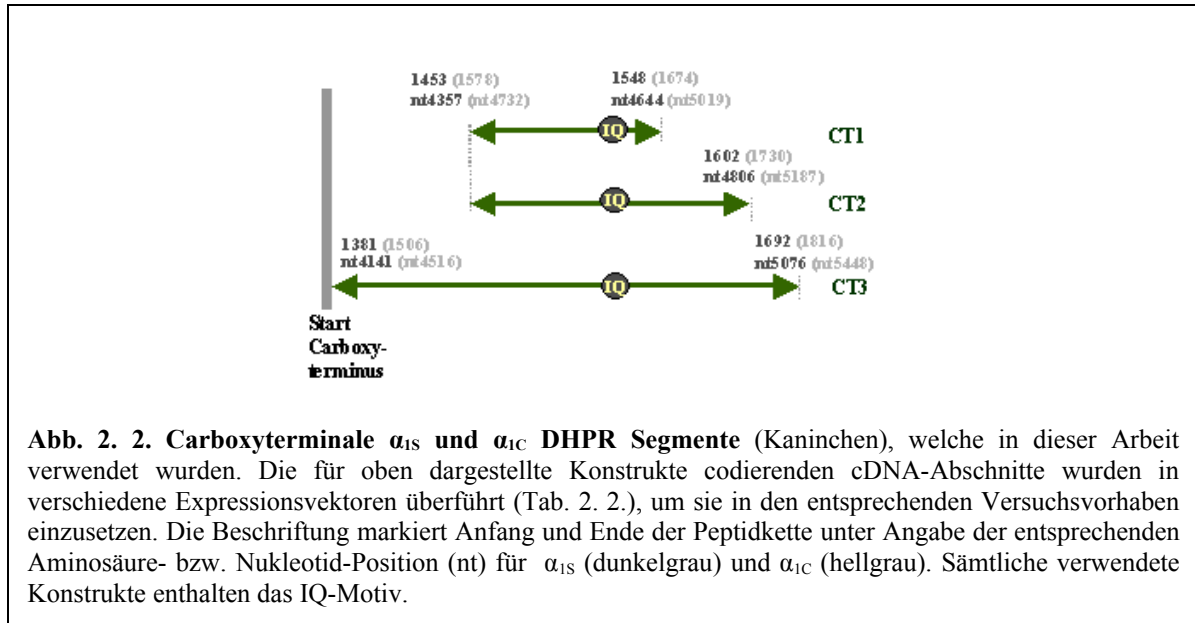
Einfriermedium: LB-Medium / Glycerol im Verhältnis 85 : 15

2. 11. Klonieren von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Plasmid-Vektoren

Bei der Methode des Klonierens wurden die zu vervielfältigenden DNA-Fragmente zunächst in Plasmid-Vektoren eingebracht und diese anschließend in Bakterien eingeschleust. Bei Anzucht der Bakterien auf Nährböden kam es zu einer gleichzeitigen Vermehrung der Fragment-tragenden Plasmid-DNA. Die erkennbar werdende Bakterienkolonien waren auf jeweils eine einzige ursprüngliche Bakterienzelle zurückzuführen. Durch Weiterzucht einzelner Kolonien und anschließende Aufreinigung der DNA-Fragmente aus den Plasmiden konnten auf diese Weise reine Amplifikationsprodukte erzielt werden.

Um CaM-Bindestudien durchzuführen, wurden unterschiedlich lange, jeweils homologe, carboxyterminale Bereiche der α_{1S} - (Genbanknr. P07293, X05921) und α_{1C} - (P15381, X15539) Untereinheit des DHP-Rezeptors rekombinant hergestellt. Dazu wurden zunächst die entsprechenden cDNA-Abschnitte der skelettmuskulären bzw. kardialen α_1 -Untereinheit aus dem Trägerplasmid herausgeschnitten und in verschiedene Plasmide kloniert (Abb. 2. 1., Abb.2. 2., Tab. 2. 2.).





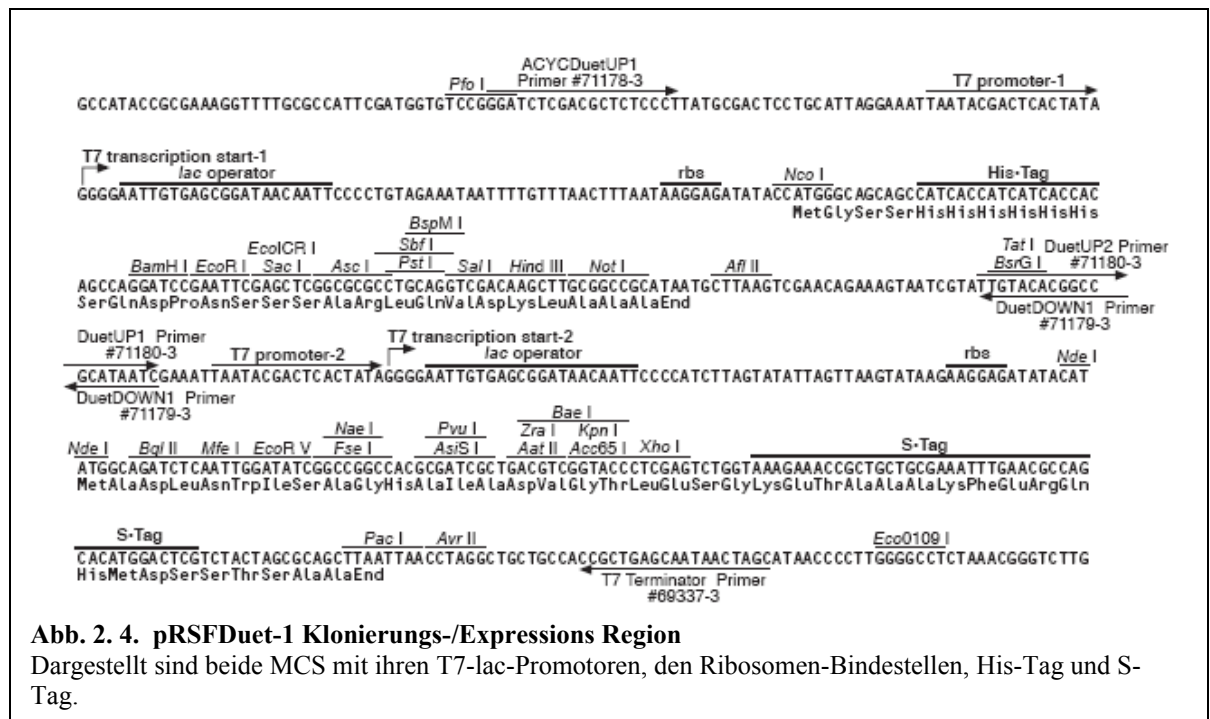
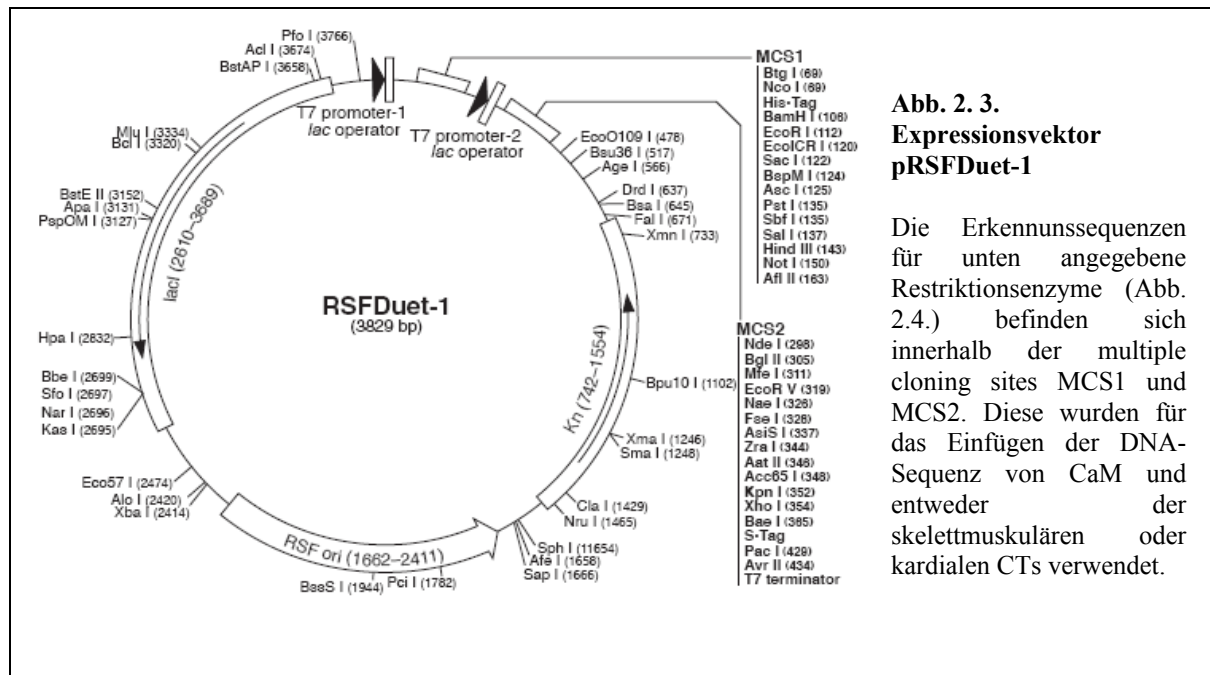
Tab. 2. 2. Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Plasmid	Selektion	Merkmale	Quelle
pET19b-CT3	Kanamycin	Expressionsvektor mit T7-lac-Promotor, N- terminaler His-Tag	S. Papadopoulos unveröffentlicht
pRSFDuet1	Kanamycin	Expressionsvektor mit multiplen Klonierungsstellen, T7-lac-Promotor 1 und 2, N- terminaler His-Tag	Novagen
pETM60-NusA	Kanamycin	Expressionsvektor mit T7-lac-Promotor, N- terminaler His-Tag, TEV- Protease - Schnittstelle	De Marco (De Marco et al., 2004)
pCyPet/YPet	Kanamycin	Expressionsvektor für Eukaryonten, Injektion in Muskelzellen	S. Papadopoulos unveröffentlicht
pRARE 2	Chloramphenicol	Vektor in <i>BL21 Rosetta 2</i> , supplementiert <i>E. coli</i> mit 7 tRNAs (Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, CGG) und verstärkt dadurch die Expression von Säuger-Genen	Novagen

2. 11. 1. Klonierung in den Expressionsvektor pRSFDuet-1

Der Expressionsvektor pRSFDuet-1 (Novagen) besitzt zwei ORFs und ermöglicht dadurch - zusätzlich zur Expression von nur einem Protein - die Coexpression zweier physisch getrennter Proteine (Abb. 2. 3.). Der Vektor enthält zwei unabhängige multiple-cloning-sites (MCS), welche jeweils über einen T7-lac-Promotor und eine Ribosomen-Bindestelle verfügen. Als Selektionsmerkmal enthält der Vektor ein Resistenzgen für Kanamycin.

Die cDNA von Calmodulin (CaM) der Ratte (Genbanknr. M19312) wurde großzügigerweise von K. Stroffekova, Utah State University, Logan, bereitgestellt.



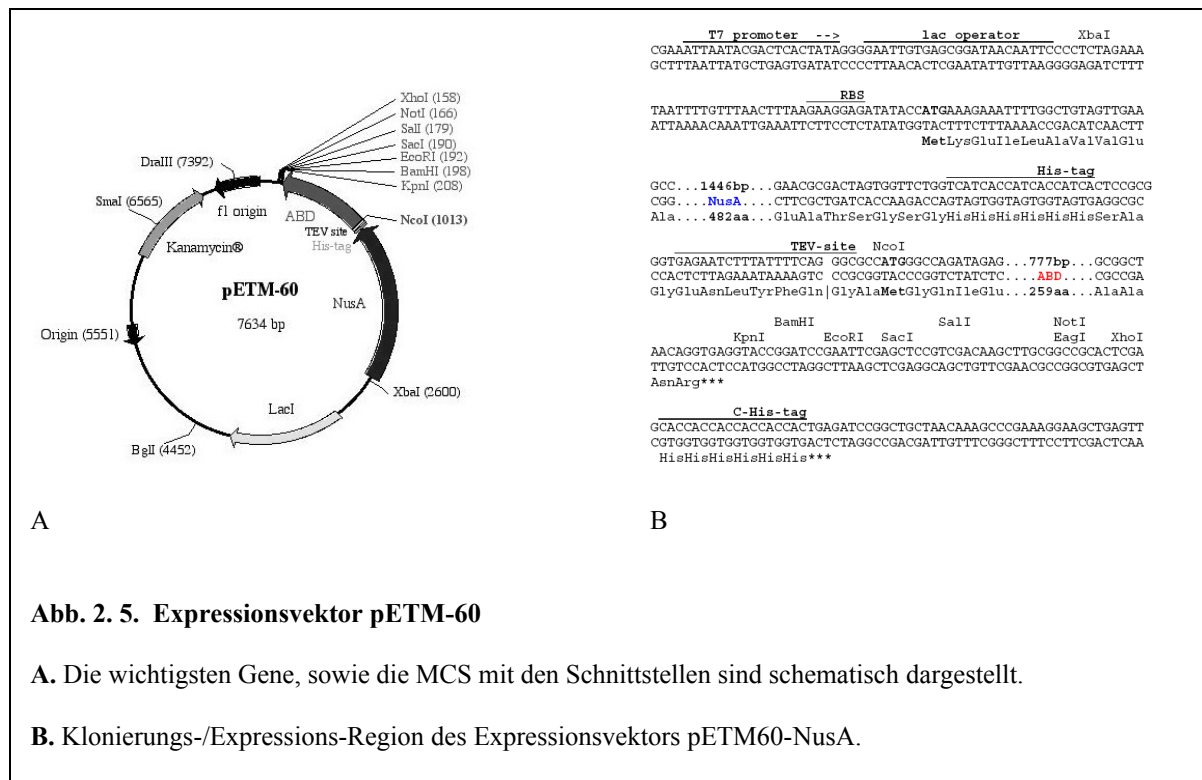
Tab. 2. 3. Restriktionsendonukleasen und Primer für den Transfer von CaM und verschiedener CTs in den Expressionsvektor pRSFDuet1 (entsprechende Erkennungssequenzen sind unterstrichen)

Insert	Restriktionsenzyme	Primersequenzen	Testverdau
CaM	Nde I	Fwd. Primer 5'-3' GACGACAAG <u>CATATG</u> GCTGACCAACTGACTG AAGAGCAGGC	Bam H I, Xho I 3581 bp, 644 bp
	Xho I	Rev. Primer 5'-3' GACT <u>CGAG</u> TCACTTCGCTGTCATCATTGTAC AAACTC-3'	
CT1 (α_{1S})	EcoR I	Fwd. Primer 5'-3' <u>GGAATTC</u> AATGCCCTGAACAGTGACGGCAC G	Bam H I, Xho I 3772 bp, 298 bp
	Afl II	Rev. Primer 5'-3' CGACTT <u>AAG</u> GCCGATACCCATAATATTCCTC CTGGCG	
CT1 (α_{1C})	EcoR I	Fwd. Primer 5'-3' <u>GGAATTC</u> AATGCCCTGAACAGTGACGGCAC G	Bgl II 3773 bp, 328 bp
	Sal I	Rev. Primer 5'-3' CTT <u>GTCGACT</u> AGGGCTTGCCCACAAGCCCTT G	
CT2 (α_{1S})	EcoR I	Fwd. Primer 5'-3' <u>GGAATTC</u> AATGCCCTGAACAGTGACGGCAC G	EcoR I 3836 bp, 517 bp, 168 bp
	Hind III	Rev. Primer 5'-3' CGC <u>AAGCTT</u> ATCCCGTCCTCCGGAAGATCCT CTCCTC	

			Testverdau
CT1 (α_{1S}) + CaM	CaM wurde mit Nde I und Xho I aus dem Vektor pRSFDuet-1-CaM ausgeschnitten und in den mit Nde I und Xho I geöffneten Vektor pRSFDuet-1-CT1 (α_{1S}) eingefügt.		Bam H I, Xho I 3581 bp, 866 bp
CT1 (α_{1C}) + CaM	CaM wurde mit Nde I und Xho I aus dem Vektor pRSFDuet-1-CaM ausgeschnitten und in den mit Nde I und Xho I geöffneten Vektor pRSFDuet-1-CT1 (α_{1C}) eingefügt.		Bgl II, Xho I 3724 bp, 773 bp

2. 11. 2. Klonierung in den Expressionsvektor pETM60-NusA

Der Vektor wurde großzügigerweise von Dr. De Marco, EMBL, Heidelberg bereitgestellt. (De Marco et al. 2004) Der MCS vorgesetzt befinden sich ein T7-Promotor, die ribosomale Bindestelle und die Sequenz des sehr löslichen "Helfer"-Proteins NusA mit einem His-Tag, was die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins erleichtert. Eine TEV-Protease Bindestelle zwischen NusA und der MCS ermöglicht die Abspaltung des rekombinant hergestellten Proteins vom Fusionsprotein (Abb. 2. 5.).



Tab. 2. 4. Restriktionsendonukleasen und Primer für den Transfer von verschiedenen CTs in den Expressionsvektor pETM60-NusA (entsprechende Erkennungssequenzen sind unterstrichen)

Insert	Primer-schnittstellen	Primersequenzen	Testverdau
CT1 (α_{IS})	Nco I	Fwd. Primer 5'-3' <u>CACCATGG</u> CCCTGAACAGTGACGGCACGGTC	Bgl II 5307 bp, 1474 bp,
	Sal I	Rev. Primer 5'-3' CTT <u>GTCGACT</u> AGGGCCGATACCCATAATATTCCTC	311 bp
CT1 (α_{IC})	Nco I	Fwd. Primer 5'-3' <u>CACCATGG</u> CTCTGAACAGTGACGGGACGGTC	Bgl II 5307 bp, 1474 bp,
	Sal I	Rev. Primer 5'-3' CTT <u>GTCGACT</u> TAGGCCCTCCTGAAGATGTCATCTTC	311 bp
CT2 (α_{IS}) (*)	Nco I	Fwd. Primer 5'-3' <u>CACCATGG</u> CCCTGAACAGTGACGGCACGGTC	Bgl II 5469 bp, 1474 bp,
	Sal I	Rev. Primer 5'-3' CTT <u>GTCGACT</u> ATCCCGTCCTCCGGAAGATCCTCTC	311 bp
CT2 (α_{IC})	Nco I	Fwd. Primer 5'-3' <u>CACCATGG</u> CTCTGAACAGTGACGGGACGGTC	Bpu1 102 I 6187 bp, 1073 bp,
	Sal I	Rev. Primer 5'-3' CTT <u>GTCGACT</u> TAGGCCCTCCTGAAGATGTCATCTTC	
CT3 (α_{IS}) (*)	NcoI	Fwd. Primer 5'-3' <u>CACCATGG</u> ACAACCTTTGACTACCTGAC	Bgl II 5739 bp, 1474 bp,
	Sal I	Rev. Primer 5'-3' CTT <u>GTCGACT</u> ATCCCGGAACTCCCTTTCACAGTG	527 bp
CT3 (α_{IC})	Nco I	Fwd. Primer 5'-3' <u>CACCATGG</u> ACAACCTTTGACTACCTGAC	Bpu1 102 I 6187 bp, 1550 bp
	Sal I	Rev. Primer 5'-3' CTT <u>GTCGACT</u> AGCTGGGGTAGCCGGCGGGGCG	

* Die amplifizierte Sequenz enthielt eine Nco I-Schnittstelle. Somit befand sich auch im PCR-Produkt, zusätzlich zur geschaffenen Schnittstelle am 5'-Anfang, eine zweite, intern gelegene

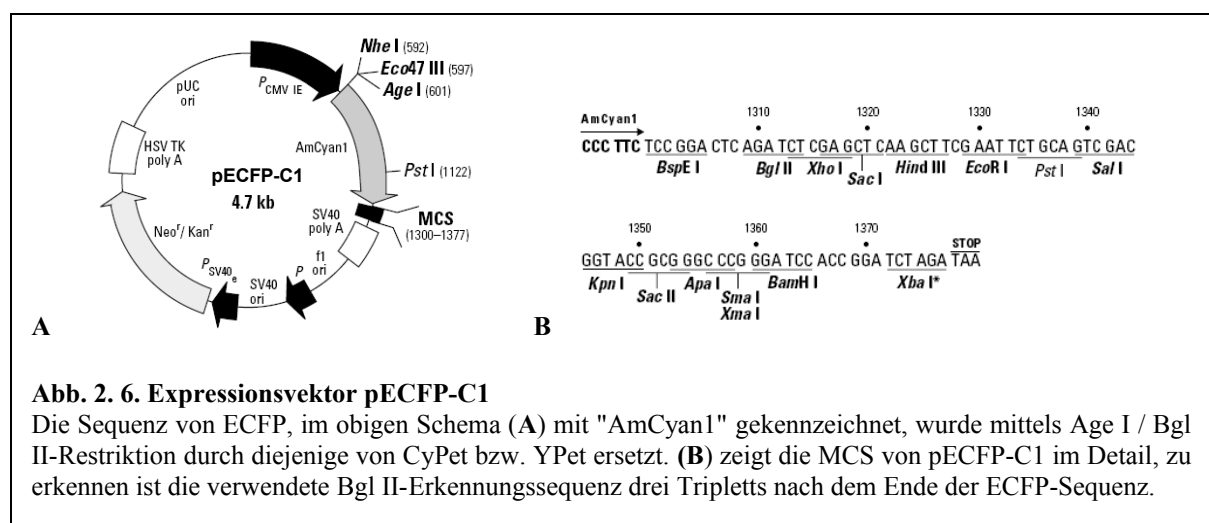
Nco I Schnittstelle. Ein Verdau mit Nco I hätte hier also auch innerhalb des PCR-Produktes geschnitten und somit zu unbrauchbaren Fragmenten geführt. Dieser Umstand erforderte eine vom normalen Protokoll (Verdau mit Nco I + Sal I im Anschluß an die PCR) abweichende Vorgehensweise: Das PCR-Produkt wurde zunächst mit Bgl II geschnitten, um eine Dissoziation der Nco I-Schnittstellen zu erzielen. Nun wurde das Stück, welches die Nco I-Schnittstelle am 5'-Ende enthielt, mit Nco I geschnitten. Danach wurden die dissoziierten Stücke mittels Ligation wieder zusammengefügt und es wurde der noch fehlende Schnitt mit Sal I durchgeführt. Das Produkt konnte nun trotz interner Nco I-Schnittstelle für die sich anschließenden Klonierungsarbeiten verwendet werden.

2. 11. 3. Klonieren mit den Vektoren pCyPet und pYPet

Vektoren mit den cDNAs der FRET-optimierten fluoreszierenden Proteine CyPet and YPet (Nguyen et al, 2005) wurden freundlicherweise von Dr. Daughery, Department of Chemical Engineering, UC Santa Barbara bereitgestellt. Um die cDNA der beiden Farbstoffe vom ursprünglichen Trägervektor auf das in den anschließenden Arbeiten einzusetzende Expressionsplasmid zu übertragen, wurden mittels PCR und mit entsprechenden Primern geeignete Schnittstellen angehängt (Tab.2.5.). Dabei konnte wegen der hohen Sequenzhomologie am 5'-Anfang der gleiche forward-Primer verwendet werden.

Tab. 2. 5. Restriktionsendonukleasen und Primer für den Transfer verschiedener Farbstoffe in den leeren Säugerzellen-Expressionsvektor (entsprechende Erkennungssequenzen sind unterstrichen)

Primer	Primer-Schnittstellen	Primersequenz
CyPet/YPet-Fwd.	Fwd. Age I	CTG CAG TCG ACG GTA CC
CyPet-Rev.	Rev. Bgl II	<u>CGA GAT CTT</u> TTG TAC AGT TCG TCC ATG C
YPet-Rev.	Rev. Bgl II	<u>CGA GAT CTC</u> TTA TAG AGC TCG TTC ATG C



Die geschnittenen PCR-Produkte wurden dann in den Säugerzellen-Expressionsvektor pECFP-C1 (Clontech) integriert. Aus diesem Vektor wurde vorher der Farbstoff ECFP durch Restriktion entfernt (Papadopoulos 2006, unveröffentlicht).

Die so geschaffenen Expressionsplasmide für CyPet und YPet wurden verwendet, um die fluoreszierenden Fusionsproteine CyPet-CT1 (α_{1s}) bzw. CyPet-CT1 (α_{1c}), sowie YPet-CaM in Myotuben zu exprimieren. Dazu wurden die Sequenzen von kardialem und skelettmuskulärem CT1 sowie von CaM mittels PCR und entsprechender Primer amplifiziert und dabei mit endständigen Erkennungssequenzen für EcoR I und Sal I (CT1) bzw. für Xho I (CaM) versehen (Tab. 2. 6.).

Tab. 2. 6. Restriktionsendonukleasen und Primer für den Transfer von CaM und verschiedener CTs in den Expressionsvektor pCyPet bzw. pYPet (entsprechende Erkennungssequenzen sind unterstrichen)

Vektor	Insert	Primer-Schnittstellen	Primersequenz	Testverdau
pCyPet	CT1 _{1s}	(α EcoR I Sal I)	Fwd. Primer 5'-3' <u>GGA ATT CCA</u> TGG CCC TGA ACA GTG ACG GCA CG Rev. Primer 5'-3' CTT <u>GTC GAC</u> TAG GGC CGA TAC CCA TAA TAT TCC TC	Nco I 3465 bp, 2762 bp, 1355 bp, 611 bp, 360 bp
pCyPet	CT1 _{1c}	(α EcoR I Sal I)	Fwd. Primer 5'-3' <u>GGA ATT CCA</u> TGG CCC TGA ACA GTG ACG GCA CG Rev. Primer 5'-3' 5'-CTT <u>GTC GAC</u> TAG GGC TTG CCC ACA AGC CCT TG-3'	Nco I 3465 bp, 2762 bp, 1355 bp, 611 bp, 360 bp
pYPet	CaM	Xho I Xho I	Fwd. Primer 5'-3' GAG <u>CTC GAG</u> ATA TGG CTG ACC AAC TGA CTG AAG AGC Rev. Primer 5'-3' GAC <u>TCG AGC</u> ACT TCG CTG TCA TCA TTT GTA CAA ACT C	Pst I 4852 bp, 326 bp

2. 12. Reziproker Austausch definierter Aminosäurereste innerhalb von CT1 mittels Mutagenese

Um die Bedeutung definierter Aminosäurereste innerhalb von kardialem bzw. skelettmuskulärem CT1 für die Interaktion mit CaM zu untersuchen, wurden unterschiedlich besetzte Aminosäurepositionen nach und nach einem reziproken Austausch unterzogen, d.h. skelettmuskuläres CT1 wurde schrittweise immer "kardialer" während kardiales CT1 "skelettmuskulärer" wurde (Abb. 2. 7.).

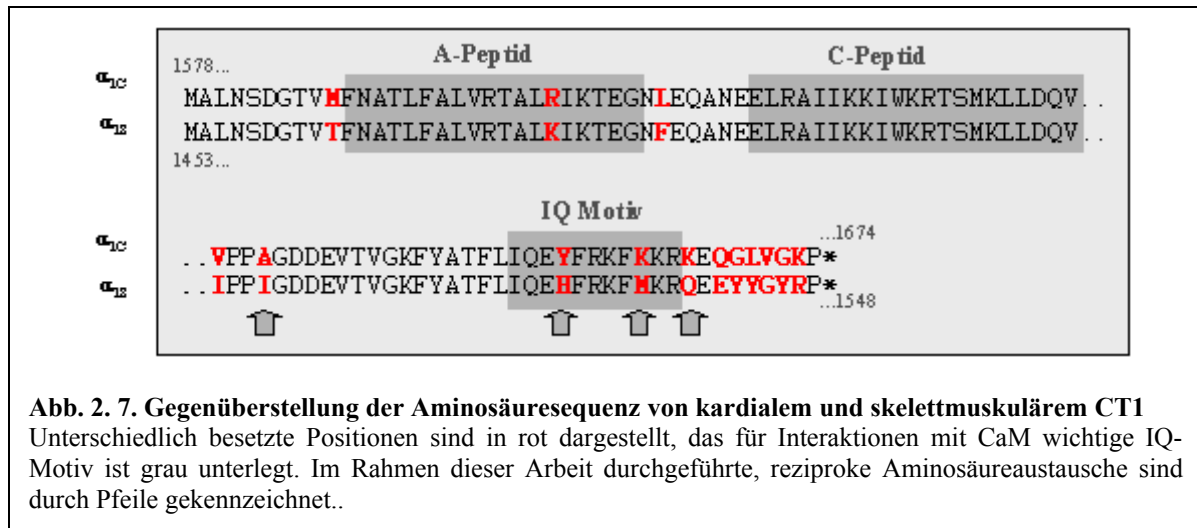
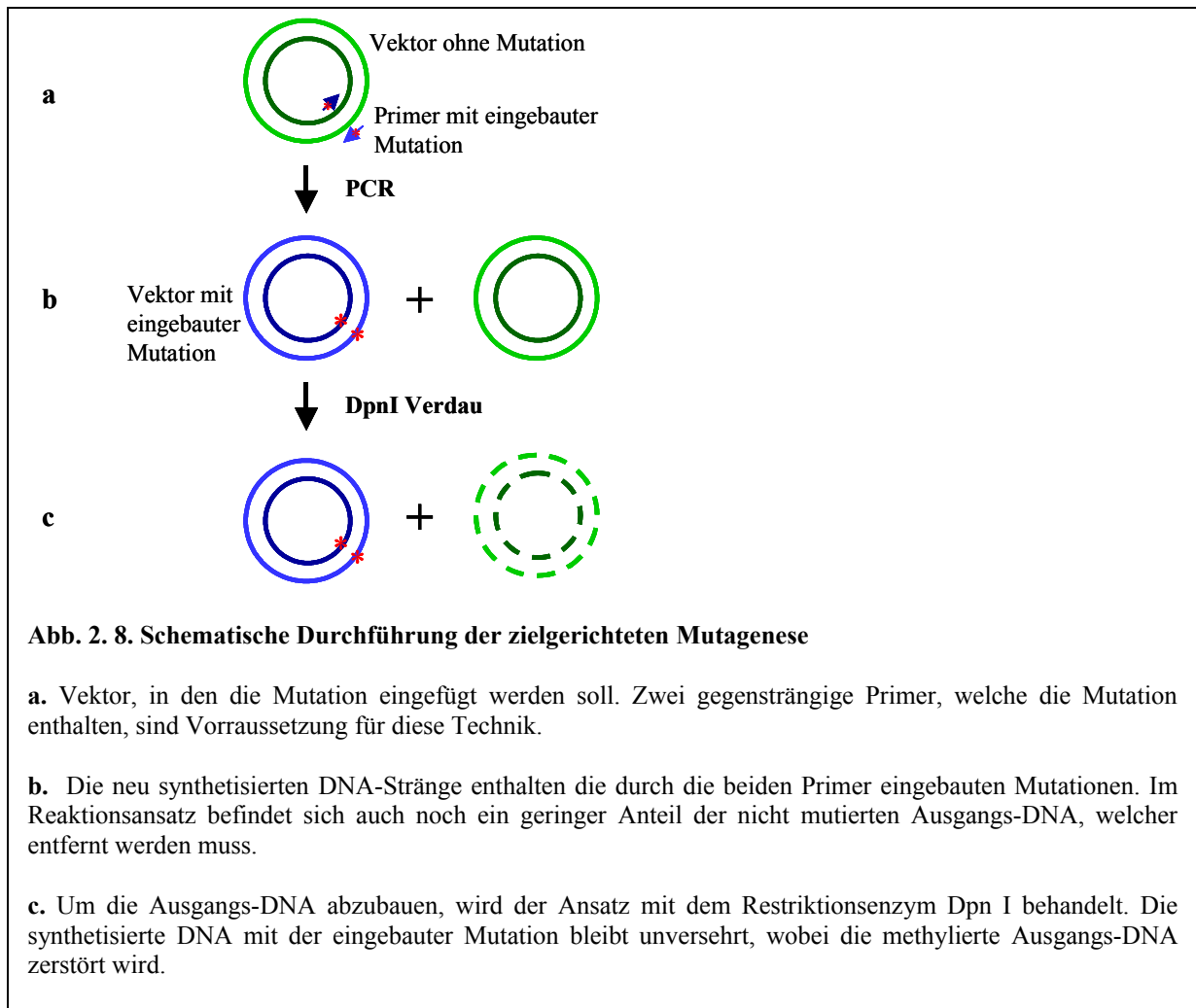


Abb. 2. 7. Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz von kardialem und skelettmuskulärem CT1
 Unterschiedlich besetzte Positionen sind in rot dargestellt, das für Interaktionen mit CaM wichtige IQ-Motiv ist grau unterlegt. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte, reziproke Aminosäureaustausche sind durch Pfeile gekennzeichnet..

Die hierfür notwendige, zielgerichtete Mutagenese wurde mit dem Quick-Change Site-directed Mutagenese Kit (Stratagene) durchgeführt, dessen Prinzip hier kurz erläutert wird: Für jede durchzuführende Sequenzänderung werden bei dieser Technik zwei komplementäre Primer benötigt, welche die Mutation enthalten (Abb. 2. 8.). Während der PCR wird dann der gesamte Vektorstrang vervielfältigt. Im Anschluss an die PCR erfolgt die Eliminierung der nichtmutierten Matrize mit dem Restriktionsenzym Dpn I. Dieses erkennt eine sehr kurze, daher häufig vorkommende, Basensequenz und zerlegt den Ausgangsvektor in zahlreiche, unbrauchbare Stücke. Da Dpn I ausschließlich methylierte, also aus Bakterien isolierte, Vektor-DNA verdaut, bleibt das nichtmethylierte PCR-Produkt mit der Mutation verschont und kann für die Transformation von Bakterien verwendet werden.



Die nachfolgenden Tabellen geben Reaktionsansatz, PCR-Protokoll sowie die jeweils verwendeten Primerpaare für die durchgeführten Quick-Change Mutagenesen an.

Reaktionsansatz:

10 x Reaktionspuffer	5 µl
Template	125 ng
Fwd. Primer	125 ng
Rev. Primer	125 ng
dNTP Mix	2 µl
ddH ₂ O	auf 50 µl
PfuUltra™ Polymerase	1 µl

PCR-Protokoll:

	Temp.	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturation	95°C	30sec	1x
Denaturation	95°C	30sec	} 18x
Anlagerung	53°C	1min	
Verlängerung	68°C	13min	
Kühlen	4°C	∞	∞

Primer:

I1513A (α_{1S})	Fwd. Primer 5'-3' GTCATCCCTCCCGCAGGAGATGACGAGG Rev. Primer 5'-3' CCTCGTCATCTCCTGCGGGAGGGATGAC
A1639I (α_{1C})	Fwd. Primer 5'-3' CCAAGTGGTGCCCCCTATAGGCGATGATGAGGTC Rev. Primer 5'-3' GACCTCATCATCGCTATAGGGGGCACCCTTGG
H1532Y (α_{1S})	Fwd. Primer 5'-3' CCACATTCCTCATCCAGGAGTACTTCCGGAAGTTCATGAAGC Rev. Primer 5'-3' GCTTCATGAACTTCCGGAAGTACTCCTGGATGAGGAATGTGG
Y1658H (α_{1C})	Fwd. Primer 5'-3' CCTTCCTGATCCAAGAGCACTTCCGGAATTC Rev. Primer 5'-3' GAATTTCCGGAAGTGCTCTTGGATCAGGAAGG
M1537K (α_{1S})	Fwd. Primer 5'-3' GCACTTCCGGAAGTTCAAGAAGCGCCAGGAGG Rev. Primer 5'-3' CCTCCTGGCGCTTCTTGAAGTCCGGAAGTGC
K1663M (α_{1C})	Fwd. Primer 5'-3' CTTCCGGAATTCATGAAGCGCAAAGAGC Rev. Primer 5'-3' GCTCTTGCGCTTCATGAATTTCCGGAAG
H1532Y & M1537K (α_{1S})	Fwd. Primer 5'-3' GGAGTACTTCCGGAAGTTCAAGAAGCGCCAGGAGG Rev. Primer 5'-3' CCTCCTGGCGCTTCTTGAAGTCCGGAAGTAC
Y1658H & K1663M (α_{1C})	Fwd. Primer 5'-3' CCAAGAGCACTTCCGGAATTCATGAAGCGCA Rev. Primer 5'-3' TGCGCTTCATGAATTTCCGGAAGTGCTCTTGG
H1532Y & M1537K & Q1540K (α_{1S})	Fwd. Primer 5'-3' CGGAAGTTCAAGAAGCGCAAGGAGGAATATTATGG Rev. Primer 5'-3' CCATAATATTCTCCTTGGCGCTTCTTGAAGTCC
Y1658H & K1663M & K1666Q (α_{1C})	Fwd. Primer 5'-3' CGGAAATTCATGAAGCGCCAAGAGCAAGG Rev. Primer 5'-3' CCCTTGCTCTTGGCGCTTCATGAATTTCC

Für die Amplifikation der PCR-Produkte wurden kompetente Bakterien transformiert und die mittels Plasmidpräparation gewonnene DNA wurde zur Erfolgskontrolle einer Sequenzierung (MWG Biotech) unterzogen.

2. 13. Rekombinante Protein-Herstellung

Die zu exprimierenden DNA-Sequenzen befanden sich nach den Klonierungs-Arbeiten auf stabil replizierten Plasmiden (s. u.) und standen unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors sowie des lac-Operators. Da die *E. coli*-eigene Polymerase nicht an diesen Promotor binden kann, wurde ein *E. coli*-Stamm benutzt, in dessen Genom die für die T7-RNA-Polymerase kodierende Sequenz inseriert war, welche unter der Kontrolle des lac-Promotors stand. Desweiteren befindet sich in diesem Stamm (*coli*-Derivat BL21 Rosetta 2) ein Plasmid, welches 7 tRNAs für die in *E. coli* nicht oder kaum verwendeten Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, CGG kodiert. Durch die Zugabe von Isopropyl-Thio-Galactosid (IPTG) wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert. IPTG bindet an den lac-Repressor, wodurch sich dieser vom lac-Operator löst und die T7-RNA-Polymerase die Sequenz transkribiert.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Expressionsvektoren pET19b, pRSFDuet-1 sowie pETM60-NusA wurde, samt den in ihnen integrierten, zu exprimierenden cDNA-Sequenzen, der *E. coli*- Stamm BL21 Rosetta (DE3)pLysS transformiert. Anschließend wurde eine Kolonie in 1 ml LB-Medium mit Antibiotika überführt und bei 37°C auf dem Schüttelinkubator bis zur sichtbaren Trübung ca. 3 h inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 150 ml LB-Medium mit Antibiotika gegeben und bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ inkubiert. Daraufhin wurden die Proben auf Eis abgekühlt und die Expression wurde mit 1,5 ml einer 100 mM IPTG-Lösung (1 mM Endkonzentration) induziert. Proben mit pRSFDuet1-Vektoren wurden 4 h bei 37°C, Proben mit pET19b und pETM60-NusA hingegen über Nacht bei RT induziert. Die Bakteriensuspensionen wurden in der Kühlzentrifuge (Hermle, Z 323K) 10 min. bei 4°C à 50 ml pelletiert, anschließend mit 500 µl Einfriermedium (LB-Medium und Glycerol im Verhältnis 85 : 15) versetzt und bis zum späteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2. 14. Metallaffinitätschromatographie / Proteinreinigung mittels HisTag

Die Metallaffinitätschromatographie basiert auf der reversiblen Bindung von Metallionen (meist Cu^{2+} , Ni^{2+} oder Zn^{2+}) an eine Matrix. An unbesetzte Koordinationsstellen der Metalle können Proteine durch frei zugängliche Histidin-, aber auch Tryptophan- und Cysteinreste, oder über die α -Aminogruppe binden. Der 6x-HisTag besteht aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten (Porath, et al 1975), der rekombinant in den Vektor an den C- bzw. N-Terminus des zu exprimierenden Proteins angefügt wird. Um die unspezifische Anlagerung

histidinreicher bakterieller Proteine zu minimieren, ist jedoch ein hohes Expressionsniveau der interessierenden His-markierten Proteine Voraussetzung.

2. 14. 1. Proteinaufreinigung mit Talon Metal Affinity Resin (BD Biosciences Clontech)

Bindepuffer: Harnstoff- Lysepuffer, pH 8,0

Waschpuffer: Harnstoff- Lysepuffer, pH 6,3

Elutionspuffer: Harnstoff- Lysepuffer, pH 4,5

Die Proteinaufreinigung mit Talon zählt zur IMAC (immobilized metal affinity chromatography) und verwendet Kobaltionen, die an eine Matrix gebunden sind. Die Elution des aufzureinigenden Proteins erfolgte über eine pH-Änderung. Zwischen den jeweiligen Aufreinigungsschritten wurde 1 min. bei 1.000 g (RT) zentrifugiert. 1 ml Talon wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß (BD Falcon) gefüllt und vorab 2 Mal mit 5 ml Bindepuffer gewaschen. 5 ml lösliches denaturiertes Gesamtprotein wurden dazugegeben, 10 min. inkubiert und dabei jede Minute mit der Pipette vorsichtig gemischt. Nach 2 Waschschritten mit je 5 ml Waschpuffer eluierte man 4 Mal mit je 0,5 ml Elutionspuffer. Die Eluate wurden gesammelt und bei -20°C gelagert.

2. 14. 2. Proteinaufreinigung mit Protino Ni-TED 2000 packed columns (Macherey-Nagel)

Bindepuffer / Waschpuffer: NusA- Lysepuffer, pH 7,4 (s.u.)

Elutionspuffer: NusA- Lysepuffer, pH 7,4
250 mM Imidazol

Auch hier handelt es sich um eine IMAC, wobei Nickelionen an eine Silica-Matrix gebunden sind und sich in einer Durchlaufsäule befinden (gravity-flow). Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol. Bevor die Probe auf die Säule gegeben werden konnte, musste die Säule 2 Mal mit 5 ml Bindepuffer gewaschen werden um die idealen Bindebedingungen zu erhalten. Anschließend ließ man 5 ml lösliches natives Gesamtprotein durch die Säule laufen. Nach 2 Waschschritten mit je 5 ml Waschpuffer eluierte man 4 Mal mit je 1 ml Elutionspuffer. Die Eluate wurden gesammelt und sofort weiterverarbeitet.

2. 15. Dialyse

Die Dialyse wurde eingesetzt um Proteinlösungen zu entsalzen oder umzupuffern bzw. um die mit Harnstoff denaturierten und dann gereinigten Proteine in ihren nativen Zustand zurückzufalten. Hierfür verwendete man die "Float-A-Lyzer" (Spectra/Por) mit der Ausschlussgröße (MWCO) von 3,5 kD und Füllvolumen von 0,5 ml, 1 ml bzw. 10 ml. Die gebrauchsfertigen Dialysemembranen waren in 0,1 % Natrium-Azid konserviert. Nach dem Entfernen des Konservierungsstoffes wurde ddH₂O in den Schlauch gefüllt und man setzte die Membran in einen mit 500 ml ddH₂O gefüllten Meßbecher. Nach 30 min. Rühren (Magnetrührer, Yellow^{line} MSH basic) war die Membran gereinigt und gebrauchsfertig. Man entfernte das ddH₂O, die Probe wurde in den Schlauch pipettiert und der "Dialyzer" in einen mit 500 ml des gewünschten Puffer befüllten Messbecher platziert. Prinzipiell dialysierte man alle Proben auf einem Magnetrührer im Kühlraum (6°C) mit vorgekühltem Puffer um das Ausfallen der empfindlichen Proteine zu vermeiden. Die Dialysezeit betrug mind. 3 h um eine Proteinlösung zu entsalzen bzw. umzupuffern. Um denaturierte Proteine zurückzufalten wurde eine Stufendialyse durchgeführt. Dieses Vorgehen sollte ein Ausfallen der Proteine vermeiden. Hierbei dialysierte man erst in 500 ml 6 M Harnstoff-Lysepuffer mit 3 % Triton, pH 7,4 für 3 h, anschließend wurde nach weiteren 3 h und 6 h jeweils 500 ml ddH₂O zugefügt, sodass die Harnstoffkonzentration zunächst 3 M, und schließlich 2 M betrug, bzw. die Tritonkonzentration auf 1.5% bzw. 1% herabgesetzt wurde. Erst dann wurde über Nacht mit einem "nativen" Puffer (pH 7,4) dialysiert.

Dialysepuffer (Zurückfaltung):	50 mM MOPS pH 7,4 1 % Triton
Dialysepuffer (CaM):	20 mM Tris/HCl 300 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,1 % Triton
Dialysepuffer (TEV- Protease):	50 mM Tris, pH 7,4 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,1 % Triton 100

2. 16. Aufreinigung durch Ionenaustausch

Der anionische Zentrifugations-Ionenaustauscher Vivapure-Q Maxi (Vivascience) wurde zur Aufreinigung von Lysatproteinen auf Basis von Ladungsunterschieden eingesetzt. Bevor das Lysat zur Aufreinigung auf die Säule gebracht werden konnte, musste es im Ladepuffer

dialysiert werden. Die Q-Säule wurde mit 5 ml Ladepuffer versetzt und 5 min in der Kühlzentrifuge (4°C, Hermle Z 323 K) bei 2000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml Dialysat beladen, zweimal mit 10 ml Ladepuffer gewaschen, und hierauf nacheinander mit 5 ml von allen Elutionspuffern eluiert (Gradientenelution von 0,2 M bis 1,0 M NaCl). Alle Fraktionen wurden mittels SDS-Page auf das aufzureinigende Protein untersucht.

Zentrifugation zwischen den Arbeitsschritten: 5 min. bei 2000 g und 4°C

Ladepuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,0

Elutionspuffer für Gradientenelution:

- 0,2 M NaCl in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 0,4 M NaCl in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 0,6 M NaCl in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 0,8 M NaCl in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 1,0 M NaCl in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0

2. 17. Proteinkonzentrierung

Um die aufgereinigten Proteine zu konzentrieren wurden Centricon Filterröhrchen (Millipore) eingesetzt. Je nach Proteingröße verwendete man die Röhrchen YM-3, YM-10, bzw. YM-50. Das zu konzentrierende Protein wurde je nach Molekulargewicht in ein Centrikon-Röhrchen gefüllt (YM-3, YM-10, bzw. YM-50) und bei 4°C bei 2500 g bis zur gewünschten Konzentration zentrifugiert. Um ein Ausfallen der Proteine durch Grenzflächenkonzentrierung zu vermeiden, wurde die Zentrifugation alle 10 min. unterbrochen und die Lösung vorsichtig mit der Pipette gemischt.

2. 18. Konzentrationbestimmung nach Bradford

Der von der Firma Roth vertriebene Test Roti-Nanoquant beruhte auf einer modifizierten Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Eine BSA-Eichreihe mit den Konzentrationen 1 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 100 µg/ml wurde hergestellt und im Photometer (Jenway Genova) als Eichreihe gespeichert. Die Arbeitslösung wurde durch Verdünnen mit ddH₂O (1:5) des Nanoquant-Konzentrates hergestellt. Zunächst wurde das Gerät mittels einer Negativkontrolle (100 µl ddH₂O + 400 µl Arbeitslösung) kalibriert und anschließend wurde die Proteinprobe (100 µl Proteinlösung + 400 µl Arbeitslösung) bei 620 nm und 450 nm gemessen. Die Eichreihe stellte einen Messbereich von OD₅₉₀ 0,004-0,296 dar, in dem sich auch die zu messende Proteinlösung befinden musste.

2. 19. Aufreinigung von rekombinantem Calmodulin

Die Bakterienpellets wurden in 5 ml Lysepuffer resuspendiert und die Zellen mit Hilfe eines Ultraschall Homogenisators (Sonics vibra cell; Amplitude 40, Pulser 8 x 8 sec.) auf Eis lysiert. Das Lysat wurde 3 min. auf 90°C erhitzt, rasch auf Eis abgekühlt und 30 min. bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge (Beckmann LE-80K) bei 4°C zentrifugiert. Im Überstand befand sich das lösliche CaM, welches anschließend mit Hilfe von Q-Ionenaustauschersäulen (Vivapure) gereinigt wurde. Das gereinigte Protein wurde gegen den Lysepuffer dialysiert und es wurde eine Calmodulin-Stammlösung von 400 µg/ml in mehreren Aliquots (Lagerung bei -85°C) angelegt.

CaM-Lysepuffer, pH 7,4: 20 mM Tris/HCl
 300 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 0,1 % Triton

2. 20. Aufreinigung rekombinanter TEV-Protease

Der Expressionsvektor pRK793 mit der cDNA-Sequenz für TEV-Protease wurde freundlicherweise von Dr. Waugh, Center of Cancer Research, Frederick (Kapust et al. 2002) zur Verfügung gestellt. Damit transformierte Zellen wurden 4 h bei 30°C mit 0,1 mM IPTG induziert. Bakterienpellets wurden in 5 ml Lysepuffer resuspendiert und die Zellen per Ultraschall Homogenisator auf Eis lysiert.

TEV-Protease Lysepuffer, pH 8,0: 50 mM Tris/HCl
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 0,1 % Triton

Das Lysat wurde 30 min. bei 4°C zentrifugiert (10.000 g) und der Überstand, in dem sich die lösliche TEV-Protease befand, mittels Metallaffinitätschromatographie (Ni-columns von Macherey-Nagel) gereinigt. Die gereinigte Protease wurde gegen den Lysepuffer dialysiert, und eine auf 200 µg/ml eingestellte Stammlösung wurde bei -85°C gelagert.

2. 21. Solubilisierung und Aufreinigung von nicht löslichen DHPR-Konstrukten mittels konzentrierter (8 M) Harnstofflösung

Bei den rekombinant hergestellten Domänen des c-terminalen DHPR handelt es sich um Proteine mit nur geringer Löslichkeit, daher war der überwiegende Teil des in Bakterien mit

den Plasmiden pET19b- und pRSFDuet1 exprimierten Materials in Form sog. "Inclusion Bodies" (IB) abgelegt. Diese mussten mit 8 M Harnstoff zunächst solubilisiert werden. Die Bakterienpellets wurden in 5 ml Tris/HCl (20 mM, pH 8,0) und 4 µl DNase I (1.000 U) resuspendiert und die Zellen mit dem Ultraschall Homogenisator (Sonics vibra cell; Amplitude 40, Pulser 8 x 8 sec.) auf Eis lysiert. Hiernach wurde 3 min. bei 2.500 g (4°C) zentrifugiert. Die IB im Überstand wurden in ein neues Gefäß überführt, das Sediment, in dem sich größere Zellreste befanden, wurde verworfen. Nach wiederholter Zentrifugation für 30 min. bei 4°C (10.000 g), wurde das Sediment, in dem sich nun die IB befanden, zweimal mit 7 ml Tris/HCl (20 mM, pH 8,0) gewaschen und zwischen den Waschschritten wie zuvor zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Solubilisierung mit 5 ml Harnstoff-Lysepuffer. Die Probe wurde 10 min. bei RT inkubiert und nochmals wie zuvor zentrifugiert. Schließlich befand sich das gelöste, denaturierte Gesamtprotein im Überstand.

Harnstoff-Lysepuffer, pH 8,0:	8 M Harnstoff
	10 mM Tris
	100 mM Natrium-Phosphat-Puffer
	300 mM NaCl
	0,1 % Triton

Das Protein wurde dann mittels Metallaffinitätschromatographie (Talon Metal Affinity Resin) aufgereinigt und es wurde ein Protein-Rückfaltungsprotokoll angewandt, welches auf der stufenweisen Reduktion des Denaturats beruht. Nach der Dialyse wurde die Lösung einer Ultrazentrifugation (30 min. bei 100.000 g) unterzogen um ausgefallenes Material zu entfernen. Der Überstand wurde unmittelbar für Experimente verwendet.

2. 22. Lösliche DHPR-Konstrukte als Fusionsprotein mit NusA

Um die rekombinant hergestellten Domänen des C-terminalen DHPR in löslicher Form zu erhalten, wurden sie als Fusionsproteine mit dem "Helfer"- Protein NusA in Bakterien exprimiert (Vektor: pETM60-NusA).

Die Bakterienpellets wurden in 5 ml NusA- Lysepuffer resuspendiert und die Zellen mit dem Ultraschall Homogenisator auf Eis lysiert. Anschließend wurde 30 min. bei 4°C (10.000 g) zentrifugiert. In den Überständen befand sich das lösliche Gesamtprotein. Die Fusionsproteine wurden mit Hilfe von Protino Ni-TED 2000 packed columns (Macherey-Nagel) aufgereinigt und anschließend konzentriert (Centricon Filtrerröhrchen, Millipore). Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, M.M., 1976) bestimmt und

auf 300 µg/ml eingestellt. Die Proben wurden nicht gelagert, da sich eine sofortige experimentelle Verwendung anschloss.

NusA- Lysepuffer, pH 7,4:	20 mM Tris/HCl
	300 mM NaCl
	5 mM MgCl
	0,1 % Triton

Reaktionsansatz für die Spaltung der Fusionsproteine mittels TEV-Protease:

Protein-Konzentrat	75 µl
Triton 100	1,65 µl
DTT (0,1M)	1,65 µl
TEV-Protease	3 µl
NusA-Lysepuffer	68,7 µl

Da die TEV-Protease im Temperaturbereich zwischen 4°C und 35°C aktiv war, konnte die Reaktionstemperatur bei der Spaltung der Fusionsproteine an die Stabilität des zu erhaltenden Proteins angepasst werden. Im Allgemeinen erfolgte die Inkubation bei 6°C über Nacht, der Reaktionserfolg wurde mit SDS-Page überprüft.

2. 23. SDS-PAGE

Gelpuffer, pH 8,6:	18,18 g 400 mg ad 100 ml	Tris/HCl SDS ddH ₂ O
Gelpuffer pH 6,8:	6,06 g 400 mg ad 100 ml	Tris/HCl SDS ddH ₂ O
Marker:	5 µl	Roti [®] -Mark 10-150 PLUS von ROTH
Laufpuffer:	100 ml 900 ml	10x Rotiphorese-SDS-Page von ROTH ddH ₂ O
Probenpuffer		RotiLoad 1 (Roth), 4 x Konzentrat

SDS-Gel 12 %

Trenngel (12 %):		Sammelgel (4,8 %):	
Rotiphorese Gel 40 (ROTH, 37,5:1)	3,0 ml	Rotiphorese Gel 40 (ROTH, 37,5:1)	600 µl
Gelpuffer pH 8,6	3,75 ml	Gelpuffer pH 6,8	1,9 ml
ddH ₂ O	2,75 ml	ddH ₂ O	2,5 ml
Glycerin	500 µl	Orange G (0,3 %)	200 µl
TEMED	10 µl	TEMED	5 µl
APS (10 %)	50 µl	APS (10 %)	35 µl

SDS-Gel 15 %

Trenngel (15 %):		Sammelgel (4,8 %):	
Rotiphorese Gel 40 (ROTH, 37,5:1)	3,75 ml	Rotiphorese Gel 40 (ROTH, 37,5:1)	600 µl
Gelpuffer pH 8,6	3,75 ml	Gelpuffer pH 6,8	1,9 ml
ddH ₂ O	2 ml	ddH ₂ O	2,5 ml
Glycerin	500 µl	Orange G (0,3 %)	200µl
TEMED	7 µl	TEMED	5 µl
APS (10 %)	50 µl	APS (10 %)	35 µl

Die verwendeten Gele (8,3 x 10 cm) bestanden aus Sammel- und Trenngel (Kammer: Mini Gel; Biometra). Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden entweder 10 %ige oder 15%ige Polyacrylamidgele verwendet. Das Trenngel wurde mit 2 cm Sammelgel überschichtet, in das nach dem Gießen ein 12-zahniger Kamm eingefügt wurde. 30 min. nach dem Gießen war das Gel gebrauchsfertig. Bei der Probenvorbereitung wurden 30 µl Probe mit 10 µl RotiLoad 1 (Roth) versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel 3 min. auf 85°C erhitzt. Der Lauf erfolgte ca. 1 h lang bei 25 mA (Netzgerät: Apelex PS 1006), es schloss sich dann eine Coomassie-Färbung an.

2. 24. Native PAGE

Gelpuffer pH 8,6:	18,18 g ad 100 ml	Tris/HCl ddH ₂ O
Laufpuffer pH 8,6:	20 mM 125 mM 0,1 % ad 1000 ml	Tris/HCl pH 8,6 Glycin Triton ddH ₂ O
Probenpuffer	4,5 ml 310 mg 1 Spatelspitze ad 10 ml	Glycerin Tris/HCl pH 7 Bromphenolblau ddH ₂ O

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese sollte Bedingungen gewährleisten, unter denen das Protein seine natürliche Konformation behält. Dies war für die CaM-Bindungsstudien von großer Bedeutung. Bei pH-Werten von 8 bis 9 (im üblicherweise verwendeten Laufpuffer) besitzen die meisten Proteine (z.B. CaM) eine negative Nettoladung und bewegen sich zur Anode hin, während einige Proteine (z.B. die hier verwendeten CT-Konstrukte) unter diesen Bedingungen in den Kathodenpuffer migrieren und nicht in die Gelmatrix eintreten.

50 µl der nativen Protein-Probe wurden mit 10 µl Probenpuffer vermischt und sofort auf das Gel aufgetragen. Auch hier betrug die Laufzeit 1 h (25 mA). Um Erwärmungseffekte auszuschließen erfolgte die Elektrophorese im Kühlraum. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel ebenso einer Coomassie-Färbung unterzogen.

2. 25. Ca²⁺-abhängige Interaktion von Calmodulin mit dem DHPR

2. 25. 1. DHPR-Konstrukte nach Rückfaltung durch Dialyse

Wegen der Instabilität der zurückgefalteten Fragmente wurden die Reaktionsansätze auf Eis pipettiert und über Nacht im Kühlraum inkubiert. Um eine Interaktion mit CaM zu überprüfen, wurden die DHPR-Fragmente mit IMAC (Protino Ni-TED 2000 von Macherey-Nagel) aus den Reaktionsansätzen entfernt, und nach der Elution mittels SDS-Page untersucht. Bei einer stabilen Interaktion würde man erwarten, auch CaM in den Eluaten vorzufinden, obwohl es nicht 6 x His-markiert war.

Reaktionsansatz für Interaktionsstudie:

Dialysiertes DHPR-Fragment	480 µl
CaM Stammlsg.	480 µl
50 mM CaCl ₂ (2 mM im Ansatz)	40 µl

Puffer für IMAC:

Bindepuffer / Waschpuffer:	50 mM MOPS, pH 7,4 1 % Triton 2 mM CaCl ₂
Elutionspuffer:	50 mM MOPS, pH 7,4 250 mM Imidazol 2 mM CaCl ₂

2. 25. 2. DHPR-Konstrukte und CaM, koexprimiert mit pRSFDuet1

Verschiedene DHPR-Konstrukte wurden zusammen mit CaM in den Vektor pRSFDuet1 inkloniert und in Bakterien koexprimiert. Nach der Lyse wurden die Proteine einer SDS-PAGE unterzogen um sie auf Löslichkeit zu untersuchen. Hierbei wurde davon ausgegangen,

dass eine stabile Interaktion die Anwesenheit eines löslichen CaM-Komplexes im Überstand bedingen sollte.

2. 25. 3. NusA-Fusionsproteine

Zunächst mussten die an NusA gebundenen DHPR-Bereiche durch die TEV-Protease abgespalten werden. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und Ca^{2+} wurde in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Bei einigen Experimenten wurde EDTA anstelle von Ca^{2+} zugefügt. Die Ansätze wurden über Nacht bei + 6°C inkubiert und anschließend mit nativer PAGE untersucht. Da es sich um die Untersuchung Ca^{2+} -abhängiger Interaktionen handelte, musste die im Reaktionsansatz befindliche Ca^{2+} -Konzentration (bzw. EDTA-Konzentration) derjenigen im nativen Polyacrylamidgel als auch der im Laufpuffer der Elektrophorese entsprechen. In jedem Fall wurde die Anwesenheit der Reaktionspartner mittels SDS-PAGE kontrolliert.

Reaktionsansätze:

<u>2 mM EDTA:</u>		<u>0 mM Ca^{2+}</u>	
Protein-Konzentrat	75 µl	Protein-Konzentrat	75 µl
CaM	50 µl	CaM	50 µl
Triton	1,65 µl	Triton	1,65 µl
DTT (0,1 M)	1,65 µl	DTT (0,1 M)	1,65 µl
TEV-Protease	3 µl	TEV-Protease	3 µl
EDTA (25 mM)	3 µl	Puffer (Lysepuffer NusA)	18,7 µl
Puffer (Lysepuffer NusA)	15,7 µl		

<u>2 mM Ca^{2+}:</u>		<u>3 mM Ca^{2+}</u>	
Protein-Konzentrat	75 µl	Protein-Konzentrat	75 µl
CaM	50 µl	CaM	50 µl
Triton	1,65 µl	Triton	1,65 µl
DTT (0,1 M)	1,65 µl	DTT (0,1 M)	1,65 µl
TEV-Protease	3 µl	TEV-Protease	3 µl
CaCl_2 (50 mM)	6 µl	CaCl_2 (50 mM)	9 µl
Puffer (Lysepuffer NusA)	12,7 µl	Puffer (Lysepuffer NusA)	9,7 µl

2. 26. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde eingesetzt um Proteine aus Gelbanden zu identifizieren und um Interaktionen zu bestätigen. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. A. Pich, Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover durchgeführt (Einzelheiten zur Technik: von Neuhoff und Pich, 2005).

In Kürze: Mit Coomassie gefärbte Gelbanden der zu untersuchenden Proteine aus SDS-Page und nativer PAGE wurden ausgeschnitten, solubilisiert und mit Trypsin behandelt. Die Peptide wurden in eine Matrix aus Zimtsäure eingebettet und mittels Laserimpulsen ionisiert, sodass sie in die Gasphase übergangen (MALDI = matrix assisted laser desorption ionisation). Die eingesetzte MALDI-Variante verwendet zwei hintereinander geschaltete Flugzeitmassenspektrometer (TOF-TOF = time of flight). Die ionisierten Proteine werden im Hochvakuum über eine Strecke von 1-3 m beschleunigt. Anhand der Ladungs-Massenabhängigkeit der Flugzeit kann die exakte Masse der Peptide ermittelt werden. Nach der Messung erhielt man einen hochspezifischen Peptidmassen-Fingerabdruck (PMF) für die enzymatisch erzeugten Peptide eines Proteins. Daher ist eine eindeutige Zuordnung des Peptidmusters zu einem Protein möglich, aber auch mehrere Konstituenten einer Gelbande (z.B. CaM & CT) können so identifiziert werden.

2. 27. Zellkultur

Es wurden Primärkulturen aus Skelettmuskeln (Extremitäten-, Schultermuskulatur) von neugeborenen Mäusen präpariert, welche keine α_1 -Subunit des DHPR exprimieren ("dysgenic"-Mäuse, Knudson et al. 1989). Die Muskeln wurden in eine Petrischale mit eiskalter CMF Ringer Lösung überführt und auf Eis unter einer Stereolupe in maximal 1mm große Stücke geschnitten. Dabei wurden auch Sehnen und Fettgewebe weitgehend entfernt. Die Muskelstücke wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Falcon) überführt. Nach Absetzen des Gewebes wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Gewebestücke wurden zweimal mit eiskalter CMF Ringer Lösung gewaschen, mit 10 ml vorgewärmter Collagenase/Dispase-Lösung versetzt und 10 min. bei 37°C im Schüttelinkubator bei 140 Upm verdaut. Um den Verdau zu stoppen wurde auf 50 ml mit kaltem DMEM / 2 % BSA + Pen/Strep aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation (10 min. bei 100 g) wurde der Überstand durch ein 40 μ m-Gaze in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 600 g für 10 min. zentrifugiert. Das Sediment wurde in DMEM / 20 % FCS resuspendiert, die Zellzahl wurde bestimmt und mit Medium auf $2,5 \times 10^5$ bis $3,75 \times 10^5$ eingestellt. Es wurden 2 ml pro Glasbodenschälchen (35 mm, MatTek) ausgesät und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Brutschrank HeraCell 150, Heraeus).

Anzuchtsmedium:	DMEM 20 % FCS	nach Präparation
Wachstumsmedium:	DMEM 10 % HS	2 Tage nach Aussaat
Differenzierungsmedium:	DIF 2 % HS	4 Tage nach Aussaat
CMF-Ringer-Lösung pH 7,4:	155,5 mM NaCl 5 mM KCl 11 mM Glucose 10 mM HEPES	
Collagenase-Dispase-Lösung:	5 mg Collagenase Typ 2 in 5 ml PBS Dispase II	

Ein Wechsel von Wachstum auf Differenzierungsmedium bewirkte ein Verschmelzen der Myoblasten zu vielkernigen Myotuben.

2. 28. cDNA Microinjektion

Die verwendete DNA wurde mit ddH₂O auf eine Konzentration von 20 ng/μl eingestellt und mit Zentrifugations-Filtrations-Röhrchen (0,45 μm Spin X, Corning) gereinigt. Glaskapillaren (Kwik-Fil) für die Mikroinjektion wurden am Puller (Flaming/Brown Micropipette Puller, Modell P-97) bei 690°C gezogen und mit 2 μl Plasmid-DNA gefüllt, bevor sie in den Mikromanipulator (PV 830, Pneumatic Pico Pump) am Mikroskop (CK, Olympus) eingespannt wurden. Plasmid-DNA wurde in einzelne Zellkerne injiziert und die Myotuben wurden anschließend 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Injizierte Plasmide:	pEYPet-CaM	20 ng/μl
	pECyPet-CT1-α _{1S}	20 ng/μl
	pECyPet-CT1-α _{1C}	20 ng/μl
	pEYPet-CaM + pECyPet-CT1-α _{1S} (1:1)	je 20 ng/μl
	pEYPet-CaM + pECyPet-CT1-α _{1C} (1:1)	je 20 ng/μl

2. 29. FRET (Fluorescence resonance energy transfer)

FRET ist ein physikalischer Prozess, bei dem die Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen werden kann. Die Nutzung hat sich

als "optisches Nanometermaß" etabliert, da die Intensität des FRET vom Abstand der beiden Fluorophore abhängt und sich deshalb zu Interaktionsstudien eignet.

Intakte fluoreszente Myotuben wurden mithilfe eines Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (FV 1000 von Olympus) untersucht. CyPet und YPet wurden durch 458 nm bzw. 514 nm Argon Laser angeregt, welcher auf die Zelle über einen 458/514 nm dualen dichroischen Spiegel gerichtet war. Die Emissionen von CyPet und YPet wurden photometrisch untersucht, indem man die Filter BA480-495 bzw. BA535-565 verwendete.

Zum Nachweis von FRET wurde YPet gebleicht, indem man wiederholte Scans (20-60) mit 514 nm bei maximaler Laserintensität durchführte. Die FRET-Effizienz wurde in % angegeben und folgendermaßen errechnet:

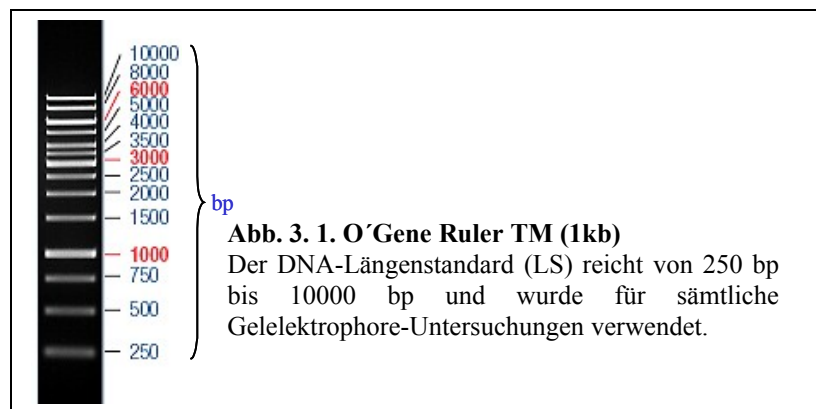
$$E = \frac{I_{\text{CyPet nach Bleichen}} - I_{\text{CyPet vor Bleichen}}}{I_{\text{CyPet nach Bleichen}}} \times 100 \%$$

Hierbei ist I die Fluoreszenzintensität, gemessen für CyPet vor bzw. nach Bleichung des Akzeptors Ypet.

3. ERGEBNISSE

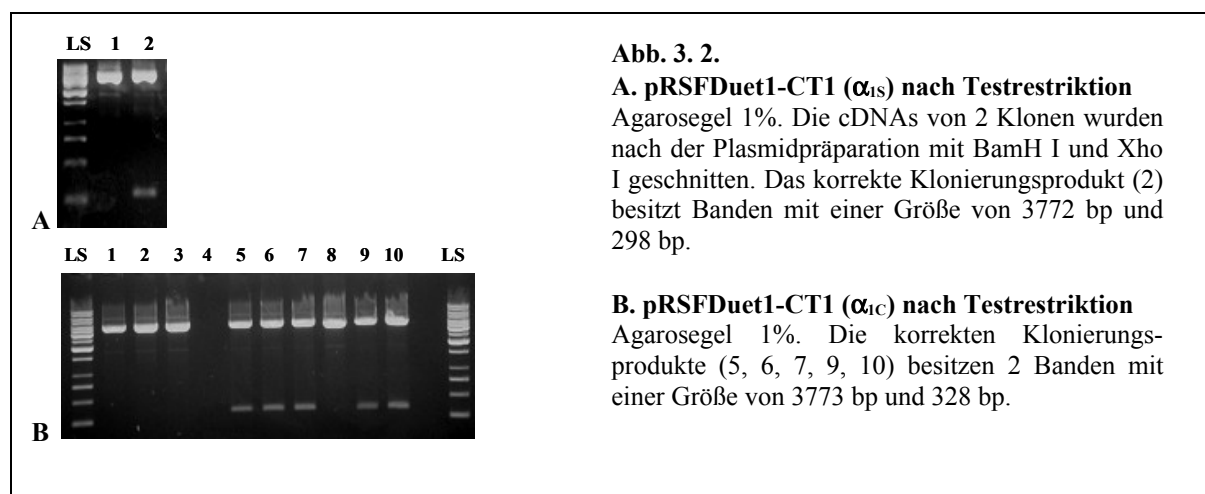
3. 1. Klonieren von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Plasmid-Vektoren

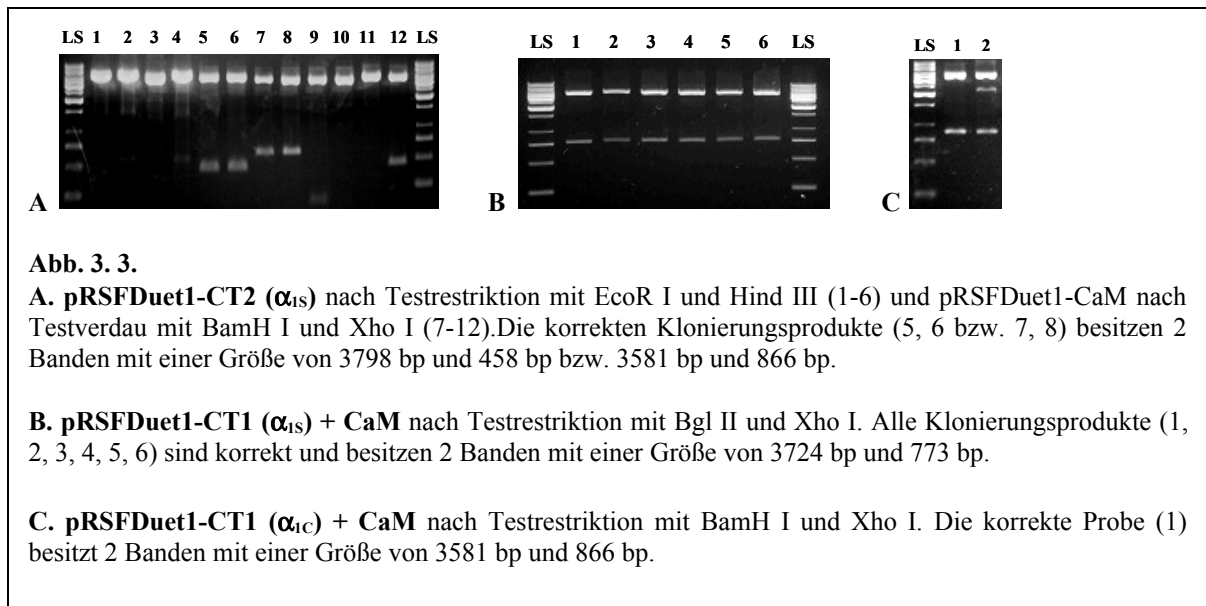
Wie in Kapitel 2. 11. beschrieben, wurden Vektoren mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geöffnet, damit die Insert-cDNAs durch Ligation eingefügt werden konnten. Nach Transformation in den *E. coli* Stamm DH5 α und Plasmidpräparation wurden die Konstrukte einer analytischen Spaltung unterzogen und auf ihre Richtigkeit hin mit Hilfe von horizontaler Gelelektrophorese untersucht. Als DNA-Längenstandard diente der Marker O'Gene Ruler™, (1kb, Fermentas), welcher im Folgenden immer als LS bezeichnet wurde (Abb. 3. 1.).



3. 2. Klonierung in den Expressionsvektor pRSFDuet-1

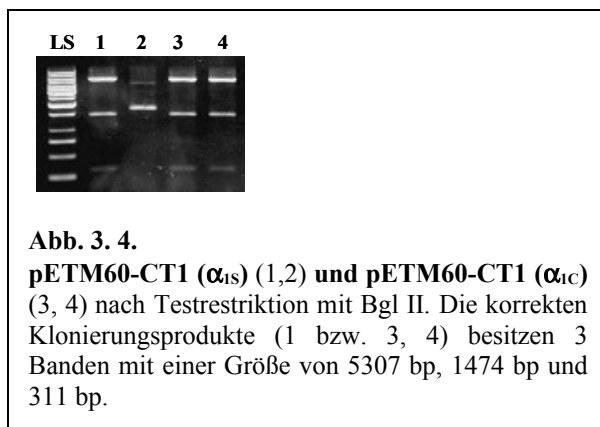
Da der Vektor pRSFDuet-1 zwei unabhängige MCS besitzt, war es möglich, für eine Koexpression von zwei Zielproteinen, zwei Konstrukte in den Vektor zu klonieren. Nach Plasmidpräparation wurden die Produkte einer analytischen Spaltung unterzogen, und anschließend ebenfalls mit Hilfe von Gelelektrophorese untersucht (Abb. 3. 2. und Abb. 3.3.).





3. 3. Klonierung in den Expressionsvektor pETM60-NusA

Die Konstrukte wurden mit Hilfe von Nco I (5') und Sal I (3') in den Vektor eingefügt, wobei die Bildung von Fusionsproteinen bei diesem Vektor ausgenutzt wurde. Die Konstrukte wurden an das sehr stabile und lösliche NusA gebunden, was bei der Herstellung von rekombinantem Protein eine Aggregation der Konstrukte in IB verhinderte und somit eine native Aufreinigung ermöglichte. Die Produkte wurden nach den Klonierungs-Arbeiten einer Testrestriktion unterzogen und dann durch Gelelektrophorese auf ihre Richtigkeit hin überprüft (Abb. 3. 4.).



Das PCR-Produkt CT2 (α_{1S}) besaß eine interne Nco I Schnittstelle, was eine von uns geplante Restriktion mit Nco I nicht möglich machte. Deshalb wurde das PCR-Produkt zuerst mit Bgl II geschnitten, was ein 132 bp und ein 323 bp Konstrukt hervorbrachte. Das 132 bp Fragment wurde mit Nco I geschnitten und hierauf die beiden Konstrukte wieder ligiert. Anschließend

wurde das Ligationsprodukt mit Sal I geschnitten und das fertige Insert-Fragment schließlich in den Vektor eingefügt (Abb. 3. 5.).

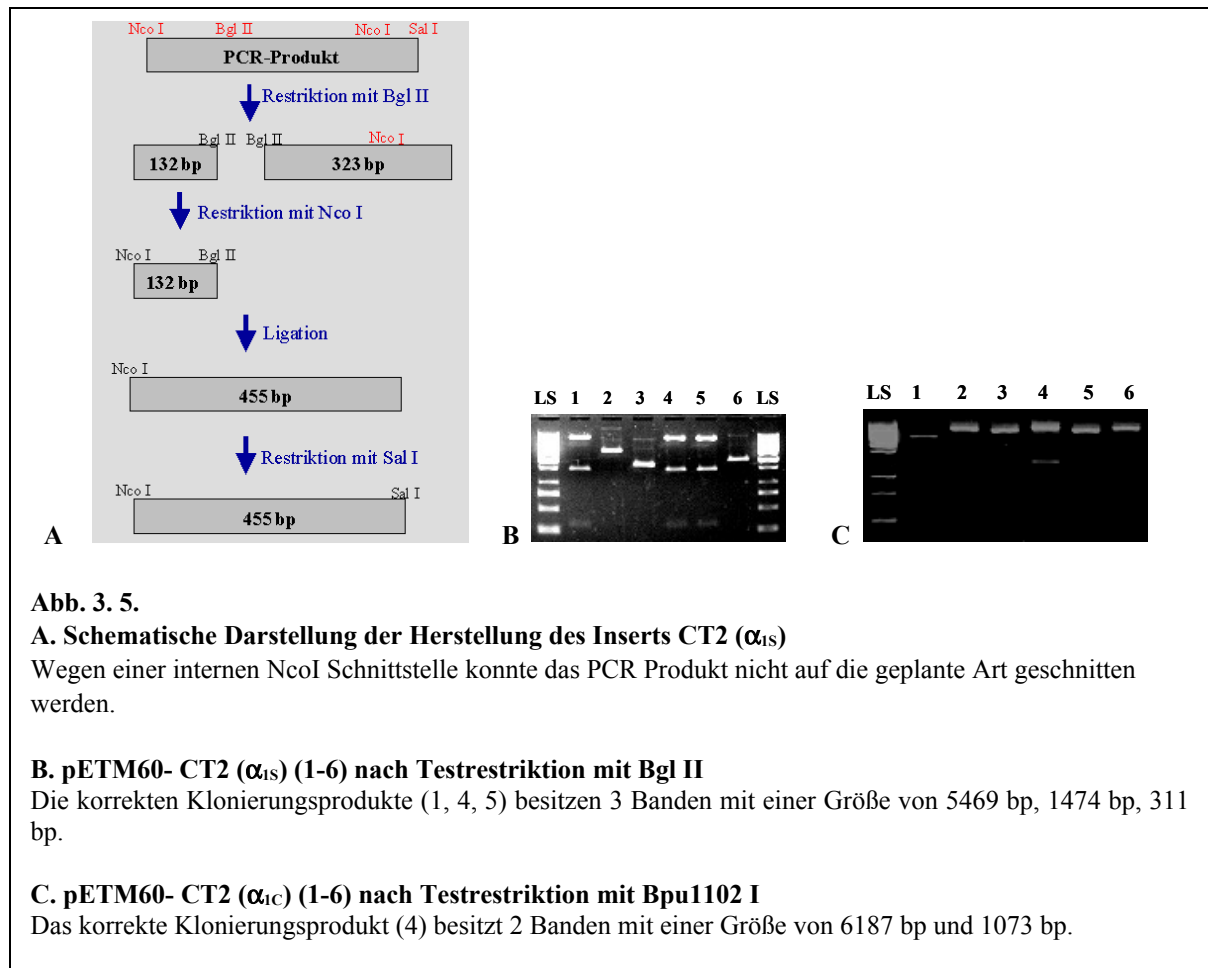


Abb. 3. 5.

A. Schematische Darstellung der Herstellung des Inserts CT2 (α_{IS})

Wegen einer internen Nco I Schnittstelle konnte das PCR Produkt nicht auf die geplante Art geschnitten werden.

B. pETM60- CT2 (α_{IS}) (1-6) nach Testrestriktion mit Bgl II

Die korrekten Klonierungsprodukte (1, 4, 5) besitzen 3 Banden mit einer Größe von 5469 bp, 1474 bp, 311 bp.

C. pETM60- CT2 (α_{IC}) (1-6) nach Testrestriktion mit Bpu1102 I

Das korrekte Klonierungsprodukt (4) besitzt 2 Banden mit einer Größe von 6187 bp und 1073 bp.

Aufgrund einer internen Nco I Schnittstelle im PCR-Produkt CT3 (α_{IS}) mußte hier die gleiche Prozedur angewandt werden, wie es für das PCR-Produkt CT2 (α_{IS}) beschrieben wurde (Abb 3. 5.). Nach Restriktion mit Bgl II erhielt man zwei Konstrukte mit einer Größe von 348 bp und 593 bp. Das Insert-Fragment mit einer Größe von 941 bp wurde dann in den Vektor eingefügt (Abb. 3. 6.).

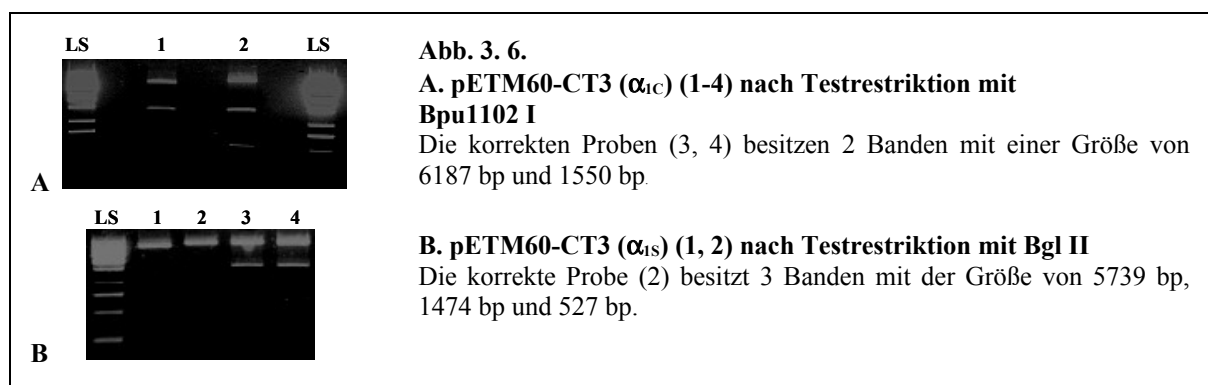


Abb. 3. 6.

A. pETM60-CT3 (α_{IC}) (1-4) nach Testrestriktion mit Bpu1102 I

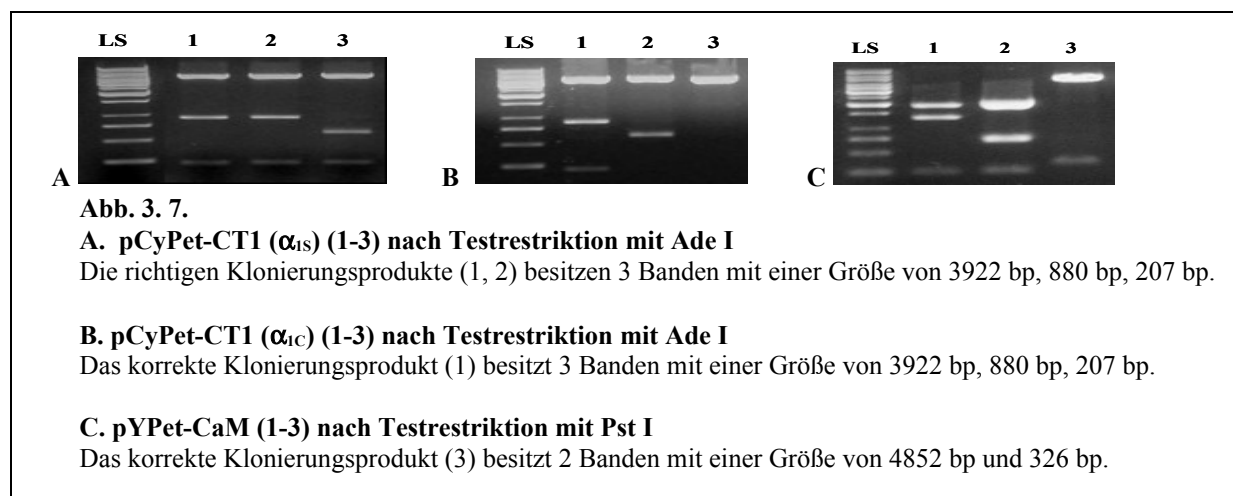
Die korrekten Proben (3, 4) besitzen 2 Banden mit einer Größe von 6187 bp und 1550 bp.

B. pETM60-CT3 (α_{IS}) (1, 2) nach Testrestriktion mit Bgl II

Die korrekte Probe (2) besitzt 3 Banden mit der Größe von 5739 bp, 1474 bp und 527 bp.

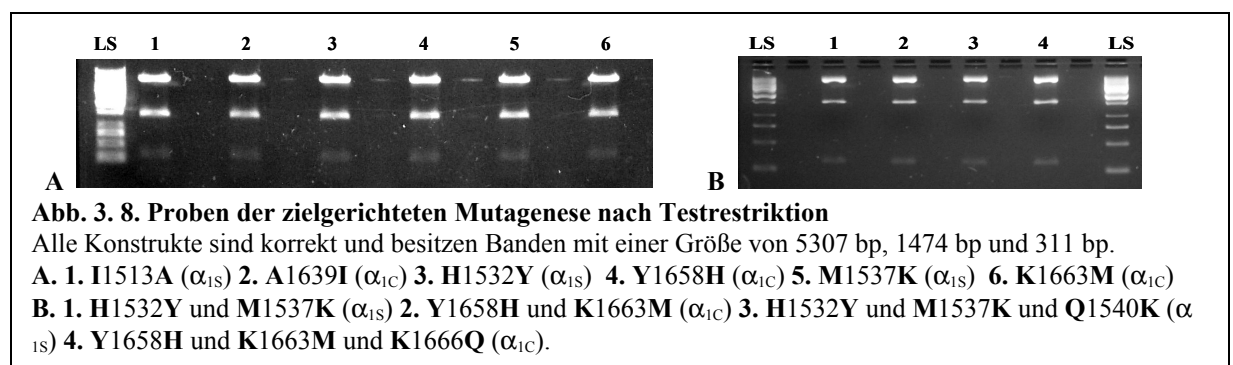
3. 4. Klonierung in den Vektor pCyPet und pYPet

Um die Korrektheit der Konstrukte zu überprüfen wurden die Proben nach der Testrestriktion auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und durch Gelelektrophorese untersucht (Abb. 3. 7.). Der Vektor pYPet-C1 wurde für die Herstellung von pYPet-CaM nur mit einem Restriktionsenzym (Xho I) geöffnet. Da sich an beiden Enden des Insert-Produktes die gleichen Schnittstellen befanden, konnte sich das Insert-Produkt nicht nur richtig orientiert (5'=>3') in den Vektor einfügen, sondern auch falsch orientiert (3'=>5') ligiert werden. Dies hätte drastische Folgen für die Translation, da CaM nicht produziert würde. Aus diesem Grund mussten für die Testrestriktion Enzyme ausgewählt werden, bei welchen die korrekte Orientierung von CaM gewährleistet werden konnte.



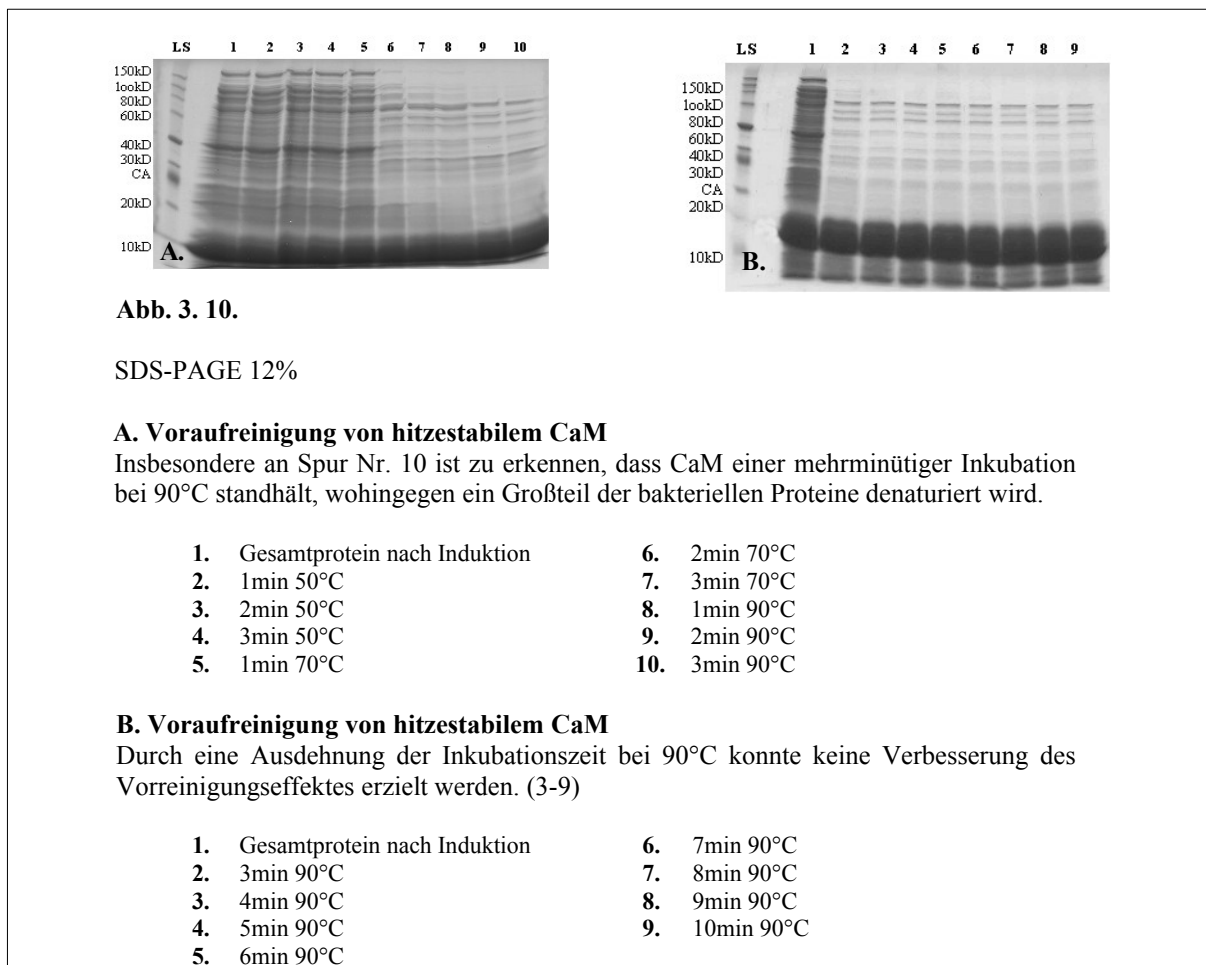
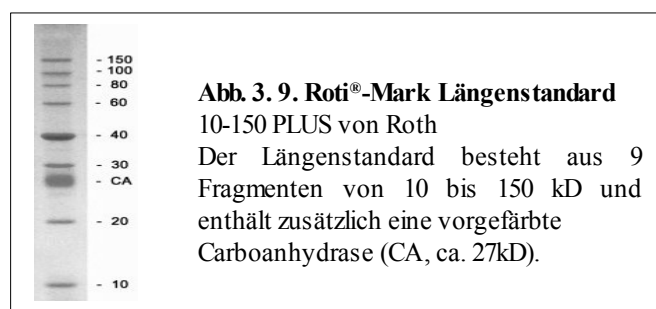
3. 5. Mutagenese

Für die Transformation der DNA-Produkte, welche die von uns geplanten Mutationen enthielten wurden die selbst hergestellten kompetenten Bakterien *E. coli* DH5 α verwendet. Nach der Plasmidpräparation wurde eine Testrestriktion durchgeführt um die korrekten Schnittstellen zu überprüfen (Abb. 3. 8.). Um zu kontrollieren, ob die Inserts die gewünschten Mutationen enthielten, wurden die cDNAs von der Firma MWG sequenziert.

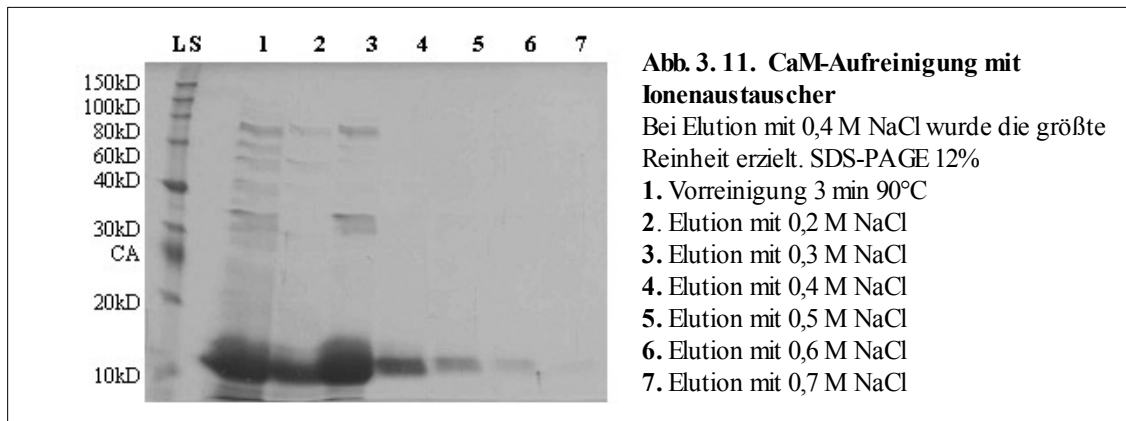


3.6. Aufreinigung von rekombinantem Calmodulin für den Einsatz in CaM Bindungsstudien

Da eine Affinitätsmarkierung von CaM wie z.B. ein 6xHis-Tag bei Interaktionen stören könnte, wurde bei den Klonierungen die reine CaM-Sequenz verwendet. Bei der Aufreinigung von CaM wurde von der ungewöhnlich hohen Stabilität dieses Proteins gegenüber Hitze Gebrauch gemacht. So war es nach IPTG-Induktion der CaM-Proteinsynthese möglich, durch Erhitzen des bakteriellen Gesamtlysats CaM anzureichern (Abb. 3.10.A.). Der Längenstandard, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Abb. 3. 9. dargestellt und besitzt eine Reichweite von 10 bis 150 kD.

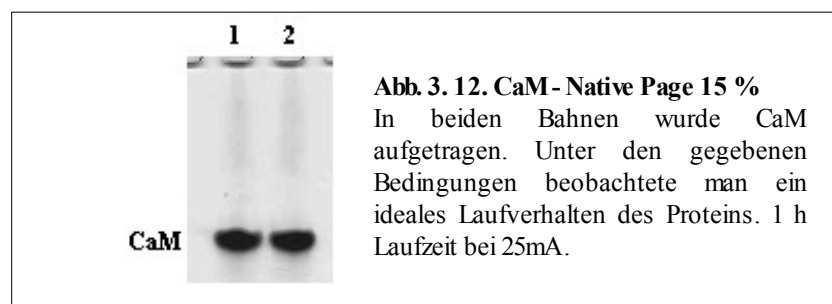


Ein deutlicher Vorreinigungseffekt für CaM wurde also durch eine dreiminütige Inkubation des Lysates bei 90°C erzielt, dieser ließ sich durch längere Inkubationszeiten nicht verbessern (Abb.3.10.B.). Nach einer Ultrazentrifugation erfolgte die Aufreinigung mit einer Ionenaustauscher-Säule. Durch Elution mit 0,4 M NaCl erhielt man sehr reines CaM (Abb. 3. 11.), welches nach Dialyse auf eine Konzentration von 400 µg/ml eingestellt und aliquotiert bei -80°C gelagert wurde.



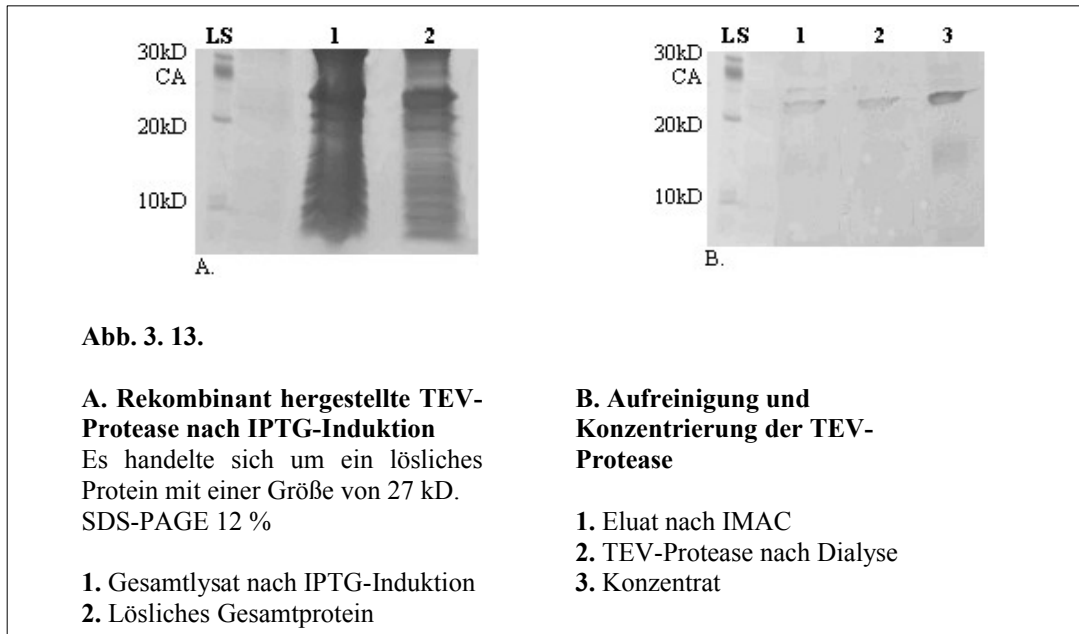
3. 6. 1. Native PAGE mit CaM

Die Wahl des Puffersystems ist bei der nativen PAGE von entscheidender Bedeutung für die Darstellungsfähigkeit des zu analysierenden Proteins. Da es sich bei CaM um ein schwach saures Protein handelt (isoelektrischer Punkt = 4,2), wurden Puffer mit einem pH von 8,6 verwendet. Unter diesen Laufbedingungen gelang der stabile Nachweis sowohl von calciumbeladenen als auch von freiem (Apo-) CaM (Abb. 3. 12.).



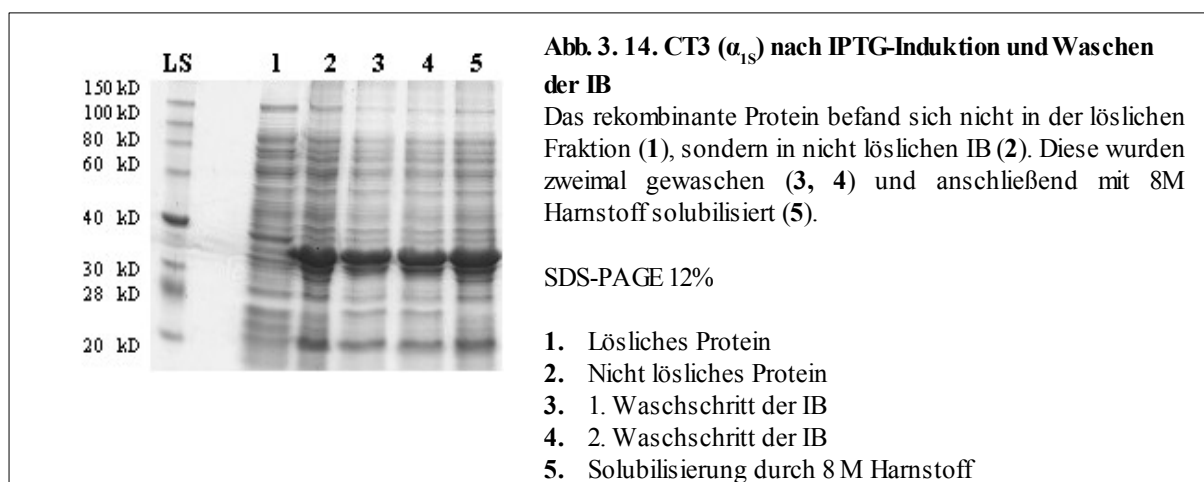
3. 7. Aufreinigung rekombinanter TEV-Protease

Nach IPTG-Induktion wurde die lösliche TEV-Protease mit IMAC gereinigt, dialysiert und konzentriert (Abb. 3. 13.)

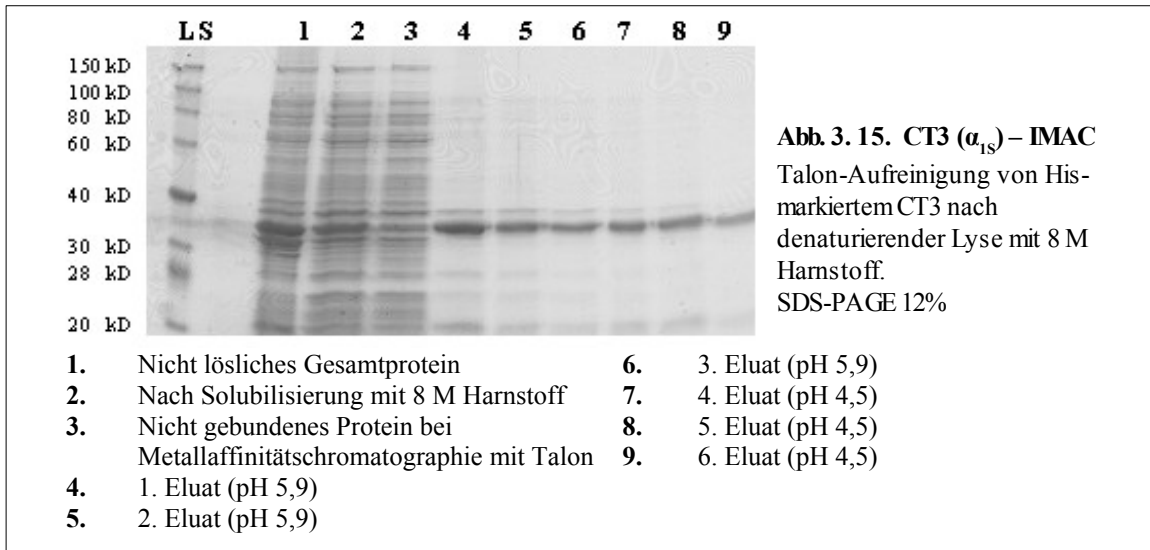


3. 8. Herstellung, Solubilisierung und Aufreinigung von nicht löslichem CT3 aus pET19b

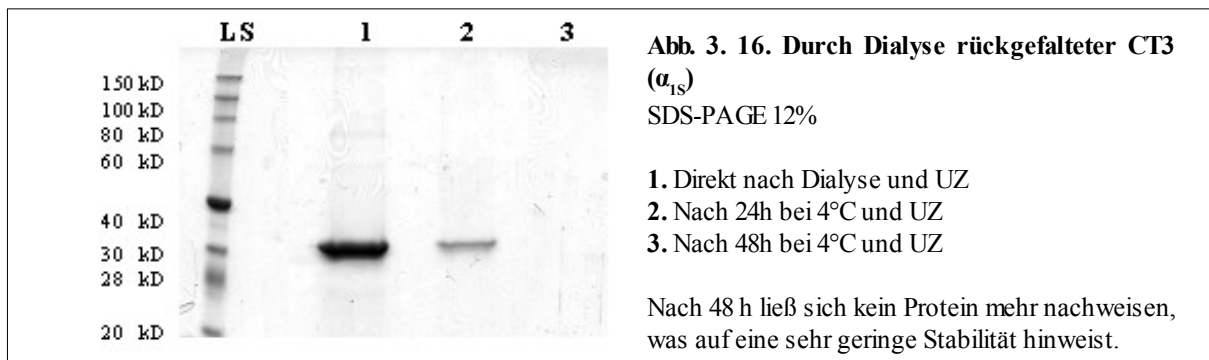
Das rekombinant hergestellte Protein CT3 (α_{1S}) aus pET19b (Papadopoulos, unveröffentlicht) befand sich nach der IPTG-Induktion nicht in der löslichen Fraktion des Lysats, sondern war in IB als nicht lösliches Protein eingeschlossen. Die IB wurden mit drei Waschschrritten gereinigt und eine Solubilisierung des Proteins erfolgte mit 8 M Harnstoff (Abb. 3. 14.)



Anschließend erfolgte die Aufreinigung des 6x-His-markierten CT3 (α_{1S}) durch IMAC, bei der die Elution des Proteins durch pH-Änderung erfolgte (Abb. 3. 15.).

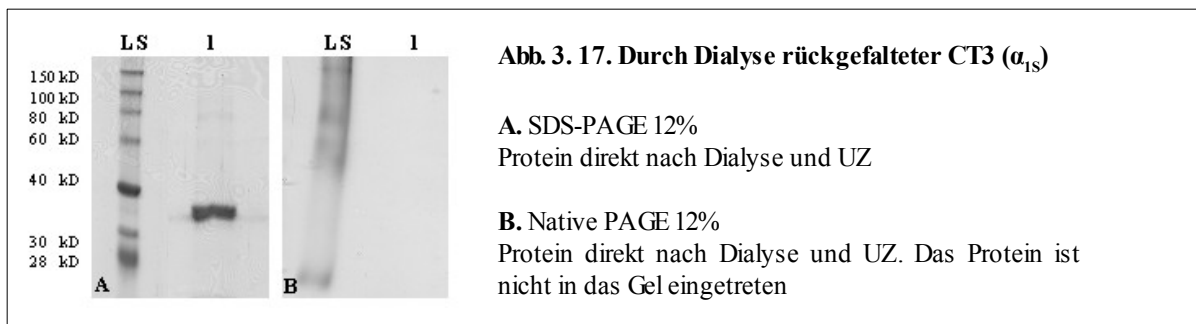


Anschließend wurde versucht, das aufgereinigte Protein durch Elimination des Harnstoffs mittels Dialyse in seinen nativen Zustand zu überführen. Durch Ultrazentrifugation wurden Rückstände und ausgefallene Aggregate entfernt. Das Produkt wurde sofort für Experimente verwendet, da es selbst bei 4°C eine geringe Stabilität aufwies. Nach 24 h war ein Großteil des CT3-Proteins ausgefallen und nach 48 h ließ sich kein Protein mehr nachweisen (Abb. 3. 16.).



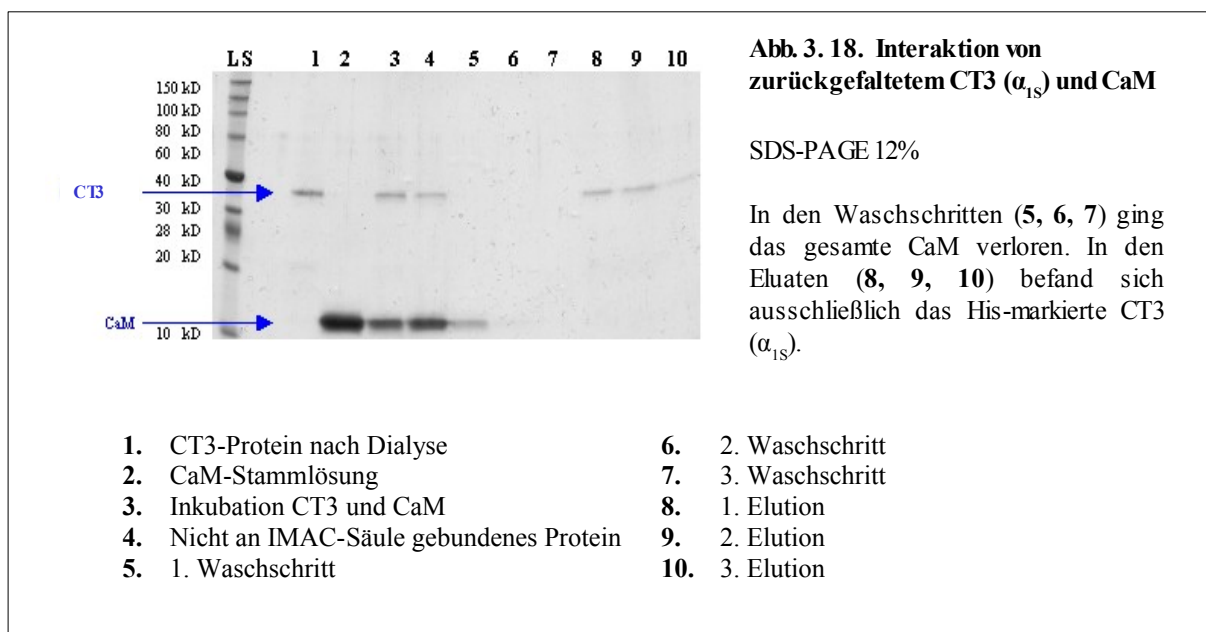
3. 8. 1. Native PAGE mit CT3 (α_{1s})

Es gelang nicht, aus IB rückgefaltetes CT3-Protein mittels nativer PAGE darzustellen (Abb. 3. 17.), vermutlich fiel so hergestelltes CT3-Protein in der Geltasche aus.



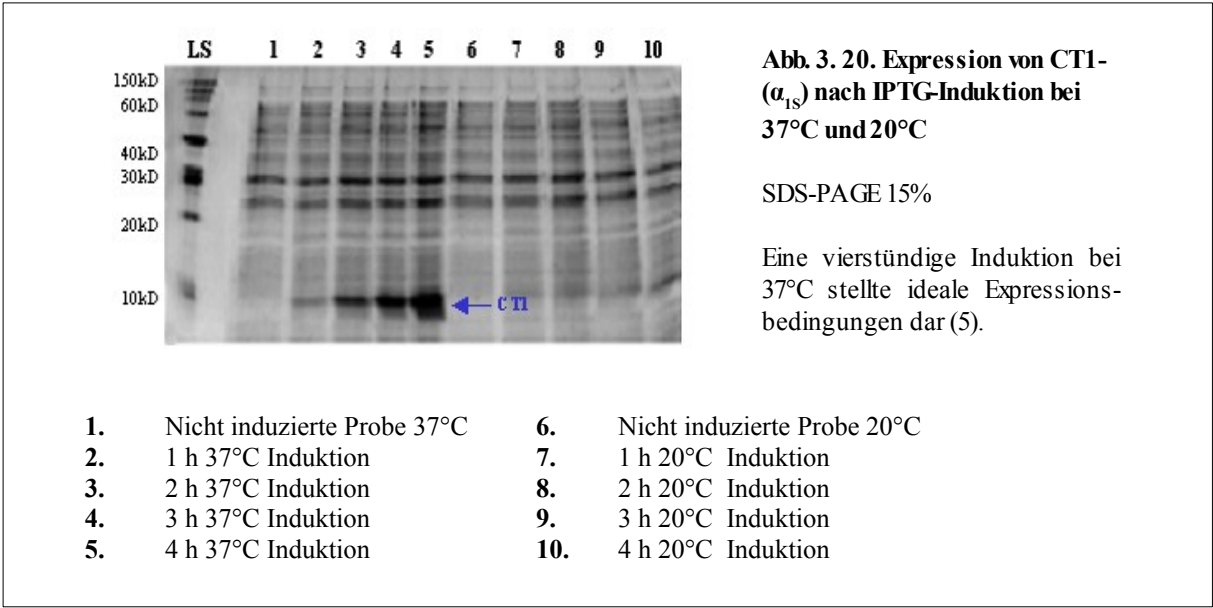
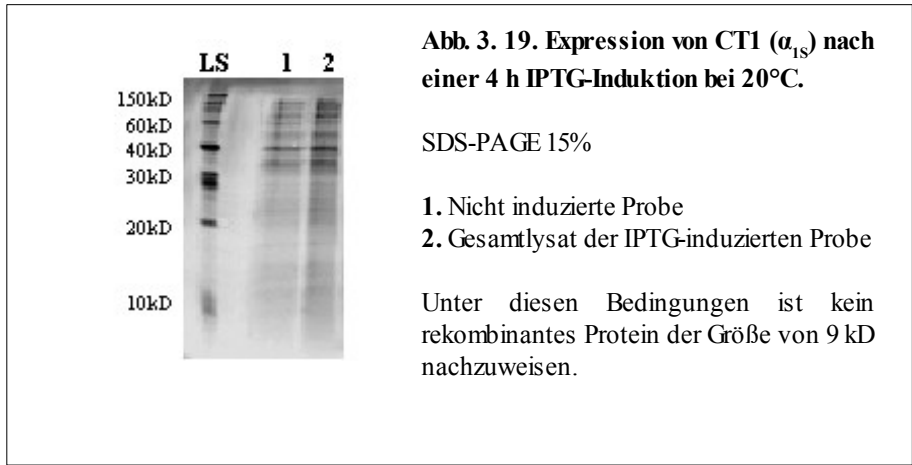
3. 8. 2. Ca²⁺-abhängige Interaktion von rückgefaltetem CT3 (α_{1S}) mit CaM?

Könnte eine Interaktion mit CaM das instabile CT3-Protein stabilisieren? Um diese Frage zu beantworten wurde rückgefalteter CT3 (α_{1S}) mit calciumbeladenen CaM (2 mM Ca²⁺) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit IMAC (Protino Ni-TED 2000 von Macherey-Nagel) aufgereinigt. Der 6x-His-markierte CT3 (α_{1S}) wurde zunächst an der Matrix adsorbiert und nach den Waschschrritten durch Imidazol eluiert. Anschließend wurden alle Fraktionen durch SDS-PAGE untersucht. Im Eluat befand sich ausschließlich CT3-Protein, CaM konnte hier nicht nachgewiesen werden. Die fehlende Retention von CaM spricht gegen eine nennenswerte CaM-Affinität des so hergestellten CT3 (α_{1S}) (Abb. 3. 18.).



3. 9. 1. Herstellung kürzerer DHPR-Fragmente mit dem Vektor pRSFDuet1

In Anbetracht der Ergebnisse oben dargestellter Versuche wurde versucht, kürzere Fragmente des C-Terminus (CT1 und CT2) als lösliche Proteine herzustellen. Bei einer Induktionstemperatur von 20°C (4 h) wurde das rekombinante Protein nicht exprimiert (Abb. 3. 19.). Um Proteine mittels des eingesetzten Vektors pRSFDuet1 zu exprimieren, musste 4 h lang bei 37°C induziert werden (Abb. 3. 20.)



Auch CT1 und CT2 befanden sich nach ihrer Synthese in Bakterien nicht im löslichen Anteil des Lysates, sondern genauso wie CT3 in der nicht löslichen Fraktion (Abb. 3. 21.)



Abb. 3. 21. Rekombinant hergestelltes Protein CT1 (α_{1S}) (A) und CT1 (α_{1C}) (B)

SDS-PAGE 15%

Auch diese kürzeren DHPR-Fragmente waren nicht in löslicher Form zu exprimieren, sie befanden sich jeweils in der nicht löslichen Fraktion (**A3**, **B3**).

- | | |
|---|---|
| <p>A.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nicht induzierte Probe 2. Gesamtlysate nach IPTG-Induktion 3. Nicht lösliche Fraktion 4. Lösliches Protein | <p>B.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nicht induzierte Probe 2. Gesamtlysate nach IPTG-Induktion 3. Nicht lösliche Fraktion 4. lösliches Protein |
|---|---|

3. 9. 2. Interaktion von DHPR-Fragmenten, exprimiert mittels pRSFDuet, mit CaM

Für diese Experimente wurden die Fragmente CT1 (α_{1S}), CT2 (α_{1S}) sowie CT1 (α_{1C}) jeweils zusammen mit CaM und mittels pRSFDuet1 koexprimiert. Ziel der Koexpression war es, CaM schon während der Proteinsynthese der CT mit diesen interagieren zu lassen um sie zu stabilisieren und somit vor dem Ausfallen zu bewahren. CT1 (α_{1S}) sowie CT2 (α_{1S}) interagierten nicht mit CaM (Abb. 3. 22.). Auch unter veränderten Expressionsbedingungen fand keine Bindung statt, die Fragmente waren weiterhin in der unlöslichen Fraktion zu finden (Abb. 3. 23.)

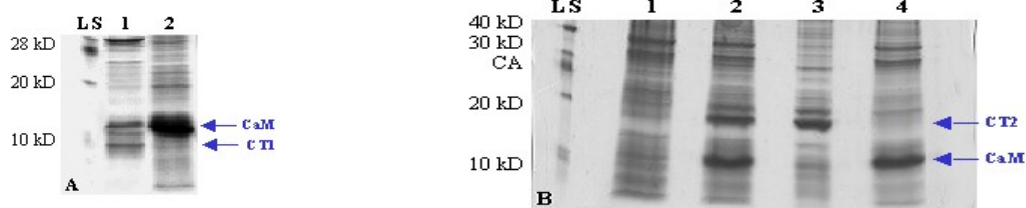


Abb. 3. 22. SDS-PAGE 15%

A. CT1 (α_{1S}) und CaM nach IPTG-Induktion und Lyse

CaM befand sich im Überstand, während CT1 (α_{1S}) als unlösliches Pellet ausgefallen war.

1. Nicht lösliche Fraktion
2. lösliches Gesamtprotein

B. CT2 (α_{1S}) und CaM nach IPTG-Induktion und Lyse

Das C-terminale Fragment befand sich in der nichtlöslichen Fraktion.

- | | |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Nicht induzierte Probe 2. Gesamtlysate nach IPTG-Induktion | <ol style="list-style-type: none"> 3. Nicht lösliche Fraktion 4. Lösliches Gesamtprotein |
|--|--|

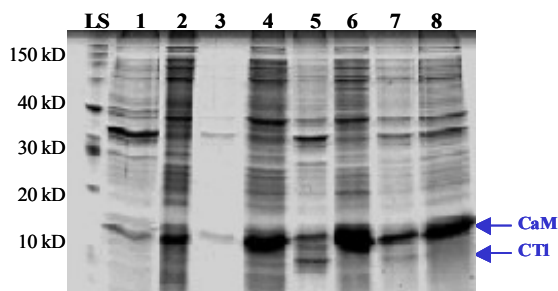


Abb. 3. 23.

Test unterschiedlicher Induktionsbedingungen für die Koexpression von CT1 (α_{1S}) und CaM

Die Temperatur und IPTG-Konzentration beeinflusste die Löslichkeit für CT1 (α_{1S}) nicht. Das Fragment wurde nur bei 37°C exprimiert (5,7) und befand sich ausschließlich in der nicht löslichen Fraktion.

SDS-PAGE 15%

- | | |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Induktion bei RT und 0,1 mM IPTG, nicht lösliche Fraktion 2. Induktion bei RT und 0,1 mM IPTG, lösliches Gesamtprotein 3. Induktion bei RT und 1 mM IPTG, nicht lösliche Fraktion 4. Induktion bei RT und 1 mM IPTG, lösliches Gesamtprotein | <ol style="list-style-type: none"> 5. Induktion bei 37°C und 0,1 mM IPTG, nicht lösliche Fraktion 6. Induktion bei 37°C und 0,1 mM IPTG, lösliches Gesamtprotein 7. Induktion bei 37°C und 1 mM IPTG, nicht lösliche Fraktion 8. Induktion bei 37°C und 1 mM IPTG, lösliches Gesamtprotein |
|--|--|

Anders stellte sich das Ergebnis der Koexpression für den kardialen CT1 dar. Hier fand eine Bindung mit CaM statt, das Fragment war im löslichen Gesamtprotein vorzufinden (Abb. 3. 24.).

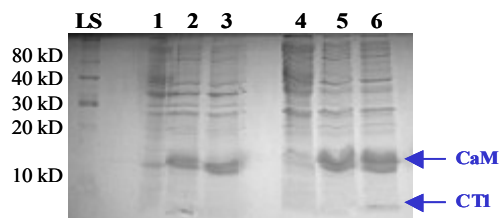


Abb. 3. 24.

Interaktion von skelettmuskulärem bzw. kardialem CT1 mit CaM.

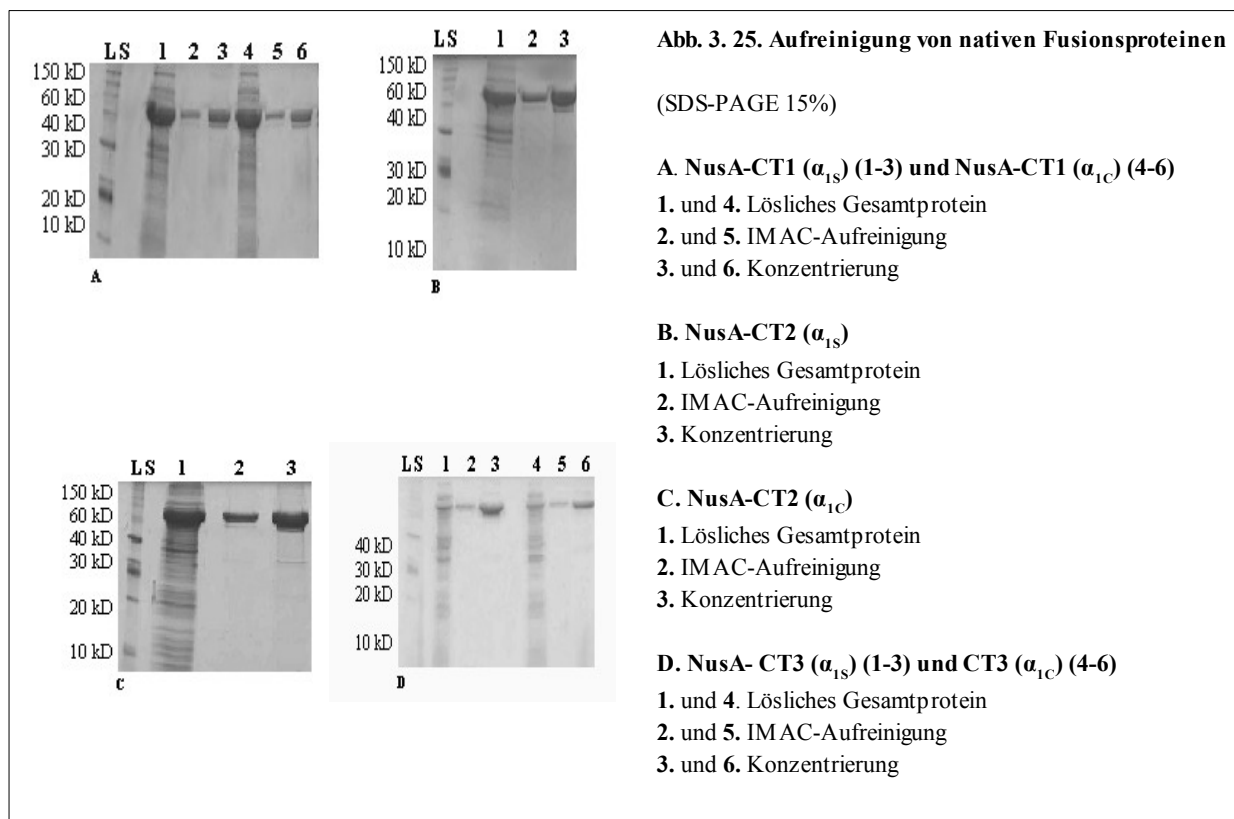
CT1 (α_{1S}) ging keine Interaktion mit CaM ein und war ausschließlich in der nicht löslichen Fraktion enthalten (2). CT1 (α_{1C}) befand sich im löslichen Gesamtprotein, interagiert demzufolge mit CaM (6).

SDS-PAGE 15%

- | | |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Nicht induzierte Probe 2. CT1-α_{1S} und CaM, nicht lösliche Fraktion 3. CT1-α_{1S} und CaM, lösliches Gesamtprotein | <ol style="list-style-type: none"> 4. Nicht induzierte Probe 5. CT1-α_{1C} und CaM, nicht lösliche Fraktion 6. CT1-α_{1C} und CaM, lösliches Gesamtprotein |
|---|---|

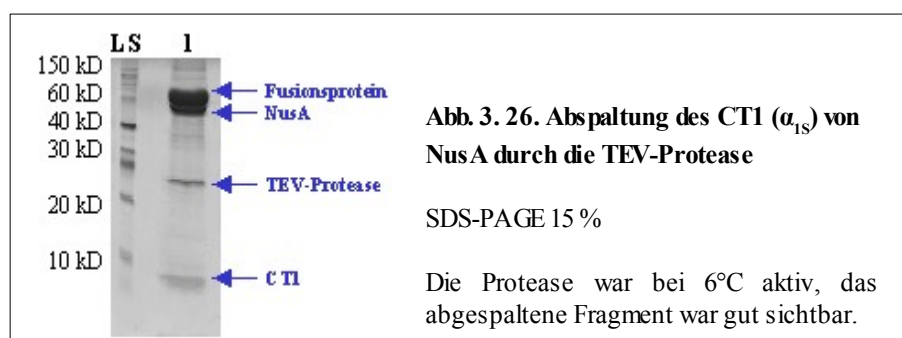
3. 10. Herstellung und Aufreinigung von löslichen DHPR-Fragmenten durch Fusion mit NusA

Die Fusion mit dem bakteriellen Transkriptionsfaktor NusA ermöglichte eine reproduzierbare Herstellung löslicher, carboxyterminaler DHPR-Fragmente. Mit dieser Methode wurden die skelettmuskulären bzw. kardialen Fragmente CT1, CT2 und CT3 exprimiert, mittels IMAC aufgereinigt und schließlich unter Verwendung spezieller Filter-Zentrifugationsröhrchen konzentriert (Abb. 3. 25.).



3. 10. 1. Abspaltung der DHPR-Fragmente von NusA durch die TEV-Protease

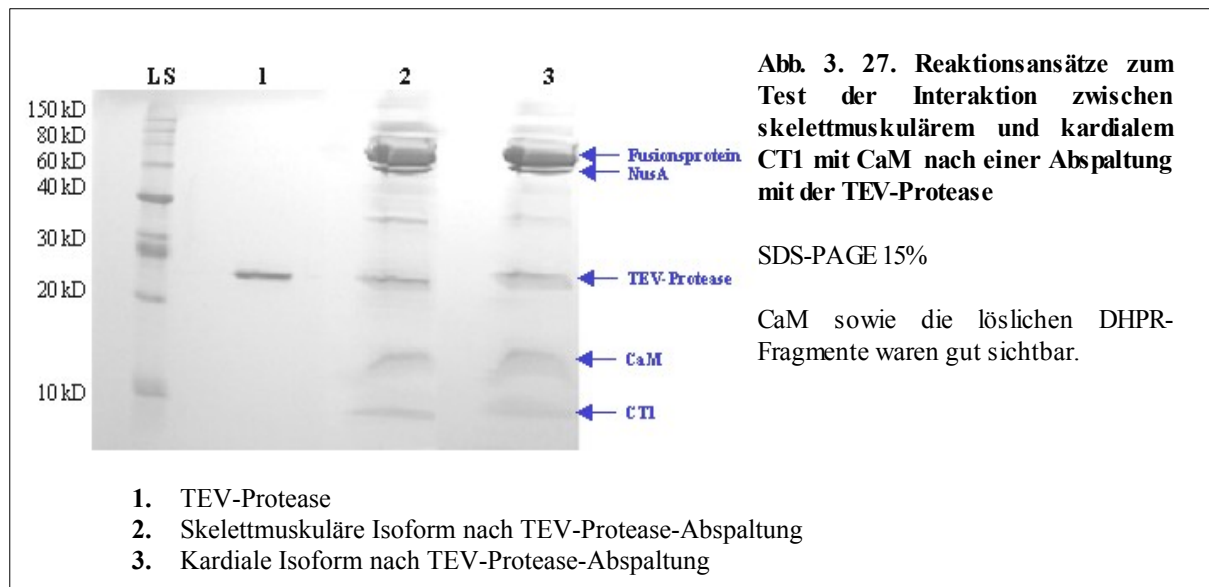
Die TEV-Protease besaß ihr Aktivitätsoptimum bei 30°C, zeigte jedoch auch ausreichende Aktivität im Bereich von 4°C - 35°C. Um ein Ausfallen der DHPR-Fragmente zu verhindern, wurde die mehrstündige Inkubation bei 6°C durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit SDS-PAGE untersucht (Abb. 3. 26.).



3. 10. 2. Ca^{2+} -abhängige Interaktion von CaM mit DHPR-Fragmenten nach Abspaltung von NusA

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 6°C inkubiert und anschließend mit nativer PAGE untersucht. Im Polyacrylamidgel sowie im Laufpuffer der Elektrophorese befand sich

die gleiche Ca^{2+} - (bzw. EDTA-) Konzentration wie in den Reaktionsansätzen. Mit SDS-PAGE wurde die Anwesenheit von Fusionsprotein, TEV-Protease und CaM, sowie die Abspaltung der Fragmente durch die TEV-Protease überprüft. CaM und DHPR-Fragmente konnten unter diesen Bedingungen gut detektiert werden (Abb. 3. 27.).



Um zu untersuchen ob auch Apocalmodulin eine Bindung mit den verschiedenen CT eingehen kann, wurde in einigen Versuchen Ca^{2+} durch den Chelator EDTA ersetzt. Hierbei konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen (nominal 0 mM bis zu 3 mM $[\text{Ca}^{2+}]$) wurden getestet. In allen Reaktionsansätzen, also auch bei nominal 0 mM Calcium (keine Zugabe von Ca^{2+} ohne Anwesenheit von EDTA), wurde für die kardiale CT1-Isoform eine Interaktion mit CaM beobachtet. Die Beobachtung einer Komplexbildung auch bei nominal 0 $[\text{Ca}^{2+}]$ ist erklärbar durch die Anwesenheit von Spuren von Ca^{2+} , welche als geringe Verunreinigung bei den meisten der verwendeten Chemikalien anzutreffen ist. Im Gegensatz dazu konnte bei der skelettmuskulären Isoform keine Interaktion mit CaM nachgewiesen werden. Auch eine höhere Ca^{2+} -Konzentration im Reaktionsansatz hatte keinen Einfluss auf dieses Ergebnis (Abb. 3. 28.).

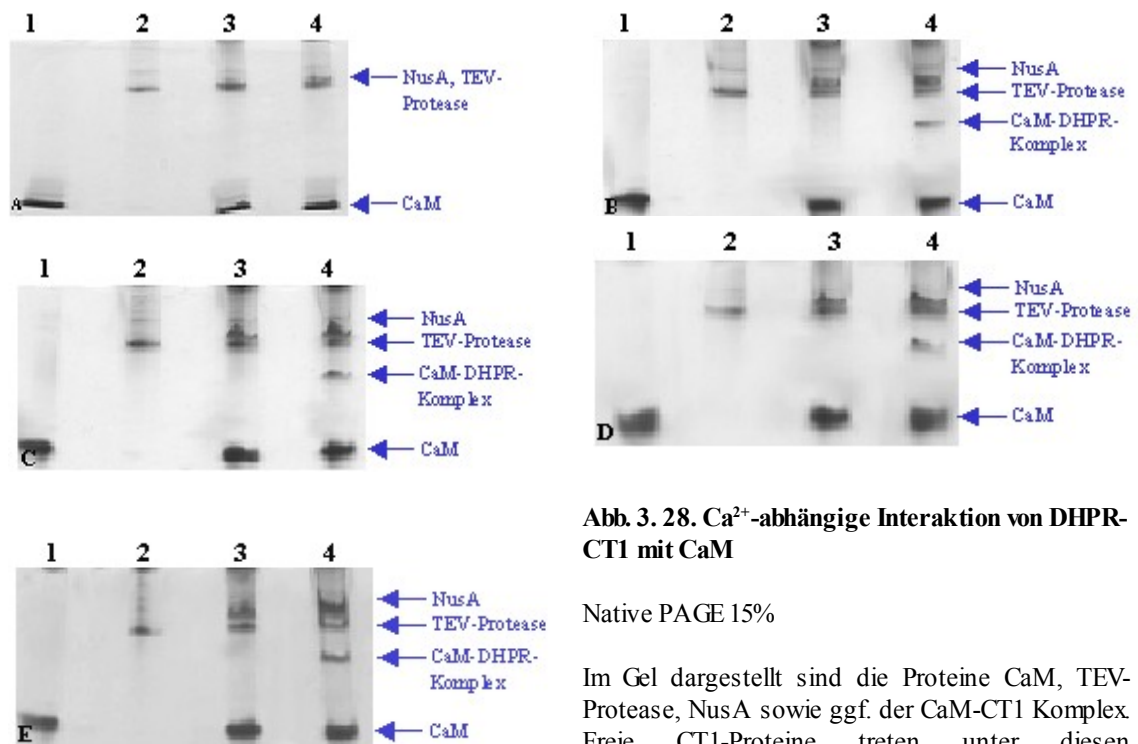


Abb. 3. 28. Ca²⁺-abhängige Interaktion von DHPR-CT1 mit CaM

Native PAGE 15%

Im Gel dargestellt sind die Proteine CaM, TEV-Protease, NusA sowie ggf. der CaM-CT1 Komplex. Freie CT1-Proteine treten unter diesen Bedingungen nicht in das Gel ein (Abb. 3. 17).

- A.** Test auf Interaktion in Gegenwart von 2mM EDTA
 - 1. CaM
 - 2. TEV-Protease
 - 3. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1S}), keine Interaktion zwischen CT1 und CaM
 - 4. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1C}), keine Interaktion zwischen CT1 und CaM
- B.** Interaktion bei nominal 0 mM Ca²⁺ (Spuren von Ca²⁺ aus Chemikalien)
 - 1. CaM
 - 2. TEV-Protease
 - 3. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1S}), keine Interaktion zwischen CT1 und CaM
 - 4. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1C}), Interaktion zwischen CT1 und CaM
- C.** Interaktion in Anwesenheit von 1mM Ca²⁺
 - 1. CaM
 - 2. TEV-Protease
 - 3. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1S}), keine Interaktion zwischen CT1 und CaM
 - 4. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1C}), Interaktion zwischen CT1 und CaM
- D.** Interaktion in Anwesenheit von 2mM Ca²⁺
 - 1. CaM
 - 2. TEV-Protease
 - 3. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1S}), keine Interaktion zwischen CT1 und CaM
 - 4. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1C}), Interaktion zwischen CT1 und CaM
- E.** Interaktion in Anwesenheit von 3mM Ca²⁺
 - 1. CaM
 - 2. TEV-Protease
 - 3. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1S}), keine Interaktion zwischen CT1 und CaM
 - 4. Reaktionsansatz mit CT1 (α_{1C}), Interaktion zwischen CT1 und CaM

Das im Vergleich zu CT1 größere DHPR-Fragment CT2 verhielt sich in Bezug auf das Bindungsverhalten mit CaM wie CT1: Das kardiale Fragment interagiert mit CaM, was durch die zusätzliche Bande in dem nativen Gel dokumentiert wurde, während bei CT2 (α_{1S}) keine zusätzliche Bande zu erkennen war (Abb. 3. 29.).

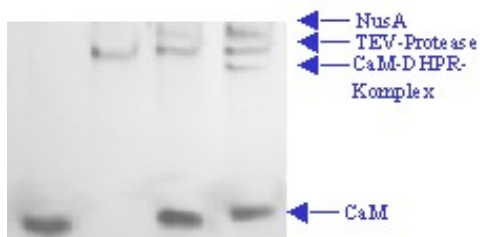


Abb. 3. 29. Ca²⁺-abhängige Interaktion von DHPR-CT2 mit CaM

Native PAGE 15%

1. CaM
2. TEV-Protease
3. Reaktionsansatz mit skelettmuskulärem CT2; die zusätzliche Bande, welche die Interaktion zwischen DHPR und CaM darstellt, fehlt
4. Reaktionsansatz mit kardialem CT2; die zusätzliche Bande war sehr gut zu erkennen.

Auch die beiden CT3-Isoformen zeigten in den Experimenten das gleiche Verhalten in Bezug auf die Interaktion mit CaM: Die α_{1S} -Isoform war nicht in der Lage CaM zu binden, eine zusätzliche Bande fehlte im nativen Gel. Wie bei kürzeren kardialen Fragmenten CT1 und CT2, so ging auch kardiales CT3 eine Interaktion mit CaM ein, erkennbar an der Anwesenheit einer zusätzlichen Bande im nativen Gel. Wie bei den kürzeren Fragmenten, so ergab sich auch für CT3 eine charakteristische elektrophoretische Laufweite. Diese fiel aber – wenn 15 %ige native Gele verwendet wurden – wegen der Größe dieses Konstruktes mit derjenigen von NusA zusammen, sodass es hier zu keiner eindeutigen Trennung kam (Abb. 3. 30. B.). Jedoch fand bei 9 %igen nativen Gelen eine gute Auftrennung von Komplex und NusA statt, sodass die zusätzliche Bande nicht verdeckt war (Abb. 3. 30. A.).

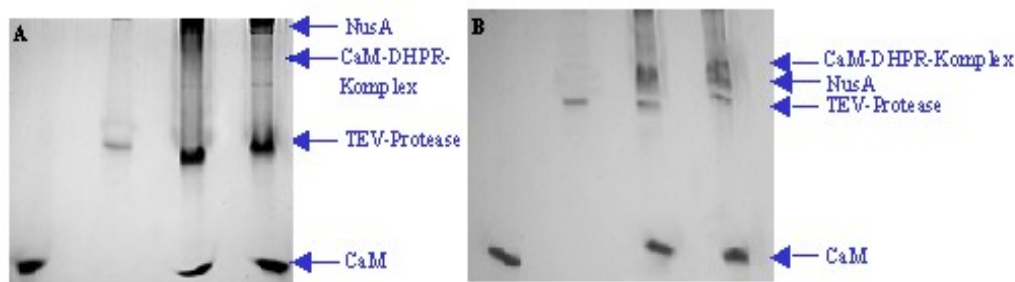
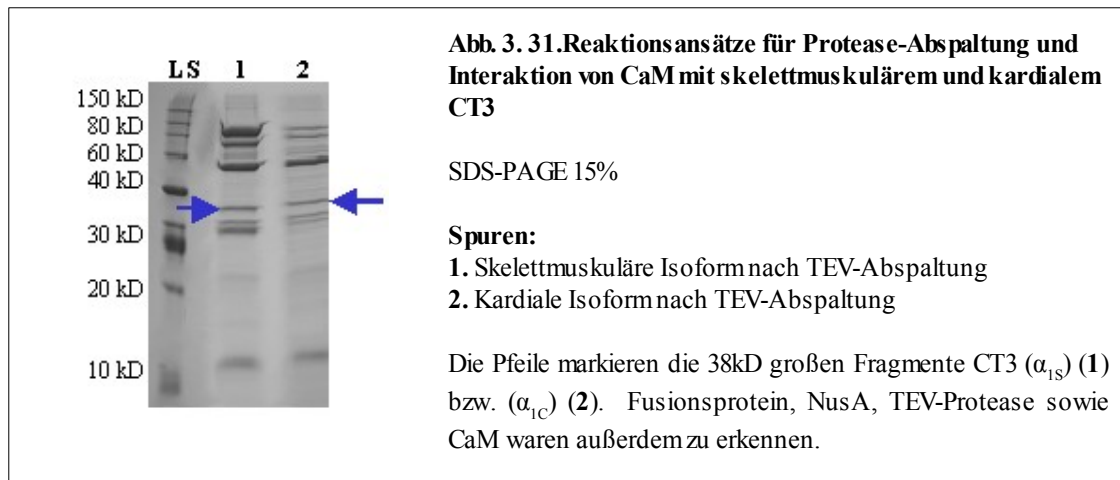


Abb. 3. 30. CT3-CaM-Interaktion

- A. 9 %iges natives Gel**
 1. CaM
 2. TEV-Protease
 3. Reaktionsansatz mit skelettmuskulärem CT3, die zusätzliche Bande, welche auf eine Interaktion schließen lässt, fehlt.
 4. Reaktionsansatz mit kardialem CT3, die zusätzliche Bande ist gut zu erkennen.
- B. 15 %iges natives Gel**
 1. CaM
 2. TEV-Protease
 3. Reaktionsansatz mit skelettmuskulärem CT3
 4. Reaktionsansatz mit kardialem CT3, Bande des CaM-CT3 Komplexes und die von NusA überlagern sich teilweise.

SDS-PAGE bestätigte die Anwesenheit von abgespaltenen skelettmuskulären und kardialen CT3 (Abb. 3. 31.).



3. 11. Massenspektrometrie

Mit dieser Methode wurde die Identität der Proteine aus Gelen (sowohl SDS- als auch native PAGE) ausgeschnittener Banden bestimmt. Dazu wurden die Proteine innerhalb der ausgeschnittenen Banden mit Trypsin gespalten, die entstandenen Peptide wurden anschließend mit einem MALDI-TOF-TOF System untersucht. Für jedes Protein ergab sich nach der Trypsinspaltung ein charakteristisches Peptidmuster, wobei die entsprechenden Peptidmassen einen unverwechselbaren "Fingerabdruck" des Proteins lieferten. Der Abgleich der massenspektrometrisch erhaltenen Peptidmuster mit in Datenbanken abgelegten Mustern führte zur eindeutigen Bestimmung der Proteinidentität, inklusive der Isoform. So wurde im Vorfeld der eigentlichen Bindungsstudien zunächst bestätigt, dass es sich bei den aus SDS-Gelen ausgeschnittenen, niedermolekularen Banden (Abb. 3. 32.) tatsächlich um die skelettmuskuläre bzw. kardiale CT1-Isoform handelte (Abb. 3. 33).

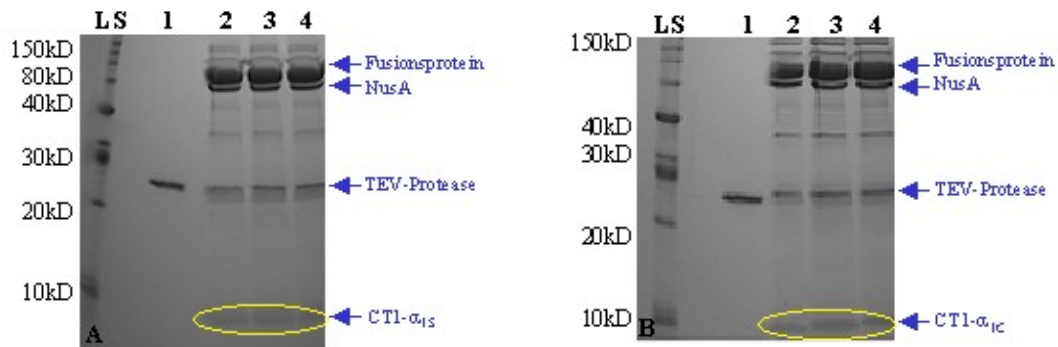


Abb. 3. 32. Durch die TEV-Protease abgespaltenes CT1 (α_{1S}) (A) und CT1 (α_{1C}) (B)

SDS-PAGE 15%

- 1 (A. B.) TEV-Protease
 2, 3, 4, (A. B.) CT1 (α_{1S})- bzw. CT1(α_{1C})-Abspaltung von NusA durch die TEV-Protease

Die markierten Banden (2, 3, 4) wurden ausgeschnitten und mit dem Massenspektrometer auf ihre Identität hin untersucht.

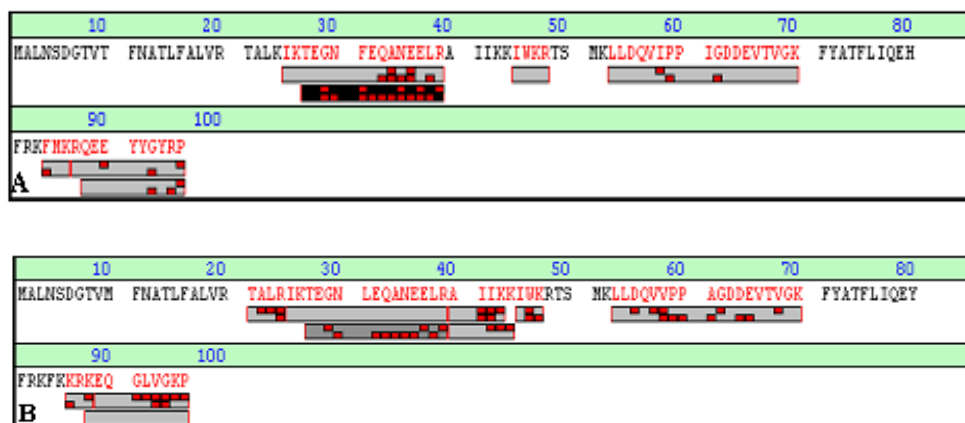


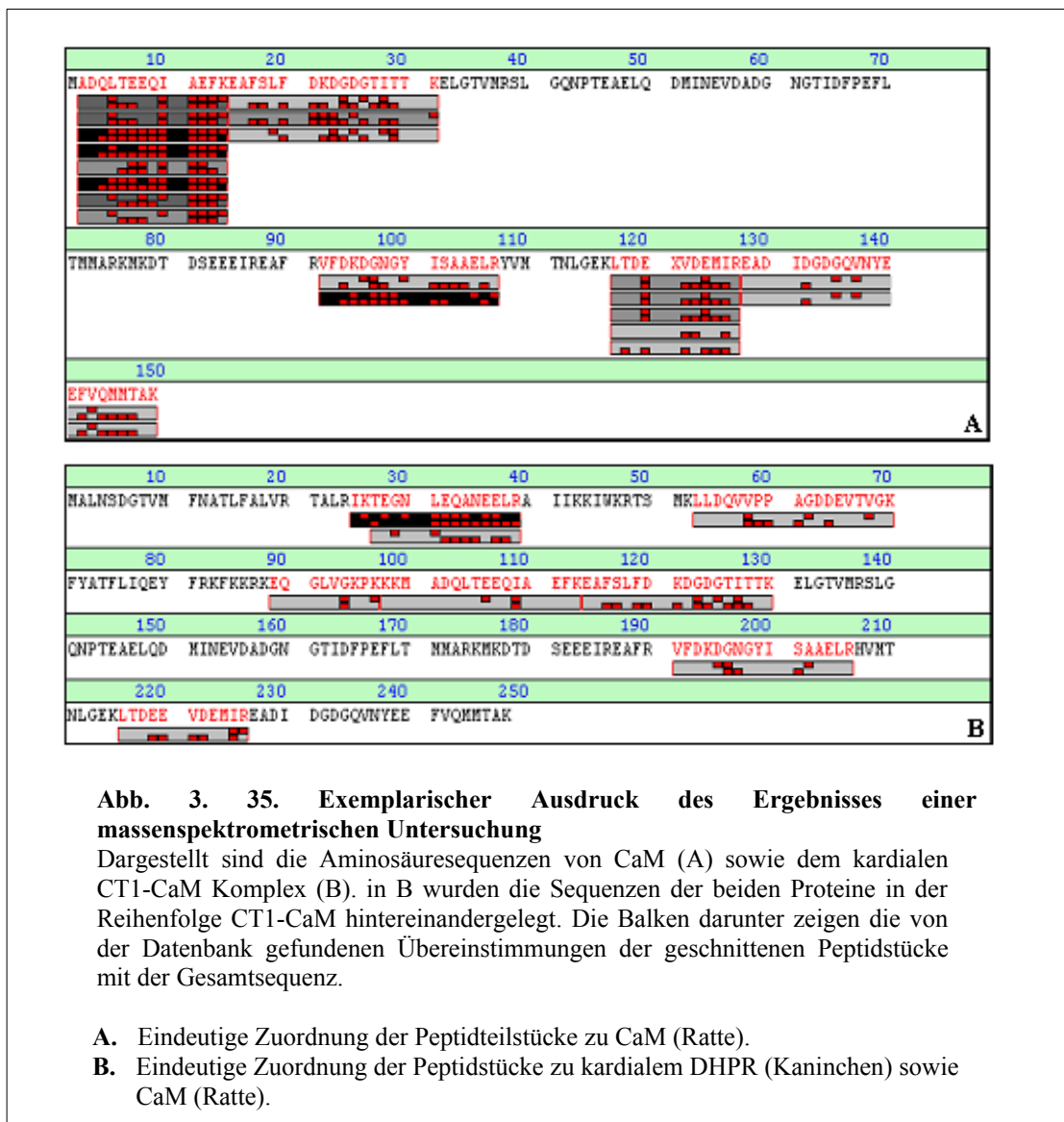
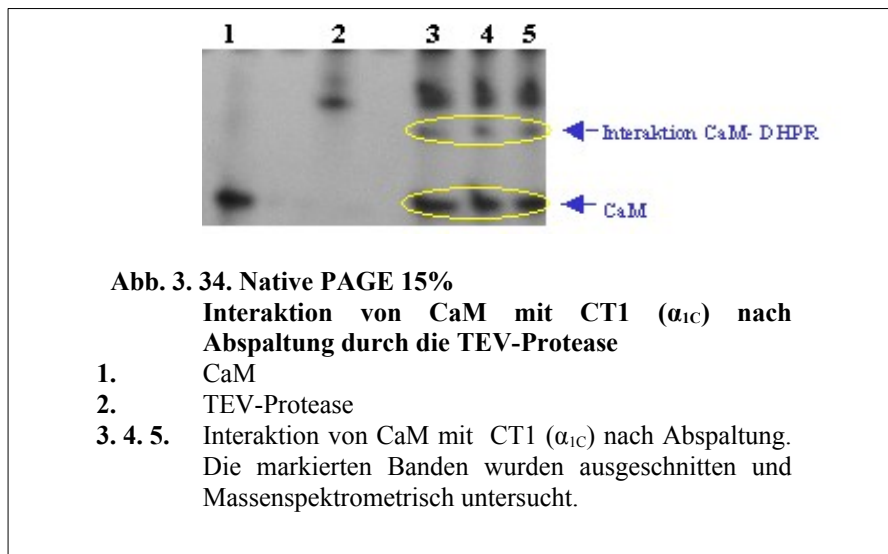
Abb. 3. 33. Exemplarischer Ausdruck des Ergebnisses einer massenspektrometrischen Untersuchung

Die Aminosäuresequenz von skelettmuskulärem (A) und kardialem (B) CT1 sind dargestellt. Die Balken darunter zeigen die von der Datenbank gefundenen Übereinstimmungen der erhaltenen Peptidstücke mit der entsprechenden CT1-Sequenz. Durch diese Übereinstimmungen kann ein Protein genauestens identifiziert werden.

- A. Eindeutige Zuordnung der Peptidteilstücke zu skelettmuskulären DHPR (Kaninchen).
 B. Eindeutige Zuordnung der Peptidteilstücke zu kardialem DHPR (Kaninchen).

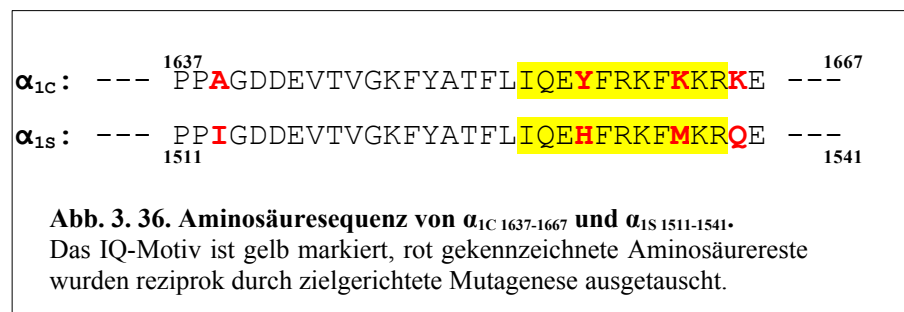
Aus nativen Gelen wurden auch die vermeintlichen Banden von CaM sowie dessen Komplex mit der kardialen CT1-Isoform ausgeschnitten (Abb. 3. 34.). Auch CaM wurde hierbei eindeutig identifiziert (Abb. 3. 35). In den ausgeschnittenen Banden, in welchen der Komplex

CaM-CT1 vermutet wurde, ergaben sich in der Datenbankanalyse exakt zwei Proteine: CaM (Isoform der Ratte) sowie kardialer DHPR (Isoform des Kaninchens) (Abb. 3. 35.).



3. 12. Einfluss reziproker Aminosäureaustausche innerhalb der IQ-Region beider CT1-Isoformen auf die CaM-Affinität

Definierte, innerhalb der beiden CT1-Isoformen unterschiedlich besetzte Aminosäurereste in der Region des IQ-Motivs, wurden durch zielgerichtete Mutagenese reziprok ausgetauscht (Abb. 3. 36.)



Nach Bestätigung des Mutationserfolgs wurden auch hier die Fragmente in Anwesenheit von CaM und 2 mM Ca^{2+} mit der TEV-Protease von NusA abgespalten und anschließend mit nativer PAGE untersucht. Für den Austausch α_{1S} -**I1513A** und α_{1C} -**A1639I** ergaben sich keine erkennbaren Abweichungen gegenüber den Beobachtungen an den entsprechenden Wildtypsequenzen. Im Unterschied dazu bedingte der Austausch α_{1S} -**H1532Y** die Präsenz einer (wenn auch schwachen) zusätzlichen Bande innerhalb nativer Gele. Der korrespondierende Austausch an der kardialen Isoform, α_{1C} -**Y1658H**, führte zur Schwächung der dem CaM-CT1 Komplex entsprechenden Bande im Gel. Ähnlich verhielt es sich bei den Mutationen **M1537K** und α_{1C} -**K1663M**, nur war hier die Schwächung der kardialen CaM-Interaktion nicht nennenswert. Gleichsinnig, jedoch deutlich stärker als die oben beschriebenen Einzelmutationen wirkte sich der Doppelaustausch innerhalb des IQ-Motivs aus (α_{1S} -**H1532Y+M1537K** bzw. α_{1C} -**Y1658H+K1663M**). Der dieser Doppelmutation zusätzlich eingefügte Austausch von α_{1S} -**Q1540K** bzw. α_{1C} -**K1666Q** führte zu keiner signifikanten Verstärkung der beobachteten Effekte. In Abb. 3. 37. und Abb. 3. 38. sind die Ergebnisse der nativen PAGE für sämtliche Mutationen dargestellt.

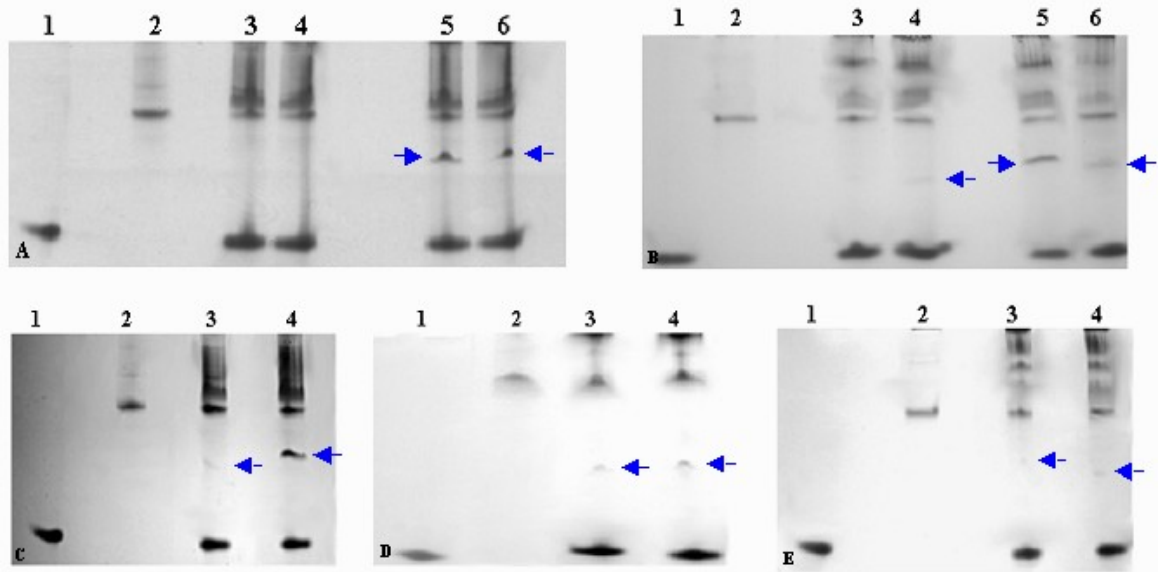


Abb. 3. 37. Ca²⁺-abhängige Interaktion von CaM mit skelettmuskulärem und kardialem CT1 nach reziprokem Austausch einiger Aminosäurereste im IQ-Motiv und seiner unmittelbaren Umgebung

Die Banden, welche den CaM-CT1-Komplex darstellen, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Native PAGE 15%

A.	1.	CaM	4.	CT1 (α_{1S}) WT	5.	CT1 (α_{1C}) WT
	2.	TEV-Protease	5.	CT1 (α_{1S}) I1513A	6.	CT1 (α_{1C}) A1639I
B.	1.	CaM	3.	CT1 (α_{1S}) WT	5.	CT1 (α_{1C}) WT
	2.	TEV-Protease	4.	CT1 (α_{1S}) H1532Y	6.	CT1 (α_{1C}) Y1658H
C.	1.	CaM	3.	CT1 (α_{1S}) M1513K		
	2.	TEV-Protease	4.	CT1 (α_{1C}) K1663M		
D.	1.	CaM	3.	CT1 (α_{1S}) H1532Y+M1513K		
	2.	TEV-Protease	4.	CT1 (α_{1C}) Y1658H+K1663M		
E.	1.	CaM	3.	CT1 (α_{1S}) H1532Y+M1513K+Q1540K		
	2.	TEV-Protease	4.	CT1 (α_{1C}) Y1658H+K1663M+K1666Q		

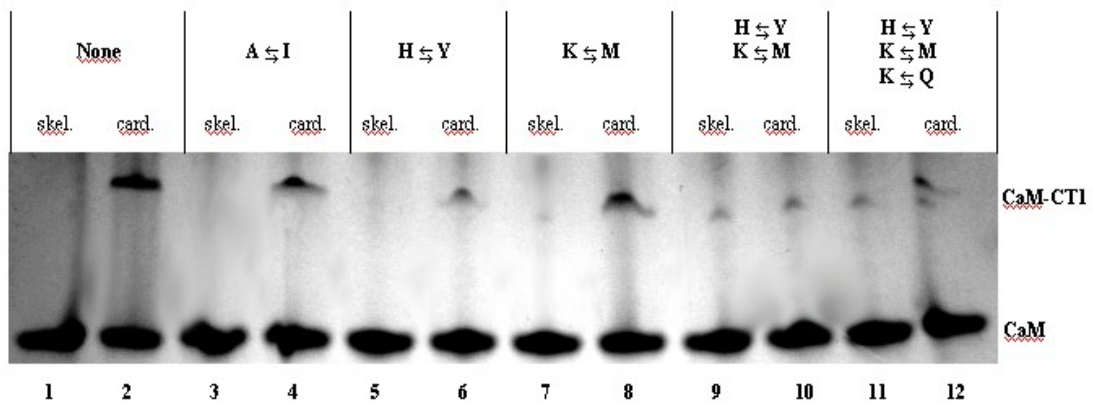


Abb. 3. 38. Ca²⁺-abhängige Interaktion von CaM mit skelettmuskulärem und kardialem CT1 nach reziprokem Austausch einiger Aminosäurereste im IQ-Motiv und seiner unmittelbaren Umgebung – Synopsis der Mutationseffekte

Native PAGE 15%

Das leicht unterschiedliche Laufverhalten der CaM-Komplexe kann durch die veränderte Protein-Nettoladung erklärt werden, welche durch den Austausch von Aminosäureresten entsteht.

- | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|--|
| 1. CT1 (α_{1S}) WT | 5. CT1 (α_{1S}) H1532Y | 9. CT1 (α_{1S}) H1532Y+M1513K |
| 2. CT1 (α_{1C}) WT | 6. CT1 (α_{1C}) Y1658H | 10. CT1 (α_{1C}) Y1658H+K1663M |
| 3. CT1 (α_{1S}) I1513A | 7. CT1 (α_{1S}) M1513K | 11. CT1 (α_{1S}) H1532Y+M1513K+Q1540K |
| 4. CT1 (α_{1C}) A1639I | 8. CT1 (α_{1C}) K1663M | 12. CT1 (α_{1C}) Y1658H+K1663M+K1666Q |

3. 14. cDNA-Microinjektion

Die hergestellten cDNAs wurden in Zellkerne von "dysgenic" Myotuben injiziert und nach 24 h mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Skelettmuskuläres CyPet-CT1, kardiales CyPet-CT1 sowie YPet-CaM wurden zunächst einzeln in Myotuben gebracht um zu überprüfen, ob eine Expression der Konstrukte stattgefunden hat und wo die einzelnen exprimierten Proteine lokalisiert waren. Die Proben wurden mit den jeweiligen Wellenlängen angeregt, und es konnte festgestellt werden, dass alle cDNAs gut exprimiert wurden. Skelettmuskuläres sowie kardiales CyPet-CT1 sind im Umfeld des Zellkernes ausgefallen, wohingegen YPet-CaM in allen Bereichen der Zelle vorzufinden war (Abb. 3. 39.).

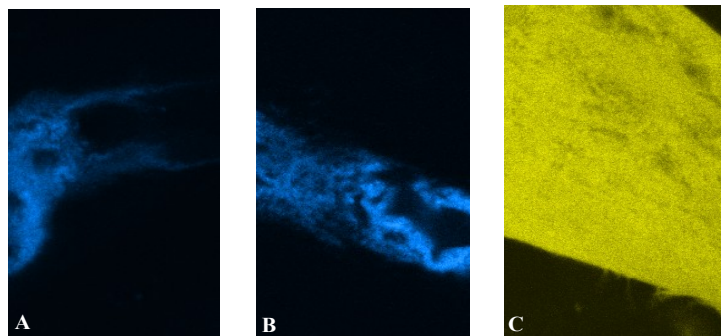


Abb. 3. 39. Fluoreszenzaufnahmen der injizierten cDNA

24h nach der Injektion wurden die Myotuben im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. CyPet wurde mit einer Wellenlänge von 458nm, YPet bei 514nm mit dem Laser angeregt.

A. CyPet-CT1 (α_{1S})

Die Probe wurde mit 458nm angeregt; das Fragment wurde exprimiert, war aber nicht in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt, sondern aggregierte im Umkreis der Zellkerne.

B. CyPet-CT1 (α_{1C})

Nach Anregung mit 458nm konnte auch hier eine Anhäufung des Fragments in der Nähe der Zellkerne beobachtet werden. das kardiale Fragment war nicht in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt.

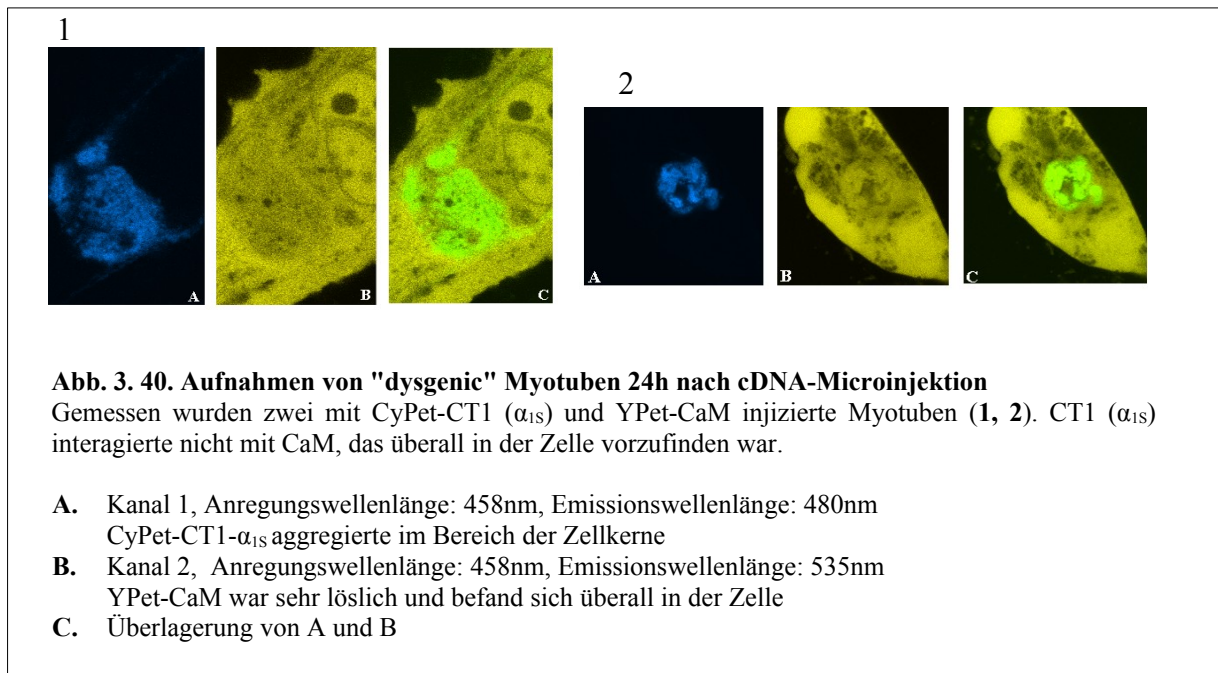
C. YPet-CaM

Nach Anregung mit 514nm konnte man erkennen, dass CaM sehr gut exprimiert wurde und wegen seiner hohen Löslichkeit in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt war.

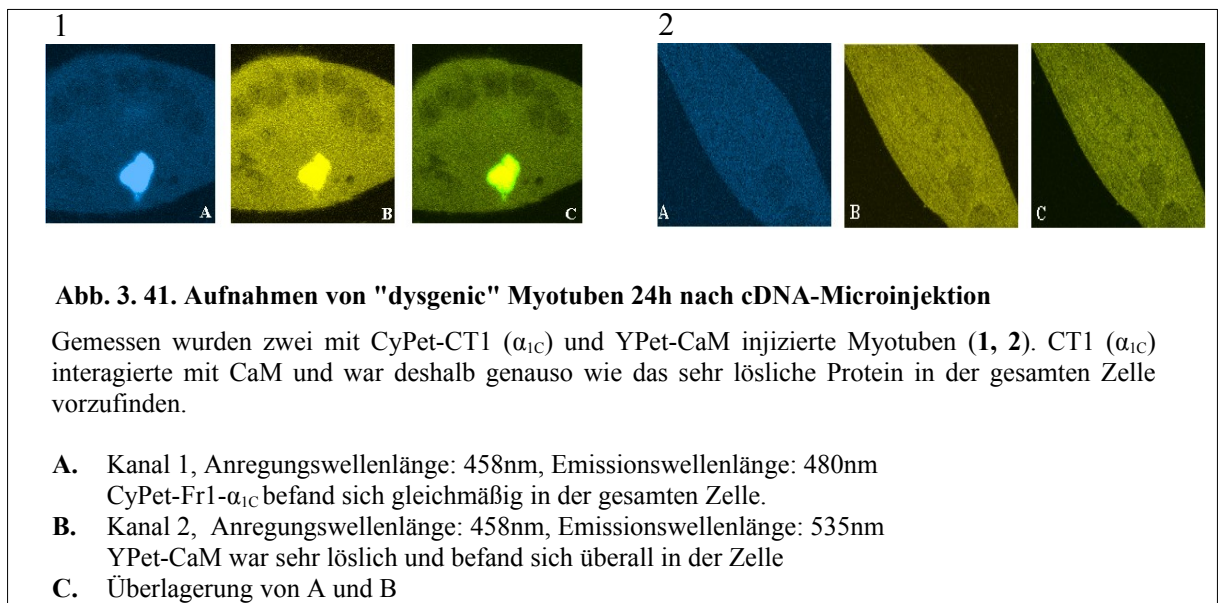
3. 15. FRET-Messungen

Um die Ca^{2+} -abhängige Interaktion von DHPR und CaM mit FRET zu überprüfen, wurden Skelettmuskuläres CyPet-CT1 bzw. kardiales CyPet-CT1 zusammen mit YPet-CaM in "dysgenic" Myotuben injiziert und nach 24h mit dem konfokalen Laser-Mikroskop untersucht. Bei Messungen mit CyPet-CT1 (α_{1S}) und YPet-CaM wurde kein FRET

beobachtet. Das carboxyterminale Fragment aggregierte in der Nähe der Zellkerne und interagiert nicht mit YPet-CaM, das sich überall in der Zelle befand (Abb. 3. 40.)



Im Gegensatz zu CT1 (α_{1S}) aggregierte die kardiale Isoform nicht, sondern interagiert mit CaM und befand sich in der gesamten Zelle (Abb. 3. 41.).



Eine FRET-Aktivität konnte in beiden Myotuben aus Abb. 3.41 gemessen werden. Um die FRET-Effizienz zu berechnen wurden die Netto-Intensitäten vor und nach dem Bleichen miteinander verglichen und anhand folgender Formel berechnet:

$$E = \frac{I_{\text{CyPet nach Bleichen}} - I_{\text{CyPet vor Bleichen}}}{I_{\text{CyPet nach Bleichen}}} \times 100 \%$$

FRET-Effizienz-Berechnung von Abb. 3.41. (1)

I _{CyPet vor Bleichen}	6387937
I _{Background/Autofluoreszenz}	1254612
Netto I _{CyPet vor Bleichen}	513325
I _{CyPet nachBleichen}	6694465
I _{Background/Autofluoreszenz}	1280361
Netto I _{CyPet nach Bleichen}	5414104
FRET-Effizienz	5,19 %

FRET-Effizienz-Berechnung von Abb. 3.41. (2)

I _{CyPet vor Bleichen}	1410219
I _{Background/Autofluoreszenz}	866553
Netto I _{CyPet vor Bleichen}	543666
I _{CyPet nachBleichen}	1547675
I _{Background/Autofluoreszenz}	879996
Netto I _{CyPet nach Bleichen}	667679
FRET-Effizienz	18,57 %

4. DISKUSSION

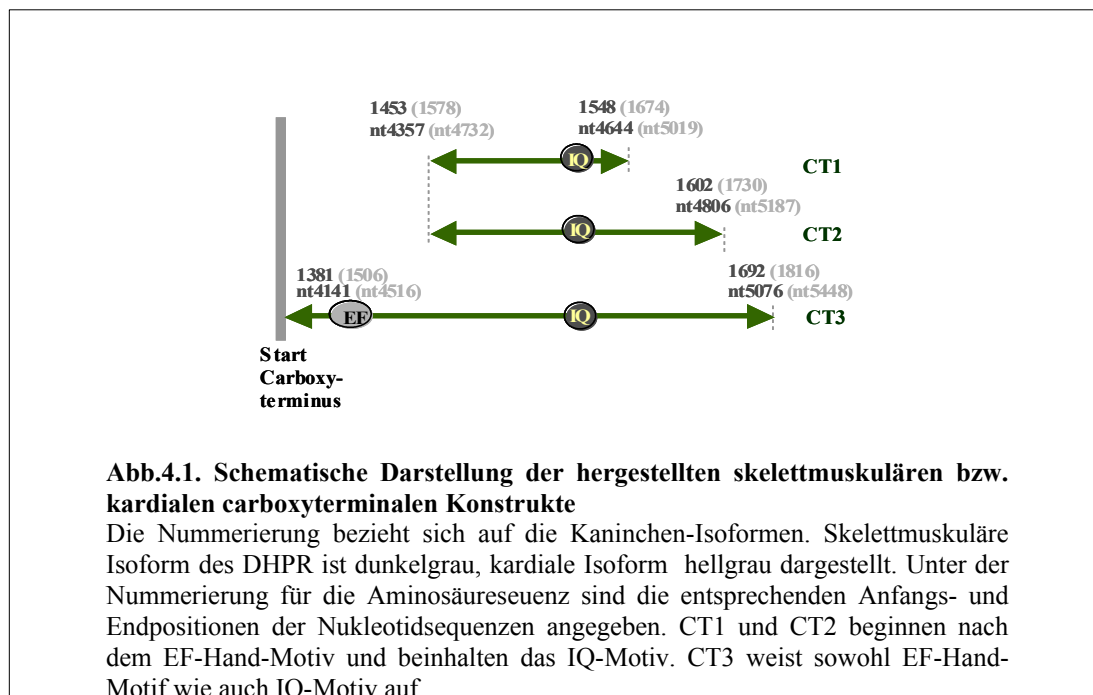
Die Inaktivierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen ist ein komplexer Vorgang mit mehreren molekularen Komponenten. Was den Ca^{2+} -vermittelten Anteil der Inaktivierung (CDI) angeht, so haben vorangegangenen Arbeiten (Soldatov et al., 1997, 1998; Zühlke und Reuter, 1998) gezeigt, dass für die CDI kardialer L-Typ-Kanäle (α_{1C} bzw. $\text{Ca}_v1.2$) eine Interaktion des α_1 -Carboxyterminus mit Ca^{2+} -Calmodulin Voraussetzung ist. Die Aminosäuresequenz des Carboxyterminus von α_{1C} beherbergt mehrere potentielle Bindungsstellen für CaM, wobei aufgrund experimenteller Evidenz vermutet wird, dass eine CaM-Interaktionsdomäne vom IQ-Typ einen dominierenden Einfluss auf die CDI hat (Adams und Tanabe, 1997; Qin et al., 1999; Zühlke et al., 1999, 2000; Pitt et al., 2001; Erickson et al., 2003). Über eine sehr ähnliche Sequenz in diesem Bereich verfügt auch das skelettmuskuläre Homolog, α_{1S} bzw. $\text{Ca}_v1.1$. Allerdings zeigt der L-Typ Calciumkanal des Skelettmuskels keine CDI (Beam und Knudson, 1988; Adams und Beam, 1989). Trotzdem wird in der Literatur, nicht zuletzt aufgrund von CaM-Bindungsstudien mit kurzen synthetischen Peptiden, von einer CaM-Interaktion auch des skelettmuskulären Calciumkanals ausgegangen.

Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation lag auf der vergleichenden Untersuchung der CaM-Interaktionen ausgedehnter carboxyterminaler Bereiche des kardialen und skelettmuskulären L-Typ-Calciumkanals. Es sollten die molekularen Determinanten der im Hinblick auf Interaktionen mit CaM bestehenden Unterschiede aufgedeckt werden.

4. 1. Expression umfangreicher carboxyterminaler DHPR-Fragmente

Die Bereitstellung ausgedehnter carboxyterminaler DHPR-Regionen in funktionsfähigem Zustand stellt eine experimentelle Herausforderung dar. Geringe bzw. fehlende bakterielle Expression sowie sehr begrenzte Löslichkeit sind dabei die Hauptprobleme. Daher basiert ein Großteil der Befunde auf diesem Gebiet auf Studien an Peptiden. So berichten Zhou et al. (1997), dass es nicht möglich sei, distal des EF-Hand Motivs gelegene Bereiche des kardialen DHPR-Carboxyterminus in Bakterien zu exprimieren (Hingegen können carboxyterminale Bereiche, die das EF-Hand Motiv enthalten, in Bakterien exprimiert werden). Kim et al. (2004) bestätigen diesen Befund indem sie eine fehlende Expression carboxyterminaler Konstrukte ohne Anwesenheit der EF-Hand Region beobachten. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, ist es sehr wohl möglich, Bereiche des Carboxyterminus von skelettmuskulärem und

kardialem DHP, die distal zum EF-Hand-Motiv liegen, in Bakterien zu exprimieren und sie für Bindungsstudien einzusetzen. Drei unterschiedliche carboxyterminale Fragmente von skelettmuskulärem und kardialem DHP (CT1, CT2, CT3; Abb. 4. 1.) wurden hierfür verwendet. Davon weisen CT1 und CT2 das EF-Hand Motiv nicht auf, alle drei Konstrukte beinhalten jedoch die - zumindest für die CDI der Herzisoform - wichtige IQ-Region. Das längste Fragment, CT3, repräsentiert praktisch den gesamten Carboxyterminus nativer α_{1s} bzw. α_{1c} , obwohl die Primärsequenz der Kanäle wesentlich länger ist. Native L-Typ Calciumkanäle unterliegen im Muskel einer Proteolyse, welche den distalen Carboxyterminus abtrennt (DeJongh et al., 1991; Hulme et al., 2005).



Für die Expression der carboxyterminalen Fragmente in *E. coli* wurden verschiedene Parameter (Temperatur, Zeit) getestet und variiert. Hierbei wurde deutlich, dass verschiedene carboxyterminale Fragmente nur unter ganz bestimmten Bedingungen ausreichend exprimiert werden. Die cDNA von CT3 befand sich in den Vektoren pET19b bzw. pETM60. Die Expression erfolgte ohne Probleme über Nacht bei Raumtemperatur (Abb. 3. 14. und Abb. 3. 25. D). cDNAs von CT1 und CT2, eingeschleust in den Vektor pETM60, wurden ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur exprimiert (Abb.3.25.A,B,C). cDNA-Konstrukte, welche sich in dem Vektor pRSFDuet befanden, konnten ausschließlich bei 37°C hergestellt werden (Abb. 3.20.), Inkubation bei Raumtemperatur erzielte keine Expression dieser Proteine (Abb. 3.19).

und Abb. 3.23.). Die Expressionszeit wurde hier verkürzt, da nach 4 h ein Expressionsmaximum vorlag (Abb. 3.20.).

Wie obige Beispiele zeigen, sollten Berichte über mangelnde Expressionsfähigkeit bestimmter Proteinbereiche mit Vorsicht aufgenommen werden, häufig können auch schwierige Konstrukte durch Variation der Expressionsparameter in ausreichendem Maße erhalten werden.

4. 2. Darstellbarkeit von CT-Bereichen mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Um eine Interaktion von CaM mit kardialen DHPR-Konstrukten mit nativer Gelelektrophorese zu untersuchen, werden basische Gele mit einem pH von 7,5 - 8,6 verwendet (Tang et al., 2003; Xiong et al., 2005). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt ist, können sowohl CaM als auch an CaM gebundene CT-Konstrukte ein Acrylamidgel mit basischem Puffer-pH durchlaufen. Warum konnten keine freien, ungebundenen CT-Proteine in den nativen Gelen nachgewiesen werden? Für die freien CT-Konstrukte werden theoretische isoelektrische Punkte (I.P.) von > 10 berechnet. Obwohl der für ein bestimmtes Protein errechnete I.P. durchaus von dem tatsächlich gemessenen Wert abweichen kann, ist davon auszugehen, dass die CT-Proteine beim verwendeten Puffer-pH der Elektrophorese mit einer positiven Ladung versehen waren. Damit wären diese Kanalbereiche, auch nach der Ansicht von Xiong et al. (2004), nicht in der Lage in das Gel einzutreten. Unabhängig vom Einfluss des I.P. könnte eine weitere Ursache für die Abwesenheit freier CT-Bereiche in nativen Gelen darin liegen, dass diese Proteine im ungebundenen Zustand in Lösung instabil sind und ausfallen. Für diese Annahme sprechen die Ergebnisse der muskulären Expressionsstudien dieser Arbeit: Sowohl die kardialen als auch die skelettmuskulären CT-Proteine bildeten Aggregate um den für Injektionen verwendeten Zellkern, wenn sie in Abwesenheit von CaM exprimiert wurden (die skelettmuskuläre Isoform darüber hinaus auch bei Ko-Expression mit CaM). Eine dritte mögliche Ursache für die Abwesenheit von CT-Bereichen in nativen Gelen, nämlich die Degradation ungebundenen Proteins nach Abspaltung von NusA, konnte mittels SDS-Gelelektrophorese des Reaktionsgemisches nach TEV-Einwirkung ausgeschlossen werden: In beiden Proben (kardialer und skelettmuskulärer CT1) war eine Proteinbande auf Höhe des entsprechenden Molekulargewichtes eindeutig nachweisbar und bei dieser handelte es sich ohne Zweifel um den jeweiligen CT1, was durch

Massenspektrometrie bestätigt wurde. So kann davon ausgegangen werden, dass der experimentelle Ansatz dieser Arbeit eine zuverlässige Methode zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit für CaM darstellt.

4. 3. Bindet der skelettmuskuläre DHPR Calmodulin?

Aufgrund zahlreicher biochemischer und funktioneller Studien gilt es mittlerweile als sehr wahrscheinlich, dass es bei der calciumabhängigen Inaktivierung des kardialen DHPR zu einer Interaktion zwischen CaM und dem Kanal kommen muss (Soldatov et al., 1997, 1998; Zühlke und Reuter et al., 1998). Wie oben erwähnt, enthält der kardiale Calciumkanal α_{1C} gleich mehrere potentielle Binderegionen für CaM, wobei gleich drei solcher Bereiche am proximalen CT lokalisiert zu sein scheinen (Adams und Tanabe, 1997; Qin et al., 1999; Zühlke et al., 1999, 2000; Pitt et al., 2001; Erickson et al. 2003). Auch der skelettmuskuläre DHPR-Carboxyterminus weist diese Bereiche auf, insbesondere sind auch in der wichtigen IQ-Region die vermeintlichen Schlüsselpositionen für eine CaM-Bindung mit den gleichen Aminosäureresten besetzt. Es verwundert daher nicht, dass auch für die Skelettmuskel-Isoform bislang von einer CaM-Bindung ausgegangen wurde, ohne dass auf den ersten Blick die Notwendigkeit einer solchen Interaktion für den Skelettmuskel Sinn macht. Gestützt wird die Ansicht einer Konformität der CaM-Interaktion der beiden Isoformen durch Studien des Hamilton-Labors an synthetischen Peptiden, welche kurze Abschnitte der potentiell mit CaM interagierenden CT-Bereiche darstellen (Pate et al., 2000; Tang et al., 2003). Obwohl in diesen Studien eine Affinität - wenn auch geringer als für die kardiale Isoform - zwischen Peptiden vom Skelettmuskeltyp (z.B. der IQ-Region) und CaM gefunden wird, muss die Aussagekraft solcher Experimente kritisch bedacht werden. Wie die Ergebnisse vorliegender Studie zeigen, ergibt sich für die „Interaktionsfähigkeit“ ausgedehnter, dem *in vivo*-Zustand eher entsprechender skelettmuskulärer CT-Bereiche ein anderes Bild. Das „Summenverhalten“ ist hier also anders als dasjenige, welches aufgrund von positiv ausfallenden Bindungsstudien an kurzen Peptiden abgeleitet werden könnte. Doch schon bei den Peptidstudien von Pate et al., (2000) offenbarte sich bei Änderung der experimentellen Bedingungen ein sehr unterschiedliches Verhalten der IQ Regionen beider Isoformen: Wurden die Bindungsstudien an mutierten CaM-Proteinen mit eingeschränkter Calciumbindungsfähigkeit (Bindung von maximal 2 statt 4 Ca^{2+} pro CaM) durchgeführt, dann wurde für das kardiale Peptid immer noch eine robuste Bindung festgestellt, während diese für die skelettmuskuläre Isoform komplett aufgehoben war. In einem weiteren

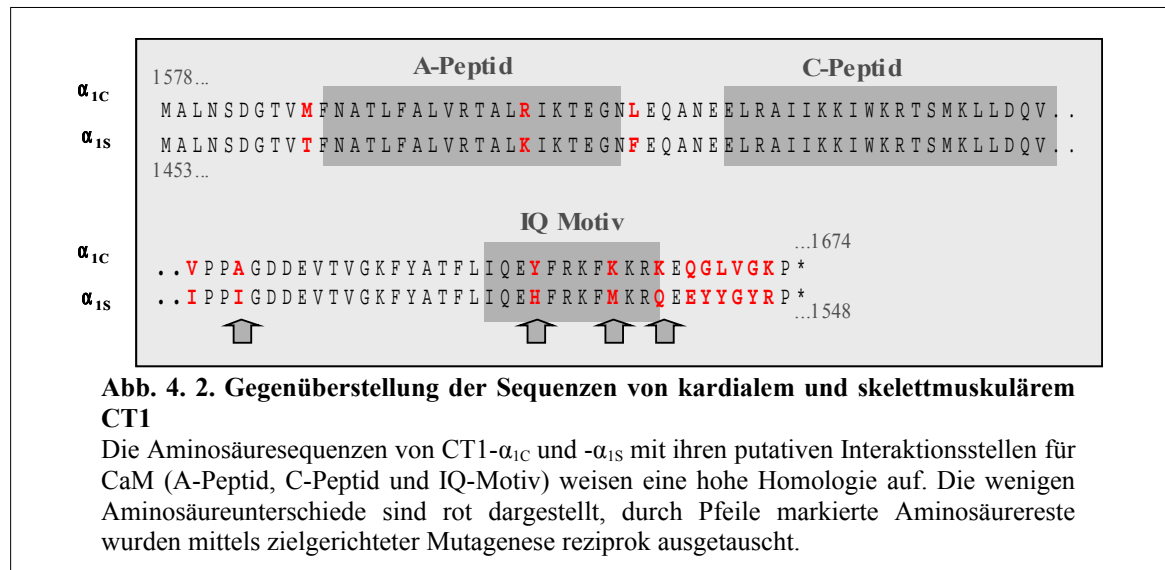
experimentellen Ansatz von Pate et al., (2000) war die Zugabe von C-Peptid in der Lage, den skelettmuskulären IQ-CaM Komplex sofort und vollständig zur Dissoziation zu bringen (Verdrängung des IQ-Peptides durch C-Peptid), während dies beim kardialen Komplex auch bei der doppelten Konzentration von C-Peptid nicht möglich war. Dieses schon auf Peptidebene signifikant unterschiedliche Bindungsverhalten mit CaM tritt bei Bindungsstudien mit ausgedehnteren CT-Bereichen noch ausgeprägter in Erscheinung, dann wird von der skelettmuskulären Isoform auch Ca²⁺-beladenes CaM nicht mehr gebunden.

Behält dieser Befund aber seine Gültigkeit auch innerhalb der Zelle? Aufgrund der Mannigfaltigkeit experimenteller Beobachtungen bei „Reagenzglasstudien“ (native PAGE; Tryptophanfluoreszenz) auf diesem Gebiet, wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, CaM-CT Bindungsstudien im sarkoplasmatischen Raum durchzuführen. Wie im Ergebnisteil dargestellt, waren die Ergebnisse dieser Studien im Einklang mit den Beobachtungen an nativen Gelen: Bindung von CaM durch die kardiale CT1-Isoform, keine CaM-Bindung des skelettmuskulären CT1 (Abb. 3. 40. und Abb. 3. 41.). Welchen Versuchsbedingungen (bezogen auf die freie Calciumkonzentration) entsprechen jedoch die bei Injektionsstudien gemachten Beobachtungen? Die sarkoplasmatische Calciumkonzentration ruhender Myotuben liegt im Bereich um 110 nM (Yang et al., 2007). Unter diesen Bedingungen sind wahrscheinlich nur die beiden hochaffinen EF-Hände am sog. C-lobe (K_d = 2 nM; Linse et al., 1991) des CaM mit Calcium besetzt. Die im Vergleich zu den Gelstudien sehr geringen sarkoplasmatischen Calciumkonzentrationen (2 mM in Gelen vs. 110 nM in Myotuben) reichen also aus, um eine Bindung zwischen kardialem CT1 und CaM zu erlauben. Aus der hier gezeigten Äquivalenz von Gelergebnissen und Injektionsstudien ergibt sich auch, dass die Ergebnisse unten diskutierter Mutationsstudien von *in vivo*-Relevanz sein könnten.

4. 4. Molekulare Determinanten des unterschiedlichen CaM-Bindungsverhaltens

Bezüglich der Fähigkeit, CaM in Gegenwart von Calcium zu binden, wurde für CT1, CT2 und CT3 der jeweiligen Isoform die gleiche Beobachtung gemacht. Somit scheint die Unfähigkeit der skelettmuskulären Isoform (bzw. die Fähigkeit der kardialen Isoform), mit dem Calciumsensor zu interagieren, in den wenigen Unterschieden innerhalb der CT1-Sequenz begründet zu sein (Abb. 4.2). Ein Cluster unterschiedlich besetzter Positionen findet sich im Bereich der IQ-Region. Interessanterweise betreffen diese Unterschiede jedoch nicht

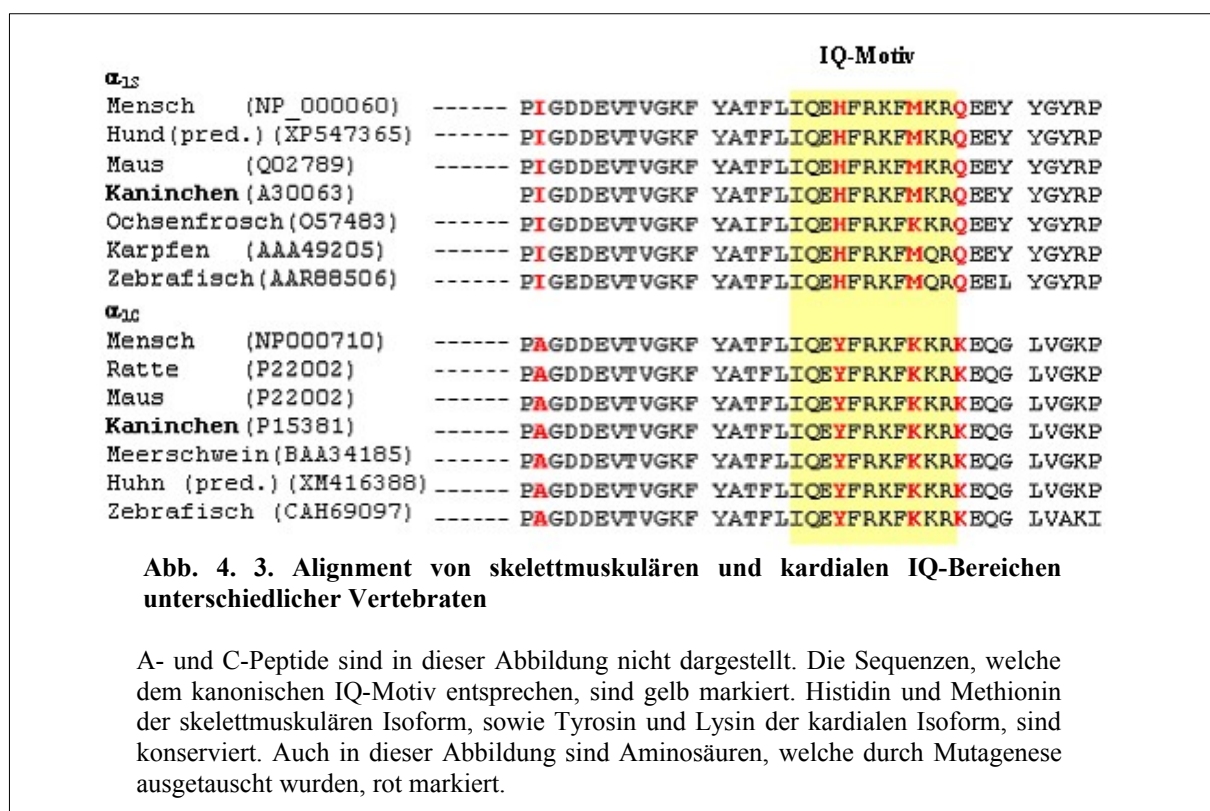
diejenigen Reste, welche die IQ-Konsensussequenz, **IQXXXRXXXXR**, für die Bindung von CaM definieren. Wie in Abb. 4.3 dargestellt, sind diese Unterschiede innerhalb der Vertebraten sehr konserviert. In diesem Bereich wurden, wie im Ergebnisteil dargestellt, sowohl einzelne reziproke Aminosäureaustausche vorgenommen als auch Doppel- und Dreifachmutationen eingefügt. Diese Änderungen hatten tatsächlich einen entgegengesetzten Effekt auf das isoformspezifische CaM-Bindungsverhalten von CT1. Insbesondere die His/Tyr- und die Met/Lys-Abweichung scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Das in der skelettmuskulären Isoform vorhandene His1532 könnte durch seine Protonierbarkeit durchaus einen ladungsbedingten (Struktur-)Unterschied zum kardialen Korrelat, dem aromatischen Tyr1657, bedingen. Zwar sollte Histidin aufgrund eines pK_s von 6.04 (freies Molekül) bei einem pH_i um 7.0 für hydrophobe Wechselwirkungen zur Verfügung stehen, wie sie in den Kristallstrukturen des kardialen CaM-Komplexes für Tyrosin gezeigt sind (Fallon et al., 2005; Van Petegem et al., 2005), doch kann der pK_s von Histidin, wenn es Teil von Peptidketten ist, stark von dem Wert für das freie Molekül abweichen (Singer und Forman-Kay, 1997). Dann könnte dieser Unterschied allerdings zum unterschiedlichen Bindungsverhalten der Isoformen beitragen.



Der gleichsinnige Effekt des $K \rightleftharpoons M$ -Austausches läßt auf einen Beitrag auch dieser Position für die Bindung von CaM schließen. Hierbei könnte das Einfügen des polaren Lysins ($pK_s=10.79$) zu der beobachteten Stärkung der CaM-Bindung durch den skelettmuskulären CT1 geführt haben. Tatsächlich ist - neben Tyr1657 - auch Lys1662 in der von Van Petegem

et al., (2005) präsentierten Kristallstruktur Teil des mit CaM interagierenden Bereiches des kardialen IQ-Peptides.

Der weiter stromabwärts (in Richtung C-Terminus) durchgeführte, zusätzliche Austausch $K \rightleftharpoons Q$ führte zu keiner weiteren Verstärkung der Effekte. Interessanterweise ist in der Studie von Van Petegem et al., (2005) auch diese Position mittels polarer Interaktionen an der Bindung von CaM beteiligt. Andererseits fehlen in der von Fallon et al., (2005) gelösten Struktur des Komplexes diese Interaktionen vollständig. Scheinbar tritt der Beitrag dieser Position für die Bindung von CaM durch kardiales CT1 hinter derjenigen von Tyr1657 und Lys1662 zurück.



Wie aus den in dieser Arbeit gezeigten Gelen ersichtlich, war auch die Dreifachmutation $Y \rightleftharpoons H$ & $K \rightleftharpoons M$ & $K \rightleftharpoons Q$ nicht in der Lage, den Anfangsbefund (Bindung von CaM durch kardialen CT1, keine CaM-Bindung durch die skelettmuskuläre Isoform) komplett umzukehren. Zwei mögliche Erklärungen kommen hierfür in Frage:

Erstens, stromaufwärts (in Richtung N-Terminus) gelegene, unterschiedlich besetzte Positionen, sind direkt oder indirekt an der Bindung beteiligt. Zwischen dem Beginn des C-terminus (Position 1381 der skelettmuskulären Isoform, Position 1506 der kardialen Isoform)

und dem Tyrosinrest der IQ-Region existieren 8 Abweichungen. Da CT1 erst ab Position 1453 (skelettmuskulär) bzw. 1578 (kardial) repräsentiert, enthält es N-terminal vom IQ-Motiv nur 5 der unterschiedlich besetzten Positionen. Von diesen könnte wiederum nur von zwei Abweichungen, Thr1462 vs. Met 1587 und Phe1483 vs. Leu1608, ein Einfluss auf die Bindung von CaM ausgehen. Bei den übrigen abweichenden Positionen besitzen die Aminosäurereste sehr ähnliche Eigenschaften (z.B. Ile1510 vs. Val1635). Bezüglich der Abweichung Ile1513 vs. Ala1638 kann angenommen werden, dass sie im Zusammenhang mit der Bindung von CaM wahrscheinlich keine große Rolle spielt. Zumindest hatte der Aminosäureaustausch an dieser Position keinerlei Effekte. Diese Position befindet sich zwischen den Bereichen C und IQ, welche (bei der kardialen Isoform) als Peptide mit CaM interagieren.

Zweitens, stromabwärts vom IQ-Motiv gelegene Abweichungen der CT1-Sequenz beider Isoformen. Zwar ist dieser Bereich in der Kristallstruktur des kardialen CaM-IQ-Komplexes nicht Teil der Bindungsdomäne, doch kann umgekehrt nicht ausgeschlossen werden, dass die abweichenden Aminosäurereste am C-terminalen Ende des skelettmuskulären CT1 die Bindung schwächen.

Somit kann festgehalten werden, dass hier einige wichtige Determinanten eines konservierten „tuning“ der Affinität zum Calciumsensor CaM identifiziert wurden.

	Hydrophob	Neutral	Hydrophil
Groß	Isoleucin (I)	Tyrosin (Y)	Lysin (K)
Klein	Alanin (A)		
	aliphatisch	ungeladen	basisch
			Amid
			ungeladen Amid
			polar

Isoleucin (I)
Methionin (M)
Tyrosin (Y)
Histidin (H)
Lysin (K)
Glutamin (Q)

aliphatisch
Schwefelhaltig
ungeladen
Amid
basisch
ungeladen
Amid

polar

Abb. 4. 4. Einige chemische Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit relevanten Aminosäuren

4. 5. Funktionelle Bedeutung des unterschiedlichen CaM-Bindungsverhaltens

Bezogen auf α_{1C} :

Hier ist der Zweck einer starken Affinität zum Calciumsensor einleuchtend: CaM scheint bei dieser Isoform permanent gebunden zu sein und zwar an einer strategisch wichtigen Stelle des kardialen DHPR, in der Nähe der Kanalpore (Kim et al., 2004; Mori et al., 2004; Morad und Soldatov, 2005; Halling et al., 2006; Cens et al., 2006). Diese Position erlaubt die schnelle Erfassung des für die elektromechanische Kopplung im Herzen zwar benötigten, doch in großer Menge auch toxischen, Calciums. Es wird angenommen, dass die Calciumbeladung des gebundenen CaM innerhalb von Millisekunden zu Umordnungen von Strukturen an der Innenseite der Kanalpore führt. Unter Beteiligung des Peptidlinkers, welcher die DHPR-Domänen I und II verbindet („I-II Loop“), erfolgt dann die Verlegung der Pore. Eines der zahlreichen, in der Literatur vorgeschlagenen möglichen Szenarien ist in Abb. 4. 5. wiedergegeben. Es ist dem Übersichtsartikel von Halling et al. (2006) entnommen. Im Herzen trägt dieser Mechanismus entscheidend zur Inaktivierung der L-Typ Calciumströme und somit zur zeitlichen Begrenzung der Erregung bei.

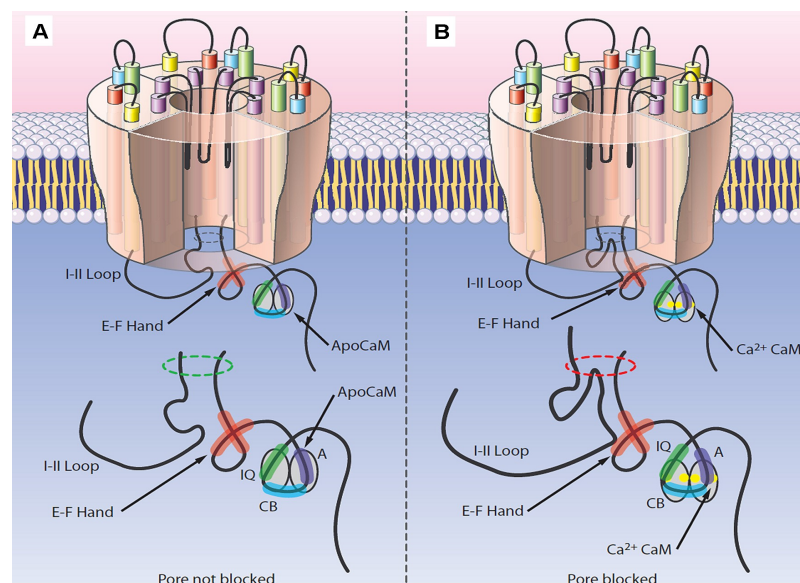


Abb. 4.5. Schematische Darstellung möglicher Vorgänge während der calciumabhängigen Inaktivierung spannungsgesteuerter L-Typ Kanäle am Beispiel des Ca_v1.2 (Herzisoform)

A: Kanalpore offen, Calciumeinstrom wäre bei Depolarisation möglich. CaM ist hierbei in der ApoCaM-Form, daher (in diesem Modell) ist keine Interaktion des EF-Hand Motivs mit der I-II Loop möglich und deshalb erfolgt keine Okklusion der Pore.

B: Calciumeinstrom führt zur Bindung von Calciumionen durch CaM, es kommt zu Konformationsänderungen, welche eine Interaktion des I-II Linkers mit der EF-Hand erlauben, der I-II Linker kann nun die Pore blockieren. Die hier gezeigte Abbildung ist der Arbeit von Halling et al., (2006) entnommen.

Die eminente Bedeutung der CaM-gesteuerten, calciumabhängigen Inaktivierung für die Begrenzung der kardialen Erregung hat die Arbeitsgruppe um David Yue eindrucksvoll demonstriert (Alseikhan et al., 2002). Eine Überexpression von genetisch manipuliertem, zur Calciumbindung nicht mehr befähigten CaM in adulten Kardiomyozyten führte zur Verlängerung der Aktionspotentialdauer um den Faktor 4 – 5 (400 ms vs. 2 sec). Es ist anzunehmen, dass die Überexpression des mutierten CaM zur Verdrängung der endogenen Moleküle von ihren Bindungsstellen am CT der Calciumkanäle geführt hatte. Die nun gebundenen mutierten CaM- Proteine wären (entsprechend des in Abb. 4. 5. gezeigten Modells) nach Depolarisation der Kardiomyozyten nicht mehr in der Lage, eine calciumabhängige Konformationsänderung mit nachfolgender Kanalinaktivierung zu bewirken. Die Aktionspotentialdauer der Herzzellen würde dann maßgeblich von der wesentlich langsamer verlaufenden, spannungsabhängigen Kanalinaktivierung bestimmt (sowie dem zusätzlichen Beitrag durch verzögert einsetzende Kaliumströme).

Eine weitere Bedeutung der engen Assoziation von CaM mit Ca_v1.2 (letzterer wird auch neuronal stark exprimiert) könnte darin liegen, dass der Calciumsensor Teil einer Signalkaskade ist, welche exklusiv durch Calciumionen aktiviert wird, die über DHPR in die Zelle gelangen (Dolmetsch et al., 2001; Morad und Soldatov, 2005). Das besondere hierbei wäre also, dass für die Aktivierung der Signalkaskade nicht eine globale Erhöhung von [Ca²⁺]_i, sondern vielmehr der Eintrittsort von Calcium ausschlaggebend sein würde. Nach Ansicht von Dolmetsch et al. spezifiziert ein solcher Mechanismus die Zellantwort (Expression bestimmter calciumabhängiger Gene) auf einen Calciumeinstrom. Die Autoren präsentieren Befunde, wonach am CT von Ca_v1.2 gebundenes CaM essentiell für die Weitergabe des Calciumsignals an den Zellkern (CREB, MEF-2) ist, und zwar über Aktivierung des MAPK-Weges. Die hierdurch exprimierten Gene würden in so wichtige Prozesse wie neuronales Überleben bzw. neuronale Plastizität eingreifen.

Bezogen auf α_{1S} :

Betrachtet man die Hauptaufgabe des DHPR im Skelettmuskel und die spannungsgetriggerte Induktion von Konformationsänderungen am RyR₁, dann sollte das Fehlen einer Bindung von CaM keinen nennenswerten Einfluss haben. Ca_v1.1-Ströme aktivieren sehr langsam und sind sehr klein, verglichen mit dem entsprechenden Verhalten der kardialen Isoform. Die Dauer eines typischen skelettmuskulären Aktionspotentials (ca. 10 ms) reicht kaum aus, um

nennenswerte Calciumströme auszulösen (Sanchez und Stefani, 1978) . In dieser Zeit hat jedoch der Spannungssensor das Signal schon längst an den RyR₁ weitergegeben. Ein effektiver Mechanismus zur Kanalinaktivierung, wie er bei der kardialen Isoform gegeben ist, sollte daher bei einem Kanal, der während eines Aktionspotentials kaum aktiv wird, nicht von so großer Bedeutung sein. Dass die eigentliche Calciumkanal-Funktion des skelettmuskulären DHPR für die elektromechanische Kopplung entbehrlich ist, zeigt sich am Beispiel des DHPR in Zebrafisch-Muskulatur: Diese „Kanäle“ leiten keine Calciumströme, sind jedoch perfekte Spannungssensoren für die Übertragung des Signals auf den Ryanodinrezeptor (Schredelseker et al., 2005).

Für die Kommunikation zwischen skelettmuskulärem DHPR und dem RyR₁ im Rahmen der elektromechanischen Kopplung ist die skelettmuskelspezifische Sequenz der Verbindungsschleife zwischen Domäne II und III (II-III Loop) des DHPR ausschlaggebend (Tanabe et al., 1990). Wahrscheinlich interagiert hierbei die II-III Loop direkt mit dem RyR₁. Doch auch der CT des DHPR scheint an den Protein-Protein-Interaktionen der beiden Kanäle beteiligt zu sein. Sencer et al. (2001) konnten zeigen, dass rekombinant hergestellter, skelettmuskulärer CT Affinität zum RyR₁ besitzt. Die Autoren präsentieren Befunde, wonach für diese Interaktion skelettmuskuläre CT-Bereiche eingesetzt werden, welche den CaM bindenden Regionen der kardialen Isoform entsprechen. Somit könnte die evolutionär ausgebildete herabgesetzte bzw. fehlende Affinität skelettmuskulärer CT-Bereiche zu CaM diese Bereiche für Interaktionen mit dem RyR₁ freigeben, welche den Komplex stabilisieren (Tetraden). Tatsächlich führt die Anwesenheit von RyR₁ in den skelettmuskulären Triaden zu signifikanten Veränderungen der räumlichen Umgebung des Carboxyterminus von DHP-Rezeptoren (Papadopoulos et al., 2004; Lorenzon et al., 2004).

4. 6. Ausblick

Erste funktionelle, elektrophysiologische Untersuchungen an der kardialen (α_{1C}) Doppelmutante **Y1658H** und **K1663M** wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. K. Beam, Department of Physiology and Biophysics, UCHSC Denver / Colorado durchgeführt. Expressionsvektoren mit den kompletten cDNAs von α_{1C} (WT bzw. Doppelmutante), hergestellt und getestet von der Verfasserin dieser Arbeit, wurden zusammen mit den akzessorischen Untereinheiten β_{1a} und $\alpha_2\delta$ in HEK-Zellen exprimiert und mittels "whole cell patch clamp" untersucht (Hamill et al., 1981; Beam und Knudson, 1988). Die Ergebnisse bezüglich des Inaktivierungsverhaltens des Wildtyps wurden mit denen der

Doppelmutante verglichen. Hierbei konnten tatsächlich Unterschiede im Inaktivierungsverhalten festgestellt werden. Durch den Aminosäureaustausch (**Y1658H** und **K1663M**) in der kardialen α_1 -Untereinheit wurde die Inaktivierung im Vergleich zum Wildtyp abgeschwächt (Abb. 4. 6.). Tyrosin und Lysin, die sich im IQ-Motiv des kardialen Wildtyps befinden scheinen somit nicht nur einen Einfluss auf die Interaktion mit CaM zu haben, sie beeinflussen auch eindeutig den Verlauf der calciumabhängigen Inaktivierung am kardialen DHPR.

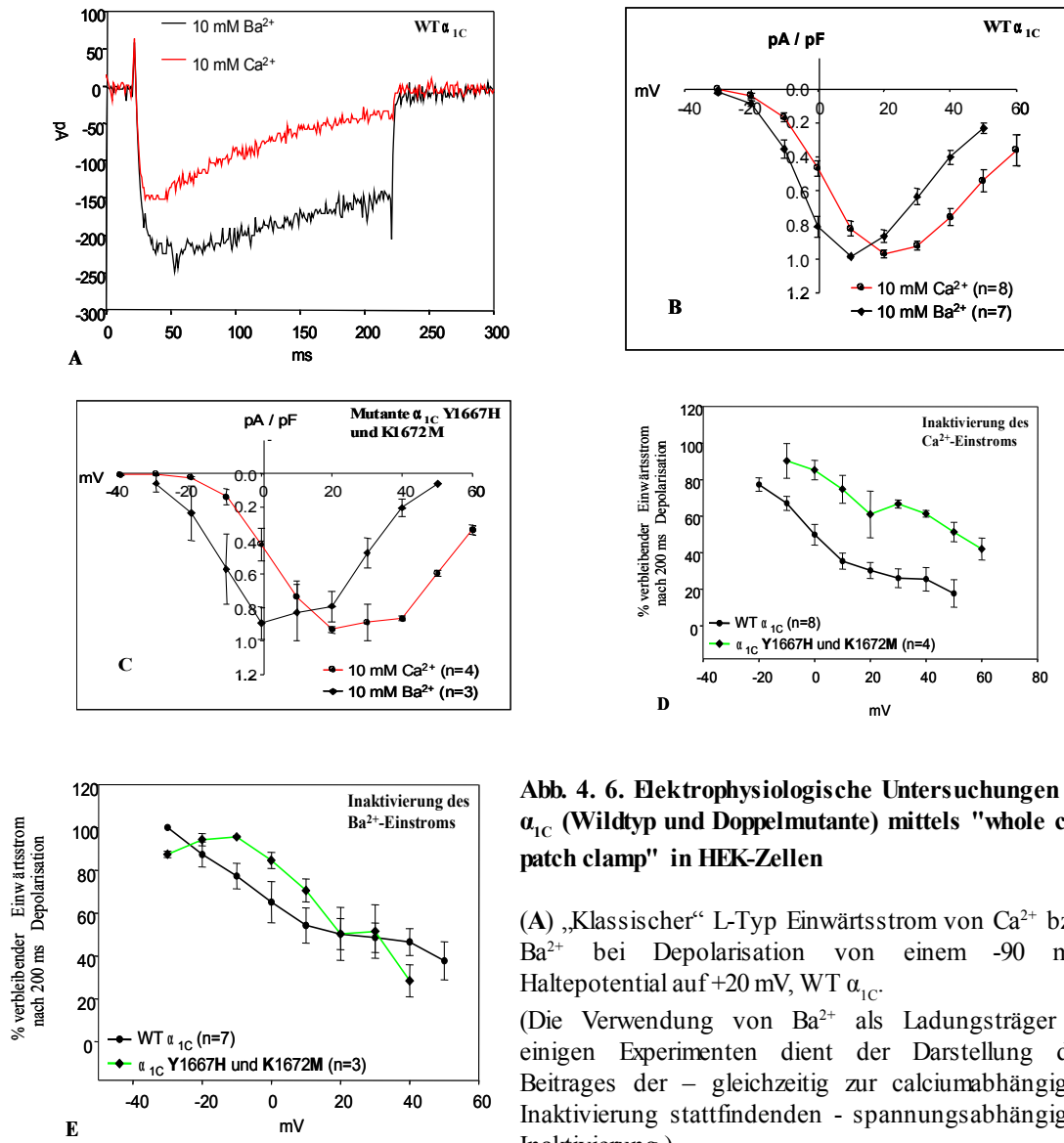


Abb. 4. 6. Elektrophysiologische Untersuchungen an α_{1C} (Wildtyp und Doppelmutante) mittels "whole cell patch clamp" in HEK-Zellen

(A) „Klassischer“ L-Typ Einwärtsstrom von Ca^{2+} bzw. Ba^{2+} bei Depolarisation von einem -90 mV -Haltepotential auf $+20 \text{ mV}$, $\text{WT } \alpha_{1C}$.
 (Die Verwendung von Ba^{2+} als Ladungsträger in einigen Experimenten dient der Darstellung des Beitrages der – gleichzeitig zur calciumabhängigen Inaktivierung stattfindenden - spannungsabhängigen Inaktivierung.)

(B) Mittlere Ca^{2+} - und Ba^{2+} -Einwärtsströme, gemessen für den Wildtyp-Kanal α_{1C} für verschiedene Depolarisationsstufen im Bereich zwischen -30 mV und $+60 \text{ mV}$.

(C) Mittlere Ca^{2+} - und Ba^{2+} -Einwärtsströme, gemessen für die α_{1C} Doppelmutante **Y1667H & K1672M** für verschiedene Depolarisationsstufen im Bereich zwischen -30 mV und $+60 \text{ mV}$.

(D) Nach 200 ms langer Depolarisation auf verschiedene Potentiale (Abszisse) verbleibende Calciumeinwärtsströme (Ordinate) als Maß für die **calciumabhängige Kanalinaktivierung**. Wildtyp α_{1C} : schwarz, Doppelmutante **Y1667H & K1672M**: grün. Die Inaktivierung des Ca^{2+} -Einstroms erreicht beim α_{1C} -Wildtyp bei gegebenem Depolarisationsniveau ein wesentlich stärkeres Ausmaß als dies bei der Doppelmutante **Y1667H & K1672M** der Fall ist.

(E) Nach 200 ms langer Depolarisation auf verschiedene Potentiale (Abszisse) verbleibende Bariumeinwärtsströme (Ordinate) als Maß für die **spannungsabhängige Kanalinaktivierung**. Wildtyp α_{1C} : schwarz, Doppelmutante **Y1667H & K1672M**: grün. Die Inaktivierung des Ba^{2+} -Einstroms zeigt im Vergleich zur derjenigen der Calciumströme (D) keinen großen Unterschied zwischen α_{1C} -Wildtyp und der Doppelmutante **Y1667H & K1672M**.

4. 7. Zusammenfassung

In dieser Dissertation ist die Interaktion zwischen der α_{1S} -Untereinheit des skelettmuskulären Dihydropyridinrezeptors (DHPR) und dem ubiquitären Calciumsensor Calmodulin (CaM) untersucht worden. Die Interaktion zwischen CaM und dem Carboxyterminus des DHPR bildet bei der kardialen Untereinheit (α_{1C}) die Basis für die Inaktivierung des Kanals und trägt somit wesentlich zur Begrenzung der zeitlichen Ausdehnung des Herz-Aktionspotentials bei. Eine Bindung von CaM wurde bislang aufgrund der hohen Sequenzhomologie beider Isoformen im carboxyterminalen (CT) Bereich auch für die skelettmuskuläre Isoform angenommen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden - normalerweise unlösliche - ausgedehnte CT Fragmente von α_{1S} und α_{1C} in Bakterien exprimiert und in löslicher Form aufgereinigt. In Bindestudien konnte gezeigt werden, dass skelettmuskuläre CT-Bereiche nicht mit CaM interagieren, wohingegen die entsprechenden Bereiche von α_{1C} sowohl bei Proteinbindestudien *in vitro* als auch nach Expression innerhalb intakter Muskelzellen einen stabilen Komplex mit CaM bilden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen skelettmuskulärer und kardialer CT-Bereiche von DHP-Rezeptoren verschiedener Vertebraten zeigt für einige wenige Positionen eine innerhalb der jeweiligen Isoform konservierte, abweichende Belegung. Mittels gezielten, reziproken Aminosäureaustausches zwischen den beiden CT-Isoformen konnte die wichtige Bedeutung zweier definierter Positionen für die CaM-Bindung aufgedeckt werden: Werden die innerhalb eines IQ-ähnlichen Motivs im skelettmuskulären CT vorkommenden Reste Histidin und Methionin durch die in entsprechender Position innerhalb des kardialen CT vorkommenden Reste Tyrosin und Lysin ersetzt, dann vermag auch skelettmuskulärer CT den Calciumsensor zu binden. Die entsprechenden Austausche führen bei der kardialen CT-Isoform zu einer Schwächung der CaM-Bindung. Weiterführende, in Kooperation stattfindende elektrophysiologische Untersuchungen weisen auf eine funktionelle Bedeutung dieser unterschiedlich belegten Positionen hin. Wahrscheinlich ist es im Zuge der Spezialisierung der skelettmuskulären DHPR-Isoform zum praktisch reinen Spannungssensor zu einer Schwächung oder gar zum Verlust der Fähigkeit gekommen, den Calciumsensor CaM zu binden, welcher in der kardialen Isoform die Calciumeinwärtsströme sinnvollerweise begrenzt.

4. 8. Perspektiven

Die in dieser Dissertation bearbeitete Fragestellung bezüglich den Determinanten der Interaktion zwischen spannungsgesteuerten Calciumkanälen und dem Calciumsensor

Calmodulin wirft trotz der gewonnenen Erkenntnisse weitere Fragen auf. Es konnten zwar zwei Aminosäuren identifiziert werden, welche die Bindung mit CaM beeinflussen, es ist aber durch die bisherige Mutagenese nicht gelungen, eine komplette Umkehr der isoformspezifischen Eigenschaften von skelettmuskulärem und kardialem CT zu erzielen. Um die Schlüsselpositionen für eine solche Umkehr zu identifizieren, müssten alle noch nicht untersuchten aberanten Aminosäuren von CT1 reziprok ausgetauscht werden. Die Konsequenzen für die Bindung von CaM müssten dann für jedes Konstrukt untersucht werden. Schließlich müssten die Auswirkungen der Aminosäureaustausche, welche in *vitro* zu einer kompletten Umkehr des CaM Bindungsverhaltens beider CT-Isoformen führen, auch mittels elektrophysiologischer Methodik innerhalb intakter Zellen und nach Expression der kompletten Kanäle untersucht werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams,B, T Tanabe, 1997, Structural regions of the cardiac Ca channel alpha subunit involved in Ca-dependent inactivation: *J.Gen.Physiol*, v. 110, p. 379-389.
- Adams,BA, K G Beam, 1989, A novel calcium current in dysgenic skeletal muscle: *J.Gen.Physiol*, v. 94, p. 429-444.
- Adams,BA, T Tanabe, A Mikami, S Numa, K G Beam, 1990, Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs: *Nature*, v. 346, p. 569-572.
- Adams,BA, K G Beam, 1990, Muscular dysgenesis in mice: a model system for studying excitation-contraction coupling: *FASEB J.*, v. 4, p. 2809-2816.
- Adams,BA, K G Beam, 1991, Contractions of dysgenic skeletal muscle triggered by a potentiated, endogenous calcium current: *J.Gen.Physiol*, v. 97, p. 687-696.
- Adams,BA, Y Mori, M S Kim, T Tanabe, K G Beam, 1994, Heterologous expression of BI Ca²⁺ channels in dysgenic skeletal muscle: *J.Gen.Physiol*, v. 104, p. 985-996.
- Adams,BA, T Tanabe, K G Beam, 1996, Ca²⁺ current activation rate correlates with alpha 1 subunit density: *Biophys.J.*, v. 71, p. 156-162.
- Alseikhan BA, CD, DeMaria, HM, Colecraft, DT, Yue, 2002, Engineered calmodulins reveal the unexpected eminence of Ca²⁺ channel inactivation in controlling heart excitation: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 99, p. 17185-17190.
- Anderson,ME, 2001, Ca²⁺-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels: is a unifying mechanism at hand?: *J.Mol.Cell Cardiol.*, v. 33, p. 639-650.
- Armstrong,CM, F M Bezanilla, P Horowicz, 1972, Twitches in the presence of ethylene glycol bis(-aminoethyl ether)-N,N'-tetracetic acid: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 267, p. 605-608.
- Arreola,J, J Calvo, M C Garcia, J A Sanchez, 1987, Modulation of calcium channels of twitch skeletal muscle fibres of the frog by adrenaline and cyclic adenosine monophosphate: *J.Physiol*, v. 393, p. 307-330.
- Bahler,M, A Rhoads, 2002, Calmodulin signaling via the IQ motif: *FEBS Lett.*, v. 513, p. 107-113.
- Beam,KG, B A Adams, T Niidome, S Numa, T Tanabe, 1992, Function of a truncated dihydropyridine receptor as both voltage sensor and calcium channel: *Nature*, v. 360, p. 169-171.
- Beam,KG, C M Knudson, 1988, Calcium currents in embryonic and neonatal mammalian skeletal muscle: *J. Gen. Physiol.*, v. 91, p. 781-798.

- Bean, BP, 1989, Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence: *Nature*, v. 340, p. 153-156.
- Bean, BP, 1989, Classes of calcium channels in vertebrate cells: *Annu. Rev. Physiol.*, v. 51, p. 367-384.
- Biel, M, P Ruth, E Bosse, R Hullin, W Stuhmer, V Flockerzi, F Hofmann, 1990, Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung: *FEBS Lett.*, v. 269, p. 409-412.
- Bradford, MM, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254.
- Carbone, E, H D Lux, 1984, A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones: *Nature*, v. 310, p. 501-502.
- Castellano, A, E Perez-Reyes, 1994, Molecular diversity of Ca²⁺ channel beta subunits: *Biochem. Soc. Trans.*, v. 22, p. 483-488.
- Cens T, M, Rousset, JP, Leyris, P, Fesquet, P, Charnet, 2006, Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca(2+) channels: *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v. 90, p. 104-117.
- Chin, D, A R Means, 2000, Calmodulin: a prototypical calcium sensor: *Trends Cell Biol.*, v. 10, p. 322-328.
- Curtis, BM, W A Catterall, 1984, Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules: *Biochemistry*, v. 23, p. 2113-2118.
- Curtis, BM, W A Catterall, 1985, Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 82, p. 2528-2532.
- De Jongh, KS, C, Warner, AA, Colvin, WA, Catterall, 1991, Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 88, p. 10778-10782
- De Leon, M, Y Wang, L Jones, E Perez-Reyes, X Wei, T W Soong, T P Snutch, D T Yue, 1995, Essential Ca²⁺-binding motif for Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels: *Science*, v. 270, p. 1502-1506.
- De Waard, M, M Pragnell, K P Campbell, 1994, Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain: *Neuron*, v. 13, p. 495-503.

- De Marco, V, G Stier, S Blandin, A, de Marco, 2004, The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 322, p. 766-771.
- Dolmetsch,RE, R S Lewis, C C Goodnow, J I Healy, 1997, Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration: *Nature*, v. 386, p. 855-858.
- Dzhura,I, Y Wu, R J Colbran, J D Corbin, J R Balsler, M E Anderson, 2002, Cytoskeletal disrupting agents prevent calmodulin kinase, IQ domain and voltage-dependent facilitation of L-type Ca²⁺ channels: *J.Physiol*, v. 545, p. 399-406.
- Dzhura,I, Y Wu, R Zhang, R J Colbran, S L Hamilton, M E Anderson, 2003, C terminus L-type Ca²⁺ channel calmodulin-binding domains are 'auto-agonist' ligands in rabbit ventricular myocytes: *J.Physiol*, v. 550, p. 731-738.
- Erickson,MG, B A Alseikhan, B Z Peterson, D T Yue, 2001, Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca⁽²⁺⁾ channels revealed by FRET in single living cells: *Neuron*, v. 31, p. 973-985.
- Erickson,MG, H Liang, M X Mori, D T Yue, 2003, FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca²⁺ channel CaM preassociation: *Neuron*, v. 39, p. 97-107.
- Fallon,JL, D B Halling, S L Hamilton, F A Quioco, 2005, Structure of calmodulin bound to the hydrophobic IQ domain of the cardiac Ca(v)1.2 calcium channel: *Structure.*, v. 13, p. 1881-1886.
- Fleming,NW, B K Lewis, D A White, K L Dretchen, 1993, Acute effects of calcitonin gene-related peptide on the mechanical and electrical responses of the rat hemidiaphragm: *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, v. 265, p. 1199-1204.
- Garcia,J, T Tanabe, K G Beam, 1994, Relationship of calcium transients to calcium currents and charge movements in myotubes expressing skeletal and cardiac dihydropyridine receptors: *J.Gen.Physiol*, v. 103, p. 125-147.
- Gonzalez-Serratos,H, L Hill, R Valle-Aguilera, 1981, Effects of catecholamines and cyclic amp on excitation--contraction coupling in isolated skeletal muscle fibres of the frog: *J.Physiol*, v. 315, p. 267-282.
- Grabner,M, R T Dirksen, K G Beam, 1998, Tagging with green fluorescent protein reveals a distinct subcellular distribution of L-type and non-L-type Ca²⁺ channels expressed in dysgenic myotubes: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 95, p. 1903-1908.
- Grabner,M, R T Dirksen, N Suda, K G Beam, 1999, The II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor is responsible for the Bi-directional coupling with the ryanodine receptor: *J.Biol.Chem.*, v. 274, p. 21913-21919.
- Grueter,CE, S A Abiria, I Dzhura, Y Wu, A J Ham, P J Mohler, M E Anderson, R J Colbran, 2006, L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII: *Mol.Cell*, v. 23, p. 641-650.

- Gurnett,CA, M De Waard, K P Campbell, 1996, Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction: *Neuron*, v. 16, p. 431-440.
- Halling, DB, H, Aracena-Parks, SL, Hamilton, 2006, Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin: *Sci STKE*., v. 318, Review.
- Hamill,OP, A Marty, E Neher, B Sakmann, F J Sigworth, 1981, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches: *Pflugers Arch.*, v. 391, p. 85-100.
- Hess,P, 1990, Calcium channels in vertebrate cells: *Annu.Rev.Neurosci.*, v. 13, p. 337-356.
- Hofmann,F, M Biel, V Flockerzi, 1994, Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity: *Annu.Rev.Neurosci.*, v. 17, p. 399-418.
- Hofmann,F, L Lacinova, N Klugbauer, 1999, Voltage-dependent calcium channels: from structure to function: *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.*, v. 139, p. 33-87.
- Hulme JT, K, Konoki, TW, Lin, MA, Gritsenko, DG, Camp 2nd, DJ, Bigelow, WA, Catterall, 2005, Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 102, p. 5274-5279.
- Ivanina,T, Y Blumenstein, E Shistik, R Barzilai, N Dascal, 2000, Modulation of L-type Ca²⁺ channels by gbeta gamma and calmodulin via interactions with N and C termini of alpha 1C: *J.Biol.Chem.*, v. 275, p. 39846-39854.
- Jay,SD, S B Ellis, A F McCue, M E Williams, T S Vedvick, M M Harpold, K P Campbell, 1990, Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle: *Science*, v. 248, p. 490-492.
- Jurado,LA, P S Chockalingam, H W Jarrett, 1999, Apocalmodulin: *Physiol Rev.*, v. 79, p. 661-682.
- Kapust,RB, J Tozser, T D Copeland, D S Waugh, 2002, The P1' specificity of tobacco etch virus protease: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 294, p. 949-955.
- Kepplinger,KJ, H Kahr, G Forstner, M Sonnleitner, H Schindler, T Schmidt, K Groschner, N M Soldatov, C Romanin, 2000, A sequence in the carboxy-terminus of the alpha(1C) subunit important for targeting, conductance and open probability of L-type Ca⁽²⁺⁾ channels: *FEBS Lett.*, v. 477, p. 161-169.
- Kim,J, S Ghosh, D A Nunziato, G S Pitt, 2004, Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca²⁺ channels: *Neuron*, v. 41, p. 745-754.
- Knudson,CM, N Chaudhari, A H Sharp, J A Powell, K G Beam, K P Campbell, 1989, Specific absence of the alpha 1 subunit of the dihydropyridine receptor in mice with muscular dysgenesis: *J.Biol.Chem.*, v. 264, p. 1345-1348.

- Lee,KS, E Marban, R W Tsien, 1985, Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium: *J.Physiol*, v. 364, p. 395-411.
- Liang,H, C D DeMaria, M G Erickson, M X Mori, B A Alseikhan, D T Yue, 2003, Unified mechanisms of Ca^{2+} regulation across the Ca^{2+} channel family: *Neuron*, v. 39, p. 951-960.
- Linse, S, A, Helmersson, S, Forsen, 1991, Calcium binding to calmodulin and its globular domains: *J. Biol. Chem.* V. 266, p. 8050-8054.
- Llinas,R, M Sugimori, D E Hillman, B Cherksey, 1992, Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca^{2+} channels in the mammalian central nervous system: *Trends Neurosci.*, v. 15, p. 351-355.
- Lorenzon NM, CS, Haarmann, EE, Norris, S, Papadopoulos, KG, Beam, 2004, Metabolic biotinylation as a probe of supramolecular structure of the triad junction in skeletal muscle: *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 44057-44064.
- Luttgau,HC, W Melzer, W Spiecker, 1977, The effects of Ca^{2+} removal on excitation-contraction coupling [proceedings]: *J.Physiol*, v. 271, p. 45P.
- McLellan,T, F Sherman, 1991, The influence of site-specificity of single amino acid substitutions on electrophoretic separation of yeast iso-1-cytochrome c: *J.Mol.Evol.*, v. 33, p. 395-401.
- Melzer,W, A Herrmann-Frank, H C Luttgau, 1995, The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1241, p. 59-116.
- Morad M, N, Soldatov, 2005, Calcium channel inactivation: possible role in signal transduction and Ca^{2+} signaling: *Cell Calcium*, v. 38, p. 223-231.
- Mori, MX, MG, Erickson, DT, Yue, 2004, Functional stoichiometry and local enrichment of calmodulin interacting with Ca^{2+} channels: *Science*, v. 304, p. 432-435.
- Nakai,J, B A Adams, K Imoto, K G Beam, 1994, Critical roles of the S3 segment and S3-S4 linker of repeat I in activation of L-type calcium channels: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 91, p. 1014-1018.
- Nakai,J, T Tanabe, T Konno, B Adams, K G Beam, 1998, Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling: *J.Biol.Chem.*, v. 273, p. 24983-24986.
- von Neuhoff, N, A Pich, 2005, Mass spectrometry-based methods for biomarker detection and analysis: *Drug Discovery Today*, v. 2, p. 361-367.
- Nguyen,AW, P S Daugherty, 2005, Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET: *Nat.Biotechnol.*, v. 23, p. 355-360.
- Nowycky,MC, A P Fox, R W Tsien, 1985, Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity: *Nature*, v. 316, p. 440-443.

- Numa,S, T Tanabe, H Takeshima, A Mikami, T Niidome, S Nishimura, B A Adams, K G Beam, 1990, Molecular insights into excitation-contraction coupling: Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol., v. 55, p. 1-7.
- Oz,M, G B Frank, 1991, Decrease in the size of tetanic responses produced by nitrendipine or by extracellular calcium ion removal without blocking twitches or action potentials in skeletal muscle: J.Pharmacol.Exp.Ther., v. 257, p. 575-581.
- Papadopoulos,S, V Leuranguer, R A Bannister, K G Beam, 2004, Mapping sites of potential proximity between the dihydropyridine receptor and RyR1 in muscle using a cyan fluorescent protein-yellow fluorescent protein tandem as a fluorescence resonance energy transfer probe: J.Biol.Chem., v. 279, p. 44046-44056.
- Pate,P, J Mochca-Morales, Y Wu, J Z Zhang, G G Rodney, I I Serysheva, B Y Williams, M E Anderson, S L Hamilton, 2000, Determinants for calmodulin binding on voltage-dependent Ca²⁺ channels: J.Biol.Chem., v. 275, p. 39786-39792.
- Peterson,BZ, C D DeMaria, J P Adelman, D T Yue, 1999, Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels: Neuron, v. 22, p. 549-558.
- Pitt,GS, R D Zuhlke, A Hudmon, H Schulman, H Reuter, R W Tsien, 2001, Molecular basis of calmodulin tethering and Ca²⁺-dependent inactivation of L-type Ca²⁺ channels: J.Biol.Chem., v. 276, p. 30794-30802.
- Porath,J, J Carlsson, I Olsson, G Belfrage, 1975, Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation: Nature, v. 258, p. 598-599.
- Qin,N, R Olcese, M Bransby, T Lin, L Birnbaumer, 1999, Ca²⁺-induced inhibition of the cardiac Ca²⁺ channel depends on calmodulin: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 96, p. 2435-2438.
- Randall,A, R W Tsien, 1995, Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons: J.Neurosci., v. 15, p. 2995-3012.
- Reuter,H, 1983, Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs: Nature, v. 301, p. 569-574.
- Rios,E, G Pizarro, E Stefani, 1992, Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling: Annu.Rev.Physiol, v. 54, p. 109-133.
- Rodney,G G, Moore, C P, Williams, B Y, Zhang, J Z, Krol, J, Pedersen, S E, Hamilton, S L, 2001,Calcium binding to calmodulin leads to an N-terminal shift in its binding site on the ryanodine Receptor: J.Biol.Chem, v. 276, p. 2069-2074
- Rohrkasten,A, H E Meyer, W Nastainczyk, M Sieber, F Hofmann, 1988, cAMP-dependent protein kinase rapidly phosphorylates serine- 687 of the skeletal muscle receptor for calcium channel blockers: J.Biol.Chem., v. 263, p. 15325-15329.
- Romanin,C, R Gamsjaeger, H Kahr, D Schaufler, O Carlson, D R Abernethy, N M Soldatov, 2000, Ca⁽²⁺⁾ sensors of L-type Ca⁽²⁺⁾ channel: FEBS Lett., v. 487, p. 301-306.

- Sanchez JA, E, Stefani, 1978, Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog: *J. Physiol*, v. 283, p. 197-209.
- Schmid,A, J F Renaud, M Lazdunski, 1985, Short term and long term effects of beta-adrenergic effectors and cyclic AMP on nitrendipine-sensitive voltage-dependent Ca^{2+} channels of skeletal muscle: *J.Biol.Chem.*, v. 260, p. 13041-13046.
- Schredelseker J, V, Di Biase, GJ, Obermair, ET, Felder, BE, Flucher, C, Franzini-Armstrong, M, Grabner, 1995, The beta 1a subunit is essential for the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 102, p. 17219-17224.
- Selvin,PR, 1995, Fluorescence resonance energy transfer: *Methods Enzymol.*, v. 246, p. 300-334
- Sencer S, RV, Papineni, DB, Halling, P, Pate, J, Krol, JZ, Zhang, SL, Hamilton, 2001, Coupling of RYR1 and L-type calcium channels via calmodulin binding domains: *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 38237-38241.
- Singer, AU, JD, Formann-Kay, 1997, pH titration studies of an SH2 domain-phosphopeptide complex: unusual histidine and phosphate pKa values: *Protein Sci.*, v. 6, p. 1910-1919
- Soldatov,NM, R D Zuhlke, A Bouron, H Reuter, 1997, Molecular structures involved in L-type calcium channel inactivation. Role of the carboxyl-terminal region encoded by exons 40-42 in α_{1C} subunit in the kinetics and Ca^{2+} dependence of inactivation: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 3560-3566.
- Soldatov,NM, R D Zuhlke, A Bouron, H Reuter, 1997, Molecular structures involved in L-type calcium channel inactivation. Role of the carboxyl-terminal region encoded by exons 40-42 in α_{1C} subunit in the kinetics and Ca^{2+} dependence of inactivation: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 3560-3566.
- Soldatov,NM, 2003, Ca^{2+} channel moving tail: link between Ca^{2+} -induced inactivation and Ca^{2+} signal transduction: *Trends Pharmacol.Sci.*, v. 24, p. 167-171.
- Spiecker,W, W Melzer, H C Luttgau, 1979, Extracellular Ca^{2+} and excitation-contraction coupling: *Nature*, v. 280, p. 158-160.
- Takahashi,M, M J Seagar, J F Jones, B F Reber, W A Catterall, 1987, Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 84, p. 5478-5482.
- Tanabe,T, H Takeshima, A Mikami, V Flockerzi, H Takahashi, K Kangawa, M Kojima, H Matsuo, T Hirose, S Numa, 1987, Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle: *Nature*, v. 328, p. 313-318.
- Tanabe,T, K G Beam, B A Adams, T Niidome, S Numa, 1990, Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling: *Nature*, v. 346, p. 567-569.
- Tanabe,T, B A Adams, S Numa, K G Beam, 1991, Repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium channel activation kinetics: *Nature*, v. 352, p. 800-803.

- Tanabe, T, A Mikami, T Niidome, S Numa, B A Adams, K G Beam, 1993, Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 707, p. 81-86.
- Tang, W, D B Halling, D J Black, P Pate, J Z Zhang, S Pedersen, R A Altschuld, S L Hamilton, 2003, Apocalmodulin and Ca²⁺ calmodulin-binding sites on the CaV1.2 channel: *Biophys.J.*, v. 85, p. 1538-1547.
- Tsien, RW, D Lipscombe, D V Madison, K R Bley, A P Fox, 1988, Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation: *Trends Neurosci.*, v. 11, p. 431-438.
- Van Petegem, F, K A Clark, F C Chatelain, D L Minor, Jr., 2004, Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain: *Nature*, v. 429, p. 671-675.
- Van Petegem, F, F C Chatelain, D L Minor, Jr., 2005, Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca²⁺/calmodulin complex: *Nat.Struct.Mol.Biol.*, v. 12, p. 1108-1115.
- Walsh, KB, Q Cheng, 2004, Intracellular Ca⁽²⁺⁾ regulates responsiveness of cardiac L-type Ca⁽²⁺⁾ current to protein kinase A: role of calmodulin: *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 286, p. H186-H194.
- Wang, MC, R F Collins, R C Ford, N S Berrow, A C Dolphin, A Kitmitto, 2004, The three-dimensional structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel: comparison with the skeletal muscle form reveals a common architectural motif: *J.Biol.Chem.*, v. 279, p. 7159-7168.
- Xiong, L, Q K Kleerekoper, R He, J A Putkey, S L Hamilton, 2005, Sites on calmodulin that interact with the C-terminal tail of Cav1.2 channel: *J.Biol.Chem.*, v. 280, p. 7070-7079.
- Yang T, E, Esteve, IN, Pessah, TF, Molinski, PD, Allen, JR, López, 2007, Elevated resting [Ca²⁺]_i in myotubes expressing malignant hyperthermia RyR1 cDNAs is partially restored by modulation of passive calcium leak from the SR: *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 292, p. 1591-1598.
- Zhang, R, I Dzhura, C E Grueter, W Thiel, R J Colbran, M E Anderson, 2005, A dynamic alpha-beta inter-subunit agonist signaling complex is a novel feedback mechanism for regulating L-type Ca²⁺ channel opening: *FASEB J.*, v. 19, p. 1573-1575.
- Zhou, J, R Olcese, N Qin, F Noceti, L Birnbaumer, E Stefani, 1997, Feedback inhibition of Ca²⁺ channels by Ca²⁺ depends on a short sequence of the C terminus that does not include the Ca²⁺ -binding function of a motif with similarity to Ca²⁺ -binding domains: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 94, p. 2301-2305.
- Zuhlke, RD, H Reuter, 1998, Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha_{1C} subunit: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 95, p. 3287-3294.
- Zuhlke, RD, G S Pitt, K Deisseroth, R W Tsien, H Reuter, 1999, Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels: *Nature*, v. 399, p. 159-162.

Zuhlke, RD, G S Pitt, R W Tsien, H Reuter, 2000, Ca²⁺-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca²⁺ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(α)_{1C} subunit: J.Biol.Chem., v. 275, p. 21121-21129.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat

B

bp	Basenpaare
BSA	Bovines Sernalbumin

C

C	Carboxy
CA	Carboanhydrase
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca _v 1.1	Spannungsgesteuerter L-Typ Calciumkanal 1.1
Ca _v 1.2	Spannungsgesteuerter L-Typ Calciumkanal 1.2
CDI	Calcium vermittelte Inaktivierung
cDNA	komplementäre DANN
°C	Grad Celsius
CFP	cyano fluorescent protein
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
Cl ⁻	Chlorid
CMF	Calcium-Magnesium-frei
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Carboxyterminus
Cu ²⁺	Kupfer

D

dd H ₂ O	Zweimal-sterilisiertes Wasser
DHPR	Dihydropyridin Rezeptor
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

E

E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

F

FCS	fetal calf serum
fmol	Femtomol
FRET	fluorescence resonance energy transfer
Fwd.	Forward

G

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm

H

H	Histidin
h	Stunde
HCl	Wasserstoffchlorid
His	Histidin
HS	horse serum

I

I	Intensität
IB	Inclusion bodies
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
I.P.	isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-Thio-Galactosid

K

K ⁺	Kalium
K	Lysin
KCl	Kaliumchlorid
kd	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid

L

l	Liter
LB	Luria Bertani
LS	Längenstandard
Lsg.	Lösung

M

m	Meter
M	Methionin
M	Mol
mA	Milliampere
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
MCS	multi cloning site
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol
µM	Mikromol
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
ms	Millisekunde
MWCO	molecular weight cut off, Einheit: Dalton

N

Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
Ni ²⁺	Nickel
nm	Nanometer
nt	Nucleotid

O

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 Nanometer
ORF	open reading frame

P

pA	Picoampere
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pF	Picofarat
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMF	Peptidmassen Fingerabdruck

Q

Q Glutamin

R

rbs Ribosomen Bindestelle
Rev. Revers
RNA Ribonukleinsäure
rpm rounds per minute
RT Raumtemperatur
RyR Ryanodin Rezeptor

S

S Segment
S Serotonin
SDS Sodium dodecyl sulfat
sec Sekunden
SR Sarkoplasmatisches Retikulum

T

Tab. Tabelle
Taq Termus Aquaticus
TEMED Tetramethylethylendiamin
TEV Tobacco Etch Virus
TOF time of flight
TP Transformationspuffer
Tris Trishydroxymethyl-aminomethan
tRNA Transfer Ribonukleinsäure

U

U Unit
 ∞ unendlich
Upm Umdrehungen pro Minute
UV Ultraviolett

V

V Volt

W

WT Wildtyp

Y

Y

Tyrosin

Z

Zn²⁺

Zink

7. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

	Seite
Abb. 1. 1. Schematische Darstellung einer Domäne von spannungsabhängigen Ionenkanälen.....	1
Abb. 1. 2. Schematische Struktur von spannungsabhängigen Calciumkanälen.....	6
Abb. 1. 3. Schematische Darstellung von Skelett- und Herzmuskelzellen	7
Abb. 1. 4. Schematische Darstellung der elektromechanischen Kopplung im Skelettmuskel und im Herzmuskel.....	8
Abb. 1. 5. A. Schematische Darstellung eines L-Typ-Ca ²⁺ -Kanals mit seinem Carboxyterminus.....	11
Abb. 1. 5. B. Carboxyterminale Fragmente (CT1, CT2, CT3).....	11
Abb. 2. 1. Schematische Darstellung der α_1 -Untereinheit von spannungsregulierten Ca ²⁺ Kanälen.....	17
Abb. 2. 2. Carboxyterminale α_{1S} und α_{1C} DHPR Segmente.....	18
Abb. 2. 3. Expressionsvektor pRSFDuet-1.....	19
Abb. 2. 4. pRSFDuet-1 Klonierungs-/Expressions Region.....	19
Abb. 2. 5. Expressionsvektor pETM-60.....	21
Abb. 2. 6. Expressionsvektor pECFP-C1.....	22
Abb. 2. 7. Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz von kardialem und skelettmuskulärem CT1.....	24
Abb. 2. 8. Schematische Durchführung der zielgerichteten Mutagenese.....	25
Abb. 3. 1. O'Gene Ruler TM.....	40
Abb. 3. 2. A. pRSFDuet1-CT1 (α_{1S}) nach Testrestriktion	40
Abb. 3. 2. B. pRSFDuet1-CT1 (α_{1C}) nach Testrestriktion.....	40
Abb. 3. 3. A. pRSFDuet1-CT2 (α_{1S})	41
Abb. 3. 3. B. pRSFDuet1-CT1 (α_{1S}) + CaM.....	41
Abb. 3. 3. C. pRSFDuet1-CT1 (α_{1C}) + CaM.....	41
Abb. 3. 4. pETM60-CT1 (α_{1S}) und pETM60-CT1 (α_{1C}).....	41
Abb. 3. 5. A. Schematische Darstellung der Herstellung des Inserts CT2 (α_{1S}).....	42
Abb. 3. 5. B. pETM60- CT2 (α_{1S})	42

Abb. 3. 5. C.	pETM60- CT2 (α_{1C})	42
Abb. 3. 6. A.	pETM60-CT3 (α_{1C}).....	42
		Seite
Abb. 3. 6. B.	pETM60-CT3 (α_{1S}).....	42
Abb. 3. 7. A.	pCyPet-CT1 (α_{1S}).....	43
Abb. 3. 7. B.	pCyPet-CT1 (α_{1C}).....	43
Abb. 3. 7. C.	pYPet-CaM.....	43
Abb. 3. 8.	Proben der zielgerichteten Mutagenese nach Testrestriktion.....	43
Abb. 3. 9.	Roti [®] -Mark Längenstandard.....	44
Abb. 3. 10. A.	Voraufreinigung von hitzestabilem CaM.....	44
Abb. 3. 10. B.	Voraufreinigung von hitzestabilem CaM.....	44
Abb. 3. 11.	CaM-Aufreinigung mit Ionenaustauscher.....	45
Abb. 3. 12.	CaM - Native PAGE	45
Abb. 3. 13. A.	Rekombinant hergestellte TEV-Protease nach IPTG-Induktion.....	46
Abb. 3. 13. B.	Aufreinigung und Konzentrierung der TEV-Protease.....	46
Abb. 3. 14.	CT3 nach IPTG-Induktion und Waschen der IB.....	46
Abb. 3. 15.	CT3 - IMAC.....	47
Abb. 3. 16.	Durch Dialyse rückgefalteter CT3.....	47
Abb. 3. 17. A.	Durch Dialyse zurückgefalteter CT3 - SDS-PAGE.....	47
Abb. 3. 17. B.	Durch Dialyse zurückgefalteter CT3 - Native Page.....	47
Abb. 3. 18.	Interaktion von zurückgefaltetem CT3 mit CaM.....	48
Abb. 3. 19.	Expression von CT1 (α_{1S}) nach einer 4 h IPTG-Induktion bei 20°C....	49
Abb. 3. 20.	Expression von CT1 (α_{1S}) nach IPTG-Induktion bei 37°C und 20°C...	49
Abb. 3. 21. A.	Rekombinant hergestelltes Protein CT1 (α_{1S}).....	50
Abb. 3. 21. B.	Rekombinant hergestelltes Protein CT1 (α_{1C}).....	50
Abb. 3. 22. A.	CT1 (α_{1S}) und CaM nach IPTG-Induktion und Lyse.....	50
Abb. 3. 22. B.	CT2 (α_{1C}) und CaM nach IPTG-Induktion und Lyse.....	50
Abb. 3. 23.	Test unterschiedlicher Induktionsbedingungen für die Koexpression von CT1 (α_{1S}) und CaM.....	51

Abb. 3. 24.	Interaktion von skelettmuskulärem bzw. kardialem CT1 mit CaM.....	51
Abb. 3. 25. A.	Aufreinigung von NusA-CT1- α_{1S} und NusA-CT1 (α_{1C}).....	52
Abb. 3. 25. B.	Aufreinigung von NusA-CT2 (α_{1S}).....	52
		Seite
Abb. 3. 25. C.	Aufreinigung von NusA-CT2 (α_{1C}).....	52
Abb. 3. 25. D.	Aufreinigung von NusA-CT3 (α_{1S}) und NusA-CT3 (α_{1C}).....	52
Abb. 3. 26.	Abspaltung des CT1 (α_{1S}) von NusA durch die TEV-Protease.....	52
Abb. 3. 27.	Reaktionsansätze zum Test der Interaktion zwischen skelettmuskulärem und kardialem CT1 mit CaM nach einer Abspaltung mit der TEV-Protease.....	53
Abb. 3. 28. A.	CT1-CaM-Interaktion mit 2 mM EDTA.....	54
Abb. 3. 28. B.	CT1-CaM-Interaktion ohne Ca^{2+}	54
Abb. 3. 28. C.	CT1-CaM-Interaktion mit 1 mM Ca^{2+}	54
Abb. 3. 28. D.	CT1-CaM-Interaktion mit 2 mM Ca^{2+}	54
Abb. 3. 28. E.	CT1-CaM-Interaktion mit 3 mM Ca^{2+}	54
Abb. 3. 29.	Ca^{2+} -abhängige Interaktion von DHPR-CT2 mit CaM.....	55
Abb. 3. 30. A	CT3-CaM-Interaktion - 9 %iges natives Gel.....	55
Abb. 3. 30. B.	CT3-CaM-Interaktion - 15%iges natives Gel.....	55
Abb. 3. 31.	Reaktionsansätze für Proteaseabspaltung und Interaktion von CaM mit skelettmuskulärem und kardialem CT3	56
Abb. 3. 32. A.	Durch die TEV-Protease abgespaltenes CT1 (α_{1S}).....	57
Abb. 3. 32. B.	Durch die TEV-Protease abgespaltenes CT1 (α_{1C}).....	57
Abb. 3. 33.	Massenspektrometrische Untersuchung von CT1 (α_{1S}) und (α_{1C}).....	57
Abb. 3. 34.	Interaktion von CaM mit CT1- α_{1C} nach Abspaltung durch die TEV- Protease.....	58
Abb. 3. 35.	Exemplarischer Ausdruck des Ergebnisses einer massenspektrometrischen Untersuchung von CaM und dem Komplex CT1 (α_{1C}) - CaM.....	58
Abb. 3. 36.	Aminosäuresequenz von α_{1C} 1637-1667 und α_{1S} 1511-1541.....	59
Abb. 3. 37. A.	Zielgerichtete Mutagenese I1513A (α_{1S}) und A1639I (α_{1C}).....	60
Abb. 3. 37. B.	Zielgerichtete Mutagenese H1532Y (α_{1S}) und Y1658H (α_{1C})	60

Abb. 3. 37. C.	Zielgerichtete Mutagenese M1513K (α_{1S}) und K1663M (α_{1C})	60
Abb. 3. 37. D.	Zielgerichtete Mutagenese H1532Y + M1513K (α_{1S}) und Y1658H + K1663M (α_{1C})	60
		Seite
Abb. 3. 37. E.	Zielgerichtete Mutagenese H1532Y + M1513K + Q1540K (α_{1S}) und Y1658H + K1663M + K1666Q (α_{1C}).....	60
Abb. 3. 38.	Ca^{2+} -abhängige Interaktion von CaM mit skelettmuskulärem und kardialem CT1 nach reziprokem Austausch einiger Aminosäurereste im IQ-Motiv und seiner unmittelbaren Umgebung - Synopsis der Mutationseffekte.....	61
Abb. 3. 39. A.	Fluoreszenzaufnahmen CyPet-CT1 (α_{1S}) in "dysgenic" Myotuben.....	62
Abb. 3. 39. B.	Fluoreszenzaufnahmen CyPet-CT1 (α_{1S}) in "dysgenic" Myotuben.....	62
Abb. 3. 39. C.	Fluoreszenzaufnahmen YPet-CaM in "dysgenic" Myotuben.....	62
Abb. 3. 40.	Fluoreszenzaufnahmen CyPet-CT1 (α_{1S}) und YPet-CaM in "dysgenic" Myotuben.....	63
Abb. 3. 41.	Fluoreszenzaufnahmen CyPet-CT1 (α_{1C}) und YPet-CaM in "dysgenic" Myotuben.....	63
Abb. 4. 1.	Schematische Darstellung der hergestellten skelettmuskulären bzw. kardialen crboxyterminalen Kontrukte.....	66
Abb. 4. 2.	Gegenüberstellung der Sequenzen von kardialem und skelettmuskulärem CT1.....	70
Abb. 4. 3.	Alignment von skelettmuskulären und kardialen IQ-Bereichen unterschiedlicher Vertebraten.....	70
Abb. 4. 4.	Einige chemische Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren.....	72
Abb. 4. 5.	Schematische Darstellung möglicher Vorgänge während der calciumabhängigen Inaktivierung spannungsgesteuerter L-Typ Kanäle am Beispiel des $Ca_v1.2$ (Herzisoform).....	73
Abb. 4. 6.	Elektrophysiologische Untersuchungen an α_{1C} (Wildtyp und Doppelmutante) mittels „whole cell patch clamp“ in HEK-Zellen.....	76

	Seite
Tab. 1. 1. Spannungsabhängige Calciumkanäle (nach Caterall 2000).....	4
Tab. 2. 1. Restriktionsenzyme und Puffer, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	14
Tab. 2. 2. Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	18
Tab. 2. 3. Restriktionsendonukleasen und Primer für den Transfer von CaM und verschiedener CTs in den Expressionsvektor pRSFDuet1.....	20
Tab. 2. 4. Restriktionsendonukleasen und Primer für den Transfer von verschiedenen CTs in den Expressionsvektor pETM60-Nusa.....	21
Tab. 2. 5. Restriktionsendonukleasen und Primer für den Transfer verschiedener Farbstoffe in den leeren Säugerzellen-Expressionsvektor.....	22
Tab. 2. 6. Restriktionsendonukleasen und Primer für den Transfer von CaM und verschiedener CTs in den Expressionsvektor pCyPet bzw. pYPet	23

8. DANKSAGUNG

Ich danke ganz herzlich

Ulli, der besten TA, ohne die das Klonieren nie geklappt hätte,

Alex, für die freundliche Unterstützung am Mikroskop,

Uwe, für die große Hilfsbereitschaft bei Computerproblemen,

Volker, Nina, Steffi

und meinen Eltern, die meine naturwissenschaftlichen Interessen stets gefördert und mich in schwierigen Zeiten immer aufgemuntert haben.

Außerdem danke ich ganz besonders

Prof. Dr. Symeon Papadopoulos, für die Überlassung des Themas, Betreuung, Unterstützung, die Übernahme des Referats dieser Arbeit und dafür, dass er jederzeit für mich und meine Fragen zur Verfügung stand,

Prof. Dr. Walter Müller für das übernommene Korreferat

und Marc für alles.

9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst habe und dass ich sie nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Hannover, den

(Barbara Ritter)

10. LEBENSLAUF

Name: Barbara Ritter
Geburtsname: Eckhart
Adresse: Alter Hof 4
31246 Lahstedt
Geburtsdatum: 07.10.1979
Geburtsort: Klagenfurt, Österreich
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: österreichisch

Schulbildung:

1985 - 1989 Volksschule Bad Bleiberg
1989 - 1997 Bundesgymnasium St. Martin, Villach
Abschluss mit Matura / allg. Hochschulreife

Studium:

1997 - 2003 Studium der Biologie an der Universität Hannover
März 2003 - November 2003 Diplomarbeit im Institut für Virologie der Medizinischen
Hochschule Hannover
seit April 2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Vegetative
Physiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

11. WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

Abstracts

- 2007 **B. Ritter**, S. Papadopoulos
"Minor sequence differences between the voltage dependent cardiac and skeletal muscle calcium channel carboxyl termini strongly affect binding of CaM." 86th Annual Meeting of the German Physiological Society. *Journal of the Federation of European Physiological Societies*
- 2007 **B. Ritter**, S. Papadopoulos
"Identification of residues within the DHPR carboxyl terminus responsible for differential CaM binding of cardiac and skeletal muscle isoforms." 2007 Biophysical Society Meeting. *Biophysical Journal*
- 2006 **B. Eckhart**, S. Papadopoulos
"Structural requirements for the interaction of the voltage gated calcium channel subunits α_{1S} and α_{1C} C-termini with Calmodulin (CaM)." 85th Annual Meeting of the German Physiological Society. *Journal of the Federation of European Physiological Societies*