

## Kurzzusammenfassung

Calciumkanäle kontrollieren den Einstrom der Calciumionen in die Zelle und ermöglichen die selektive, dem Konzentrationsgradienten und der Ladungsdifferenz folgende, passive Permeation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellulärraum in das Cytosol. Spannungsabhängige Calciumkanäle gehören zur Gruppe der transmembranären Ionenkanäle. Sie sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaute Proteinkomplexe. Die porenbildende  $\alpha_1$ -Untereinheit ist der funktionell wichtigste Bestandteil des Kanals und dominiert seine biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften. Die übrigen Untereinheiten besitzen modulatorische Funktionen und werden als  $\beta$ -,  $\alpha_2\delta$ - und  $\gamma$ -Hilfsuntereinheiten bezeichnet. Die Zusammensetzung des heteromeren Kanalkomplexes ist dabei variabel und u.a. von Organ, Zelltyp oder Krankheitszuständen abhängig.

$\text{Ca}_v1.3$  L-Typ Calciumkanäle haben eine bedeutende Rolle unter anderem für Hörprozesse, Kontrolle der Herzfrequenz, neuronale Erregbarkeit, aber auch Depressions-, und Angstverhalten sowie das räumliche Gedächtnis. Vor kurzem wurde eine zentrale Rolle von  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanälen für die Pathophysiologie des Morbus Parkinson beschrieben.

Wir konzentrieren uns auf zwei natürlich vorkommende  $\text{Ca}_v1.3$ -Isoformen. Durch alternatives Spleißen kommen lange Isoformen mit einem langen C-Terminus (hier:  $\text{Ca}_v1.3_{42}$ ) sowie kurze mit distal verkürztem C-Terminus (hier:  $\text{Ca}_v1.3_{42A}$ ) vor. Die lange  $\text{Ca}_v1.3_{42}$ -Isoform enthält eine C-terminale Modulator Domäne (CTM), die die sogenannte calciumabhängige Inaktivierung (CDI) des Kanals verhindert. Die CDI wird als ein wichtiger Inaktivierungsprozess und Rückkopplungsmechanismus betrachtet, der die Zelle vor übermäßigem Calciumeinstrom schützt. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierungsprozess wird durch den C-Terminus vermittelt: lokal erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen werden durch das Calcium-bindenden Protein Calmodulin (CaM) registriert. CaM bindet an ein C-terminal lokalisiertes IQ-Motiv der Calciumkanalpore (Halling et al., 2005). Der C-Terminus spielt auch eine wichtige Rolle im Membran-Targeting des Kanals, also dem Transport des Ionenkanals vom endoplasmatischen Retikulum in die Zellmembran. Es gibt Hinweise darauf, dass die intramolekulare Interaktion von CTM mit dem proximalen C-Terminus der Kanalpore die Bindung von Calmodulin behindert. Um die Mechanismen der CTM-vermittelten Hemmung der  $\text{Ca}_v1.3$ -Kanäle zu untersuchen, haben wir Einzelkanalmessungen durchgeführt. Unsere Messungen mit  $\text{Ba}^{2+}$  als Ladungsträger zeigen, dass die kurze Isoform ( $\text{Ca}_v1.3_{42A}$ ) eine hohe Aktivität aufweist, was dem Zustand entspricht, in dem apo-CaM an den C-Terminus des Kanals gebunden hat. Die CTM der langen  $\text{Ca}_v1.3_{42}$ -Isoform verhindert die Bindung von CaM, was zu einer geringen Aktivität des Kanals führt. Allerdings war in einigen Zellen (zwei von

sieben) zu beobachten, dass die Aktivität der Cav1.3<sub>42</sub>-Isoform zwischen hoher und niedriger Kanalaktivität wechselte. Eine Erklärung dafür wäre der Wechsel von Bindung und Dissoziation von CaM.

Mit Ca<sup>2+</sup> als Ladungsträger wird die CDI (sichtbar z.B. als Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit am Ende des Pulses) ermöglicht. In einer Publikation von Josephson et al. 2010 wurden statistische Ansätze entwickelt, um die Wirkung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen auf das Schaltverhalten im Detail zu analysieren. Im Einklang mit den Befunden von Josephson et al. zeigen unsere Ergebnisse, dass die relative Verkürzung der Offenzeit von der Summe der Ca<sup>2+</sup>-Ionen, die durch den Kanal fließen, abhängig ist. Je steiler diese Abhängigkeit ist, desto stärker ist der Inaktivierungseffekt von Ca<sup>2+</sup>-Ionen bzw. die CDI-Sensitivität. Wir finden, dass die CDI-Sensitivität für Cav1.3<sub>42A</sub> größer zu sein scheint als für Cav1.3<sub>42</sub>. Dabei reichen Ca<sup>2+</sup>-Ströme durch einzelne Cav1.3-Kanäle aus, um eine CDI zu verursachen. Es ist bekannt, dass die CTM-Domäne die CDI der Cav1.3<sub>42</sub>-Isoform hemmt (Singh et al., 2006; Bock et al. 2011). Allerdings zeigen unsere Ergebnisse, dass diese Hemmung nicht vollständig bzw. anhaltend erfolgt: in den meisten Messungen mit Ca<sup>2+</sup> als Ladungsträger zeigte sich ein Wechsel zwischen hoher und niedriger Aktivität. Für die meisten Cav1.3<sub>42</sub>-Kanäle beobachten wir eine dynamische Veränderungen der CDI auf der Minutenzeitskala zwischen hoher und niedriger CDI. Zusammenfassend erlauben uns die Einzelkanalaufnahmen die Übergänge des Gleichgewichts zwischen zwei Aktivitätsarten (hohe und niedrige Kanalaktivität und CDI), die aufgrund der vorhandenen CTM in den Cav1.3-Kanälen entstanden sind, aufzuklären.