

WG 1019

1993/1103

Franz Gross Hypertonie Symposium

Zelluläre Mechanismen der Herz-Kreislaufregulation

Pharmakologische und klinische Konsequenzen

Schloßhotel Kronberg, 5. – 7. März 1992

Herausgeber
Detlev Ganten

Mit 57 Abbildungen und 8 Tabellen



Schattauer

Stuttgart –
New York 1993

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Zelluläre Mechanismen der Herz-Kreislaufregulation :

pharmakologische und klinische Konsequenzen ; Schlosshotel Kronberg, 5. – 7. März 1992 ; mit 8 Tabellen / Franz-Gross-Hypertonie-Symposium. Hrsg. Detlev Ganten. – Stuttgart ; New York : Schattauer, 1993

ISBN 3-7945-1544-7

NE: Ganten, Detlev [Hrsg.]; Franz-Gross-Hypertonie-Symposium <1992, Kronberg>

In diesem Buch sind die Stichwörter, die zugleich eingetragene Warenzeichen sind, als solche nicht besonders kenntlich gemacht. Es kann also auch der Bezeichnung der Ware mit dem für diese eingetragenen Warenzeichen nicht geschlossen werden, daß die Bezeichnung ein freier Warenname ist.

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Verbreitung sowie der Übersetzung in fremde Sprache, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Fotokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlags reproduziert werden.

© 1993 by F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Lenzhalde 3, D-7000 Stuttgart 1, Germany.

Satz, Druck und Bindung: Bosch-Druck, Festplatzstraße 6, 8300 Landshut/Ergolding, Germany.

Printed in Germany

ISBN 3-7945-1544-7

Inhalt

Ca²⁺ Gating of Ca²⁺ Release in Heart Muscle	
M. Morad, S. K. Sham	1
The Plasma Membrane Calcium Pump	
E. Carafoli	7
Bedeutung der cGMP-abhängigen Proteinkinase für den Aktionsmechanismus von Nitrovasodilatoren und EDRF	
M. Eigenthaler, P. Schanzenbächer, K. Kochsiek, U. Walter	11
Genetischer Polymorphismus spannungsaktivierter Calciumkanäle	
R. Hullin, M. Biel, E. Bosse, A. Welling, F. Hofmann, V. Flockerzi	23
Intracellular Calcium Release Channels of Muscle	
S. Fleischer	39
Zur Pathogenese irreversibler Schäden der subendokardialen Purkinje-Fasern nach unterschiedlichen Ischämiebelastungen	
Ph. A. Schnabel, H. Fehrenbach, A. Schmiedl, J. Richter	43
Regulation der Herzfunktion	
E.-G. Krause, S. Bartel, P. Karczewski, A. Lindeke	69
Stimulation von Phosphoinositid-spezifischen Phospholipasen C durch $\beta\gamma$-Untereinheiten heterotrimerischer G-Proteine	
P. Gierschik, M. Meister, A. Scheer, R. Schreck, A. Dietrich, P. Schnabel, M. Camps	81
Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration durch cGMP-abhängige Proteinkinase	
P. Ruth, G.-X. Wang, B. May, J. Felbel, M. Korth, F. Hofmann ..	97

Zytosolische Guanylyl-Zyklasten	
D. Koesling, Ch. Harteneck, B. Wedel, P. Humbert, G. Schultz, E. Böhme.....	111
Guanylyl Cyclase Cell Surface Receptors	
D. L. Garbers	119
Koronare Mikrozirkulationsstörung bei Patienten mit dilativer Kardiomyopathie und der Einfluß einer ACE-Hemmer-Therapie	
M. Vogt, W. Motz, B. E. Strauer	125
Endotheliale Funktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie	
M. Kelm, M. Preik, W. Motz, B. E. Strauer.....	139
Androgene regulieren die Transkriptionsrate der schweren α-Myosinkette im Herzen	
M. Kaling, I. Morano.....	151

Autorenverzeichnis

Bartel, Sabine

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Molekulare Kardiologie,
Robert-Rössle-Str. 10, O-1115 Berlin-Buch, Tel. 0 30/9 46 23 87

Biel, M.

Institut für Pharmakologie, Technische Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 56

Böhme, E.

Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin,
Thielallee 69–73, W-1000 Berlin 33, Tel. 0 30/8 38 64 74

Bosse, Eva

Institut für Pharmakologie, Technische Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 56

Camps, M.

Abteilung Molekulare Pharmakologie, Deutsches Krebsforschungszentrum,
Im Neuenheimer Feld 280/III, W-6900 Heidelberg,
Tel. 0 62 21/42 33 50/1

Carafoli, E.

Laboratory of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology
(ETH), Zurich, Switzerland

Dietrich, A.

Abteilung Molekulare Pharmakologie, Deutsches Krebsforschungszentrum,
Im Neuenheimer Feld 280/III, W-6900 Heidelberg,
Tel. 0 62 21/42 33 50/1

Eigenthaler, M.

Medizinische Universitätsklinik, Klinische Forschergruppe,
Josef-Schneider-Str. 2, W-8700 Würzburg, Tel. 09 31/2 01 34 79

Fehrenbach, H.

Zentrum Anatomie der Universität Göttingen,
Abt. Elektronenmikroskopie,
Kreuzberggring 36, W-3400 Göttingen, Tel. 05 51/39 70 26

Felbel, J.

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 78

Fleischer, S.

Department of Molecular Biology, Vanderbilt University,
Nashville, TN 37235 USA

Flockerzi, V.

Institut für Pharmakologie, Technische Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 56

Garbers, D. L.

Howard Hughes Medical Institute, Department of Pharmacology,
University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas TX 75235, USA
Tel. (2 14) 6 89-50 90

Gierschik, P.

Abteilung Molekulare Pharmakologie, Deutsches Krebsforschungszentrum,
Im Neuenheimer Feld 280/III, W-6900 Heidelberg, Tel. 0 62 21/42 33 50/1

Harteneck, Ch.

Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin,
Thielallee 69 – 73, W-1000 Berlin 33, Tel. 0 30/8 38 64 74

Hofmann, F.

Institut für Pharmakologie, Technische Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 56

Hullin, R.

Institut für Pharmakologie, Technische Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 56

Humbert, P.

Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin,
Thielallee 69 – 73, W-1000 Berlin 33, Tel. 0 30/8 38 64 74

Kaling, M.

Deutsches Institut für Bluthochdruckforschung
und Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 366, W-6900 Heidelberg

Karczewski, P.

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Molekulare Kardiologie,
Robert-Rössle-Str. 10, O-1115 Berlin-Buch, Tel. 0 30/9 46 23 87

Kelm, M.

Medizinische Klinik B, Heinrich-Heine-Universität,
Moorenstr. 5, W-4000 Düsseldorf 1, Tel. 02 11/3 11 78 07

Kochsiek, K.

Medizinische Universitätsklinik, Klinische Forschergruppe,
Josef-Schneider-Str. 2, W-8700 Würzburg, Tel. 09 31/2 01 34 79

Koesling, Doris

Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin,
Thielallee 69 – 73, W-1000 Berlin 33, Tel. 0 30/8 38 64 74

Korth, M.

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 78

Krause, E.-G.

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Molekulare Kardiologie,
Robert-Rössle-Str. 10, O-1115 Berlin-Buch, Tel. 0 30/9 46 23 87

Lindeke, A.

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Molekulare Kardiologie,
Robert-Rössle-Str. 10, O-1115 Berlin-Buch, Tel. 0 30/9 46 23 87

May, B.

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 78

Meister, M.

Abteilung Molekulare Pharmakologie, Deutsches Krebsforschungszentrum,
Im Neuenheimer Feld 280/III, W-6900 Heidelberg,
Tel. 0 62 21/42 33 50/1

Morad, M.

Department of Physiology, School of Medicine, University of
Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104-6085, USA, Tel. (2 15) 8 98-79 39

Morano, J.

II. Physiologisches Institut der Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld, 326, W-6900 Heidelberg

Motz, W.

Medizinische Klinik und Poliklinik B der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Abteilung für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie,
Moorenstr. 5, W-4000 Düsseldorf 1

Preik, M.

Medizinische Klinik B, Heinrich-Heine-Universität,
Moorenstr. 5, W-4000 Düsseldorf 1, Tel. 02 11/3 11 78 07

Richter, J.

Zentrum Anatomie der Universität Göttingen,
Abteilung Elektronenmikroskopie,
Kreuzberggring 36, W-3400 Göttingen, Tel. 05 51/39 70 26

Ruth, P.

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 78

Schanzenbächer, P.

Medizinische Universitätsklinik, Klinische Forschergruppe,
Josef-Schneider-Str. 2, W-8700 Würzburg, Tel. 09 31/2 01 34 79

Scheer, A.

Abteilung Molekulare Pharmakologie, Deutsches Krebsforschungszentrum,
Im Neuenheimer Feld 280/III, W-6900 Heidelberg,
Tel. 0 62 21/42 33 50/1

Schmiedl, A.

Zentrum Anatomie der Universität Göttingen,
Abteilung Elektronenmikroskopie,
Kreuzberggring 36, W-3400 Göttingen, Tel. 05 51/39 70 26

Schnabel, Petra

Abteilung Molekulare Pharmakologie, Deutsches Krebsforschungszentrum,
Im Neuenheimer Feld 280/III, W-6900 Heidelberg, Tel. 0 62 21/42 33 50/1

Schnabel, Ph. A.

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg,
Im Neuenheimer Feld 220/221, W-6900 Heidelberg,
Tel. 0 62 21/56 33 56

X

Schreck, R.

Abteilung Molekulare Pharmakologie, Deutsches Krebsforschungszentrum,
Im Neuenheimer Feld 280/III, W-6900 Heidelberg,
Tel. 0 62 21/42 33 50/1

Schultz, G.

Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin,
Thielallee 69 – 73, W-1000 Berlin 33, Tel. 0 30/8 38 64 74

Sham, S. K.

Department of Physiology, School of Medicine, University of
Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104-6085, USA, Tel. (2 15) 8 98-79 39

Strauer, B. E.

Medizinische Klinik und Poliklinik B der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Abteilung für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie,
Moorenstr. 5, W-4000 Düsseldorf 1

Vogt, M.

Medizinische Klinik und Poliklinik B der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf, Abteilung für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie,
Moorenstr. 5, W-4000 Düsseldorf 1

Walter, U.

Medizinische Universitätsklinik, Klinische Forschergruppe,
Josef-Schneider-Str. 2, W-8700 Würzburg, Tel. 09 31/2 01 34 79

Wang, G.-X.

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 78

Wedel, Barbara

Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin,
Thielallee 69 – 73, W-1000 Berlin 33, Tel. 0 30/8 38 64 74

Welling, Andrea

Institut für Pharmakologie, Technische Universität München,
Biedersteinerstr. 29, W-8000 München 40, Tel. 0 89/38 49 32 56

Genetischer Polymorphismus spannungsaktivierter Calciumkanäle

R. Hullin, M. Biel, Eva Bosse, Andrea Welling, F. Hofmann, V. Flockerzi

Einleitung

Spannungsaktivierte Calciumkanäle sind integrale Membranproteine, die den Eintritt von Calciumionen durch die Zellmembran in die Zelle ermöglichen. Sie sind an der Entstehung und Fortleitung des Aktionspotentials beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der Umsetzung von elektrischer Erregung in intrazelluläre Signale (21, 49). In der Zelle bindet Calcium an verschiedene Proteine, die Veränderungen bei der Sekretion (z. B. durch Bindung an Synaptotagmin, 9), bei der Kontraktion (z. B. Bindung von Calcium an Calmodulin oder Troponin C) oder der Erregbarkeit der Zellen (z. B. Hyperpolarisation durch Aktivierung von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen, 8) hervorrufen. Calciumkanäle sind dynamische Strukturen. Sie können geöffnet und geschlossen und im geschlossenen Zustand aktivierbar oder inaktiviert sein. Schnelle Übergänge zwischen diesen Zuständen werden durch das Membranpotential reguliert. Darüber hinaus können diese schnellen Übergänge längerfristig durch Hormone und Neurotransmitter über Guaninnukleotid-bindende Proteine (sog. G-Proteine) oder Phosphorylierung durch Proteinkinasen sowie über Pharmaka und Toxine moduliert werden (10, 68).

Im Herzen führt der Einstrom von Calciumionen durch den Kanal zur Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und löst dadurch die Kontraktion des Herzmuskels aus. Gleichzeitig sind Calciumkanäle an der Entstehung der elektrischen Erregung und deren Ausbreitung im spezifischen Erregungsleitungssystem, insbesondere im AV-Knoten, beteiligt. Bei Erkrankungen des Herzens können Calciumströme zur Entstehung von Arrhythmien und abnormer Erregungsausbreitung beitragen. Im Gefäßsystem kontrollieren die Calciumkanäle über die Regulation der intrazellulären Calcium-Konzentration den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur (8).

Calciumkanäle werden auf Grund pharmakologischer und elektrophysiologischer Eigenschaften in mindestens vier verschiedene Klassen eingeteilt: L-, T-, P- und N-Typ Calciumkanäle (3, 63, 69). Calciumkanäle vom L-Typ

finden sich in den meisten bisher untersuchten Geweben, so auch im Herzmuskel und in der glatten Muskulatur. Sie weisen im Vergleich zu den anderen Typen eine höhere Leitfähigkeit für Calciumionen auf und werden durch Pharmaka, sog. Calcium-Antagonisten oder Calcium-Kanalblocker, inhibiert. Prototypen dieser blockierenden Substanzen sind das Verapamil, ein Phenylalkylamin (PAA), und das Nifedipin, ein Dihydropyridin (DHP). Diese Pharmaka binden an die Calcium-Kanalproteine und blockieren dadurch den Calciumstrom durch den Kanal. Mit Hilfe tritierter Derivate dieser Substanzen ist es möglich, die spezifischen, hochaffinen Bindungsstellen, die Teil des Calciumkanals sind, in den Membranfraktionen derjenigen Gewebe zu identifizieren, welche L-Typ Calciumkanäle enthalten (23). Auf Grund der geringen Dichte der Calciumkanäle im Herzen und in den meisten Geweben (etwa 3 000–10 000 Kanäle pro Zelle) ist auch die Dichte der Bindungsstellen für Calcium-Kanalblocker in diesen Geweben niedrig (53). Die einzige Ausnahme stellt das transversale Tubuli-System des Skelettmuskels dar. In diesen Membranen liegt die Dichte der Bindungsstellen bei 10–80 pmol/mg Protein und damit um das 10- bis 100fache höher als im Herzmuskel (17). Für die biochemische Charakterisierung ist deshalb der Kanal aus Skelettmuskel weit besser geeignet als beispielsweise der aus Herz.

Struktur des Calciumkanals aus dem Skelettmuskel

Die Isolierung der Bindungsstellen für Calcium-Kanalblocker aus dem Skelettmuskel ergibt einen Komplex aus verschiedenen Proteinen mit relativen Molekulargewichten von 165 000 (α_1 -Untereinheit) 132 000/28 000 (α_2/δ -Untereinheit), 55 000 (β -Untereinheit) und 32 000 (γ -Untereinheit) (17, 57). Die isolierten Proteine lassen sich in künstlichen Phospholipidmembranen zu funktionellen Calciumkanälen rekonstruieren, welche wie der native Calciumkanal durch cAMP-abhängige Phosphorylierung moduliert und in Anwesenheit von Calcium-Kanalblockern gehemmt werden (18, 37).

α_1 -Untereinheit. Dieses Protein (Skelettmuskel, 1 873 Aminosäuren) besitzt alle biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Bindungsstelle für Calcium-Kanalblocker: Es ist ein Membranprotein, bindet Calcium-Kanalblocker und wird von der cAMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert (17, 18, 57). Seine Primärstruktur weist strukturelle Merkmale auf, die auch bei anderen spannungsaktivierbaren Kationenkanälen gefunden werden (64). Die meisten dieser Merkmale ergeben sich aus computergestützten Analysen der Primärsequenz, sind also nicht direkt experimentell begründet. Dennoch kann mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden, daß die Gesamtheit dieser Daten eine erste Annäherung an die tat-

sächlichen topologischen Verhältnisse des Kanalproteins innerhalb der Zellmembran darstellt (Abb. 1). Wie spannungsaktivierbare Natriumkanäle (41) besteht die α_1 -Untereinheit aus vier homologen Domänen (I, II, III, IV) von jeweils 250–300 Aminosäuren. Insbesondere durch die Konstruktion von Chimären der α_1 -Untereinheiten aus Skelettmuskel und Herz konnte gezeigt werden, daß diese Domänen nicht ohne weiteres gegeneinander austauschbar sind. Domäne I scheint für die Aktivierungskinetik des jeweiligen Calciumkanals eine Rolle zu spielen (67), während die intrazelluläre Schleife zwischen Domäne II und III die Art der elektromechanischen Kopplung determiniert (66), die sich z. B. im Skelettmuskel von der im Herzen unterscheidet.

Jede der Domänen I bis IV enthält sechs Segmente (S1 bis S6) aus jeweils 18 bis 21 Aminosäuren, die als α -Helizes die Zellmembran durchqueren. Eines dieser Segmente in jeder Domäne, das Segment 4, enthält 5 bis 7 positive Ladungen, ist in allen bisher bekannten spannungsaktivierbaren Kationenkanälen konserviert (41, 46) und, wie an Natrium- und Kaliumkanälen gezeigt werden konnte, an der Kanalaktivierung beteiligt (32, 33, 62). Darüber hinaus existieren zwischen den jeweiligen S5- und S6-Segmenten der Domänen I bis IV Abschnitte, die sog. „SS1- und SS2“-Regionen, die aller Wahrscheinlichkeit nach in die Zellmembran hineinragen (19) und Teil der unmittelbar die Kanalpore formenden Strukturen sind. Hierfür sprechen analoge Untersuchungen an Kalium- und Natriumkanälen (20, 75, 76), deren Primärstruktur in diesem Bereich ähnlich ist.

In diesem Modell (Abb. 1) liegen die Aminosäurereste Serin₆₈₇, Serin₁₆₁₇ und Serin₁₈₅₄, die *in vitro* durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phospho-

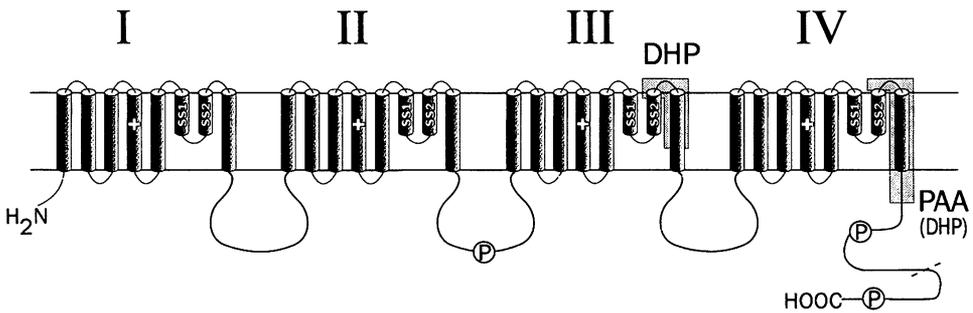


Abb. 1 Modell der α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals. Dargestellt ist die Orientierung des Kanalproteins in der Zellmembran. Tatsächlich ist diese Untereinheit derartig zusammengelagert, daß in ihrem Innern ein Kanal von etwa einem Millionstel Millimeter Durchmesser entsteht. Die schraffierten Regionen kennzeichnen die Aminosäurereste, die an der Bindung der Calciumkanalblocker (DHP, Dihydropyridin; PAA, Phenylalkylamin) beteiligt sind. P kennzeichnet die Aminosäurereste der α_1 -Untereinheit aus Skelettmuskel, die *in vitro* durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert werden. -- gibt die Region an, in der die α_1 -Untereinheit aus Skelettmuskel wahrscheinlich *in vivo* prozessiert wird (s. Text).

phoryliert werden (51, 52), intrazellulär. Calcium-Kanalblocker können nach Photoaktivierung irreversibel in die α_1 -Untereinheit inkorporiert werden (15). Die Ergebnisse solcher Untersuchungen sprechen dafür, daß sich die Bindungsstellen für Calciumkanalblocker vom Dihydropyridin-Typ im Bereich der „SS1-SS2“-Region von Domäne III (38, 61), die für Phenylalkylamine in unmittelbarem Anschluß an das Transmembransegment 6 der Domäne IV (60) befinden (Abb. 1). In enger Nachbarschaft existieren hier möglicherweise auch weitere Bindungsstellen für Dihydropyridine (48) und für Calciumionen (2). Es scheint also so zu sein, daß Dihydropyridine eher an extrazelluläre, Phenylalkylamine dagegen eher an intrazellulär gelegene Regionen der Calciumkanal- α_1 -Untereinheit binden. Die α_1 -Untereinheit wird wahrscheinlich in vivo prozessiert, wodurch ein carboxyterminal verkürztes Protein resultiert (13). Damit wird auch der Serinrest₁₈₅₄ entfernt, der in vitro durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert wird (52). Verschiedene Befunde sprechen dafür, daß der α_1 -Untereinheit im Skelettmuskel zwei Funktionen zukommen (64, 65). In Anwesenheit der α_2/δ -, der β - und der γ -Untereinheit könnte sie längerfristig als Kanal die intrazelluläre Calcium-Homöostase regeln. Als Spannungssensor würde sie unabhängig von den anderen Untereinheiten durch spannungsabhängige Veränderung ihrer Konformation die extrazelluläre Erregung in die Zelle leiten und dadurch die Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch den Ryanodin-sensitiven Calciumkanal auslösen (16, 50). Ein 95-kDa-Protein, das sowohl mit der α_1 -Untereinheit als auch mit dem Ryanodin-Rezeptor in Kontakt steht (30), könnte beide Proteine miteinander verbinden.

α_2/δ -Untereinheit. Die α_2/δ -Untereinheiten sind glykosylierte Membranproteine (Skelettmuskel 955 bzw. 146 Aminosäuren), die von einer einzigen mRNA kodiert werden (14, 35) und durch proteolytische Spaltung einer Proteinvorstufe entstehen (12). α_2 ist extrazellulär lokalisiert und über Disulfidbrücken mit der δ -Untereinheit verbunden (26). δ ist ein integrales Membranprotein und verankert α_2 in der Zellmembran (Abb. 2). Bisher wurde die cDNS der α_2/δ -Untereinheit aus Skelettmuskel und Hirn kloniert (14, 29, 74). Ähnliche oder identische Proteine existieren wahrscheinlich aber in sämtlichen Geweben, die spannungsaktivierbare Calciumkanäle exprimieren (4, 40).

β -Untereinheit. Die β -Untereinheit (524 Aminosäuren) ist ein peripheres Membranprotein und wahrscheinlich an der zytosolischen Seite der Zellmembran lokalisiert (Abb. 2). Ihre Primärstruktur (54) enthält Sequenzabschnitte, die in ähnlicher Form in Proteinen des Zytoskeletts vorkommen und dort für die Wechselwirkung dieser Proteine verantwortlich sind. Es ist deshalb vorstellbar, daß die β -Untereinheit eine ähnliche Funktion erfüllt und zur Verankerung des Calciumkanals an das Zytoskelett beiträgt. cAMP-

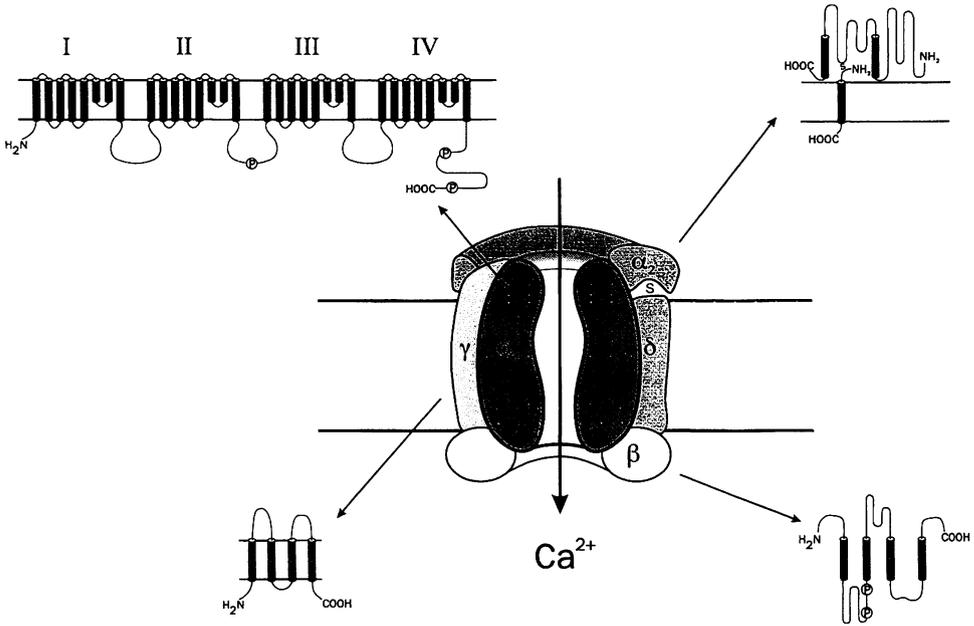


Abb. 2 Modell des Calciumkanals aus Skelettmuskel. Der Kanal besteht aus α_1 -, α_2/δ -, β - und γ -Untereinheiten. Die Strukturmodelle dieser Untereinheiten sind dargestellt. α_1 -, γ - und δ -Untereinheit sind integrale Membranproteine. Die Zellmembran ist angedeutet durch die beiden waagerechten Linien. Oberhalb dieser Linien befindet sich der Extrazellulär-, unterhalb der Intrazellulärraum.

und cGMP-abhängige Proteinkinase, Caseinkinase II und Proteinkinase C phosphorylieren spezifische Peptide der β -Untereinheit (25, 39), und es konnte gezeigt werden, daß Ser₁₈₂ (54) und Thr₂₀₅ (11) in vitro durch cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert werden. Phosphorylierung dieser Aminosäurereste könnte für die hormonelle Modulation der Calciumkanalaktivität verantwortlich sein.

γ -Untereinheit. Dieses Protein (222 Aminosäuren) ist ein integrales glykosyliertes Membranprotein (Abb. 2), das wahrscheinlich nur im Skelettmuskel exprimiert wird (7, 26).

Struktur der L-Typ-Calciumkanäle in verschiedenen Geweben

Aufgrund der geringen Dichte der Kalziumkanäle liegt bisher keine homogen gereinigte Präparation aus anderen Geweben als Skelettmuskel vor. Es gibt jedoch Hinweise, daß sich die Proteine der Calciumkanäle im Herzen (55) und im Hirn (1, 34) von denen des Kanals aus Skelettmuskel unterscheiden.

den. In Übereinstimmung mit diesen Experimenten sind Untersuchungen, die zur Klonierung der cDNS von α_1 -Untereinheiten aus Herz (35), glattem Muskel (5), Hirn (36, 59, 74) und neuroendokrinem Gewebe (56) geführt haben und die zeigen, daß diese Kanalproteine untereinander verschieden sind und zur α_1 -Untereinheit aus Skelettmuskel eine Homologie von 41 – 70% aufzeigen. Die relativen Molekulargewichte der bisher bekannten α_1 -Untereinheiten reichen von 212 018 (Skelettmuskel, 1 873 Aminosäuren) bis 273 217 (Hirn, 2 424 Aminosäuren).

Entsprechend ergeben Untersuchungen auf Transkriptionsebene für die α_1 -Untereinheit im Skelettmuskel eine mRNS mit einer Länge von 6 500 Basen (4, 64); in Herz, Hirn, Aorta, Trachea und Lunge lassen sich spezifische 8,9 und 15,5 kb (Kilobasen) Transkripte nachweisen (4). Für die α_2/δ -Untereinheit finden sich in allen Geweben zwei Transkripte von jeweils 7 und 8 kb (4). β -spezifische Transkripte werden außer im Skelettmuskel auch in Hirn, Aorta und Herz exprimiert (24). Ein Transkript der γ -Untereinheit (1,3 kb) existiert im Skelettmuskel, möglicherweise aber nicht in anderen Geweben (4, 7). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Calciumkanäle der einzelnen Gewebe sich in ihren Untereinheiten unterscheiden.

Die bisher identifizierten α_1 -Untereinheiten lassen sich in vier verschiedene Klassen einteilen, die jeweils von einem Gen kodiert werden (22, 45). Durch alternatives Spleißen dieser Gene entstehen jeweils mehrere Spleißvarianten. Gen 1 (CaCh1) kodiert die α_1 -Untereinheit aus Skelettmuskel. Die Einschleusung dieser Nukleinsäure in Fibroblasten aus der Maus und in Myoblasten von Mäusen mit muskulärer Dysgenese, sog. mdg-Zellen, führt zur Expression DHP-sensitiver Calciumkanäle (65). In mdg-Zellen ist gleichzeitig die elektromechanische Kopplung gestört, und die Injektion eines rekombinanten Plasmids, das die cDNS der α_1 -Untereinheit aus Skelettmuskel enthält, führt nicht nur zur Ausbildung eines DHP-sensitiven Calciumkanals, sondern auch zur Wiederherstellung dieser Kopplung, so daß nach elektrischer Reizung diese Zellen wieder kontrahieren können (65). α_1 aus Herz und glattem Muskel sind Spleißprodukte von Gen 2 (CaCh2, 4, 5) und kodieren wie α_1 aus Skelettmuskel DHP-sensitive Calciumkanäle (5, 35), während die Gene 3 und 4 neurale α_1 -Untereinheiten kodieren, die partiell durch ω -Conotoxin (CaCh3, 74) und AgaIII Toxin inhibierbar sind (CaCh4, 36).

Für die α_2/δ -Untereinheit ist bisher nur ein Gen identifiziert worden, dessen verschiedene Spleißprodukte im Skelettmuskel und im Hirn exprimiert werden (14, 29).

Für die β -Untereinheit existieren mindestens drei verschiedene Gene, die als CaB1, CaB2 und CaB3 bezeichnet werden (Tab. 1; 24). Das Primärtranskript der β -Untereinheit des Skelettmuskels (CaB1) wird alternativ gespleißt, wobei eine Isoform in erster Linie im Skelettmuskel (CaB1a; 54), die ande-

Tab. 1 Genetischer Polymorphismus der β -Untereinheit des spannungsaktivierten Calciumkanals.

Gen	Splice-variante	Gewebe	Spezies	AA	cA-Phos	Referenz
CaB1	β 1a	Skelettmuskel	Kaninchen	524	T ₂₀₅ *	Ruth et al., 1989
	β 1b	Hirn	Ratte	597	T ₂₀₅	Pragnell et al., 1991
	β 1c	Hirn	Mensch	478	T ₂₀₅	Williams et al., 1992
	β 1d	Hippocampus	Mensch	**	T ₂₀₅	Williams et al., 1992
CaB2	β 2a	Herz	Kaninchen	606	T ₁₆₅	Hullin et al., 1992
		Hirn		PCR	T***	
		Aorta		PCR	T***	
	β 2b	Herz	Kaninchen	632	T ₁₉₁	Hullin et al., 1992
		Hirn		PCR	T***	
		Aorta		PCR	T***	
	β 2c	Hirn	Kaninchen	PCR	T***	Hullin et al., 1992
	β 2d	Hirn	Ratte	604	T ₁₆₄	Perez-Reyes et al., 1992
Herz		Ratte	PCR	****	Perez-Reyes et al., 1992	
CaB3	β 3	Herz	Kaninchen	477	n. v.	Hullin et al., 1992
		Hirn		PCR	n. v.	
		Aorta		PCR	n. v.	

PCR, durch Polymerase-Ketten-Reaktionen erzeugtes, unvollständiges cDNS-Fragment einer β -Untereinheit; AA, Anzahl der Aminosäurereste der jeweiligen Primärstruktur; cA-Phos, Position der Konsensussequenzen für Phosphorylierung durch cAMP-abhängige Proteinkinase analog zu *; T, Threonin; *: durch cAMP-abhängige Proteinkinase in vitro phosphorylierter Threoninrest; **: karboxyterminal unvollständiger cDNS-Klon; ***: Konsensussequenz für cAMP-abhängige Phosphorylierung in PCR-Fragment enthalten; ****: Position der Konsensussequenz für cAMP-abhängige Phosphorylierung liegt außerhalb des durch PCR amplifizierten cDNS-Fragments; n. v., Konsensussequenz für cAMP-abhängige Proteinkinase nicht vorhanden.

ren im Hirn (CaB1b) exprimiert werden (47, 74). Die cDNS von CaB2 und CaB3 wurden ursprünglich von mRNA kloniert, die aus Herz isoliert wurde (24). Das Ausmaß der Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz von CaB2 und CaB3 im Vergleich zu CaB1 beträgt 71 bzw. 67%. Wie im Falle von CaB1 wird auch bei CaB2 das Primärtranskript gespleißt, wodurch mehrere Genprodukte entstehen: CaB2a, CaB2b, CaB2c (24) und CaB2d (43). Auch die Transkripte vom Typ CaB2 und CaB3 werden gewebspezifisch exprimiert, wobei Typ CaB2 vor allem im Herzen, aber auch in Aorta, Lunge, Trachea und Hirn, CaB3 dagegen überwiegend in Hirn und in geringeren Mengen in Aorta, Trachea und Lunge existiert (24). Sowohl Aorta als auch Trachea, Herz und Lunge besitzen einen hohen Anteil an glattem Muskel, und CaB3 könnte aus diesen Zellen stammen. cDNS von Proteinen, welche der γ -Untereinheit des Skelettmuskels entsprechen, konnte aus anderen Geweben bisher nicht kloniert werden.

Expression und Regulation von Calciumkanälen

Einige der bisher klonierten Calciumkanal- α_1 -Untereinheiten konnten in Oocyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (5, 35, 36, 58, 74), in Fibroblasten (L-Zellen; 31, 44, 71) und Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen; 6, 73) zu funktionellen Calciumkanälen exprimiert werden. Die Eigenschaften dieser Kanäle unterscheiden sich von denen nativer Calciumkanäle. Beispielsweise inaktiviert der durch α_1 aus Skelett-

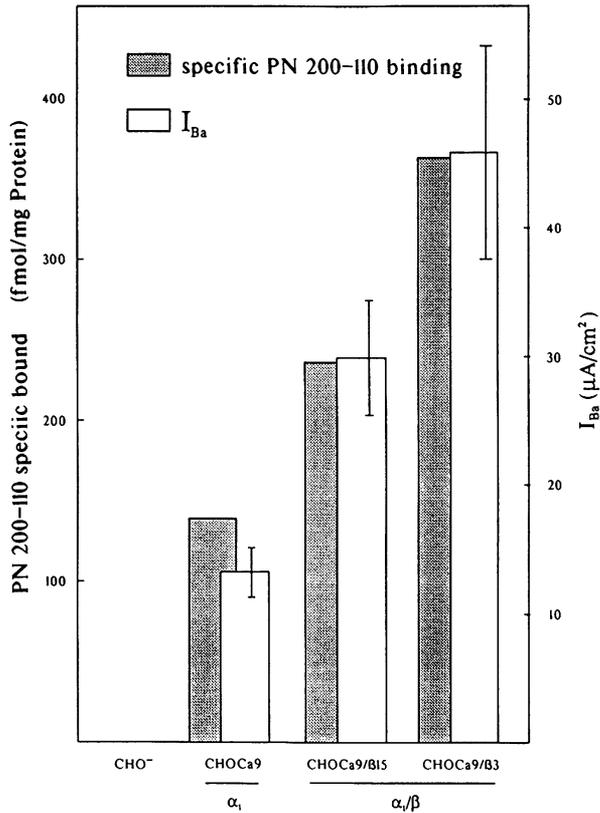


Abb. 3 Stabile Expression der Calciumkanal-Untereinheiten in somatischen Zellen. Die α_1 -Untereinheit aus glattem Muskel (CaCh2b) wurde allein oder in Kombination mit der β -Untereinheit aus Skelettmuskel (CaB1a) stabil in Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) exprimiert. Auf der senkrechten Achse links ist die Dichte der Bindungsstellen für den Dihydropyridin-Typ Calciumkanalblocker PN 200-110, rechts die Stromamplitude von Bariumeinwärtsströmen (I_{Ba}) durch den neu exprimierten Calciumkanal dargestellt. Zellen, die α_1 exprimieren (CHO α_1), nicht aber die nicht transfizierten Zellen CHO-Zellen, binden den Calciumkanalblocker (schraffierter Balken) und weisen Bariumeinwärtsströme auf (offener Balken). Koexpression von α_1 und β (CHO α_1/β_{15} - und CHO α_1/β_3 -Zellen) führt zu einer Zunahme der Zahl der Bindungsstellen und der Ströme.

muskel induzierte Calciumkanal in L-Zellen etwa 100fach langsamer als der native Calciumkanal im Skelettmuskel (44). Gleichzeitige Expression der β -Untereinheit (CaB1) beschleunigt die Aktivierung, die sich nun von der des nativen Kanals nicht mehr unterscheidet (31, 70). Ähnlich verhält es sich, wenn α_1 aus Herz zusammen mit CaB1, CaB2 und CaB3 oder zusätzlich mit α_2/δ exprimiert wird (24, 58, 71). Neben der Beeinflussung des Öffnungs- und Schließungsverhaltens der Calciumkanäle führen β und α_2/δ auch zu einer Zunahme der Stromdichte und zumindest in den CHO-Zellen auch zu einer Zunahme der Zahl der Bindungsstellen für Calcium-Kanalblocker (Abb. 3). Die γ -Untereinheit verschiebt dagegen die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung eines durch α_1 aus Herz hervorgerufenen Calciumkanals zu negativeren Potentialen (58). Eine ähnliche spannungsabhängige Inaktivierung findet man nur bei nativen Calciumkanälen im Skelettmuskel. Es ist daher wahrscheinlich, daß die γ -Untereinheit, die nur im Skelettmuskel exprimiert wird, für diese spezielle Kinetik verantwortlich ist.

Die Öffnung des L-Typ-Calciumkanals wird durch Änderungen des Membranpotentials reguliert. Darüber hinaus modulieren Hormone über Second-messenger-Systeme wie cAMP oder Guaninnukleotid-bindende Proteine (sog. G-Proteine) die Kanalfunktion (10, 68). So nimmt in Gegenwart von Isoproterenol der Calciumstrom durch den Kanal in Herzmuskelzellen (42) und an glatten Muskelzellen aus Trachea (72) um das Drei- bis Vierfache zu. Im Herzen führt die Stimulierung des β -adrenergen Rezeptors dabei zunächst zu einer Aktivierung der Adenylzyklase (Abb. 4). Die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt an, und cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Dadurch dissoziiert das inaktive Holoenzym in seine Untereinheiten. Die nun aktive katalytische Untereinheit der Kinase phosphoryliert den Kanal oder ein damit assoziiertes Protein und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit, daß der Kanal öffnet oder zur spannungsaktivierten Öffnung verfügbar ist (28). In der glatten Muskelzelle dagegen führt der β -adrenerge Rezeptor nicht über die cAMP-Kaskade, sondern direkt über ein G-Protein zur Stromzunahme durch den Kanal (72). Diese Ergebnisse überraschen, da beide Zelltypen cAMP-abhängige Proteinkinase besitzen und die Primärstrukturen der α_1 -Untereinheiten aus Herz und glattem Muskel identische potentielle Phosphorylierungsstellen enthalten (4, 5). Eine Erklärung könnte darin bestehen, daß nicht die α_1 -Untereinheit das Substrat für die Proteinkinase darstellt, sondern daß die unterschiedliche Modulation der Kalziumströme von der Phosphorylierung anderer Untereinheiten wie z. B. der β -Untereinheiten abhängt. In der Aminosäuresequenz der CaB2- β -Untereinheit, welche in erster Linie im Herzen exprimiert wird, existiert ein Aminosäurerest (Thr₁₆₅ in CaB2a bzw. Thr₁₉₁ in CaB2b), der durch cAMP-abhängige Proteinkinase phosphory-

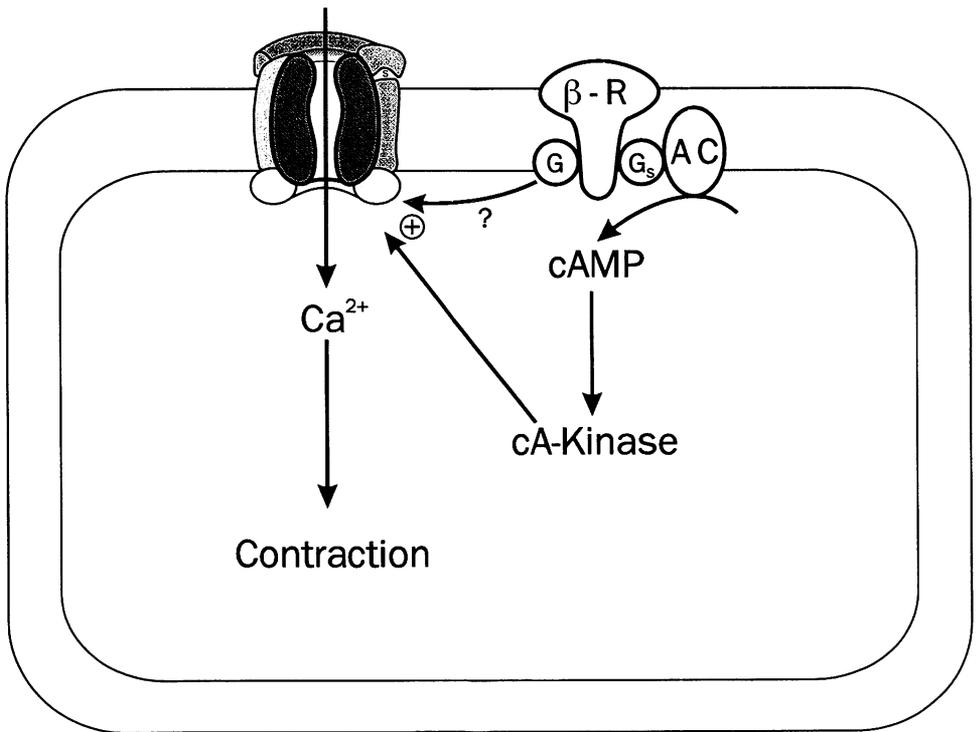


Abb. 4 Hormonelle Regulation des Calcium-Einstroms am Herzen. Dargestellt ist das Schema einer Herzmuskelzelle. Stimulierung des β -adrenergen Rezeptors führt zu einer Zunahme des Calcium-Einwärtsstroms und damit zu einer Kontraktionszunahme am Herzen. Zwei dafür wesentliche Mechanismen sind dargestellt. Zum einen wird über cAMP die cAMP-abhängige Proteinkinase aktiviert, die den Kanal oder ein damit assoziiertes Protein phosphoryliert. Zum anderen kann es zur Wechselwirkung eines Guaninnukleotid-bindenden Proteins mit dem Kanal kommen. β -R, β -adrenerger Rezeptor; G, Guaninnukleotid-bindendes Protein; AC, Adenylatcyclase; cA-Kinase, cAMP-abhängige Proteinkinase.

liert werden kann (24). Dieser Threoninrest entspricht dem Thr₂₀₅ der CaB1- β -Untereinheit, der *in vitro* durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert wird (11). Die β -Untereinheit vom CaB3-Typ, die im glatten Muskel und im Hirn exprimiert wird, enthält dagegen keine entsprechende Phosphorylierungsstelle für die cAMP-abhängige Proteinkinase (24). Dementsprechend könnte der Kanal im Herzen, nicht aber der im glatten Muskel über Phosphorylierung einer β -Untereinheit in seiner Aktivität moduliert werden. Die Zusammensetzung des Kalziumkanals aus gewebsspezifischer α_1 -Untereinheit und den „dazugehörigen“ anderen Untereinheiten ist also nicht nur verantwortlich für seine elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften, sondern wahrscheinlich auch für seine Modulierbarkeit durch Hormone.

Zusammenfassung

L-Typ-Calciumkanäle sind Heterooligomere; sie setzen sich aus einer α_1 -, einer α_2/δ -, einer β - und zumindest im Skelettmuskel einer zusätzlichen γ -Untereinheit zusammen. Die verschiedenen gewebsspezifisch exprimierten α_1 -Untereinheiten bilden die calciumionenleitende Pore des Kanals und enthalten die Bindungsstellen für Calcium-Kanalblocker. Die anderen Untereinheiten beeinflussen spezifisch in unterschiedlichem Ausmaß das Schaltverhalten, möglicherweise auch die pharmakologischen Eigenschaften und die hormonelle Modulierbarkeit des durch die α_1 -Untereinheit gebildeten Ionenkanals. Bisher sind für die α_1 -Untereinheit und die β -Untereinheit insgesamt vier bzw. drei verschiedene Gene kloniert worden, deren Primärtranskripte gespleißt und gewebsspezifisch exprimiert werden. Sowohl für die α_2/δ -Untereinheit als auch für die γ -Untereinheit ist bisher nur jeweils ein Gen isoliert worden. Expressionsuntersuchungen mit Kombinationen homologer Untereinheiten, d. h. Untereinheiten aus einem Gewebe, und heterologer Untereinheiten sprechen dafür, daß die gewebsspezifische Expression der einzelnen Untereinheiten des Calciumkanals für die gewebetypischen Calciumströme und deren Modulation durch Proteinphosphorylierung und Guaninnukleotid-bindende Proteine verantwortlich ist. Dieser genetische Polymorphismus spannungsabhängiger Calciumkanäle kann für die Therapie insofern von Bedeutung sein, als daß er zu Calciumkanälen führt, die pharmakologisch möglicherweise sehr unterschiedlich zu beeinflussen sind.

Literatur

1. Ahljianian MK, Westenbroek RE, Catterall WA. Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord and retina. *Neuron* 1990; 4: 819–32.
2. Babitch J. The DHP-receptor contains a calcium binding site. *Nature* 1990; 346: 321–2.
3. Bertolini M, Llinás R. The central role of voltage-activated and receptor operated calcium channels in neuronal cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32: 399–421.
4. Biel M, Hullin R, Freundner St, Singer D, Dascal N, Flockerzi V, Hofmann F. Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur J Biochem* 1991; 200: 81–8.
5. Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stühmer W, Flockerzi V, Hofmann F. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* 1990; 269: 409–12.
6. Bosse E, Bottlender R, Kleppisch T, Hescheler J, Welling A, Hofmann F, Flockerzi V. Stable and functional expression of the calcium channel α_1 subunit from smooth muscle in somatic cell lines. *EMBO J* 1992; 11: 2033–8.
7. Bosse E, Regulla S, Biel M, Ruth P, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F. The cDNA and deduced amino acid sequence of the γ subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 1990; 267: 153–6.

8. Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992; 256: 532–5.
9. Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R. Synaptotagmin: A calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 1992; 256: 1021–4.
10. Brown AM, Birnbaumer L. Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu Rev Physiol* 1990; 52: 197–213.
11. De Jongh KS, Merrick DK, Catterall WA. Subunits of purified calcium channels: A 212-kDa form of α_1 and partial amino acid sequence of a phosphorylation site of an independent β subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8585–9.
12. De Jongh KS, Warner C, Catterall WA. Subunits of purified calcium channels; α_2 and δ are encoded by the same gene. *J Biol Chem* 1990; 265: 14738–41.
13. De Jongh KS, Warner C, Colvin AA, Catterall WA. Characterization of the two size forms of the α_1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10778–82.
14. Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, Campbell KP, McKenna E, Koch WJ, Hui A, Schwartz A, Harpold MM. Sequence and expression of mRNAs encoding the α_1 and α_2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 1988; 241: 1661–4.
15. Ferry DR, Rombusch M, Goll A, Glossmann H. Photoaffinity labelling of Ca^{2+} channels with (^3H)azidopine. *FEBS* 1984; 169: 112–8.
16. Fleischer S, Inui M. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Chem* 1989; 18: 333–64.
17. Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F. Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal muscle microsomes. *Eur J Biochem* 1986; 161: 217–24.
18. Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F, Pelzer D, Cavalié A, Trautwein W. Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* 1986; 323: 66–8.
19. Guy HR, Conti F. Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *TINS* 1990; 13: 201–6.
20. Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992; 356: 441–3.
21. Hille B. Calcium channels. In: *Ionic channels of excitable membranes*. 2. Aufl. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1992: 83–114.
22. Hofmann F, Biel M, Hullin R, Bosse E, Flockerzi V. High voltage activated calcium channels. In: *GTPase in Biology*. Dickey B, Birnbaumer L, eds. *Handbook of Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg 1993: im Druck.
23. Hofmann F, Flockerzi V, Nastainczyk W, Ruth P, Schneider T. The molecular structure and regulation of muscular calcium channels. *Curr Top Cell Regulation* 1990; 31: 223–39.
24. Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V. Calcium channel β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J* 1992; 11: 885–90.
25. Jahn H, Nastainczyk W, Röhrkasten A, Schneider T, Hofmann F. Site specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II. *Eur J Biochem* 1989; 178: 535–42.
26. Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell K. Primary structure of the γ subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 1990; 248: 490–2.
27. Jay SD, Sharp AH, Kahl StD, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel α_2 -subunit and the associated δ peptides. *J Biol Chem* 1991; 266: 3287–93.
28. Kameyama M, Hescheler J, Hofmann F, Trautwein W. Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in the guinea pig heart. *Pflügers Arch* 1986; 407: 123–8.
29. Kim HL, Kim H, Lee P, King RG, Chin HR. Rat brain expresses an alternatively spliced form of the dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel α_2 -subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3251–5.

30. Kim KC, Caswell AH, Talvenheimo JA, Brandt NR. Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry* 1990; 29: 9281–9.
31. Lacerda AE, Kim HS, Ruth P, Perez-Reyes E, Flockerzi V, Hofmann F, Birnbaumer L, Brown AM. Normalization of current kinetics by interaction between the α_1 and β subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel. *Nature* 1991; 352: 527–30.
32. Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage sensitive residues in the S4 region of a mammalian K^+ channel. *Nature* 1991; 353: 752–6.
33. Lopez GA, Jan YN, Jan LY. Hydrophobic substitution in the S4 sequence alter voltage-dependent-gating in shaker K^+ channels. *Neuron* 1991; 7: 327–36.
34. McEnery MW, Snowman AM, Sharp AH, Adams ME, Snyder SH. Purified ω -conotoxin GIVA receptor of rat brain resembles a dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11095–9.
35. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989; 340: 230–3.
36. Mori Y, Friedrich T, Kim M-S, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, Mikoshiba K, Imoto K, Tanabe T, Numa S. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 1991; 350: 398–402.
37. Mundiña-Weilenmann C, Ma J, Rios E, Hosey M. Dihydropyridine-sensitive skeletal muscle Ca channels in polarized planar bilayers. *Biophysical J* 1991; 60: 902–9.
38. Nakayama H, Taki M, Striessnig J, Glossmann H, Catterall WA, Kanaoka Y. Identification of 1,4-dihydropyridine binding regions within the α_1 subunit of skeletal muscle Ca^{2+} channels by photoaffinity labeling with diazepam. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9203–7.
39. Nastainczyk W, Röhrkasten A, Sieber M, Rudolph C, Schächtele C, Marmé D, Hofmann F. Phosphorylation of the purified receptor for calcium channel blockers by cAMP kinase and protein kinase C. *Eur J Biochem* 1987; 169: 137–42.
40. Norman RI, Burgess AJ, Allen E, Harrison TM. Monoclonal antibodies against the 1,4-dihydropyridine receptor associated with voltage-sensitive Ca^{2+} channels detect similar polypeptides from a variety of tissues and species. *FEBS Lett* 1987; 212: 127–32.
41. Numa S. A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. *Harvey Lect.* 1989; 83: 121–65.
42. Osterrieder W, Brum G, Hescheler J, Trautwein W, Flockerzi V, Hofmann F. Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates calcium current. *Nature* 1982; 298: 576–8.
43. Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda A, Wei X, Birnbaumer L. Cloning and expression of cardiac/brain β subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* 1992; 267: 1792–7.
44. Perez-Reyes E, Kim HS, Lacerda AE, Horne W, Wei X, Rampe D, Campbell KP, Brown AM, Birnbaumer L. Induction of calcium currents by the expression of the α_1 subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 1989; 340: 233–6.
45. Perez-Reyes E, Wei X, Castellano A, Birnbaumer L. Molecular diversity of L-type calcium channel. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *J Biol Chem* 1990; 265: 20430–6.
46. Pongs O. Molecular basis of potassium channel diversity. *Pflügers Arch* 1989; 414 (Suppl 1): S71–5.
47. Pragnell M, Sakamoto J, Jay SD, Campbell KP. Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel β -subunit. *FEBS Lett* 1991; 291: 253–8.
48. Regulla S, Schneider T, Nastainczyk W, Meyer HE, Hofmann F. Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium-channel α_1 subunit. *EMBO J* 1991; 10: 45–9.
49. Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 1983; 301: 569–74.
50. Rios E, Pizarro G, Stefani E. Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-concentration coupling. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 251–275.

51. Röhrkasten A, Meyer HE, Nastainczyk W, Sieber M, Hofmann F. cAMP-dependent protein kinase rapidly phosphorylates serine-687 of the skeletal muscle receptor for calcium channel blockers. *J Biol Chem* 1988; 263: 15325–9.
52. Rotman EI, Florio V, Lai Y, De Jongh D, Catterall WA. Specific phosphorylation of a C-terminal site on the 212 kDa form of the α_1 subunit of the skeletal muscle calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J* 1992; 6: A246.
53. Ruth P, Flockerzi V, Nettelbladt E, Oeken J, Hofmann F. Characterization of the binding sites for nimodipine and (–)-desmethoxyverapamil in bovine cardiac sarcolemma. *Eur J Biochem* 1985; 150: 313–22.
54. Ruth P, Röhrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann F. Primary structure of the β subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 1989; 245: 1115–8.
55. Schneider T, Hofmann F. The bovine cardiac receptor for calcium channel blockers is a 195 kDa protein. *Eur J Biochem* 1988; 174: 369–75.
56. Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI. Cloning of the α_1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 584–8.
57. Sieber M, Nastainczyk W, Zubor V, Wernet W, Hofmann F. The 165-KDa peptide of the purified skeletal muscle dihydropyridine receptor contains the known regulatory sites of the calcium channel. *Eur J Biochem* 1987; 167: 117–22.
58. Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 1991; 253: 1553–7.
59. Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP, Gilbert MM. Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* 1991; 7: 45–57.
60. Striessnig J, Glossmann H, Catterall WA. Identification of a phenylalkylamine binding region within the α_1 subunit of skeletal muscle Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9108–12.
61. Striessnig J, Murphy BJ, Catterall WA. Dihydropyridine receptor of L-type Ca^{2+} channels: Identification of binding domains for [^3H](+)-PN200-110 and [^3H]azidopine within the α_1 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10769–73.
62. Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in the activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989; 339: 597–603.
63. Swandulla D, Carbone E, Lux HD. Do calcium channel classifications account for neuronal calcium channel diversity? *TINS* 1991; 14,2: 46–51.
64. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987; 328: 313–8.
65. Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 1988; 336: 134–9.
66. Tanabe T, Beam KG, Adams BA, Niidome T, Numa S. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 1990; 346: 567–9.
67. Tanabe T, Brett AA, Numa S, Beam KG. Repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium current by phosphorylation and G-proteins. *Annu Rev Physiol* 1990; 52: 257–73.
68. Trautwein W, Hescheler J. Regulation of cardiac L-type calcium channel activation kinetics. *Nature* 1991; 352: 800–3.
69. Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, Rosenberg RL. Calcium channels: Mechanisms of selectivity, permeation and block. *Annu Rev Biophys Chem* 1987; 16: 265–90.
70. Varadi G, Lory P, Schultz D, Varadi M, Schwartz A. Acceleration of activation and inactivation by the β subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 1991; 352: 159–62.

71. Wei X, Perez-Reyes E, Lacerda AE, Schuster G, Brown AM, Birnbaumer L. Heterologous regulation of the cardiac Ca^{2+} channel α_1 subunit by skeletal muscle β and τ subunits. *J Biol Chem* 1991; 266: 21943–7.
72. Welling A, Felberl J, Peper K, Hofmann F. Hormonal regulation of calcium current in freshly isolated airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992; 262: L351–9.
73. Welling A, Bosse E, Ruth P, Bottlender R, Flockerzi V, Hofmann F. Expression and regulation of cardiac and smooth muscle calcium channels. *J J Pharmacol* 1992; im Druck.
74. Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM. Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 1992; 8: 71–84.
75. Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of K^+ channel. *Science* 1991; 251: 939–44.
76. Yool AJ, Scharz TL. Alteration of ionic selectivity of a K^+ channel by mutation of H5 region. *Nature* 1991; 349: 700–4.