

# 1. Zusammenfassung

Spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermitteln nach Depolarisation den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Zellen und steuern eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Muskelkontraktion, Sekretion, Neurotransmitter-Freisetzung und Genexpression. Ihre Aktivität ist von grundlegender Bedeutung, um elektrische Signale in zelluläre und physiologische Prozesse umzuwandeln. Innerhalb der verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanaltypen ist die Aktivierung und Regulation des  $\text{Ca}_v2.3$  / R-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals noch unverstanden, teils verursacht durch den Mangel an selektiven Kanal-Antagonisten. Um die Regulation und physiologische Funktion des  $\text{Ca}_v2.3$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals zu untersuchen, wurden kürzlich mehrere Interaktionspartner dieses Kanaltyps identifiziert. In der vorliegenden Studie wurden einige dieser Kandidaten, nämlich Hsp70, eine v-ATPase-Untereinheit, APLP1 und Rab5A biochemisch auf ihre Protein-Proteinwechselwirkung hin untersucht und ihre funktionelle Relevanz getestet.

Um den Mechanismus der Kanalaktivierung zu verstehen, wurde die funktionelle Wechselwirkung von Hsp70 mit  $\text{Ca}_v2.3$  analysiert. Die Hemmung von Hsp70 verursachte eine Reduktion der Inaktivierungszeitkonstante. Somit kann angenommen werden, dass Hsp70 daran beteiligt ist, den Kanal in einer aktiven Konformation zu stabilisieren, wahrscheinlich, indem Hsp70 als ein Brückenprotein (Scaffold-Protein) in einem Aktivierungs-Signaltransduktionsweg dient. Die biochemische Wechselwirkung des  $\text{Ca}_v2.3$  C-Terminus mit der G1-Untereinheit der v-ATPase wurde bestätigt, und es wurde gezeigt, dass sie benötigt wird für das Trafficking des Kanalproteins an die Plasmamembran. Mit APLP1 wurde ein weiterer neuer Interaktionspartner biochemisch bestätigt, welcher funktionell die Kanalprotein-Internalisierung stimuliert. Diese Aufnahme des  $\text{Ca}_v2.3$ -Kanals wurde durch Koexpression von Rab5A aktiviert, ebenso die Endozytose von APLP1 selbst. Insgesamt zeigen die Ergebnisse einen neuen, bisher unbekanntem Mechanismus der Zelloberflächen-Expression des  $\text{Ca}_v2.3$   $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals.

# 1. Summary

Voltage-gated calcium channels (VGCC) mediate calcium influx in response to membrane depolarization and regulate a large number of intracellular processes such as contraction, secretion, neurotransmission, and gene expression. Their activity is essential to couple the electrical signals in the cell surface to physiological events in cells. Among the different types of VGCCs the mechanisms of activation and regulation of Ca<sub>v</sub>2.3 / R-type calcium channel is not fully understood owing to its pharmacological resistance. To explore the regulation and physiological functions of the Ca<sub>v</sub>2.3 calcium channel, protein interaction partners of the channel were identified previously. In this study, among the several candidates, Hsp70, V-ATPase, APLP1 and Rab5A were biochemically validated and their functional relevance was investigated.

To understand the mechanism of activation of the channel, the interaction of Hsp70 was functionally tested. Inhibition of Hsp70 resulted in reduction of inactivation time constant of the channel. This suggested that Hsp70 is involved in maintaining the channel in the active form, presumably by acting as a scaffold protein in the activation pathway. The interaction of C-terminus of the channel with the G1 subunit of V-ATPase was validated and it was demonstrated that it is required for trafficking of the channel to the plasma membrane. Another novel partner, APLP1 was shown to bind to the channel and significantly increase channel internalization. In addition, the endocytotic catalyst Rab5A enhanced the channel internalization and dramatically increased the endocytosis of APLP1. Taken together, these results illustrate a novel, previously unrecognized regulatory mechanism of Ca<sub>v</sub>2.3 calcium channel surface expression.