

Dipl.-Biol. Vladan Rankovic

Abstract of the Dissertation

Theme of the Dissertation - Modulation of Ca²⁺ dependent inactivation of Ca²⁺ channels by intracellular signalling

Summary

Voltage-dependent Ca²⁺ channels are the one of the main routes of cellular Ca²⁺ entry. Intracellular Ca²⁺ ions control processes as diverse as cell proliferation, neuronal development and transmitter release. All of these functions have to be accomplished within a narrow range of Ca²⁺ concentrations, as this cation can be toxic if its level is not tightly controlled. The Ca²⁺-dependent inactivation (CDI) of voltage-dependent Ca²⁺ channels is an auto-inhibitory feedback mechanism controlling the Ca²⁺-influx. In thalamocortical relay neurons this is a very prominent mechanism, but its modulation is not well understood. Recent studies in hippocampal cells have shown a functional link between beta-adrenergic receptors (β-AR) and L-type Ca²⁺ channels (Ca_v1.2) via protein kinase A (PKA) and A kinase anchoring proteins (AKAPs). Therefore, we here combined electrophysiological, immunological and molecular biological techniques to investigate a possible role of β-AR stimulation, PKA and AKAPs in the modulation of CDI of Ca_v1.2 in thalamocortical relay neurons. Our data show that under whole cell patch clamp conditions using double-pulse protocols, β-AR stimulation contributes to modulation of CDI in thalamocortical relay neurons. These effects could be blocked by inhibition of PKA with a cell-permeable inhibitor (myristoylated protein kinase inhibitor-(14-22)-amide) or AKAP St-Ht31 inhibitory peptide, suggesting a critical role of these molecules downstream of the receptor. Blocking of dephosphorylation processes by Okadaic acid revealed an additional contribution of protein phosphatases to the modulation of CDI after β-AR stimulation. Furthermore, we demonstrated that stimulation of β-AR with Isoproterenol caused the translocation of PKA from cytoplasmatic regions to sites close to the plasma membrane and calcium channels in primary hippocampal neurons. Also, the translocation of PKA was reduced by application of AKAP St-Ht31 inhibitory peptide. These data suggest that AKAPs mediate targeting of PKA to L-type Ca²⁺ channels allowing their phosphorylation and modulation of CDI. Finally we provide evidence for a new interaction between AKAPs and calcium-binding protein, caldendrin which may be of specific interest for modulation of CDI in TC neurons. Together with immunocytochemistry and pull down experiments, our data shed light on the existence of a possible inactivation complex for CDI in thalamocortical relay neurons consisting of Ca_v1.2, PKA and proteins from the AKAP family. The present study will contribute to our current knowledge of the physiology of thalamocortical neurons in general and to the modulation of CDI of calcium channels in particular.

Dipl.-Biol. Vladan Rankovic

Zusammenfassung der Dissertation

Thema der Dissertation - Modulation of Ca^{2+} dependent inactivation of Ca^{2+} channels by intracellular signalling

Zusammenfassung

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle stellen einen wichtigen Mechanismus des Ca^{2+} -Einstromes in Zellen dar. Intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen regulieren so unterschiedliche Prozesse wie Proliferation und Entwicklung von Neuronen oder die Freisetzung von Neurotransmittern. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration muß dazu innerhalb enger Grenzen kontrolliert werden, da hohe Konzentrationen zellschädigend wirken. Einen bedeutenden Rückkopplungs-Mechanismus zur Kontrolle des Ca^{2+} -Einstromes stellt die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung von spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanälen (CDI) dar. In thalamocortikalen Schaltneuronen ist dieser Mechanismus zur Kontrolle des Ca^{2+} -Einstromes noch wenig verstanden. Studien an hippocampalen Neuronen legen eine Modulation der CDI durch funktionelle Interaktionen zwischen β -adrenergen Rezeptoren (β -ARs) und L-Typ Ca^{2+} -Kanälen ($\text{Ca}_v1.2$) über die Proteinkinase A (PKA) und A-Kinase Ankerproteine (AKAPs) nahe. Eine solche Modulation der CDI von $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen thalamocortikaler Schaltneurone nach Stimulation β -adrenerger Rezeptoren wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe von elektrophysiologischen, immunohistochemischen und molekularbiologischen Ansätzen untersucht. Mit Hilfe der Ganzzell „patch-clamp“ Technik konnte eine Modulation der CDI thalamocortikaler Neurone in Hirnschnitt-Präparaten nach Stimulation β -adrenerger Rezeptoren gezeigt werden. Die Effekte β -adrenerger Stimulation konnten durch spezifische Inhibitoren von PKA und AKAPs mittels eines membrangängigen Inhibitors (myristoylierter Protein Kinase Inhibitor-(14-22)-amid) bzw. AKAP St-Ht31 Peptid vollständig blockiert werden, was auf deren Rolle in der Signalkette zwischen Rezeptor und Effektor hindeutet. Blockierung von Phosphatasen durch Okadeinsäure hatte dagegen eine Verstärkung der CDI nach β -adrenerger Stimulation zur Folge. An Primärkulturen hippocampaler Neurone konnte darüberhinaus eine Translokation von cytoplasmatischer PKA zur Plasmamembran und zu Ca^{2+} -Kanälen beobachtet werden, die sich durch AKAP St-Ht31 Peptid blockieren ließ. Diese Daten legen eine durch AKAPs vermittelte Phosphorylierung von Ca^{2+} -Kanälen durch PKA nahe. Auf einen möglichen Beitrag Ca^{2+} -bindender Proteine wie Caldendrin zur Modulation der CDI in thalamocortikalen Neuronen weist eine erstmals gezeigte Protein-Protein Interaktion zwischen AKAPs und Caldendrin hin. Zusammen mit den Daten weiterer immunocytochemischer und „pull-down“ Experimente legen die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit die Existenz eines Proteinkomplexes zur Regulation der CDI in thalamocortikalen Schaltneuronen, bestehend aus $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen, PKA und AKAPs, nahe. Die vorgelegte Arbeit erweitert das Verständnis der Regulation Ca^{2+} -abhängiger Mechanismen thalamocorticaler Neurone.