Les déterminants moléculaires et cellulaires de la mutation humaine R482X de la sous-unité Cavb4 impliqués dans l'épilepsie

Abir Tadmouri

▶ **To cite this version:**

Abir Tadmouri. Les déterminants moléculaires et cellulaires de la mutation humaine R482X de la sous-unité Cavb4 impliqués dans l'épilepsie. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00171896

HAL Id: tel-00171896

https://theses.hal.science/tel-00171896

Submitted on 13 Sep 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER- GRENOBLE 1
Faculté de Médecine
Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Spécialité Biotechnologie, Santé et Management

Les déterminants moléculaires et cellulaires de la mutation humaine R482X de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ impliqués dans l'épilepsie

Présentée et soutenue publiquement
par

Abir TADMOURI

Le 27 juin 2007
Devant le jury composé de

Président :	Pr. Emmanuel DROUET
Rapporteurs :	Dr. Pierre CHARNET
	Dr. Alfonso REPRESA
Examinateur :	Dr. Sylvain RICHARD
Directeur de thèse :	Dr. Michel DE WAARD

Thèse réalisée au sein du laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies
INSERM U836

« A la mémoire de ma chère maman... »
« Et de ma tante... »

Je tiens à remercier en premier, mon directeur de thèse, Michel De Waard, pour la confiance qu'il m'a fait et le soutien précieux qu'il m'a offert, afin de mener cette thèse à ses bouts. Je voudrai le remercier particulièrement de m'avoir donné la chance d'intégrer une équipe compétente et solidaire, qui représentait à mes yeux ma seconde famille dans mon deuxième pays. Ainsi, je suis profondément reconnaissante aux chercheurs du labo, Michel Ronjat, Christophe Arnoult et Sandrine Cestel, pour l'aide morale et scientifique, et pour leur esprit convivial et amical.

J'exprime mes vifs remerciements au Pr. Emmanuel Drouet d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, mais également pour son dévouement affectif aux soucis de ses étudiants. Je remercie Dr. Pierre Charnet et Dr. Alfonso Represa, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs et de consacrer un moment pour lire ma thèse. Je remercie notamment Dr. Sylvain Richard de m'avoir fait l'honneur de participer au jury. Je suis reconnaissante au Pr. Mohamad Mikati d'avoir accepté de co-diriger ma thèse.

Je n'oublierai jamais mes collègues du bureau ; Norbert pour son aide et son soutien moral aux moments les plus difficiles, et aussi pour les discussions scientifiques (devant la machine à café) ; Narendra pour son sourire et son humour enfantin (Thank you Ram!), Sonia pour sa bonté et son affection et Emilie pour sa gentillesse, son sourire et son gâteau.. Enfin Merci! pour l'ambiance studieuse et parfois folle du bureau..
Je remercie aussi Florence pour son aide et pour les fois qu'elle était à mes écoutes.. Jessica pour son amitié et nos petites confidences.. Je pense aussi à Hicham (no comment plz), Joséphine et Margaret, et aux anciens membres de l'équipe, Xavi, Nathalie, Stéphane..

Je ne me passerai pas sans remercier mes ami(e)s qui ont eu la peine de me supporter les moments de mes détresses.. En le disant, je pense surtout à Darine qui était là quand j'avais besoin d'une soeur (même en pleine nuit)..
Je tiens à remercier particulièrement un ami qui m'a donné un autre sens de l'amitié.. Qui m'a apporté beaucoup, à tous les niveaux.. Pour ton soutien inlassable.. Merci Aziz! Et Merci de m'avoir fait connaître ton amitié affective et passionnelle..

On dit souvent qu'on ne peut pas choisir sa famille.. Moi Je dis que si j'avais le choix, j'aurai choisi la mienne.. J'aurai choisi Papa pour tout le mal qu'il a pris à consacrer sa vie pour veiller sur nous, et pour nous offrir une meilleure vie.. Et surtout pour sa confiance qui m'a permis d'atterrir ici..
J'aurai évidemment choisi mes trois anges.. Mes soeurs.. Merci et mille Mercis! Pour vos sentiments, votre tendresse et votre amour dans lequel je vois l'amour de notre Maman.

Finalement, un petit mot de reconnaissance à une personne, sans laquelle je n'aurai pas pu achever cette thèse.. Je voudrai remercier Maher sincèrement, pour son soutien et son aide, pour son amour, sa confiance et sa fidélité (j'espère !).. De m'avoir attendu sans se lasser.. D'être fort, et bizarrement plus fort que moi parfois.. J'espère un jour pouvoir te rendre tout ce que tu m'as offert..

« A la mémoire de ma chère maman... »
« Et de ma tante... »

Je tiens à remercier en premier, mon directeur de thèse, Michel De Waard, pour la confiance qu'il m'a fait et le soutien précieux qu'il m'a offert, afin de mener cette thèse à ses bouts. Je voudrai le remercier particulièrement de m'avoir donné la chance d'intégrer une équipe compétente et solidaire, qui représentait à mes yeux ma seconde famille dans mon deuxième pays. Ainsi, je suis profondément reconnaissante aux chercheurs du labo, Michel Ronjat, Christophe Arnoult et Sandrine Cestel, pour l'aide morale et scientifique, et pour leur esprit convivial et amical.

J'exprime mes vifs remerciements au Pr. Emmanuel Drouet d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, mais également pour son dévouement affectif aux soucis de ses étudiants. Je remercie Dr. Pierre Charnet et Dr. Alfonso Represa, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs et de consacrer un moment pour lire ma thèse. Je remercie notamment Dr. Sylvain Richard de m'avoir fait l'honneur de participer au jury. Je suis reconnaissante au Pr. Mohamad Mikati d'avoir accepté de co-diriger ma thèse.

Je n'oublierai jamais mes collègues du bureau ; Norbert pour son aide et son soutien moral aux moments les plus difficiles, et aussi pour les discussions scientifiques (devant la machine à café) ; Narendra pour son sourire et son humour enfantin (Thank you Ram!), Sonia pour sa bonté et son affection et Emilie pour sa gentillesse, son sourire et son gâteau.. Enfin Merci! pour l'ambiance studieuse et parfois folle du bureau..
Je remercie aussi Florence pour son aide et pour les fois qu'elle était à mes écoutes.. Jessica pour son amitié et nos petites confidences.. Je pense aussi à Hicham (no comment plz), Joséphine et Margaret, et aux anciens membres de l'équipe, Xavi, Nathalie, Stéphane..

Je ne me passerai pas sans remercier mes ami(e)s qui ont eu la peine de me supporter les moments de mes détresses.. En le disant, je pense surtout à Darine qui était là quand j'avais besoin d'une soeur (même en pleine nuit)..
Je tiens à remercier particulièrement un ami qui m'a donné un autre sens de l'amitié.. Qui m'a apporté beaucoup, à tous les niveaux.. Pour ton soutien inlassable.. Merci Aziz! Et Merci de m'avoir fait connaître ton amitié affective et passionnelle..

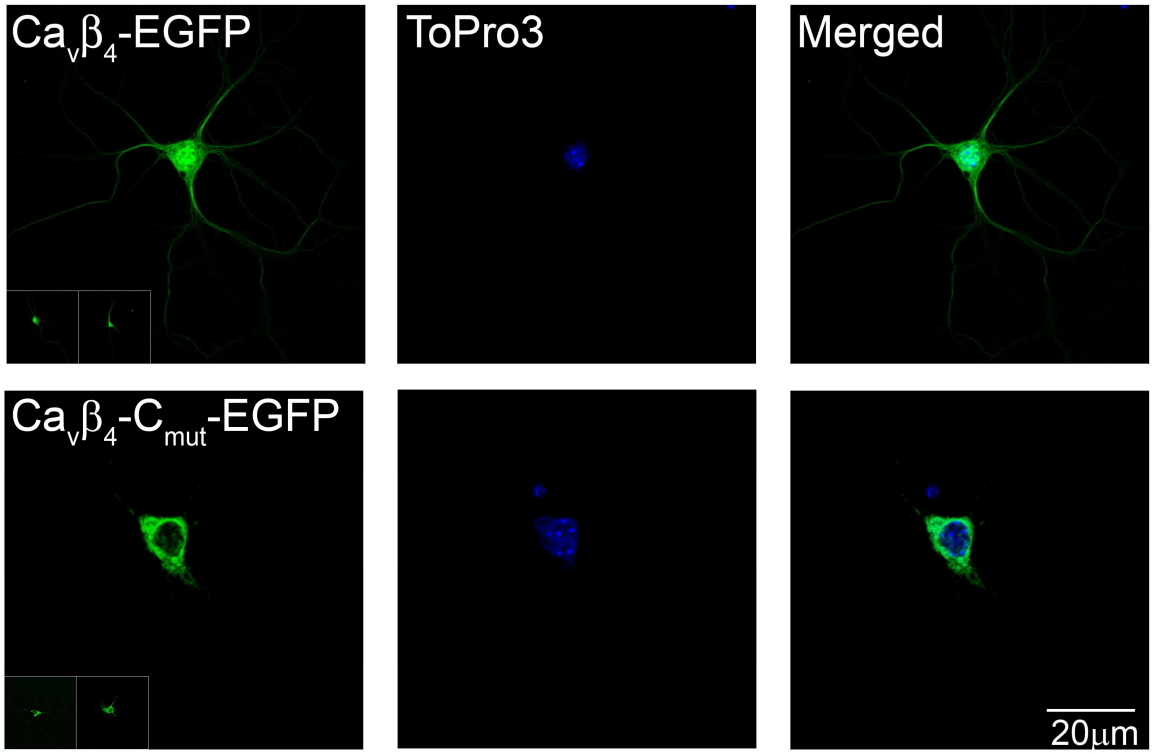
On dit souvent qu'on ne peut pas choisir sa famille.. Moi Je dis que si j'avais le choix, j'aurai choisi la mienne.. J'aurai choisi Papa pour tout le mal qu'il a pris à consacrer sa vie pour veiller sur nous, et pour nous offrir une meilleure vie.. Et surtout pour sa confiance qui m'a permis d'atterrir ici..
J'aurai évidemment choisi mes trois anges.. Mes soeurs.. Merci et mille Mercis! Pour vos sentiments, votre tendresse et votre amour dans lequel je vois l'amour de notre Maman.

Finalement, un petit mot de reconnaissance à une personne, sans laquelle je n'aurai pas pu achever cette thèse.. Je voudrai remercier Maher sincèrement, pour son soutien et son aide, pour son amour, sa confiance et sa fidélité (j'espère !).. De m'avoir attendu sans se lasser.. D'être fort, et bizarrement plus fort que moi parfois.. J'espère un jour pouvoir te rendre tout ce que tu m'as offert..

séquestrer dans le cytoplasme (Figure 23.F). La quantification des images confocales montre une différence importante et significative entre le ratio cytoplasmique/nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP exprimée en présence de la sous-unité mutante (5.36 ± 0.99) et la $Ca_v\beta_4$-EGFP exprimée seule (10.1 ± 3,3) (Figure 23.G). La même étude est en cours de réalisation dans les neurones d'hippocampe en co-exprimant $Ca_v\beta_4$-myc et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP.

Enfin, le mutant montre un effet négatif sur les courants calciques régulés par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène et notamment sur la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native. Comment le mutant exerce cet effet sur la sous-unité $Ca_v\beta_4$ demeure une question sans réponse. En effet, l'idée que les deux protéines interagissent ensemble est exclue. Une étude d'immunoprécipitation suivie par un western blot, à partir des cellules CHO co-transfectées par $Ca_v\beta_4$-myc et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP, montre que ses protéines n'interagissent pas (western non ajouté).

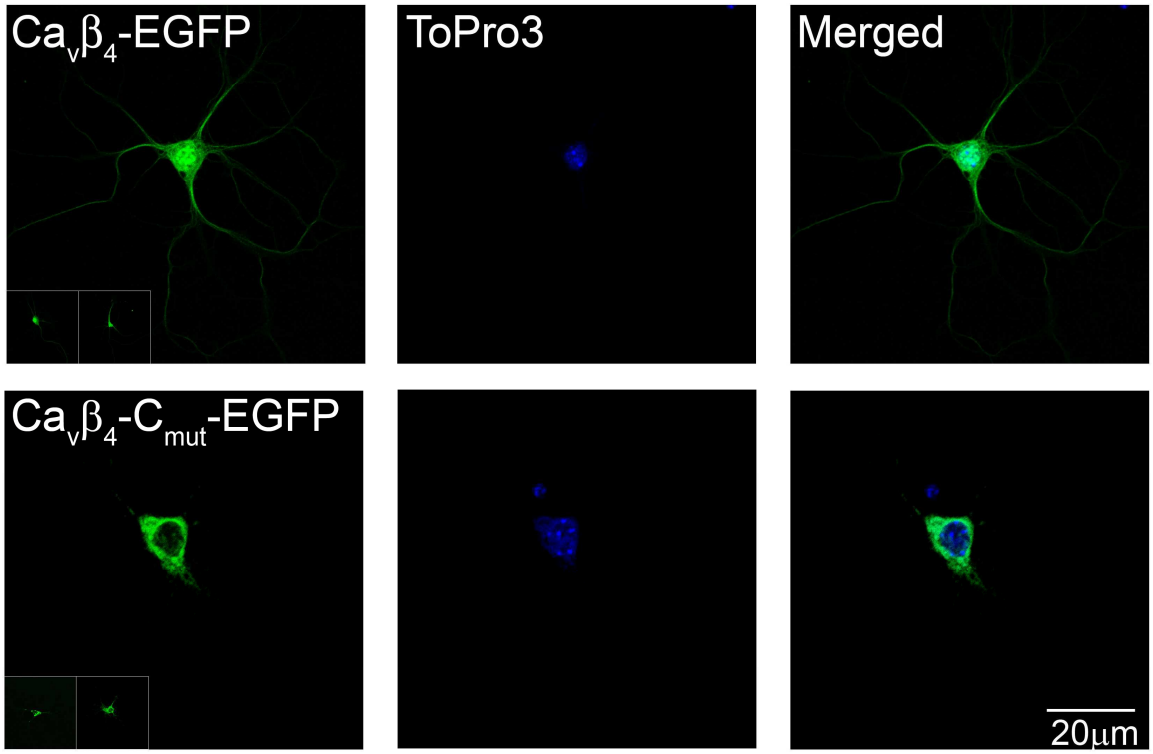
Figure 23-A



séquestrer dans le cytoplasme (Figure 23.F). La quantification des images confocales montre une différence importante et significative entre le ratio cytoplasmique/nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP exprimée en présence de la sous-unité mutante (5.36 ± 0.99) et la $Ca_v\beta_4$-EGFP exprimée seule (10.1 ± 3,3) (Figure 23.G). La même étude est en cours de réalisation dans les neurones d'hippocampe en co-exprimant $Ca_v\beta_4$-myc et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP.

Enfin, le mutant montre un effet négatif sur les courants calciques régulés par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène et notamment sur la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native. Comment le mutant exerce cet effet sur la sous-unité $Ca_v\beta_4$ demeure une question sans réponse. En effet, l'idée que les deux protéines interagissent ensemble est exclue. Une étude d'immunoprécipitation suivie par un western blot, à partir des cellules CHO co-transfectées par $Ca_v\beta_4$-myc et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP, montre que ses protéines n'interagissent pas (western non ajouté).

Figure 23-A



RESUME

Les canaux calciques neuronaux activés par la dépolarisation membranaire contrôlent diverses fonctions cellulaires telles que l'excitabilité neuronale et la transmission synaptique. Les canaux calciques sont formés d'une sous-unité principale Ca_v associée à 3 sous-unités régulatrices (β, $\alpha_2\delta$ et γ). La sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta$ joue un rôle crucial dans la régulation des propriétés biophysiques du canal et dans l'adressage membranaire de la sous-unité Ca_v. Chez l'homme, un isoforme de cette sous-unité $Ca_v\beta_4$ est l'objet de mutations qui conduisent à des phénotypes épileptiques. L'une de ces mutations est une délétion d'une partie du domaine carboxy-terminal de $Ca_v\beta_4$ (R482X). Les efforts effectués pour comprendre les mécanismes cellulaires du phénotype épileptique des patients concernés n'ont pas encore aboutit à des explications probantes. Ainsi, le phénotype neurologique ne semble pas lié à une altération de l'activité du canal, mais plus vraisemblablement à des fonctions cellulaires inconnues de $Ca_v\beta_4$.

Ma thèse porte sur la caractérisation des déterminants moléculaires et cellulaires du mutant humain R482X impliqué dans le phénotype neurologique des patients qui portent la mutation. Etant donné que l'épilepsie implique essentiellement les neurones du lobe temporal, je me suis particulièrement intéressée à l'étude des fonctions et de la localisation de $Ca_v\beta_4$ dans les neurones d'hippocampe. Dans ces cellules, une translocation de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ du cytoplasme vers le noyau est notée au cours de la différenciation neuronale. Cette translocation est dépendante de l'intégrité structurale de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, elle est perdue dans le cas de la mutation R482X. La perte du fragment carboxy-terminal conduit à une altération de la structure de $Ca_v\beta_4$ suite à la rupture de l'interaction intramoléculaire entre les deux domaines conservés, au sein de la protéine native. Dans les neurones d'hippocampe, cette déstructuration empêche la localisation nucléaire de la protéine mutante. Etant donné que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ ne possède aucun signal d'adressage nucléaire, la technique du double hybride a été réalisée afin de déterminer les partenaires protéiques capables d'adresser la sous-unité $Ca_v\beta_4$ vers le noyau. Parmi les trois protéines criblées qui interagissent spécifiquement avec $Ca_v\beta_4$ et pas avec le mutant, une est capable d'adresser $Ca_v\beta_4$ dans le noyau alors que l'autre la retient dans le cytoplasme. Afin d'étudier l'effet de la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ sur la régulation génique, une étude transcriptomique a été réalisée. La sous-unité $Ca_v\beta_4$ montre un effet répressif sur l'expression génique. Cette répression est inversée dans le cas du mutant incapable de s'adresser vers le noyau des neurones. Parmi ces gènes, plusieurs sont des candidats potentiels pour expliquer l'altération d'activités neuronaux impliquée dans le phénotype épileptique.

Enfin, l'absence de l'adressage nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante (R482X) due à la déformation de sa structure native, altèrerait la régulation transcriptionnelle des gènes, qui serait à la base du phénotype épileptique des patients qui portent cette mutation.

SUMMARY

Disrupted nuclear localization and function of the human mutant R482X of the calcium channel $Ca_v\beta_4$ subunit

High voltage-activated (HVA) calcium channels are hetero-multimeric complexes that translate electrical signals into Ca^{2+} influx, a secondary messenger that mediates essential neuronal processes such as neurotransmitter release and neuronal excitability. HVA calcium channels are composed of four subunits: $Ca_v\alpha_1$ subunit, the pore forming of the channel and the auxiliary subunits $Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ and $Ca_v\gamma$. The Ca_vß subunit has focused much of the interest owing to its regulatory functions within the complex. By masking an endoplasmic retention signal on the $Ca_v\alpha_1$ subunit, Ca_vß subunit targets the mature calcium channel to the plasma membrane and contributes to the increase in number of functional calcium currents. In humans, pathologic mutations have been identified in CACNAB4 that produce epileptic phenotype. One of these mutations is a premature termination mutation (R482X). Mutations produced minor biophysical effects on calcium channels in spite of their preponderant pathological phenotypes, which tend to indicate that cellular functions other than channel regulation may be responsible for the predominant neurological effects of the R482X mutation.

My thesis focuses on the molecular and cellular determinants of the $Ca_v\beta_4$ mutant (R482X) inducing the human neurological phenotype. Studies were realized in hippocampal neurons which are particularly implicated in epilepsy. A translocation of endogenous Ca_vß$_4$, from the cytoplasm to the nucleus is observed during neuronal differentiation and synaptogenesis. This translocation is conditioned by the native structural conformation of Ca_vß$_4$ subunit; carboxy-terminal deletion inhibits the nuclear localization of the mutant. The 38 amino acids deletion disturbs the structure of Ca_vß$_4$ by altering the intramolecular interaction between the two conserved domains in Ca_vß$_4$ subunit. In hippocampal neurons, this structural distortion prevents the nuclear localization of the mutant Ca_vß$_4$. In order to identify the impact of the nuclear localization of the Ca_vß$_4$ subunit on transcriptional regulation, a study on gene expression generated by microarray is realized. Profiles of gene expression revealed a differential gene regulation between wild-type and mutant Ca_vß$_4$. Ca_vß$_4$ subunit seems to have a repressive action on gene regulation; on the other hand, the lack of nuclear localization of the mutant reverses this repressive impact. Among the specific transcripts differentially expressed, some genes are primordial keys in neuronal activities, thus alterations in the regulation of these genes could be involved in neuronal diseases. Since no NLS consensus sequence has been identified on Ca_vß$_4$, two-hybrid assay was realized in order to identify partners responsible of the Ca_vß$_4$ nuclear targeting. A specific protein holding a NLS sequence interacts specifically with Ca_vß$_4$ subunit, but not with the mutant, and is able to target Ca_vß$_4$ to the nucleus. The other protein which specifically interacts with the WT Ca_vß$_4$ sequesters Ca_vß$_4$ in the cytoplasm.

Finally, the lack in nuclear targeting of the R482X mutant due to the structural distortion appears to alter the transcriptional gene regulation which is maybe implicated in the epileptic phenotype of patients holding the mutation.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

I. Canaux calciques dépendants du voltage (CCDV) 3

1. Canaux LVA 7

2. Canaux HVA 7

II. Structure protéique des CCVD 10

1. La sous-unité $Ca_v\alpha_1$ 11

a. Régulation par phosphorylation 14

b. Régulation par $G\beta\gamma$ 15

c. Régulation par les protéines de l'exocytose 15

2. La sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ 17

3. La sous-unité $Ca_v\gamma$ 18

4. La sous-unité $Ca_v\beta$ 20

III. Structure et fonctions de la sous-unité $Ca_v\beta$ 20

1. Caractérisation des isoformes de la sous-unité $Ca_v\beta$ 20

2. Les processus post-translationels de la sous-unité $Ca_v\beta$ 22

3. $Ca_v\beta$ modulateur endogène des canaux calciques 24

4. La base structurale de l'interaction $Ca_v\alpha_1$-β 29

5. Implication de $Ca_v\beta$ dans des interactions protéine-protéine 37

6. Le domaine SH3-GK reconstitue une unité fonctionnelle 44

7. Modèles d'études des sous-unités $Ca_v\beta$ 47

8. Implication des $Ca_v\beta$ les pathologies humaines 52

9. Développements thérapeutiques et pharmacologiques 56

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE 59

RESULTATS ET DISCUSSION 63

La sous-unité Cavβ4 est fortement exprimée dans l'hippocampe de souris contrôle, tandis qu'elle est absente chez la souris léthargique 63

La sous-unité Cavβ4 est exprimée différentiellement durant le développement des neurones primaires avec une translocation nucléaire synchronisée avec la différenciation neuronale chez la souris ……. 66

La translocation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta4$ est induite par un facteur de différenciation neuronale dans la lignée cellulaire NG108.15 …….. 71

La localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta4$ est également observée dans les systèmes d'expression hétérologues. Par contre, elle est perdue quand $Ca_v\beta4$ est exprimée avec le complexe calcique, ainsi que dans le cas de la mutation R482X humaine…….....…….. 75

La localisation nucléaire de la sous-unité Cavβ4 n'est pas due à une séquence d'adressage nucléaire…. 81

La mutation humaine R482X de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ rompt l'interaction intramoléculaire SH3/GK observée dans la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native. .....…… 86

Dans les neurones d'hippocampe, la sous-unité Cavβ4-Cmut-EGFP surexprimée est exclusivement cytoplasmique. L'étude de son effet sur les fonctions cellulaires de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native…… 95

La sous-unité $Ca_v\beta_4$ interagit avec B56, Dlgap3 et mKIAA1152 alors que le mutant en est incapable. B56 recrute $Ca_v\beta_4$ dans le noyau, alors que SAPAP3 la maintient dans le cytoplasme.....101

L'expression de la sous-unité Cavβ4 influence l'activité transcriptionnelle des gènes, d'une façon différente que celle de la sous-unité mutante et du contrôle négatif…….. 109

La sous-unité $Ca_v\beta_4$ n'interagit pas avec la protéine nucléaire HP1γ, à l'image du variant $Ca_v\beta_{4c}$ identifié chez le poulet …….. 117

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 119

MATERIELS ET METHODES..... 125

ANNEXE I 137
Two PEST-like motifs regulate Ca^{2+}/calpain-mediated cleavage of the $Ca_v\beta_3$ subunit and provide important determinants for neuronal Ca^{2+} channel activity …… 139

ANNEXE II 152
Importance of voltage-dependent inactivation in N-type calcium channel regulation by G-proteins …….. 153

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 168

ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : L'homéostasie calcique est régulée par des pompes et des canaux calciques présents à la membrane plasmique et à la membrane des organelles intracellulaires.

Figure 2 : Présentation schématique du canal calcique dépendant du voltage.

Figure 3 : Topologie des canaux calciques dépendants du voltage et de leurs sous-unités régulatrices.

Figure 4 : Deux séquences qui portent un signal de dégradation protéolytique « PEST », ont été identifiées sur la sous-unité $Ca_v\beta_3$. La séquence PEST1 est localisée sur le domaine amino-terminal, et PEST2 sur le domaine carboxy-terminal.

Figure 5 : Les effets des $Ca_v\beta$ sur l'amplitude du courant et la voltage-dépendance.

Figure 6 : Les effets de $Ca_v\beta$ sur l'activation et l'inactivation du canal.

Figure 7 : La facilitation dépendante de l'activité de la PKA implique uniquement les canaux de type L.

Figure 8 : La facilitation qui implique les canaux non L dépend de l'isoforme des sous-unités $Ca_v\beta$ et des sous-unités G $\beta\gamma$.

Figure 9 : Le motif AID constitué de 18 acides aminés, situé sur la boucle cytoplasmique I-II, représente le site d'interaction principale des sous-unités $Ca_v\beta$. Neuf résidus sur 18 sont conservés parmi toutes les sous-unités $Ca_v\alpha$ des HVA.

Figure 10 : Représentation cristallographique des sous-unités $Ca_v\beta$.

Figure 11 : Représentation schématique du site d'interaction primaire et des sites d'interaction secondaires, entre les sous-unités $Ca_v\alpha_{2.1}$ et $Ca_v\beta_4$.

Figure 12 : Représentation schématique du site d'interaction primaire et des sites d'interaction secondaires, entre les sous-unités $Ca_v\alpha_{2.1}$ et $Ca_v\beta_4$.

Figure 13 : L'interaction entre un variant de $Ca_v\beta_{4a}$ du poulet avec HP1, une protéine nucléaire responsable du silence transcriptionnel imposé aux gènes au niveau des chromatines.

Figure 14 : L'interaction de la synaptotagmine avec le coté amino-terminal de la sous-unité $Ca_V\beta_4$ et le site « syntprint » sur la boucle II-III de la sous-unité $Ca_V\alpha$.

Figure 15 : L'interaction SH3/GK est un déterminant structural essentiel pour la modulation du canal.

Figure 16 : Les variants d'épissage de la sous-unité $Ca_v\beta_4$.

Figure 17 : La sous-unité $Ca_v\beta_4$ est abondamment exprimée dans l'hippocampe de la souris contrôle et absente chez la souris léthargique.

Figure 18 : La sous-unité $Ca_v\beta_4$ est transloquée dans le noyau durant la différentiation neuronale.

Figure 19 : La différenciation neuronale induite par l'AMPc des cellules NG108.15 induit la translocation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$.

Figure 20 : La localisation nucléaire est altérée par l'expression du canal calcique, et est totalement prévenue avec une mutation du coté carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, produisant une épilepsie juvénile myoclonique.

Figure 21 : Absence d'une séquence d'adressage nucléaire dans la sous-unité $Ca_v\beta_4$.

Figure 22 : La mutation humaine $Ca_v\beta_4$-C_{mut} perturbe l'interaction intramoléculaire SH3/GK dans la sous-unité $Ca_v\beta_4$..

Figure 23 : La localisation différentielle entre la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native et le mutant dans les neurones.

Figure 24 : La sous-unité $Ca_v\beta_4$ interagit avec trois protéines, mais pas le mutant. Une protéine recrute $Ca_v\beta_4$ dans le noyau, l'autre la maintient dans le cytoplasme.

Figure 25 : Analyses statistiques des puces dans les trois conditions, $Ca_v\beta_4$-EGFP, $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP ou EGFP.

Figure 26 : Expression différentielle des gènes up régulés par le mutant versus la protéine native.

Figure 27 : Co-transfection de CHCB2 avec $Ca_v\beta_4$-EGFP ou $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP dans la lignée MDCK.

Tableau 1 : Classification pharmacologique et distribution tissulaire des CCDV.

Tableau 2 : Caractéristiques électrophysiologiques des CCDV.

Tableau 3 : Nomenclature structurale des canaux calciques dépendants du voltage.

Tableau 4 : Distribution tissulaire, fonctions particulières et implication pathologique des $Ca_v\beta_4$.

Tableau 5 : Mutations dirigées ou spontanées au niveau des gènes des $Ca_v\beta$ chez la souris.

LISTE DES ABREVIATIONS

aa : acide aminé
ABP : AID-Binding Pocket
AID : Alpha Interaction Domain
AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messager
ATP : Adénosine Triphosphate
Ba^{2+} : Ion barium
BID : Beta Interaction Domain
Ca^{2+} : Ion calcium
Ca_v : Canal Calcique activé par le voltage
cDNA : complementary DNA
CSNB2 : Congenital Stationary Night Blindness
DHP : dihydropyridines
DHPR : récepteur sensible à la DHP
DNA : Acide desoxyribonucléique
EA2 : Episodic Ataxia type-2
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
GABA : Acide γ-Amino-Butyrique
GDP : Guanosine Diphosphate
GK : Guanylate Kinase
GTP : Guanosine Triphosphate
HEK293: Human Embryonic Kidney 293
HVA : High Voltage Activated
IP_3 : Inositol Trisphosphate
IP_3R : Récepteur à l'IP_3
JVM : Juvenile Myoclonic
kDa : Kilo Dalton
***lh/lh* :** phénotype Léthargique
LVA : Low Voltage Activated
MAGUK : Membrane Associated Guanylate Kinase
Na^+ : Ion sodium
NCA : Nuclear Ca^{2+}-ATPase
NG108.15 : Neuroblastome-Gliome 108.15
NLS : Nuclear Localisation Signal
NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEST : Potential Signals for Rapid Protein Degradation
PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PLCβ : Phospholypase Cβ
PLCγ : Phospholypase Cγ
PMCA : Plasma Membrane Ca^{2+}-ATPase
PSD : Post-Synaptic Density
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G hétérotrimériques
RE : Réticulum Endoplasmique
RGK : Rad Gem Kir proteins
RyR : Récepteur à la Ryanodine
SCA6 : Spino Cerebelar Ataxia type-2
SERCA : Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase
SH3 : Src Homology-3
SNAP : Soluble NFS Attachment Protein
SNARE : SNAP Receptor
VGCC : Voltage-Gated Calcium Channel

CODES DES ACIDES AMINES

Alanine	Ala	A	**Cystéine**	Cys	C
Acide aspartique	Asp	D	**Acide glutamique**	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F	**Glycine**	Gly	G
Histidine	His	H	**Isoleucine**	Ile	I
Lysine	Lys	K	**Leucine**	Leu	L
Méthionine	Met	M	**Asparagine**	Asn	N
Proline	Pro	P	**Glutamine**	Gln	Q
Arginine	Arg	R	**Sérine**	Ser	S
Thréonine	Thr	T	**Valine**	Val	V
Tryptophane	Try	W	**Tyrosine**	Tyr	Y

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'ion calcium (Ca^{2+}) joue un rôle universel dans la signalisation intracellulaire. En tant que messager ubiquitaire secondaire, le calcium est impliqué dans le contrôle et la régulation d'une variété de fonctions cellulaires allant du couplage excitation-contraction musculaire, de la libération d'hormones ou de neurotransmetteurs, jusqu'à l'activation d'enzymes ou à l'expression de certains gènes. En condition de repos, la concentration de calcium libre dans le cytosol ($[Ca^{2+}]_c$) est maintenue à des niveaux très faibles (10-100 nM à 2 µM) par rapport à la concentration de calcium extracellulaire (1 à 2 mM). Son élévation transitoire suite à une stimulation cellulaire constitue un signal dynamique capable d'activer des cibles moléculaires impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux (Petersen et al., 2005). Cette régulation est gouvernée par divers types de canaux et de transporteurs calciques présents sur la membrane plasmique et permettant l'entrée et l'extrusion du Ca^{2+} cytosolique (Figure 1). Notamment, les réserves calciques localisées dans les organelles subcellulaires contribuent activement à l'homéostasie calcique par la déplétion des stocks via les récepteurs à l'inositol triphosphate (IP_3R) et à la ryanodine (RyR), ainsi que par le stockage du Ca^{2+} via les pompes calciques situés au sein des membranes des organelles. De ce fait, la signalisation calcique est étroitement régulée en amplitude et fréquence par une codification spatio-temporelle spécifique. Toute altération de l'homéostasie calcique et, en particulier une élévation durable de la $[Ca^{2+}]_c$, engendre en retour un contexte pathologique pouvant entraîner la mort cellulaire. Ainsi, le calcium n'exécute pas uniquement le rôle d'un messager omniprésent : il contrôle aussi la survie cellulaire et peut induire la mort cellulaire.

Deux mécanismes de transport calcique transmembranaire ont été identifiés : un transport actif via les pompes et un passif impliquant les canaux. Les pompes calciques constituées aussi par des échangeurs Na^+/Ca^{2+}, assurent le transport du calcium à travers la membrane plasmique contre le gradient de concentration et/ou le gradient électrochimique et ainsi sont couplées à une consommation d'énergie métabolique. Par contre, l'entrée du Ca^{2+} suite à l'ouverture des canaux suit les lois de la diffusion passive. L'ouverture des canaux se fait en réponse à deux stimuli différents : i) la fixation directe ou indirecte d'un ligand spécifique ou ii) le changement du voltage transmembranaire. Le

premier mécanisme implique en particulier les canaux chimio-dépendants ou les récepteurs ionotropiques comme le récepteur glutamatergique ou à l'acétylcholine. Les acteurs du deuxième mécanisme sont les canaux calciques dépendants du voltage.

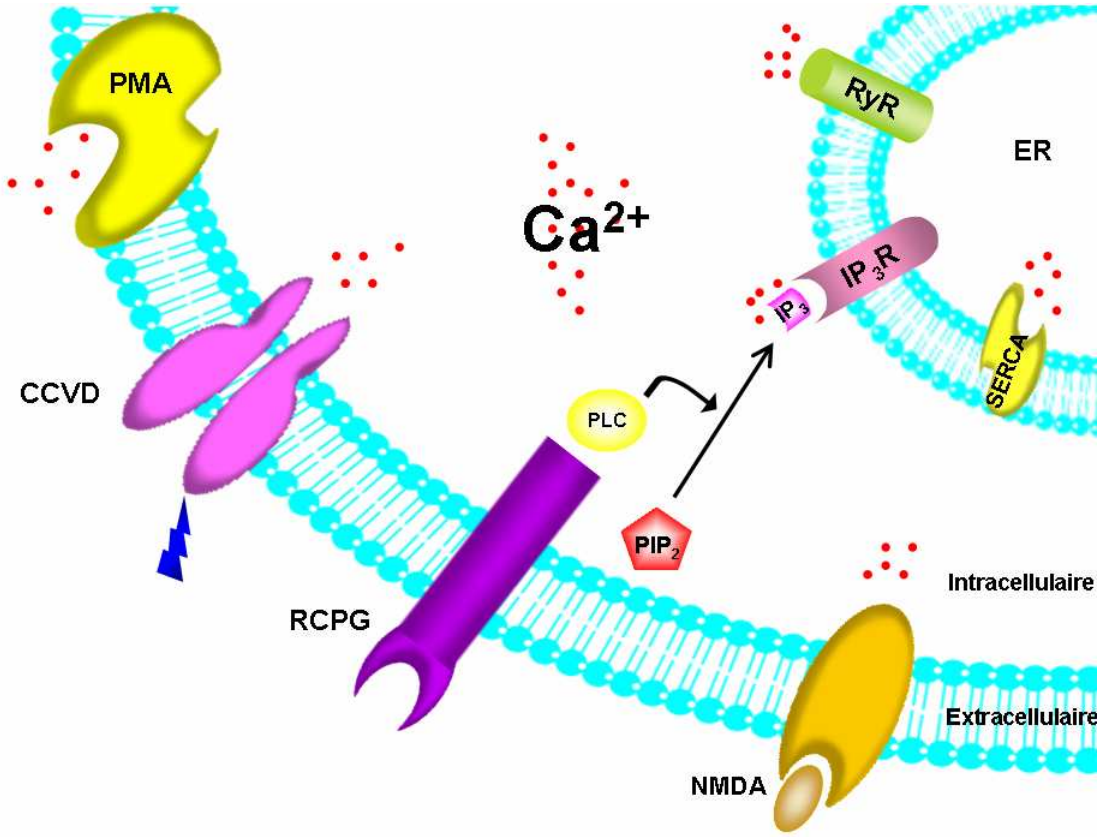


Figure 1*: L'homéostasie calcique est régulée par des pompes et des canaux calciques présents à la membrane plasmique et à la membrane des organelles intracellulaires. PMA « plasma-membrane ATPase » ; CCVD « canaux calciques voltage dépendants » ; RCPG « récepteur couplé aux protéines G » ; NMDA « N-méthyl-D-aspartate » ; PLC « phospholipase C » ; SERCA « smooth endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase pump » ; IP_3R « récepteur activé par l'inositol triphosphate » ; RyR « récepteur à la ryanodine ».*

Les bases des analyses biophysiques menées sur les canaux ioniques dépendants du voltage ont été révélées à l'origine par les travaux de Hodgkin et Huxley dans les années 30 et ensuite affirmées par le model d'Hodgkin-Huxley sur le potentiel d'action

en 1952 (Hodgkin and Huxley, 1952a; Hodgkin and Huxley, 1952b; Hodgkin and Huxley, 1952c; Hodgkin and Huxley, 1952d; Hodgkin and Huxley, 1952e).
En 1953, les canaux calciques dépendants du voltage ont été identifiés par Fatt et Katz (Fatt and Katz, 1953). Plus tard, les travaux pionniers de Hagiwara et *al*. en 1975 ont indiqué la présence de plusieurs types de canaux calciques dans la membrane plasmique des œufs d'étoile de mer (Hagiwara, 1975; Hagiwara et al., 1975), et dans de nombreuses autres cellules de différents organismes (Bean, 1985; Nowycky et al., 1985).

I. Canaux calciques dépendants du voltage (CCDV)

La famille des canaux calciques dépendants du voltage traduit les dépolarisations membranaires en un influx calcique induisant par la suite, la régulation de fonctions physiologiques très variées au sein de la cellule. Leur activité est essentielle pour coupler les signaux électriques de la surface cellulaire aux événements physiologiques, notamment la transmission synaptique et le couplage excitation-contraction.

La membrane plasmique forme un condensateur virtuel isolant deux solutions conductrices, tandis que le canal ionique forme un conducteur. Dans les cellules eucaryotes, la distribution des ions de part et d'autre de la membrane plasmique est inégale. Au repos, l'intérieur des cellules est chargé négativement par rapport à l'extérieur. Le potentiel de membrane, dit de repos, est négatif et varie entre -20 et -90 mV selon le type de la cellule. Lorsque le potentiel de membrane se déplace vers des valeurs plus négatives, on dit que la cellule s'hyperpolarise ; lorsqu'il se déplace vers des valeurs positives, la cellule se dépolarise.

L'électrophysiologie cellulaire constitue une étape essentielle et une approche fonctionnelle qui permet d'étudier l'activité des canaux calciques et de mesurer le courant calcique lors d'une dépolarisation membranaire par potentiel imposé. Effectivement, le développement de la technique du « patch clamp », dans le but de mesurer le courant traversant une cellule complète ou un canal unique, a permis de mettre en évidence la diversité des canaux calciques et d'établir leurs caractéristiques biophysiques et pharmacologiques.

En effet, le principe de base de la technique « patch clamp » consiste à réaliser des sauts de potentiels d'amplitude et de durée variables. A partir d'un potentiel de maintien, proche de celui de repos, on enregistre les courants qui apparaissent lors des sauts du potentiel de diverses amplitudes, appelés potentiels tests, et qui amènent le potentiel de membrane à des valeurs plus négatives. L'intensité des courants enregistrés en fonction de la valeur du potentiel transmembranaire peut ainsi être étudié et mesuré. Une dépolarisation appliquée aux canaux calciques favorise l'ouverture du canal et provoque une apparition d'une succession d'échelons de courant dirigés vers le sens entrant. En configuration cellule entière, le courant global (I_{Ca}) enregistré en fonction du voltage imposé (V_m) présente une allure en cloche caractéristique. D'après la loi d'Ohm, la pente de la courbe I-V est égale à la conductance du canal. La relation I-V indique si le canal est voltage-dépendant, c'est à dire si sa conductance varie selon le potentiel ce qui implique un mécanisme voltage-dépendant de la régulation du courant, intrinsèque au canal.

A l'aide du patch clamp, on peut déterminer d'autres paramètres comme par exemple les cinétiques d'inactivation et d'activation. En fait, les canaux ioniques présentent généralement trois états : un état fermé, un état ouvert et un état inactivé. Dans le cas des canaux calciques dépendants du potentiel à haut seuil, l'activation, passage de l'état fermé à l'état ouvert, a lieu suite à une dépolarisation. L'inactivation, passage de l'état ouvert vers l'état inactivé, a lieu suite à une dépolarisation et/ou une augmentation locale de la concentration en calcium. Les canaux calciques à haut seuil présentent donc une inactivation voltage-dépendante et notamment dépendante du calcium. Pour décrire la dépendance de l'inactivation vis à vis du potentiel, on trace des courbes d'inactivation qui décrivent le rapport canaux activables/canaux inactivés pour chaque potentiel à l'état stable. Ces courbes sont obtenues en appliquant un prépulse d'amplitude variable et assez long pour atteindre l'état stable de l'inactivation puis un pulse test toujours au même potentiel. La courbe représente les courants obtenus lors du pulse test en fonction du potentiel du prépulse correspondant, c'est à dire la quantité de canaux encore activables à la fin du prépulse. Les courants sont normalisés (courant I à un potentiel Em donné sur le courant maximum obtenu Imax).

La classification des canaux calciques a été fondée sur des critères électrophysiologiques auxquels se sont rapidement associés des critères pharmacologiques après la découverte de toxines spécifiques (Tableau 1) (Catterall et al., 2005).

Les études électrophysiologiques ont permis de mettre en évidence l'existence des différents types de canaux Ca^{2+}. On distingue deux catégories essentielles classées selon leur seuil d'activation : « Low-Voltage-Activated » (LVA) et « High-Voltage-Activated » (HVA). L'activation des canaux LVA se produit à des potentiels membranaires relativement faibles vers -70 mV, et est complètement inactivé lorsque le potentiel de membrane est maintenu à une valeur plus positive que -50 mV. Alors que les canaux HVA s'activent à des dépolarisations plus élevées entre -40 mV et 10 mV, et ne s'inactive pas sous le seul effet du potentiel.

Tableau 1

Classification pharmacologique et distribution tissulaire des CCDV

Courant	Pharmacologie	Distribution tissulaire
Type T	Benzimidazoles (mibéfradil) Amiloride, Éthosuximide Kurtoxine, Nickel	Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines, spermatozoïdes
Type L	Dihydropyridines (nifédipine) Phénylakylamines Benzothialzépines	Muscles squelettiques et lisses, neurones, cœur, cellules endocrines, rétine
Type N	ω-Conotoxine GVIA ω-Conotoxine MVIIA ω-Agatoxine IIIA	Neurones
Type P/Q	ω-Agatoxine IVA ω-Agatoxine IIIA ω-Conotoxine MVIIC	Neurones, cellules pancréatiques
Type R	Nickel, Cadmium	Neurones, cellules endocrines

1. Canaux LVA

En 1981, les courants à bas seuil ont été décrits initialement par Llinas et Yarom, au niveau du soma et des dendrites proximales des neurones du noyau de l'olive inférieure (Llinas and Yarom, 1981). Par la suite, ces courants ont été mis en évidence dans les neurones thalamiques, les cellules corticales surrénaliennes (Llinas, 1988) et dans le sperme (Arnoult et al., 1996) où ils permettent la réaction acrosomique.

Cette catégorie de canaux confère un courant calcique de **type T** (pour *Transient*). C'est un courant activé par des faibles dépolarisations, rapidement inactivé à des potentiels plus négatifs, et ayant une petite conductance élémentaire (Williams et al., 1997). Ses propriétés biophysiques particulières, confèrent au courant T un rôle fondamental. Les canaux LVA étant rapidement inactivés, pour des valeurs de potentiel proches du potentiel de repos, leur activation ne peut être efficace qu'après une période d'hyperpolarisation membranaire, au moins transitoire, permettant la levée de l'inactivation. Une fois activée, le canal de type T produit une dépolarisation membranaire suffisante pour permettre l'activation d'autres conductances ioniques, aux seuils plus élevés. Ainsi, les courants de type T seraient impliqués dans la genèse des activités périodiques de type *pacemaker* (Huguenard, 1996) ou de bouffées de potentiels d'action.

Dans le système nerveux central, les canaux T sont incriminés dans l'activité oscillatoire, lui-même impliquée dans des processus comme la régulation du cycle sommeil/éveil (Hughes et al., 2004) ou la coordination motrice et dans la spécialisation des circuits neuronaux au cours de l'ontogenèse (Llinas, 1988).

A l'heure actuelle, aucun ligand spécifique n'est décrit pour ce type de canaux.

2. Canaux HVA

Ces canaux activés à des potentiels plus positifs que ceux du type T, s'inactivent peu ou très lentement par rapport aux LVA. Les canaux HVA engendrent divers courants de type L, N et P/Q. Le tableau 2 répertorie les caractéristiques électrophysiologiques de chaque type des canaux calciques dépendants du voltage.

Les courants de **type L** (pour *Long Lasting*) s'activent pour de fortes dépolarisations, avec une inactivation très lente et une conductance élémentaire assez importante (Fox et al., 1987a). Les enregistrements unitaires ont montré une perméabilité généralement plus élevée pour le Ba^{2+} que pour le calcium (Fox et al., 1987b). Ces courants, exprimés dans toutes les cellules excitables et endocrines, notamment dans le muscle squelettique et cardiaque, composent la majorité des courants calciques et jouent un rôle clé dans le couplage excitation-contraction et la sécrétion d'hormones. La caractéristique essentielle du type L est sa sensibilité aux antagonistes calciques comme la famille des dihydropyridines (DHP) (Flockerzi et al., 1986; Takahashi et al., 1987), les phenylalkylamines et les benzothiazepines. La modulation par les DHPs constitue un enjeu thérapeutique important dans le traitement des maladies cardiovasculaires, où les DHPs constituent un outil pharmacologique comprenant des inhibiteurs comme le nifedipine, le nisoldipine et l'isradipine, et des activateurs comme le Bay K 8644 (Schramm et al., 1983).

Dans le muscle squelettique, une interaction directe a été décrite entre le récepteur aux DHPs (DHPR) du muscle squelettique et cardiaque, et le RyR (Grabner et al., 1999; Nakai et al., 1996). En fait, le DHPR en réponse à une excitation par dépolarisation, active les RyR et permet le relâchement du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique, initiant ainsi la contraction musculaire (Ikemoto et al., 1989).

Toujours dans la même famille des canaux HVA, on peut distinguer les courants de **type N**, distribués essentiellement dans les neurones (Westenbroek et al., 1992), avec des caractéristique « Ni T, Ni L » (« Neither Transient, Nor Long Lasting »), d'où leur appellation. Les courants de type N sont caractérisés par un seuil d'activation et une cinétique d'inactivation intermédiaires entre le type L et le type T (Fox et al., 1987a; Nowycky et al., 1985). Ces canaux N s'ouvrent pour des valeurs de potentiels plus négatives que le canal L et plus positives que celui de type T. Ils sont d'autre part entièrement inactivés à -30 mV, potentiel de membrane où les canaux de type L restent largement actifs. La mesure des conductances unitaires des canaux de type N permet également de les distinguer des autres canaux (Fox et al., 1987b). Les cinétiques d'inactivation des courants N présentent une grande variabilité d'un type cellulaire à un

autre. Ils sont insensibles aux DHPs, les antagonistes du type L, mais spécifiquement bloqués par une toxine peptidique isolée à partir d'un mollusque marin *Conus geographicus* : l'ω-conotoxine GVIA (ω-CgT-GVIA) (Kerr and Yoshikami, 1984).

Dans les cellules neuronales, les courants calciques de type N sont impliqués dans la libération des neurotransmetteurs. Des expériences ont montré que l'ω-GVIA est capable d'inhiber la libération de glutamate et de GABA au niveau des neurones de l'hippocampe (Burke et al., 1993) ou à partir des synaptosomes isolés (Tsien et al., 1991). Dans les cellules endocrines, les courants de type N sont impliqués dans la sécrétion d'hormones (Sher et al., 1992).

Tableau 2

Caractéristiques électrophysiologiques des CCDV

	Type T	Type N	Type L	Type P/Q	Type R
Seuil d'activation (mV)	-70	-20	-30~-10	-60	-40
Intervalle d'inactivation (mV)	-100~-60	-120~-30	-60~-10	-100~-30	-100~-30
Cinétique d'inactivation (ms)	14-80	100 - >500	>500	100-500	20-40
Conductance (pS)	7-10	12-20	10-25	10-20	14
Temps d'ouverture (ms)	0,5-2	0,7-1,5	0,5-10	<1	?

L'utilisation des toxines spécifiques a permis la découverte également d'autres canaux neuronaux de **type P**, fortement exprimés au niveau des cellules de Purkinje, et de **type Q** (après P dans l'alphabet) décrits au niveau des cellules granulaires du cervelet. Considérés par certains comme appartenant à deux catégories de canaux distincts, les

canaux P et Q n'affichent cependant qu'une faible variabilité dans leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques, suggérant finalement que ces canaux constituent une seule et même famille P/Q regroupant différents sous-types (Tottene et al., 1996). Les canaux de type P sont spécifiquement bloqués par une toxine du venin d'une araignée *Agelenopsis aperta* : l'ω-agatoxine IVA (ω-Aga-IVA) (Llinas et al., 1989). Ils s'activent pour des valeurs de potentiels supérieurs à -40 mV, avec un pic d'amplitude aux alentours de +10 mV. Ils ne s'activent pas ou très lentement si l'on maintient la cellule dans un état dépolarisé. Le type Q est bloqué par l'ω-conotoxine MVIIC (ω-CmT-MVIIC) isolé à partir d'une toxine extraite du venin du *Conus magus* (Hillyard et al., 1992). Il se différencie du courant P par une cinétique d'inactivation plus rapide et un seuil d'activation plus élevé. La découverte des toxines a permis l'étude fonctionnelle des canaux de type N et P/Q et a démontré leur implication dans la transmission synaptiques rapides et la libération des neurotransmetteurs comme le glutamate dans le système nerveux (Takahashi and Momiyama, 1993; Turner et al., 1992). Les canaux P/Q semblent même davantage impliqués que les canaux N dans la communication entre les neurones granulaires du cervelet et les cellules de Purkinje (Regehr and Mintz, 1994), ou encore entre les neurones pyramidaux CA3 et CA1 de l'hippocampe (Wu and Saggau, 1995). Malgré les difficultés techniques, une étude utilisant la différence d'affinité pour l'ω-Aga-IVA, a permis d'attribuer au type Q, plutôt qu'au type P, la responsabilité de cette communication CA3/CA1 (Wheeler et al., 1994). Les courants de type P sont aussi impliqués dans la libération de l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire (Uchitel et al., 1992).

Un courant résiduel est décrit après l'application des toxines spécifiques qui bloquent les courants N et P/Q. Ce courant dit de **type R** pour « Remaining current » a été mis en évidence dans les cellules granulaires du cervelet (Randall and Tsien, 1995). Il est apparenté à une famille intermédiaire entre les HVA et les LVA, étant donné qu'il partage les propriétés biophysiques des courants type N et Q, et quelques paramètres de cinétique des courants de type T comme l'inactivation, qui apparaît pour des valeurs hyperpolarisées du potentiel de membrane avec une cinétique d'inactivation rapide et une sensibilité au blocage par le Ni^{+} (Tottene et al., 1996).

II. Structure protéique des canaux calciques dépendants du voltage

Les premières études biochimiques ont été à la base de la description structurale des sous-unités protéiques des canaux calciques (Flockerzi et al., 1986; Leung et al., 1987; Takahashi et al., 1987). Ces études ont révélé la présence au sein des canaux HVA d'une sous-unité principale $Ca_v\alpha_1$ responsable de la formation du pore ionique à laquelle sont associées les sous-unités régulatrices: $Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ et $Ca_v\gamma$ selon une stoechiométrie de 1 :1 :1 :1 (Figure2). Par contre, les canaux LVA semblent constitués uniquement de la sous-unité principale sans l'association des sous-unités auxiliaires. La composition structurale des canaux LVA demeure donc encore mal connue.

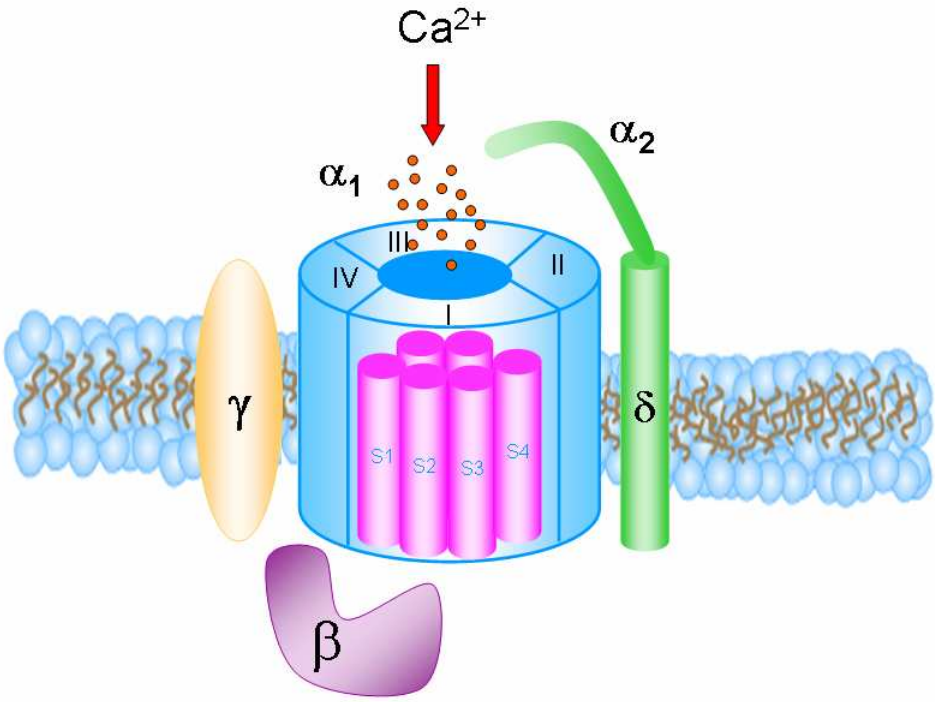


Figure 2: *Présentation schématique du canal calcique dépendant du voltage. Le CCDV est constitué de 4 sous-unités; α_1, β, $\alpha_2\delta$ et γ. La sous-unité canal α_1 est formée de 4 domaines homologues (I,II,III,IV); chaque domaine possède 6 segments transmembranaires.*

1. La sous-unité $Ca_v\alpha_1$

La sous-unité $Ca_v\alpha_1$ contient le pore ionique du canal et le senseur du voltage, qui traduisent la dépolarisation en un influx calcique vers le milieu intracellulaire.

La toute première classification des canaux calciques était basée sur des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques (Tsien et al., 1988). La seconde a été établie dans les années 80 avec le clonage des cDNAs codant divers types de canaux calciques (Birnbaumer et al., 1994; Snutch et al., 1990). Les chercheurs ont essayé de rétablir un lien entre les sous-unités α_1 clonées dernièrement et les complexes calciques identifiés par les techniques électrophysiologiques traditionnelles. Ainsi avec l'augmentation du nombre d'isoformes clonés, un besoin s'est imposé pour créer une nomenclature systématique des sous-unités α_1 basée sur $Ca_vx.y$ (Ertel et al., 2000) où Ca_v désigne les canaux calciques dépendants du voltage, x est le nombre indiquant la famille du canal (T-type, L-type et canaux neuronaux) et y est le nombre indiquant les sous-familles. Une présentation générale des canaux calciques connus figure dans le tableau 3.

Les sous-unités $Ca_v\alpha_1$, codées par 10 gènes distincts, sont classées selon 3 sous-familles. La sous-famille Ca_v1 ($Ca_v1.1$-$Ca_v1.4$) qui produit les courants de type L, est représentée par 4 sous-unités : α_{1S} clonée du muscle squelettique ($Ca_v1.1$) (Curtis and Catterall, 1984; Tanabe et al., 1987), α_{1C} du muscle cardiaque (Mikami et al., 1989) et lisse (Biel et al., 1990) ($Ca_v1.2$) , α_{1D} ($Ca_v1.3$) (Seino et al., 1992; Williams et al., 1992b) et α_{1F} ($Ca_v1.4$) (Bech-Hansen et al., 1998; Strom et al., 1998), les derniers identifiés. La sous-famille des Ca_v2 ($Ca_v2.1$-$Ca_v2.3$) représente les 3 canaux de types neuronaux : α_{1A} pour le type P/Q ($Ca_v2.1$) (Mori et al., 1991; Starr et al., 1991), α_{1B} pour le type N ($Ca_v2.2$) (Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992a) et α_{1E} pour le type R ($Ca_v2.3$) (Niidome et al., 1992; Soong et al., 1993). Dans la sous-famille des Ca_v3 ($Ca_v3.1$-$Ca_v3.3$), 3 sous-unités de type T ont été identifiées α_{1G} ($Ca_v3.1$) (Perez-Reyes et al., 1998), α_{1H} ($Ca_v3.2$) (Cribbs et al., 1998) et α_{1I} ($Ca_v3.3$) (Lee et al., 1999b). La même sous-famille $Ca_v\alpha_1$ contient plus de 70% d'homologie de séquence et moins de 40% entre les 3 sous-familles.

Structuralement, $Ca_v\alpha_1$ (175-250 kDa) comporte quatre domaines homologues connectés par trois boucles intracytoplasmiques. Chaque domaine est constitué de six

segments en hélice α transmembranaires (S1 à S6). Ces segments transmembranaires présentent des séquences en acides aminés qui sont fortement conservées parmi les divers canaux ioniques (sodique et potassique) (Noda et al., 1984). La boucle formée de deux feuillets β intramembranaires relie les segments S5-S6 pour constituer le pore du canal (Guy and Conti, 1990). C'est au niveau de ces boucles que s'effectue la sélectivité des ions calciques. Une seule mutation dans le pore peut perturber la sélectivité ionique et peut ainsi convertir un canal calcique en un canal sodique (Heinemann et al., 1992).

Tableau 3

Nomenclature structurale des canaux calciques dépendants du voltage

		Classification biophysique (1)	Classification moléculaire (2-3)	Nomenclature structurale (4)
Canaux HVA		L-type	α_{1S}	$Ca_V1.1$
			α_{1C}	$Ca_V1.2$
			α_{1D}	$Ca_V1.3$
			α_{1F}	$Ca_V1.4$
	Type neuronal	P/Q-type	α_{1A}	$Ca_V2.1$
		N-type	α_{1B}	$Ca_V2.2$
		R-type	α_{1E}	$Ca_V2.3$
Canaux LVA		T-type	α_{1G}	$Ca_V3.1$
			α_{1H}	$Ca_V3.2$
			α_{1I}	$Ca_V3.3$

[1] Tsien et al. (1988); [2] Snutch et al. (1990); [3] Birnbaumer et al. (1994); [4] Ertel et al.(2000).

Les études en biologie moléculaire ont permis de caractériser les déterminants structuraux gouvernant les propriétés pharmacologiques et biophysiques. Le senseur de voltage responsable de l'activation a ainsi pu être identifié comme étant le quatrième segment de chaque domaine (S4) dont les acides aminés sont en majorité chargés positivement. De plus, la boucle S5-S6 et le segment S6 du troisième domaine répété ont été identifiés comme étant des sites de fixation des tétrodoxines et des dihydropyridines,

deux drogues connues pour bloquer l'entrée aux ions Na^+ et Ca^{2+} de leurs canaux respectifs (Catterall and Striessnig, 1992).

Deux sites consensus de phosphorylation par le PKC ont été identifiés au sein de la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ (Zamponi et al., 1997). Dans les neurones, l'activation de la PKC induit une augmentation de l'amplitude du courant des canaux de type N et P/Q (Swartz et al., 1993).

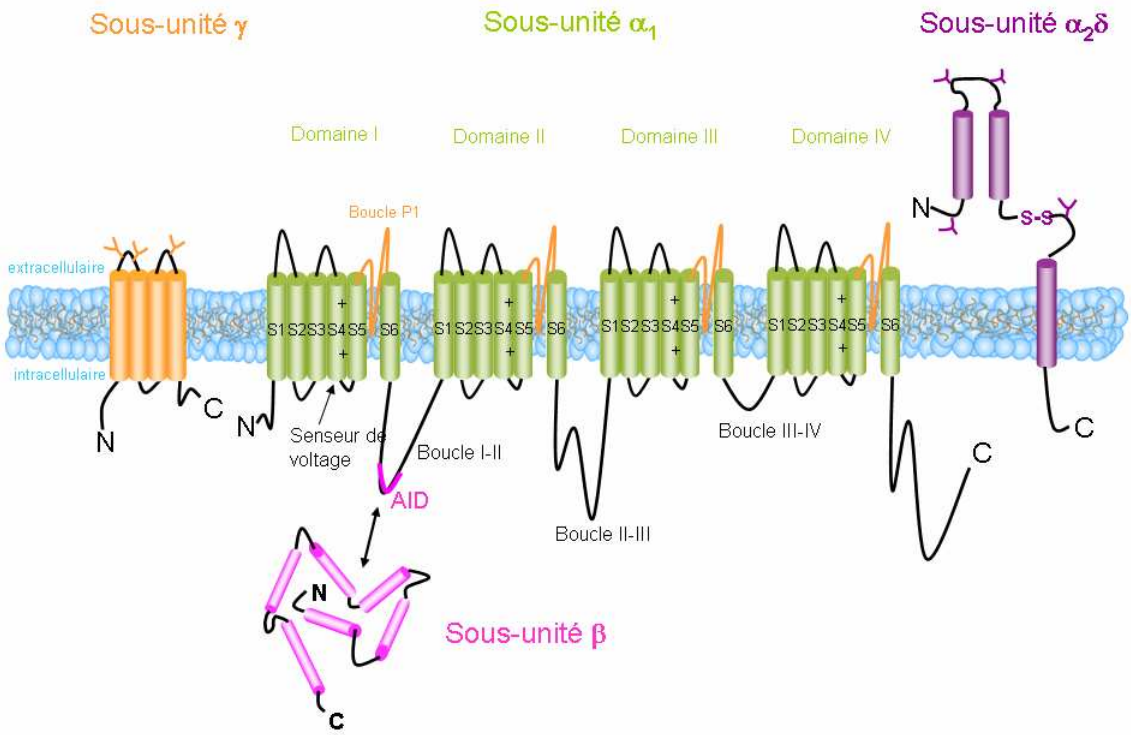


Figure 3: *Topologie des canaux calciques dépendants du voltage et de leurs sous-unités régulatrices (Tanabe et al., 1987). La sous-unité α_1 se compose de quatre domaines (domaine I à IV) constitués chacun par six segments transmembranaires (S1à S6). Ces quatre domaines sont liés par des boucles cytoplasmiques reliant les domaines. Le segment S4, riches en résidus basiques arginines et lysines, constituent le senseur du voltage. Les boucles extracellulaires et transmembranaires reliant les segments S5-S6 (boucle P) forment le pore ionique du canal. La sous-unité $Ca_v\beta$ est entièrement cytoplasmique et entre en interaction avec a_1 via une séquence AID présente sur la boucle I-II. La sous-unité γest entièrement membranaire et glycosylée. La sous-unité $\alpha_2\delta$ est essentiellement extracellulaire et ancrée à la membrane plasmique par la sous-unité δ de la protéine. Les parties αet δsont reliées entre elles par des ponts disulfures.*

A cette sous-unité essentielle, trois sous-unités auxiliaires sont associées pour former un complexe protéique stable par le biais d'interactions directes avec le canal $Ca_v\alpha_1$. Leurs rôles essentiels est de moduler directement les propriétés biophysiques du canal et/ou le trafic de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ vers la membrane (Figure 2 et 3).

Nous allons rapidement passer en revue les régulations des canaux calciques, particulièrement concernant la sous-unité $Ca_v\alpha_1$, par des voies intracellulaires avant de revenir aux autres sous-unités qui forment le canal.

a- Régulation par phosphorylation :

Les phosphorylations correspondent aux processus modulateurs post-traductionnels les plus répandus puisqu'ils concernent, indépendamment du degré de régulation, l'ensemble des canaux natifs mis en évidence. Les phosphorylations impliquent diverses protéines kinases, on distingue les protéines kinases A (activées par l'AMPc), les kinases C (activées par les esters de phorbol et le diacyl-glycérol DAG), les kinases G (activées par le GMPc) et les CaM-kinases (activées par le complexe Ca^{2+}/Calmoduline).

La phosphorylation par la PKA a été particulièrement étudiée sur les canaux de type L squelettique et cardiaque. La stimulation des canaux Ca^{2+} du muscle squelettique par la phosphorylation PKA est à l'origine de l'augmentation d'amplitude du courant calcique, suite à une application d'agonistes β-adrénergiques ou en mimant par une élévation artificielle d'AMPc intracellulaire (Lory and Nargeot, 1992). Le phénomène de facilitation observé lors de stimulations répétitives requiert une étape de phosphorylation par la PKA. Cette potentialisation augmente les courants calciques d'un facteur approximativement égal à 20 et apparaît dans un laps de temps très court (50ms), impliquant un ancrage de la PKA à proximité du canal (Sculptoreanu et al., 1993).

La phosphorylation par la PKC module l'activité des canaux Ca^{2+} de nombreux neurones (Dolphin, 1995; Yang and Tsien, 1993). La stimulation par la PKC conduit à une modification des propriétés intrinsèques des canaux puisqu'elle s'accompagne d'une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal (Yang and Tsien, 1993). Dans la plupart des études, la stimulation par la PKC induit un effet biphasique sur le courant

généré par les sous-unités $Ca_v1.2$, $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.3$, avec une phase d'augmentation, immédiatement suivie d'une décroissance de l'amplitude du courant (Stea et al., 1995).

b- Régulation par Gβγ :

De nombreux neurotransmetteurs (noradrénaline, sérotonin, GABA, glutamate, opoïdes ...), agissant via des récepteurs couplés aux protéines G, sont capables d'inhiber l'activité des canaux Ca^{2+} présynaptiques (Hille, 1994). L'inhibition se caractérise par une diminution importante de l'amplitude du courant et s'accompagne d'un ralentissement des cinétiques d'activation et d'inactivation (Bean, 1989). Dans les cellules neuronales, les courants de type N et P/Q natifs, impliqués dans la neurotransmission, sont les cibles de cette inhibition dépendante des protéines G (Bourinet et al., 1996; Currie and Fox, 1997). En effet, l'interaction directe entre les protéines G et le canal implique le complexe Gβγ, non pas la sous-unité Gα et la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ et $Ca_v2.3$ (Chen et al., 1995; De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997). Cette inhibition directe par les protéines G est dépendante du potentiel, mais aussi de la sous-unité $Ca_vβ$ qui réduit ou s'oppose à l'inhibition par les protéines G (Canti et al., 2000). La présence de $Ca_vβ$ accélère la cinétique de dissociation du complexe Gβγ, mais ne modifie pas sa cinétique de réassociation. Autrement dit, la sous-unité $Ca_vβ$ induit une dissociation de Gβγ, mais ne perturbe pas l'accès du complexe Gβγ à son site de liaison en vu d'une nouvelle réassociation (Canti et al., 2000).

c- Régulation par les protéines de l'exocytose :

La libération rapide des neurotransmetteurs dans l'espace synaptique est déclenchée par un influx de calcium dans l'élément présynaptique, au travers des canaux calciques de type N, P/Q et parfois L. Le processus d'exocytose des vésicules dépend d'une machinerie protéique complexe, dont les composants principaux sont les protéines $SNARE_s$ (SNAP receptor, « SNAP pour soluble NSF attachament protein »). Ces protéines permettent une reconnaissance entre la vésicule d'exocytose et la membrane plasmique, et la fusion des deux membranes. On distingue deux catégories. Les protéines associées aux vésicules sont appelées v-SNARE, On connaît dans cette catégorie, la synaptobrevine ou VAMP (« vesicule associated membrane protein »). Les protéines

associées à la membrane forment les t-SNAREs (t pour « target »), qui comprennent la syntaxine et la SNAP 25. Outre les SNAREs, d'autres protéines interviennent dans le contrôle de l'exocytose : i) la synaptotagmine, une protéine capable de lier les ions Ca^{2+}, ii) la CSP (« Cysteine String Protein »), protéine chaperonne localisée sur les vésicules synaptiques, et iii) la calmoduline.

Une interaction directe a été décrite entre les canaux calciques de type N et P/Q et les composants du complexe SNARE comme la syntaxine et la SNAP 25 (Sheng et al., 1994), mais également avec les protéines régulatrices comme la synaptotagmine (Charvin et al., 1997), la CSP (Magga et al., 2000) et la calmoduline (Lee et al., 1999a). Un site de liaison commun à plusieurs de ces protéines a été identifié. Il lie la syntaxine, la SNAP 25 et la CSP. Ce domaine, appelé synprint (« synaptic protein interaction site »), correspond à une séquence de 87 acides aminés localisée sur la boucle cytoplasmique II-III des canaux N et P/Q. Une séquence de 70 acides aminés, contenue dans le domaine synprint, est responsable de la liaison de la synaptotagmine sur le canal P/Q (Sheng et al., 1997). Enfin, une interaction avec la calmoduline, dépendante du calcium, implique quant à elle l'extrémité C-ter du canal P/Q (Lee et al., 1999a).

Outre leur indispensable rôle dans l'exocytose, ces interactions modifient également la distribution et le fonctionnement biophysiques des canaux calciques. Ainsi, la syntaxine inhibe l'activité des canaux N et P/Q exprimés dans l'ovocyte de xénope, en stabilisant l'état inactivé du canal (Bezprozvanny et al., 1995). Comme la syntaxine, la CSP diminue l'amplitude du courant N. Cet effet est cependant exclusivement lié à une potentialisation de l'inhibition du canal par les complexes $G\beta\gamma$ et non à un effet direct sur le canal (Magga et al., 2000). Les effets de la SNAP 25 sont très proches de ceux de la syntaxine. Sa coexpression avec le canal N favorise l'inactivation du courant et réduit son amplitude (Wiser et al., 1996). La calmoduline présente des effets inverses, qui se traduisent par une accélération de l'inactivation et une amplification du phénomène de facilitation du courant. La calmoduline est également capable d'interagir avec les canaux de type L et de moduler l'inactivation dépendante du Ca^{2+} (Peterson et al., 1999). En effet, la calmoduline interagit avec une séquence consensus identifiée sur l'extrémité C-ter de Ca_v et constitue le senseur calcique de l'inactivation. Enfin, malgré l'absence d'effet lorsqu'elle est exprimée seule, la synaptotagmine abolit les modifications du

courant provoquées par la syntaxine, confirmant l'antagonisme fonctionnel prédit par le chevauchement de leur site de fixation (Wiser et al., 1997).

2. La sous-unité $\alpha_2\delta$

Les sous-unités $\alpha_2\delta$ de nature glycoprotéique dérivent d'un seul gène (De Jongh et al., 1990; Ellis et al., 1988). Quatre sous-unités $\alpha_2\delta$ distinctes génétiquement ont été décrites ($\alpha_2\delta_1$-$\alpha_2\delta_4$) (Gao et al., 2000; Klugbauer et al., 1999; Qin et al., 2002). Elles sont répandues dans les tissus excitables. Au cours d'un processus post-traductionnel, $\alpha_2\delta$ est clivée en deux peptides α_2 et δ qui sont reliés par des ponts disulfures. Les mécanismes du clivage protéique et la localisation du pont disulfure restent mal connus. D'après les analyses topologiques, la sous-unité $\alpha_2\delta$ est représentée par un modèle où α_2 est entièrement extracellulaire tandis que δ présente un seul domaine transmembranaire avec une petite portion intracellulaire de l'extrémité carboxy-terminale (Figure 3) (Gurnett et al., 1996). $\alpha_2\delta$ interagit avec la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ via une interaction totalement extracellulaire, mettant en jeu la sous-unité α_2 uniquement (Gurnett et al., 1997). La région correspondante sur $Ca_v\alpha_1$ qui interagit avec $\alpha_2\delta$ est localisée dans le 3ème domaine transmembranaire. La co-expression de $\alpha_2\delta$ améliore l'adressage de la sous-unité α_1 vers la membrane et augmente l'amplitude du courant (Felix et al., 1997). Elle est aussi à la base d'une cinétique d'activation et d'inactivation plus rapide et un potentiel d'activation hyperpolarisé.

En fait, les glycosylations post-traductionnelles sur α_2 sont essentielles pour la stabilité de son interaction avec $Ca_v\alpha_1$, autant que pour son habilité à moduler les propriétés biophysiques du canal. D'une manière intéressante, $\alpha_2\delta_1$ et $\alpha_2\delta_2$ interagissent spécifiquement avec la gabapentine (GBP), un anti-épileptique utilisé aussi dans le traitement de la douleur et l'anxiété. Puisque les CCDV sont directement impliqués dans l'excitabilité électrique des neurones, on postule que cette molécule réduit le courant calcique, en modulant l'activité de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ via son interaction avec $\alpha_2\delta$. Néanmoins, l'effet prévu de la GBP sur les propriétés biophysiques du canal n'est pas clairement établi.

La souris *ducky* (du/du) est un modèle où le transcrit du gène codant pour la sous-unité $\alpha_2\delta_2$ est tronqué (Barclay et al., 2001; Brodbeck et al., 2002). Il en résulte l'expression d'une petite portion de α_2 qui se traduit par l'absence totale de δ. Par conséquent, la protéine n'est plus ancrée dans la membrane plasmique, et est probablement entièrement cytoplasmique. Les études électrophysiologiques montrent une réduction sévère dans la densité de courants de type P des souris *(du/du)* avec une conductance unitaire normale. Ce disfonctionnement peut être directement lié à l'absence fonctionnelle de la protéine. De même, la présence de cette protéine tronquée peut interférer avec la formation du complexe ou avec l'adressage du canal. Phénotypiquement, la souris *ducky* est plus petite que les souris contrôles et n'arrive pas à survivre au delà de 5 semaines. Elle est atteinte d'ataxie et de dyskinésie paroxysmale. Au niveau cellulaire, les cellules de Purkinje de la souris *du/du* semblent être incomplètement développées; elles sont plus petites et présentent moins de prolongements. Aucune souris KO ou avec mutation spontanée n'a été décrite pour les autres isoformes (Arikkath and Campbell, 2003).

3. La sous-unité γ

La sous-unité γ est une autre sous-unité associée au canal, dont huit isoformes ont été déjà décrits (γ_1-γ_8) (Chu et al., 2001; Sharp et al., 2001). Ces derniers sont distribués dans presque tous les tissus, à l'exception de γ_1 exprimée uniquement dans le tissu musculaire squelettique (Jay et al., 1990). Les autres sous-unités sont toutes exprimées dans les neurones (Letts et al., 1998).

Les sous-unités γ possèdent quatre domaines transmembranaires hautement conservés, liés par une boucle intracellulaire et deux boucles extracellulaires, avec deux extrémités cytosoliques, amino-terminale et carboxy-terminale (Figure 3). Les sous-unités γ présentent plusieurs motifs et résidus conservés, notamment les sites consensus de glycosylations présents sur la première boucle extracellulaire, dont la signification physiologique est inconnue. Toutes les sous-unités γ neuronales possèdent des sites consensus pour la phosphorylation par voie cAMP/cGMP.

Le domaine d'interaction de la sous-unité γ avec $Ca_v\alpha_1$ a été localisé sur la première moitié amino-terminale de la protéine (Arikkath et al., 2003). Très peu de

choses sont connues sur les fonctions biophysiques des sous-unités γ. Les études de ses propriétés modulatrices sont contradictoires, allant d'une absence totale d'effet (Varadi et al., 1991), à des modifications des paramètres biophysiques du courant (Rousset et al., 2001). Quelques unes sont capables d'adresser les canaux vers la membrane en absence des sous-unités β (Moss et al., 2002; Restituito et al., 2001) tandis qu'une inhibition du courant est enregistrée pour certaines (Kang et al., 2001). Une étude récente reporte l'implication de la sous-unité γ_2 et γ_3 dans l'inhibition de l'activité du canal de type N en coexprimant le complexe $Ca_v2.2$ avec les sous-unités γ dans un système d'expression hétérologue. En fait, l'inhibition des courants calciques est due à une diminution de l'expression du canal $Ca_v2.2$ à la surface cellulaire. Une interaction entre le canal et γ, durant les premières étapes de la biosynthèse des canaux, serait à la base d'une déstructuration de la conformation native des canaux, empêchant leurs adressages membranaires (Sandoval et al., 2007).

Un modèle de souris déficiente en γ_1 a été généré (Ahern et al., 2001; Ursu et al., 2001). Aucune anomalie de phénotype n'est remarquée sur ces souris. Au niveau moléculaire, les canaux VDCC dans le tissu musculaire squelettique révèlent une augmentation des courants de type L et une inhibition d'inactivation ; ceux-ci ne touchent pas le couplage excitation-contraction (Ursu et al., 2001).

La souris « stargazer », issue d'une mutation spontanée dans le gène codant pour γ_2, constitue un modèle totalement déficient en γ_2 (Letts et al., 1998). La souris stargazer manifeste une ataxie et des crises paroxystiques. Au niveau moléculaire, cette souris est caractérisée aussi par une diminution sévère et spécifique du facteur de croissance neurotrophique dans le cervelet (BDNF) (Qiao et al., 1996). La relation entre le manque d'expression de la sous-unité γ_2, la diminution de l'expression du BDNF et le phénotype neurologique demeure mal connu. Enfin, cette souris présente des défauts synaptiques liés à la perte des récepteurs AMPA, GluR2 et GluR3 dans le cervelet. Cependant, les courants calciques sont normaux (Chen et al., 2000).

4. La sous-unité $Ca_v\beta$

La sous-unité $Ca_v\beta$ joue le rôle le plus déterminant dans la régulation du canal calcique et l'adressage membranaire d'un canal mature. Durant ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à cette sous-unité entièrement cytosolique.

III. Structure et fonctions de la sous-unité $Ca_v\beta$

1. Caractérisation des isoformes de la sous-unité $Ca_v\beta$

$Ca_v\beta$ est codée par quatre gènes différents. Ainsi quatre isoformes ($Ca_v\beta_{1-4}$) ont été identifiés et chacun présente plusieurs variants (Helton and Horne, 2002). Les sous-unités $Ca_v\beta$ présentent cinq domaines, dont la description a été basée sur les homologies de séquences, avec D2 et D4 étant deux domaines particulièrement conservés entre les quatre isoformes de $Ca_v\beta$. Les gènes des $Ca_v\beta$ présentent des épissages alternatifs dans les trois domaines variables, notamment sur les extrémités, amino-terminale et carboxy-terminale et dans la séquence séparant les domaines conservés (Tableau 4).

$Ca_v\beta_1$, la première sous-unité identifiée, existe sous quatre variants d'épissage : $Ca_v\beta_{1a}$, $Ca_v\beta_{1b}$, $Ca_v\beta_{1c}$ et $Ca_v\beta_{1d}$. Les canaux calciques du muscle squelettique semblent être exclusivement associés aux sous-unités $Ca_v\beta_{1a}$ pour former le DHPR responsable du couplage excitation-contraction (Hofmann et al., 1994). $Ca_v\beta_{1b}$ et $Ca_v\beta_{1c}$ sont exprimées dans de nombreux tissus (Ludwig et al., 1997; Powers et al., 1992). Particulièrement, $Ca_v\beta_{1b}$ est considérée comme étant la sous-unité majoritairement exprimée dans le muscle cardiaque (Hullin et al., 1999). Récemment, un nouvel isoforme a été trouvé aussi dans le muscle cardiaque $Ca_v\beta_{1d}$ (Cohen et al., 2005).

Neuf variants de $Ca_v\beta_2$ ont été caractérisés et classés en quatre groupes: $Ca_v\beta_{2a,}$ $Ca_v\beta_{2b}$, $Ca_v\beta_{2c}$ et $Ca_v\beta_{2d}$. Ce classement est basé sur l'épissage du domaine D3. L'épissage additionnel de l'extrémité amino-terminale des isoformes produit d'autres variants (par exemple : $Cav\beta_2aN_1$…). Tous ces isoformes ont été clonés dans le tissu cardiaque (Foell et al., 2004). Récemment, deux petits isoformes ont été ajouté à cette famille $Ca_v\beta_{2f}$ et $Ca_v\beta_{2g}$ (Harry et al., 2004). Malgré le désaccord concernant la sous-unité majoritaire du tissu cardiaque, la sous-unité $Ca_v\beta_2$ est abondamment exprimée dans le cœur (Colecraft

et al., 2002; Hullin et al., 1992; Ludwig et al., 1997). Elle est également exprimée dans l'aorte, et dans le cerveau à des niveaux plus faibles (surtout au niveau des photorécepteurs).

$Ca_v ß_3$, la sous-unité dominante du cerveau (Witcher et al., 1994) est aussi présente dans le système vasculaire, particulièrement dans l'aorte et dans l'artère rénale, aussi bien dans le myocarde (Foell et al., 2004; Hullin et al., 1992). Une étude sur le tissu cardiaque montre la présence d'un isoforme de $Ca_v ß_3$ tronqué de 20 acides aminés dans son domaine d'interaction avec la sous-unité $Ca_v \alpha_1$ (Hullin et al., 2003).

Fortement exprimée dans le cerveau, la sous-unité $Ca_v \beta_{4b}$ est également dominante dans le cervelet et l'hippocampe avec une faible expression dans le rein, les testicules et les lymphocytes. L'épissage alternatif de la séquence amino-terminale produit l'isoforme $Ca_v \beta_{4a}$ d'abord identifié parmi les ARNm extraits à partir de la humaine (Helton and Horne, 2002), et ensuite caractérisé dans le système nerveux central (Helton et al., 2002). Deux petits variants détectés dans les ventricules ont été ajoutés récemment (Foell et al., 2004).

Tableau 4

Distribution tissulaire, fonctions particulières et implication pathologique des $Ca_v \beta$

	Distribution tissulaire	Fonctions particulières	Pathologies humaines identifiées
$Ca_v \beta_1$[1] (65 kDa)	Muscle squelettique (β_{1a}) cerveau (autres isoformes)	Couplage excitation-contraction, adressage de $\alpha_1$1.1 aux triades	Myopathie cardiaque (β_{1b})
$Ca_v \beta_2$[2] (53 kDa)	Cœur, poumon, trachée, aorte, cerveau	Adressage de $\alpha_1$1.4 dans la rétine	
$Ca_v \beta_3$[3] (55 kDa)	Muscle lisse, trachée, aorte poumon, cerveau		
$Ca_v \beta_4$[4] (58 kDa)	Cerveau, cervelet		Épilepsie idiopathique générale, épilepsie juvénile myoclonique

[1] Hullin et *al.* 1999 et 2003; [2] Ball et *al.* 2002; [3] Hullin et *al.* 1992; [4] Escayg et *al.* 2000.

2. Les processus post-traductionnels de la sous-unité $Ca_v\beta$

a- Phosphorylation

Dans le muscle cardiaque et squelettique, la stimulation de la protéine kinase par l'AMPc induit une augmentation du courant des canaux calciques. De nombreuses études ont montré la phosphorylation du canal et de la sous-unité $Ca_v\beta$ *in vitro* et *in vivo* (Haase et al., 1993; Rohrkasten et al., 1988).

Une séquence consensus RRPTP (Thr-205) a été identifiée sur la sous-unité $Ca_v\beta_{1a}$ du DHPR étant un site de phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) (De Jongh et al., 1989). Également, la phosphorylation de la sous-unité $Ca_v\beta_2$ via la signalisation par l'AMPc semble être impliquée dans l'activation des courants calciques de type L (Puri et al., 1997).

Plusieurs sites de phosphorylation par la PKC et d'autres protéines kinases sont prédits sur la sous-unité $Ca_v\beta$. Certains sont conservés parmi toutes les $Ca_v\beta$ et d'autres sont spécifiques pour certaines $Ca_v\beta$. La prédiction des sites de phosphorylation doit tenir compte aussi de leur accessibilité aux kinases au sein de la structure native de la protéine. Deux sites de phosphorylation par la PKC sur le domaine HOOK, reliant les deux domaines SH3 et GK, sont conservés. La mutation du premier site (Ser228) en arginine sur la $Ca_v\beta_{1b}$ affecte les courants du canal $Ca_v2.1$ (De Waard et al., 1994). Notamment, la sous-unité $Ca_v\beta$ schistosome contient une cystéine et une alanine à la place de ces deux sites de phosphorylation cités ci-dessus. Cette sous-unité n'assure ni l'adressage et ni l'expression de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ in vitro (Kohn et al., 2001).

Les MAP kinases (microtubule-associated protein kinases) sont impliquées aussi dans la phosphorylation des canaux de type N et L ($Ca_v\alpha_1$ et $Ca_v\beta$) et par la suite leur activation (Fitzgerald, 2000). Leur effet sur le canal exige la présence de la sous-unité $Ca_v\beta$ (Fitzgerald, 2002).

Une étude récente expose un mécanisme moléculaire par lequel la protéine kinase dépendante du Ca^{2+}/Calmoduline (CaMKII) agit sur les canaux calciques de type L. Cette modulation par la CaMKII exige la présence de la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$. En fait, CaMKII interagit avec $Ca_v\beta_{2a}$ et assure préférentiellement la phosphorylation de la thréonine 498 (Thr498) de cette sous-unité. Cette phosphorylation est essentielle autant pour la

modulation des canaux calciques de type L que pour la facilitation du courant calcique global dans les cardiomyocytes (Grueter et al., 2006).

b- Palmitoylation

La palmitoylation est une modification post-translationnelle caractéristique à la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$, dont le rôle est de faciliter l'ancrage membranaire des protéines hydrophiles. La palmitoylation nécessite l'ajout d'un acide palmitique sur une cystéine via une liaison thioesther. La palmitoylation est un processus dynamique qui implique des cycles de palmitoylation et de dépalmitoylation, ce qui suggère un rôle régulateur de ce type de modification.

Sur la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$, les sites de palmitoylation ont été identifiés sur l'extrémité amino-terminale et précisément sur les résidus cys3 et cys4 (Chien et al., 1996). Un mutant de $Ca_v\beta_{2a}$, non palmitoylé, est capable d'adresser le canal à la membrane, mais son habilité à moduler les courants calciques est altérée (Chien et al., 1996). Parmi les sous-unités $Ca_v\beta$, $Ca_v\beta_{2a}$ est la seule palmitoylée, comme la protéine p55 de la famille des MAGUKs, qui est également palmitoylée du coté amino-terminal (Chishti, 1998).

c- Turnover

En utilisant une séquence antisens commune à toutes les sous-unités $Ca_v\beta$ injectée dans les neurones DRG (dorsal root ganglion), l'immunomarquage avec un anticorps dirigé contre toutes les sous-unités $Ca_v\beta$ montre une réduction maximale de la quantité des sous-unités $Ca_v\beta$ après 108 h, ce qui donne une idée approximative sur la demie vie des sous-unités $Ca_v\beta$ (environ 50 h) (Berrow et al., 1995). En parallèle, l'immunomarquage de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ exprimée dans les cellules COS-7 s'anéantit complètement 6-7 h après l'inhibition de la synthèse protéique par le cycloheximide (Bogdanov et al., 2000).

Sandoval et *al*. (2006) ont identifié sur $Ca_v\beta_3$ deux séquences PEST (potential signals for rapid protein degradation). Ces séquences sont riches en proline (P), glutamate (E), sérine (S) et thréonine (T), et possèdent un signal de dégradation protéolytique par la calpaïne, une protéase activée par le Ca^{2+} (Rechsteiner and Rogers, 1996). La première

séquence PEST se trouve dans le domaine amino-terminal, tandis que la deuxième est présente du coté carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ (Figure 4). *In vitro*, ces séquences sont sensibles à la calpaïne en présence du Ca^{2+}. Une sous-unité $Ca_v\beta_3$, mutante dans ces deux séquences, induit une augmentation de l'amplitude du courant et un changement des cinétiques d'inactivation, par rapport à la sous-unité intacte. Cela suggère un mécanisme de régulation des canaux calciques dépendant de la protéolyse (Sandoval et al., 2006).

D'autre part, la sous-unité $Ca_v\beta_{1b}$ est plus stable que la $Ca_v\beta_3$ probablement à cause de son association spécifique à une protéine membranaire. Un motif de neuf acides aminés (WEEEEDYEEE) identifié sur $Ca_v\beta_{1b}$ est impliqué dans l'ancrage membranaire et semble stabiliser la protéine contre la dégradation (Bogdanov et al., 2000).

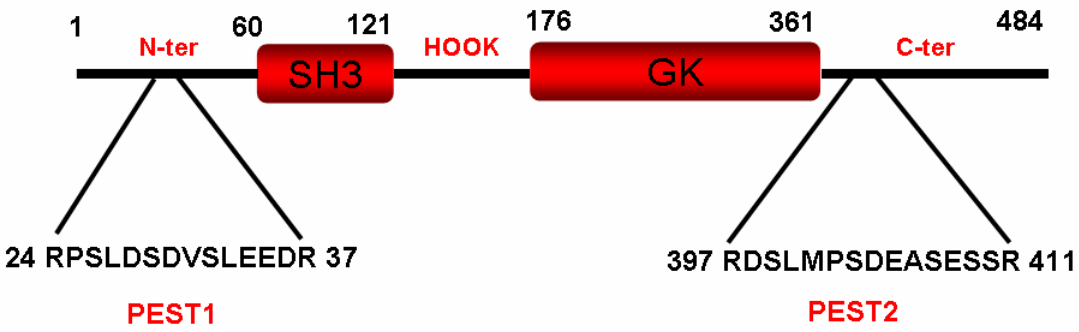


***Figure 4** : Deux séquences qui portent un signal de dégradation protéolytique « PEST », ont été identifiées sur la sous-unité $Ca_v\beta_3$. La séquence PEST1 est localisée sur le domaine amino-terminal, et PEST2 sur le domaine carboxy-terminal.*

3. $Ca_v\beta$ modulateur endogène des canaux calciques

Les sous-unités $Ca_v\beta$ jouissent d'un rôle essentiel aussi bien dans l'assemblage moléculaire et l'adressage du canal calcique vers la membrane plasmique, que dans la modulation des propriétés biophysiques de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$.

a- Rôle de $Ca_v\beta$ dans l'assemblage et l'adressage du canal calcique

La sous-unité $Ca_v\alpha_1$ semble former un canal immature dans le réticulum endoplasmique. Sa fonction à ce niveau est complètement inconnue pour l'instant. Les sous-unités auxiliaires, notamment $Ca_v\beta$, ont montré un effet assez marquant sur les propriétés biophysiques des canaux calciques HVA, ainsi que sur l'amplitude et la cinétique du courant, et l'adressage du complexe vers la membrane plasmique. Plusieurs études ont démontré l'implication des $Ca_v\beta$ dans l'augmentation de l'expression fonctionnelle de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ (Birnbaumer et al., 1998). D'autres études ont aussi montré le rôle de la sous-unité $Ca_v\beta$ en tant qu'une protéine d'échafaudage contrôlant l'expression et l'insertion des canaux fonctionnels dans la membrane (Chien et al., 1995).

En fait, les sous-unités $Ca_v\beta$ s'avèrent capable de masquer un signal de rétention endoplasmique, localisé sur la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ (Bichet et al., 2000). Apparemment, ce mécanisme se produit lors du premier stade d'assemblage du canal, ce qui permet ensuite l'adressage d'un canal mature via l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Ce processus reste à préciser puisque aucune séquence consensus de rétention endoplasmique n'est identifiée sur la boucle I-II.

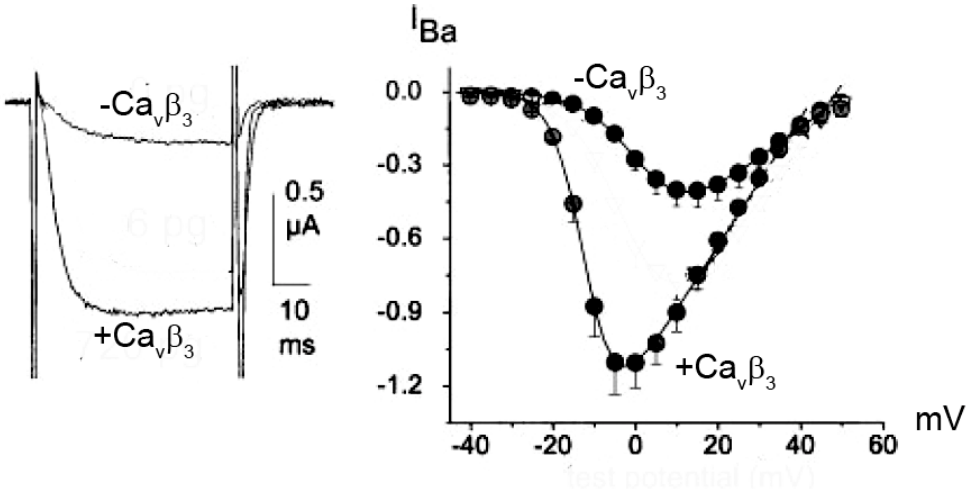


Figure 5 : *Les effets des $Ca_v\beta$ sur l'amplitude du courant et la voltage-dépendance. La coexpression de la sous-unité $Ca_v2.2$ avec la sous-unité $Ca_v\beta_3$ augmente l'amplitude du courant et déplace la courbe d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés (Dolphin, 2003).*

b- L'effet des sous-unités $Ca_v\beta$ sur la modulation des propriétés des canaux calciques

Les propriétés biophysiques des sous-unités $Ca_v\alpha_1$ sont modifiées en absence de $Ca_v\beta$. L'expression de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ seule, dans un système d'expression hétérologue, génère des courants de faibles densités. Par contre, sa coexpression avec la sous-unité $Ca_v\beta$ augmente l'amplitude du courant. Par exemple, la sous-unité $Ca_v\beta_{1b}$ avec la sous-unité $Ca_v2.1$ (De Waard et al., 1994), ou $Ca_v2.2$ (Stea et al., 1993), ou $Ca_v2.3$ (Wakamori et al., 1994) produit une augmentation du courant respectivement dix-huit, quatre et trois fois. L'augmentation de la densité de courant apportée par les sous-unités $Ca_v\beta$ est autant due aux effets de la régulation biophysique, qu'à son rôle dans l'adressage membranaire. La figure 5 illustre l'effet des sous-unités $Ca_v\beta$ sur l'amplitude du courant.

La première caractéristique biophysique touchée par les sous-unités $Ca_v\beta$ est la voltage-dépendance (Figure 6). En fait, toutes les sous-unités $Ca_v\beta$ hyperpolarisent le potentiel d'activation des canaux HVA, autrement dit augmentent la sensibilité du canal au voltage, ce qui se traduit par un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs (environ de 10 à 20 mV) (De Waard and Campbell, 1995; Stea et al., 1993).

Par contre, le déplacement de la courbe d'inactivation à l'état stable est variable et dépend aussi bien de la sous-unité $Ca_v\beta$ que de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ mise en jeu. Pour $Ca_v2.1$, toutes les sous-unités $Ca_v\beta$ hyperpolarisent les potentiels d'inactivation (De Waard et al., 1994). Par contre, pour $Ca_v2.3$ et $Ca_v2.2$, seule la sous-unité palmitoylée $Ca_v\beta_{2a}$ s'avère incapable de moduler l'inactivation. La coexpression de la sous-unité $Ca_v\beta$ avec toutes les sous-unités de type L ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$) ne génère aucun déplacement de la courbe de l'inactivation à l'état stable.

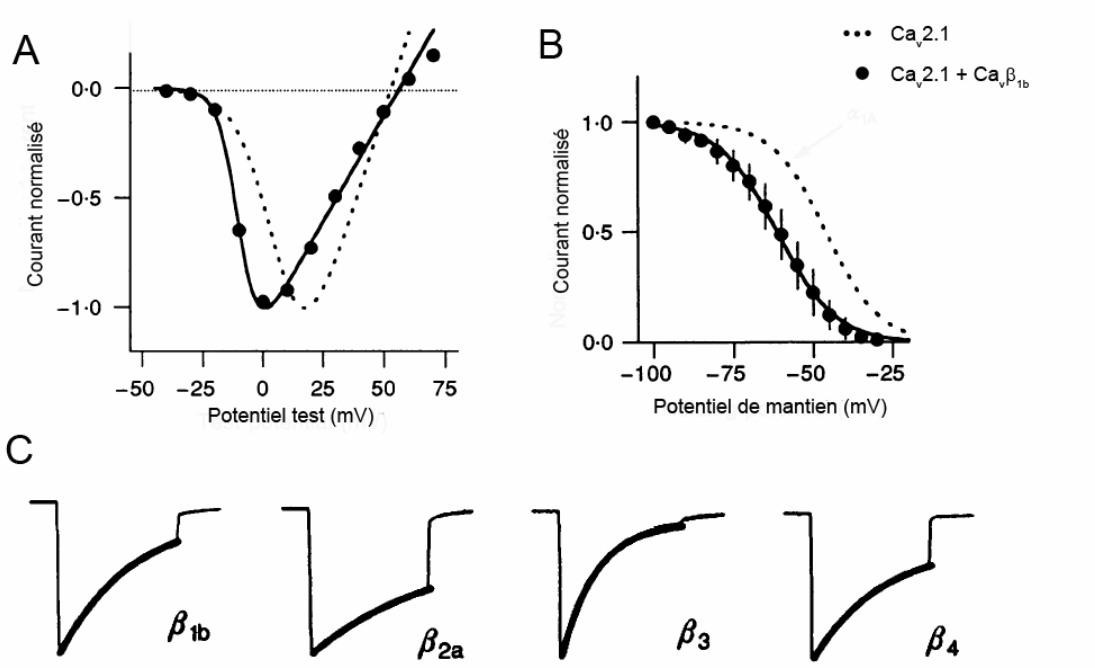


Figure 6 : *Les effets de Ca$_v$β sur l'activation et l'inactivation du canal.*
(A) La coexpression de la sous-unité Ca$_v$β$_{1b}$ avec Ca$_v$2.1 déplace à l'état stable la courbe d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés et (B) pareil pour la courbe d'inactivation. (C) Les effets des sous-unités Ca$_v$β sur la cinétique d'inactivation du courant, généré par l'expression de Cav2.1, varient suivant l'isoforme. Ainsi Ca$_v$β$_{1b}$, β$_3$ et β$_4$ provoquent une accélération de l'inactivation du courant, alors que Ca$_v$β$_{2a}$ induit un ralentissement (De Waard and Campbell, 1995; De Waard et al., 1994).

Toutes les sous-unités Ca$_v$β affectent la cinétique d'inactivation de toutes les sous-unités Ca$_v$ des canaux HVA. Mais, les études récentes indiquent qu'elles influencent les cinétiques d'activation et d'inactivation, ainsi que la probabilité d'ouverture. Cependant, leurs effets sur la cinétique d'inactivation du courant peuvent être différents. Par exemple, la sous-unité Ca$_v$β$_3$ provoque une forte accélération de l'inactivation (De Waard et al., 1994) contrairement à l'isoforme Ca$_v$β$_2$ palmitoylé qui ralentit cette cinétique (Restituito et al., 2000a) (Figure 6).

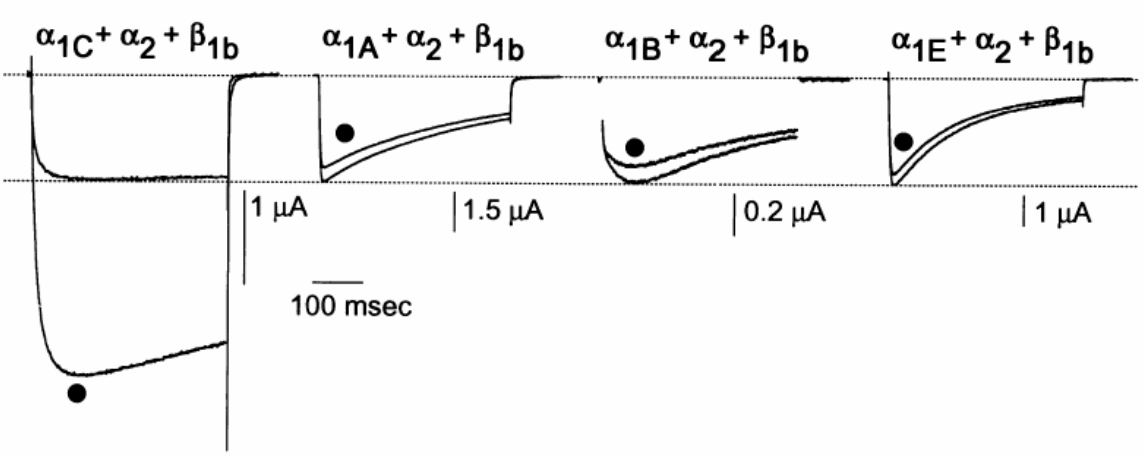


Figure 7 *: La facilitation dépendante de l'activité de la PKA implique uniquement les canaux de type L. La comparaison entre l'amplitude du courant suite à une prédépolarisation appliquée sur des ovocytes de xénope coexprimant $Ca_v1.2$, $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ ou $Ca_v2.3$ avec $Ca_v\beta_{1b}$ et $Ca_v\alpha_2$ montre une facilitation uniquement dans le cas de $Ca_v1.2$ (cercle fermé). Cette facilitation dépendante de l'activité de la PKA n'est observée que dans le cas des canaux de type L neuronal (Bourinet et al., 1994).*

En présence de la sous-unité $Ca_v\beta$, une augmentation de l'amplitude du courant d'un facteur allant jusqu'à deux est observé, suite à une prédépolarisation importante ou un train de potentiel d'action. Cette facilitation est due à une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal induite par $Ca_v\beta$ (Cens et al., 1996). Il existe deux types de facilitation toutes deux modifiées par la présence de $Ca_v\beta$. La première concerne les canaux de type L et a été observée dans différents types cellulaires, incluant les neurones et les cellules musculaires squelettiques et cardiaques. Elle dépend d'une phosphorylation par la PKA (Bourinet et al., 1994) (Figure 7). Le deuxième type de facilitation implique les protéines G, particulièrement le complexe $G\beta\gamma$ et les canaux de type non L (Bourinet et al., 1996; Qin et al., 1997) (Figure 8). Le degré de facilitation et ses cinétiques diffèrent d'une sous-unité $Ca_v\beta$ à une autre (Feng et al., 2001).L'augmentation du courant suite à un prépulse dépolarisant est due à la levée de l'inhibition imposée par $G\beta\gamma$ (Meir et al., 2000). Une modification de la durée du prépulse ou du temps séparant le prépulse permet respectivement l'analyse des cinétiques de dissociation et de réassociation. Ces analyses ont permis de démontré que la présence de $Ca_v\beta$ accélère la cinétique de

dissociation du complexe Gβγ, mais ne modifie pas sa cinétique de réassociation. Autrement dit, la sous-unité $Ca_v\beta$ induit une dissociation de Gβγ, mais ne perturbe pas l'accès du complexe Gβγ à son site de liaison en vu d'une nouvelle réassociation (Canti et al., 2000).

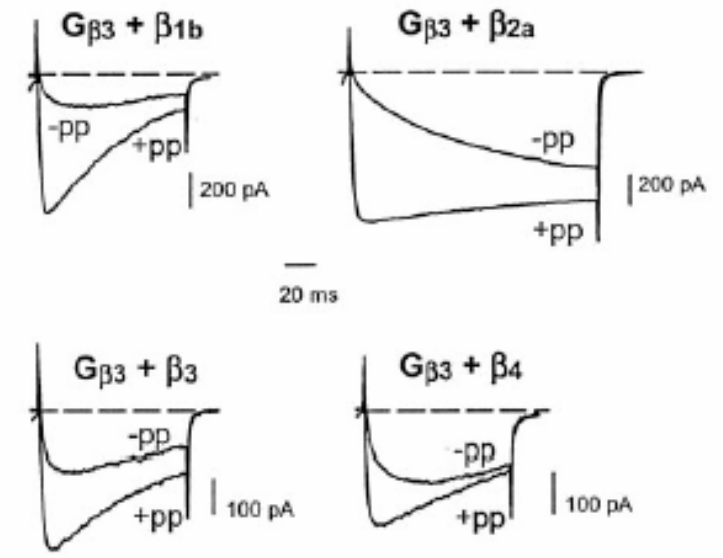


Figure 8 : *La facilitation qui implique les canaux non L dépend de l'isoforme des sous-unités $Ca_v\beta$ et des sous-unités Gβγ. La comparaison entre l'amplitude du courant suite à une prédépolarisation (+pp) ou du contrôle (-pp), en coexprimant le canal N ($Ca_v2.2+\alpha_2\delta$+ divers $Ca_v\beta$) avec la sous-unité Gβγ montre l'effet des différentes $Ca_v\beta$ sur le degré de la facilitation (Feng et al., 2001).*

4. La base structurale de l'interaction $Ca_v\alpha_1$-β

Les sous-unités $Ca_v\beta$ interagissent directement avec $Ca_v\alpha_1$, le canal proprement dit, selon une affinité très élevée (De Waard et al., 1994). Elles entrent en interaction avec la boucle cytoplasmique joignant les domaines I et II, via un motif de 18 acides aminés appelé « α_1 interaction domain » (AID) sur la boucle I-II (Pragnell et al., 1994). La séquence commence à partir du 23ème acide aminé de la fin du 6ème segment transmembranaire du domaine I (IS6) (Figure 9). Au sein de toutes les sous-unités $Ca_v\alpha_1$ des HVA, neuf résidus sur 18 sont conservés (QQ-E-L-GY-WI---E). Dans toute la

séquence AID, des résidus spécifiques, comme le tryptophane, l'isoleucine et la tyrosine s'avèrent particulièrement indispensable pour l'interaction $Ca_v\alpha_1$-β (Berrou et al., 2002; De Waard et al., 1996).

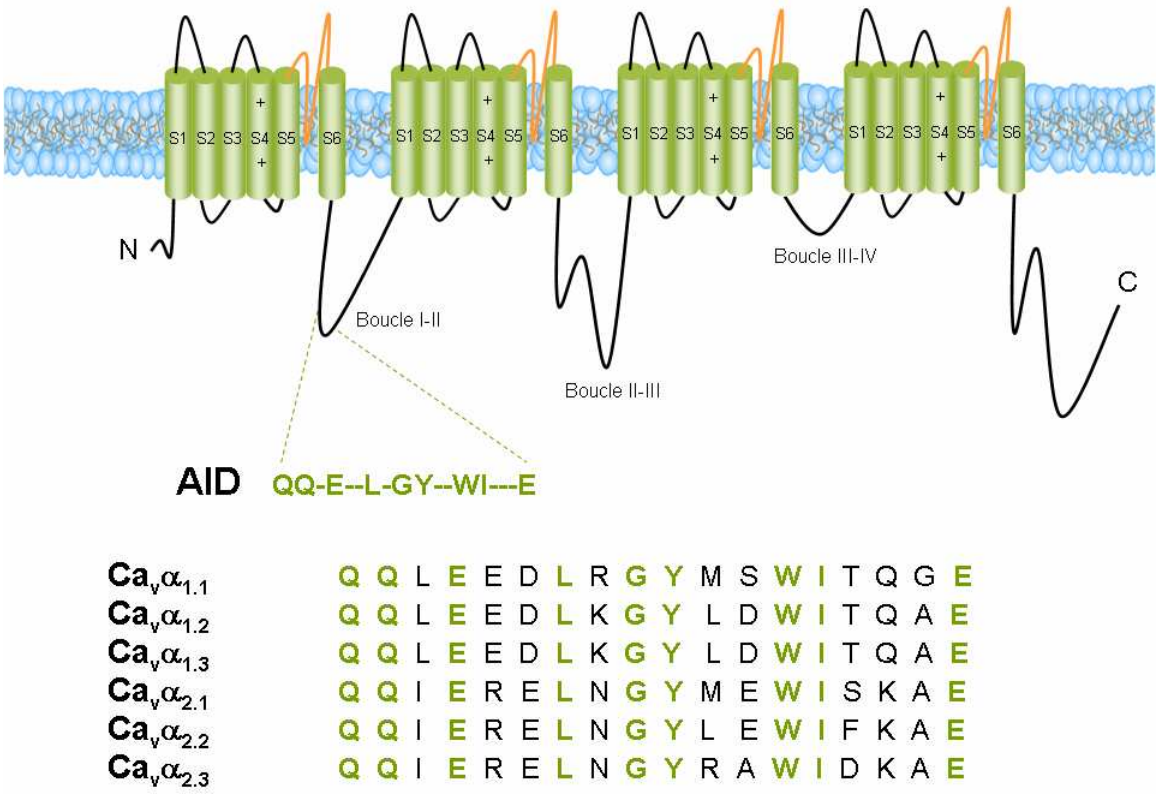


Figure 9 : *Le motif AID constitué de 18 acides aminés, situé sur la boucle cytoplasmique I-II, représente le site d'interaction principale des sous-unités $Ca_v\beta$. Neuf résidus sur 18 sont conservés parmi toutes les sous-unités $Ca_v\alpha$ des HVA (Pragnell et al., 1994).*

Du coté $Ca_v\beta$, une séquence de 41 acides aminés (BID) avait été identifiée comme étant un élément essentiel dans l'expression de la sous unité $Ca_v\alpha_1$ et de l'interaction $Ca_v\alpha_1$-β (De Waard et al., 1996). Des données obtenues au cours de ces trois dernières années ont redéfinies les bases de l'interaction $Ca_v\alpha_1$-β, notamment après la sortie de la structure cristallographique de la sous-unité $Ca_v\beta$ seule et en interaction avec AID.

a- Structure tridimensionnelle de la sous-unité $Ca_v\beta$, membre de la famille MAGUK

La sous-unité $Ca_v\beta$ consiste en cinq domaines structuraux, dont deux sont particulièrement conservés. Trois des ces domaines ont été cristallisés (Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegem et al., 2004) (Figure 10). Ils sont impliqués dans des interactions protéine-protéine (Hanlon and Wallace, 2002). Le premier domaine conservé correspondant au D2 est le domaine SH3 pour Src Homology-3. Ce dernier est caractérisé par son interaction avec des motifs particulièrement riches en proline. Dans les domaines SH3 de la sous-unité $Ca_v\beta$, les résidus qui constituent la clé de son interaction avec les sites polyproline sont conservés. Ce site habituel de fixation des ligands est occupé par une hélice α du domaine GK qui le rend inaccessible à la fixation d'autres partenaires à sites polyproline. Le domaine SH3 constitué de cinq feuillets β est connecté au deuxième domaine conservé par une boucle flexible. Le deuxième domaine conservé désigné par D4, est le domaine Guanylate Kinase (GK) qui présente une homologie avec l'enzyme guanylate kinase. Le cœur de ce domaine est composé de cinq feuillets β parallèles pris en tenaille par cinq hélices α. Le domaine GK de la sous-unité $Ca_v\beta$ est dépourvu d'activité catalytique, puisque le motif riche en glycine, indispensable pour la fixation de l'ATP, n'est pas conservé dans $Ca_v\beta$. Il en va de même pour le motif impliqué dans la fixation du GMP, normalement présent dans les enzymes GK.

L'agencement de ces deux domaines SH3-GK positionne les sous-unités $Ca_v\beta$ parmi les protéines de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK) (Blaszczyk et al., 2001). Ces protéines facilitent, grâce à leurs multiples sites d'interaction, la création de véritables échafaudages moléculaires aux abords de la membrane plasmique, permettant ainsi l'organisation des voies de signalisation intracellulaire.

Ces protéines présentent souvent une chaîne flexible, le domaine HOOK qui joint les domaines SH3 et GK. Ceci constitue un autre sigle parallèle avec les sous-unités $Ca_v\beta$, dont le noyau est constitué du motif SH3-HOOK-GK. Ce domaine HOOK est aussi impliqué dans des interactions protéine-protéine. Dans le cas de la protéine p55, membre de la famille MAGUK, HOOK est capable d'interagir avec la protéine 4.1, une protéine

qui se lie à l'actine du cytosquelette. Un autre motif HOOK est capable de se lier aussi à la calmoduline (Paarmann et al., 2002). La protéine p55 est aussi palmitoylée sur son extrémité amino-terminale comme la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$ (Chishti, 1998).

D'une manière analogue aux protéines de la famille MAGUK, il existe une interaction intramoléculaire entre les domaines SH3 et GK. Cette interaction serait nécessaire à l'assemblage complet de l'unité SH3 et primordiale pour obtenir un accrochage sur le canal et enregistrer des effets fonctionnels. Ce couple SH3-GK peut fonctionner aussi bien en intramoléculaire qu'en intermoléculaire (McGee et al., 2004). En effet, la co-expression de ces deux domaines permet de reconstituer un dimère fonctionnel (Takahashi et al., 2004; Takahashi et al., 2005).

Récemment, la structure cristallographique du premier domaine, l'extrémité amino-terminale de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, a été identifiée. Il contient deux hélices α et deux feuillets β (Vendel et al., 2006a). La structure de l'extrémité carboxy-terminale demeure inconnue.

La structure de la sous-unité $Ca_v\beta$ et son homologie avec les protéines de la famille des MAGUK remettent en cause les fonctions de la sous-unité $Ca_v\beta$. En fait, l'architecture moléculaire de la sous-unité $Ca_v\beta$ montre que cette protéine a évolué pour optimiser son interaction protéine-protéine avec d'autres partenaires.

b- <u>Le concept de l'ABP (AID binding pocket)</u>

Les données structurales montrent que AID en complexe avec $Ca_v\beta$ forme une hélice α. Par contre le peptide AID seul en solution est une structure embobinée d'une façon aléatoire (Opatowsky et al., 2004). Cette structuration semble ne pas être exclusive à AID, et cette hélice α de AID serait extrapolée vers l'extrémité amino-terminale, tout au long de la boucle I-II, jusqu'à la fin de l'IS6 ($6^{ème}$ segment du premier domaine transmembranaire) (Opatowsky et al., 2004). Du fait, la sous-unité $Ca_v\beta$, en interagissant avec AID, impose une structure en hélice α non seulement à la séquence AID mais aussi à sa région proximale amino-terminale sur la boucle I-II. $Ca_v\beta$ semble donc induire un changement de conformation de la boucle I-II, ce qui favoriserait la stabilité de l'interaction et la modulation électrophysiologique du canal (Opatowsky et al., 2004).

Des études de mutagenèse dirigée ont indiqué l'importance de trois résidus conservés de la séquence AID dans l'interaction $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$ (Y437, W440 et I441 dans $Ca_v1.2$ et Y392, W395 et I396 dans $Ca_v2.1$) (De Waard et al., 1996). La structure cristallographique confirme leur importance fonctionnelle puisqu'ils participent aux fortes interactions avec $Ca_v\beta$ (Chen et al., 2004).

AID en hélice α entre en interaction avec $Ca_v\beta$ via un creux hydrophobe dans le domaine GK du coté opposé du domaine SH3 (Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegem et al., 2004) (Figure 10). Cette région est maintenant reconnue sous le nom de « AID binding pocket » (ABP). Cette poche est formée de 3 hélices α (α3, α6 et α9) et 2 feuillets β (β9 et β10). L'interaction entre AID et $Ca_v\beta$ est constituée surtout des interactions hydrophobes et des liaisons de van der waals, dans lesquelles sont impliqués des acides aminés apolaires, situés particulièrement dans les deux domaines d'interaction AID et ABP. Le rôle crucial de ces acides aminés dans la stabilité de l'interaction est confirmé par des expériences de mutagenèse (Opatowsky et al., 2004). Ces interactions seraient à la base de la forte affinité (~ 10 nM) entre $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$.

Cette structure révèle que le BID, auparavant considéré comme étant la séquence qui entre directement en interaction avec AID, est partiellement masqué et est incapable à elle seule de participer aux interactions protéine-protéine. Par contre, il constitue une partie structurale essentielle pour l'intégrité du motif SH3-HOOK-GK et cruciale pour l'association intramoléculaire des domaines SH3 et GK. Les mutations sur BID qui se sont précédemment révélées défavorables pour l'interaction $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$, ont en fait perturbé la structure et la conformation de la protéine $Ca_v\beta$ et non pas les contacts directs entre AID et $Ca_v\beta$.

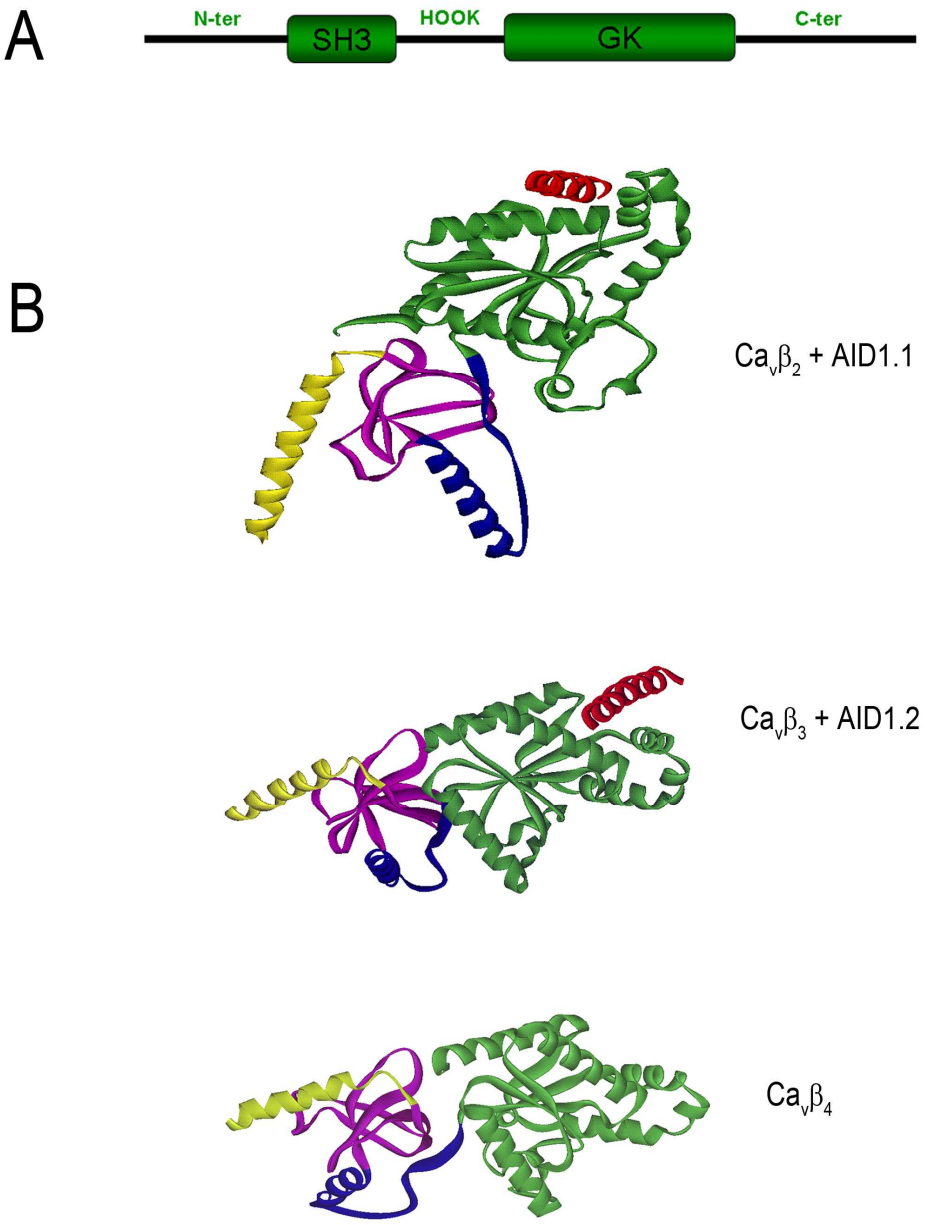


Figure 10 : *Représentation cristallographique des sous-unités $Ca_v\beta$.*
(A) Structure des différents domaines de la sous-unité $Ca_v\beta$. SH3 et GK représentent les domaines conservés ; N-ter, HOOK et C-ter constituent les domaines variables. (B) Structures cristallographiques des domaines conservés de la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$ en interaction avec l'AID du $Ca_v1.1$ (Van Petegem et al. 2004), de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ avec l'AID de $Ca_v1.2$ (Chen et al. 2004) et de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ seule. La cristallographie révèle la nature de l'interaction entre la cavité (ABP) présente dans le domaine GK (vert) et le domaine AID de la boucle I-II (rouge). La partie N-ter est représentée en jaune, SH3 en violet et le HOOK en bleu.

De manière intéressante, AID occupe une zone restreinte dans le motif SH3-HOOK-GK, et une large surface de $Ca_v\beta$ reste vacante et libre pour d'autres interactions avec $Ca_v\alpha_1$ ou même avec d'autres protéines. Dans la famille des MAGUK, chaque région du motif SH3-HOOK-GK est engagée dans de nombreuses interactions protéiques. Etant membre de la famille MAGUK, les domaines de $Ca_v\beta$ libres pour les interactions protéiques peuvent aussi être impliqués dans des fonctions importantes, outre l'adressage du canal et la modulation de ses propriétés (Chen et al., 2004).

c- <u>La réversibilité de l'interaction $Ca_v\alpha_1$-β</u>

Plusieurs études récentes montrent que l'interaction $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$ qui module l'activité du canal, peut s'établir une fois que Ca_v est à la membrane plasmique et qu'elle est réversible (Hidalgo et al., 2006; Sandoz et al., 2004). Un canal $Ca_v2.3/\beta_{1b}$ est converti en un canal type $Ca_v2.3/\beta_{2a}$ après l'injection cytoplasmique de la sous-unité protéique β_{2a}. Une fois le canal ancré à la membrane par l'intermédiaire de la sous-unité β_{1b}, l'ajout de la sous-unité β_{2a} crée une compétition entre les deux sous-unités pour AID, produisant la dissociation de β_{1b} du canal et l'association de β_{2a}. En fait, l'affinité du canal pour les sous-unités $Ca_v\beta$ semble être plus faible à la surface cellulaire, qu'aux premiers stades de la synthèse et de la structuration du canal (Tareilus et al., 1997).

D'autres études ont démontré aussi le dynamisme de l'interaction $Ca_v\alpha_1$-β dans des systèmes d'expression hétérologues. Les sous-unités $Ca_v\beta$ sont capables de se dissocier de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$, dans des conditions physiologiques, après l'adressage membranaire du canal (Restituito et al., 2001). Cette dissociation n'affecte pas la probabilité d'ouverture du canal mais uniquement la phase d'inactivation, exprimée par un shift de la courbe de voltage-dépendance de l'inactivation et une augmentation de l'amplitude du courant non inactivé (Restituito et al., 2001). Cette dissociation physiologique révèle un nouveau processus dans la régulation et la modulation des propriétés propres au canal.

Des résultats obtenus sur les neurones d'un mollusque invertébré (*Lymnaea stagnalis*) ont confirmé la séparation spatiale et physique des sous-unités $Ca_v\alpha_1$ et $Ca_v\beta$ durant le développement (Spafford et al., 2004). Ces deux sous-unités co-localisent dans

les neurones matures et connectés par les synapses. Par contre, elles sont séparées dans les neurones immatures et dans les neurites en développement. La sous-unité $Ca_v\alpha_1$, et non $Ca_v\beta$, est impliquée dans le développement des neurones du *Lymnaea*. En fait, les canaux calciques qui induisent des dépolarisations spontanées de type « *transient* », jouent un rôle primordial dans la croissance axonale et la maturation des neurites. Par contre, dans les synapses matures, où les canaux calciques sont activement localisés, des dépolarisations longues sont indispensables pour la plasticité synaptique. De ce fait, l'association différentielle de la sous-unité $Ca_v\beta$ avec les canaux calciques synaptiques et ceux exprimés dans les neurites en développement suggère un rôle de la sous-unité β dans la transformation des fonctions du canal calcique dans les neurones immatures et dans les synapses matures (Spafford et al., 2004).

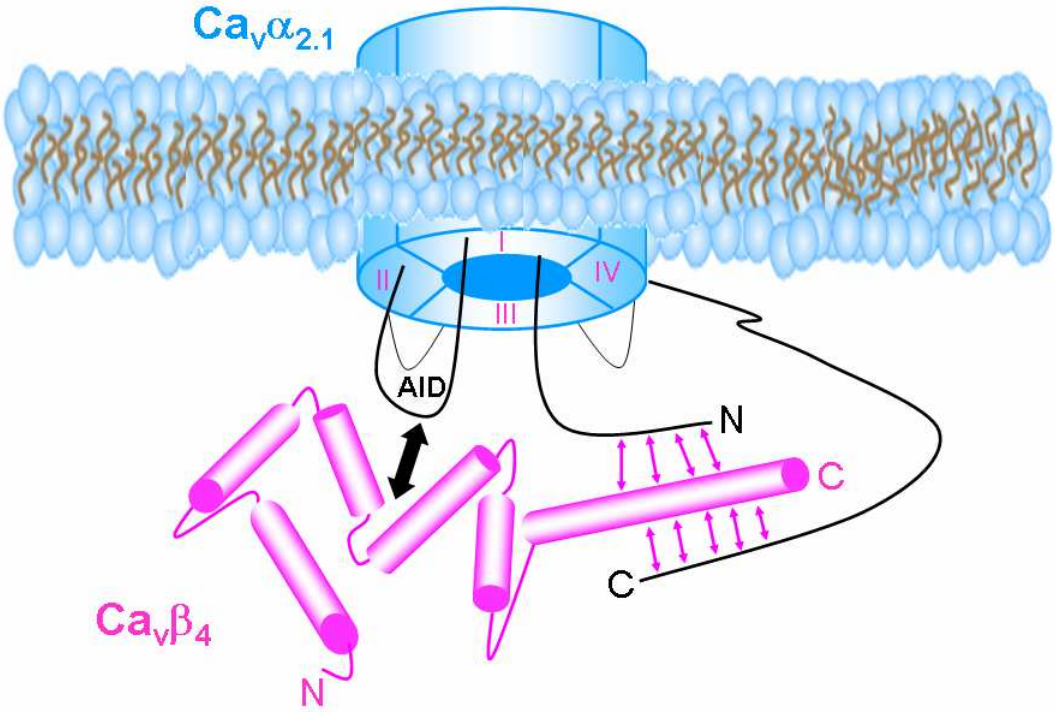


Figure 11 : *Représentation schématique du site d'interaction primaire et des sites d'interaction secondaires, entre les sous-unités $Ca_v\alpha_{2.1}$ et $Ca_v\beta_4$ (Walker et al., 1998; Walker et al., 1999).*

d- Interactions secondaires entre $Ca_v\alpha_1$ et $Ca_v\beta$

D'autres sites d'interaction avec les sous-unités $Ca_v\beta$ ont été identifiés sur la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ du canal (Figure 11). Des études *in vitro* ont mis en évidence l'existence d'une interaction secondaire entre la partie carboxy-terminale de la sous-unité $Ca_v\alpha_{2.3}$ et la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$ (Tareilus et al., 1997). Le même type d'interaction a été révélé entre la sous-unité $Ca_v\alpha_{2.1}$ et $Ca_v\beta_4$. En effet, l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité $Ca_v\alpha_{2.1}$ est capable de lier la $Ca_v\beta_4$ traduite *in vitro*. La partie de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ impliquée dans cette interaction secondaire est une séquence du domaine carboxy-terminal (de l'acide aminé 446 à 482) (Walker et al., 1998). Par la suite, un deuxième site d'interaction secondaire entre $Ca_v\alpha_{2.1}$ et $Ca_v\beta_4$ a été identifié. Ce dernier implique la partie amino-terminale de la sous-unité $Ca_v\alpha_{2.1}$ et l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (Walker et al., 1999). L'affinité de ces interactions secondaires est de 93 et 330 nM respectivement, soit trente fois inférieures à l'interaction AID/ABP. Cette différence d'affinité supporte l'idée de la nature secondaire de ces interactions. Probablement, l'interaction AID/ABP constituerait le site d'interaction permettant l'adressage et l'ancrage des deux sous-unités dans la membrane et les sites d'interactions secondaires se mettraient en place par la suite. Ces interactions secondaires semblent être indispensables pour une fonction complète des $Ca_v\beta$, surtout dans la modulation des propriétés d'inactivation (Stephens et al., 2000). Un domaine d'interaction avec $Ca_v\beta$ sur l'extrémité carboxy-terminale de $Ca_v\alpha_1$ a aussi été décrit dans l'inhibition du canal par les récepteurs aux protéines G (Qin et al., 1997).

5. Implication de $Ca_v\beta$ dans des interactions protéine-protéine

La sous-unité $Ca_v\beta$ classée parmi les protéines de la famille des MAGUKs suivant leur homologie structurale, pourrait s'engager dans des interactions protéine-protéine. En fait, les protéines MAGUKs jouent un rôle majeur dans l'organisation des régions spécialisées des membranes plasmiques comme les synapses neuronales, les zones d'adhérence des bordures épithéliales ou encore les disques intercalaires du myocarde. Ces protéines ubiquitaires possèdent toutes plusieurs domaines d'interaction protéique engagés pour former de larges complexes protéiques. Les MAGUKs interviennent dans

«l'échafaudage» des protéines en favorisant le regroupement et les interactions fonctionnelles des récepteurs et des canaux membranaires (Godreau et al., 2004).

Outre le canal calcique dépendant du voltage, des partenaires de la sous-unité $Ca_v\beta$ ont été décrits.

a- L'interaction avec la famille des RGKs

Tous les membres de la famille RGK sont capables d'interagir avec la sous-unité $Ca_v\beta$ (Beguin et al., 2006; Beguin et al., 2001; Chen et al., 2005; Finlin et al., 2006). La famille des protéines Ras-Related RGK comprend Kir/Gem, Rad, Rem et Rem2. Ces dernières sont des protéines G (GTP-binding protein) de petites masses moléculaires, impliquées dans une large gamme de processus cellulaires comprenant la croissance et la différentiation cellulaire, l'adressage des vésicules intracellulaires, l'échange nucléo-cytoplasmique et l'organisation du cytosquelette. Ces protéines alternent entre une forme active liée à la GTP (guanosine triphosphate) et une forme inactive liée à la GDP (guanosine diphosphate). Elles répondent à des signaux externes par l'échange de la GDP par une GTP, ce qui par la suite lui permet de déclencher les cascades de signaux intracellulaires. L'arrêt de ces cascades s'effectue par l'hydrolyse du GTP en GDP par les GAPs (GTPases activating protein) (Finlin and Andres, 1997).

Un modèle de régulation des canaux calciques HVA a été présenté en se basant sur l'interaction des RGK protéines et la sous-unité $Ca_v\beta$. Suite à l'activation de la calmoduline (CaM) par le Ca^{2+} intracellulaire, la CaM/Ca^{2+} interagit avec les protéines Kir/Gem et permet leur translocation vers le cytoplasme (Figure 12). La sous-unité $Ca_v\beta$ interagit uniquement avec la forme liée à la GTP de ces protéines. Cette interaction est inhibée par la présence de la CaM/Ca^{2+}, donc une dissociation du CaM/Ca^{2+} de la forme GTP du Kir/Gem est indispensable pour permettre l'interaction de GTP-Kir/Gem avec $Ca_v\beta$. Cette interaction inhibe l'adressage et l'expression de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ sur la membrane plasmique étant donné que $Ca_v\beta$ n'est plus capable de masquer le signal de rétention dans le réticulum endoplasmique présent sur $Ca_v\alpha_1$. Cela présente un moyen de régulation de l'expression des canaux calciques dépendants du voltage de haut seuil (HVA) (Beguin et al., 2001).

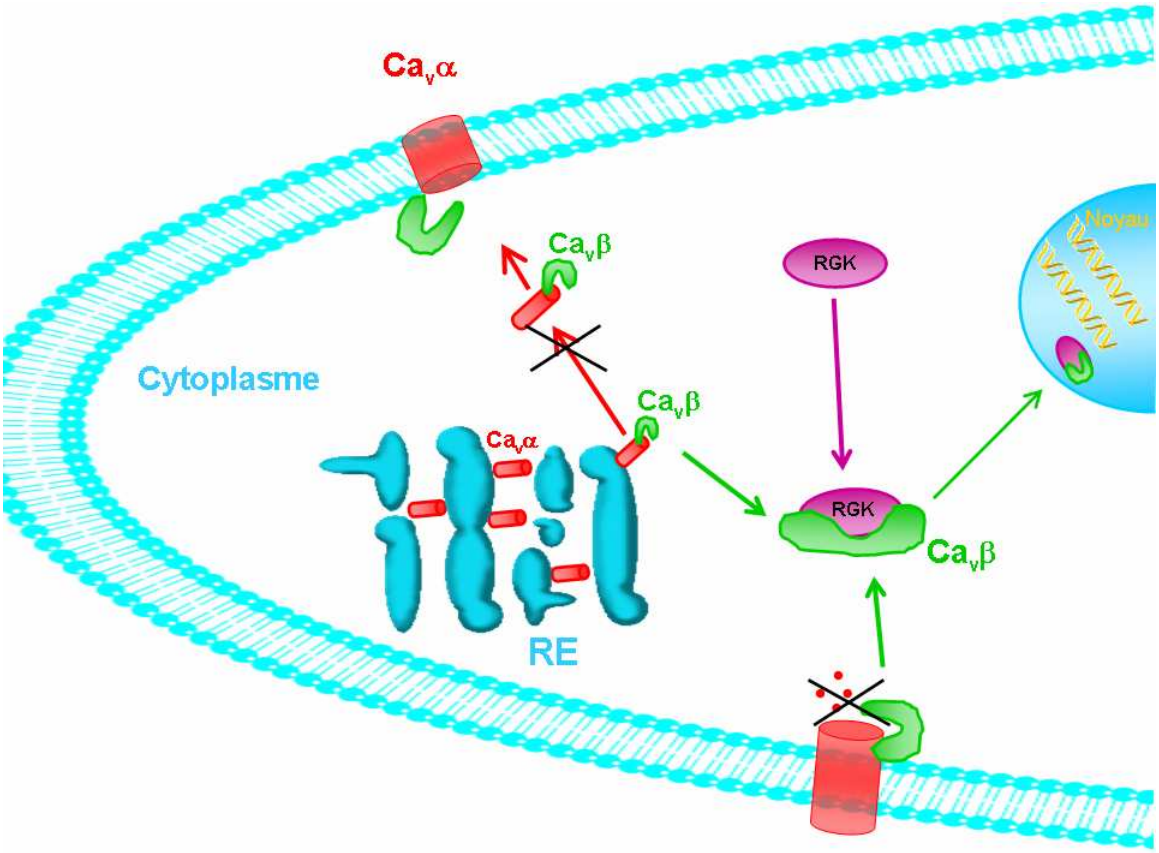


Figure 12 *: L'interaction de Ca$_v$β avec les protéines de la famille RGK bloque l'adressage membranaire du canal et inhibe les courants calciques des CCDV. Les protéines RGK séquestrent Ca$_v$β dans le cytoplasme ou dans le noyau.*

Apparemment toutes les protéines de la famille RGK sont capables d'interagir avec la sous-unité Ca$_v$β. Par conséquence, cette interaction interfère avec l'assemblage et l'adressage du canal calcique vers la membrane plasmique et assure une inhibition importante de l'amplitude du courant issue des canaux HVA préexistants sur la membrane.

Rem2, abondamment exprimée dans le tissu nerveux, anéantie le courant calcique provenant des canaux dépendants du voltage à haut seuil (HVA), mais ne touche pas les canaux à bas seuil (Colecraft et al.). Parmi la famille RGK, Rem2 exceptionnellement est capable de transformer le canal calcique en une unité non conductrice, sans affecter l'expression et la densité des canaux calciques sur la membrane (Chen et al., 2005).

Rad et Rem jouent le même rôle que les autres protéines RGK. Ces protéines possèdent des domaines d'interaction avec la CaM et la protéine 14.1.1 qui sont responsables de la distribution subcellulaire de Rad et Rem entre le noyau et le cytoplasme. En fait, l'expression des canaux calciques dépendants du voltage à la surface cellulaire est régulée par deux mécanismes différents, dont l'un est l'association des $Ca_v\beta$ avec Rad et Rem dans le cytosol, et l'autre est la séquestration des $Ca_v\beta$ dans le noyau (Figure 12) (Beguin et al., 2006).

Des résultats récents ont décrit l'interaction entre $Ca_v\beta$ et la GTPase Rem. En fait, le domaine d'interaction de Rem est localisé dans le domaine GK sur $Ca_v\beta$, sur un site structuralement différent qu'AID. $Ca_v\beta$ est capable d'interagir simultanément avec $Ca_v\alpha_1$ et Rem, ce qui suggère que Rem n'affecte pas l'interaction $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$. La régulation des canaux calciques fait donc intervenir la formation du complexe $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$/Rem sans altérer l'expression de $Ca_v\alpha_1$ à la membrane plasmique (Beguin et al., 2007; Finlin et al., 2006).

b- L'interaction avec HP1γ

$Ca_v\beta_{4c}$, un variant de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ a été détecté dans la cochlée du poulet, et son ARNm dans le cerveau, la moelle épinière, l'œil et le cœur. Ce variant est capable d'interagir avec la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ et de moduler ses propriétés. Mais son effet sur les courants calciques est assez restreint (Hibino et al., 2003). Par contre, ce variant est susceptible d'interagir avec une protéine nucléaire, HP1γ (heterochromatin proteins). Ces protéines constituent une composante essentielle dans le domaine de l'hétérochromatine qui est généralement considéré comme une région chromosomique. La structure confère aux protéines HP1γ le potentiel de compacter la chromatine, ce qui impose un silence transcriptionnel aux gènes localisés dans cette région. Ces protéines contiennent deux domaines intéressants : CD (chromo domain) du coté amino-terminal et CSD (chromo shadow domain) du coté carboxy-terminal. Le CD est essentiel pour l'activité répressive des gènes tandis que le CSD assure l'échafaudage des protéines nucléaires. $Ca_v\beta_{4c}$, et non la protéine complète $Ca_v\beta_{4a}$ interagit avec HP1γ via CSD, son chromo shadow domain, après translocation nucléaire (Hibino et al., 2003). Cette interaction empêche HP1γ de

reconnaître ses partenaires, et donc prévient la répression transcriptionnelle des gènes (Figure 13). La translocation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta$ reste ambiguë. On peut imaginer un mécanisme où suite à un changement d'activité électrique au niveau de la membrane, un feedback peut se créer entre la réponse neuronale et la transcription génique.

c- L'interaction avec la synaptotagmine I

Récemment, la structure cristallographique du domaine amino-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_{4a}$ a été caractérisée (Vendel et al., 2006a). En fait, le rôle de la sous-unité $Ca_v\beta_{4a}$ dans l'expression du canal sur la membrane et dans la régulation des courants calciques ne sollicite pas la présence de son domaine amino-terminal. Dans le cerveau, les sous-unités $Ca_v\beta_{4a}$ sont localisées surtout dans les synapses, où elles sont impliquées dans des interactions dépendantes du Ca^{2+} avec la synaptotagmine via leur coté amino-terminal : la présence du Ca^{2+} prévient cette interaction (Vendel et al., 2006b).

La synaptotagmine est une protéine membranaire des vésicules synaptiques. Ces dernières sont localisées dans les terminaisons axonales et constituent le site de stockage des neurotransmetteurs. La libération des neurotransmetteurs est initiée par une augmentation locale de la concentration du calcium intracellulaire via les canaux calciques dépendants du voltage, particulièrement du type P/Q et en deuxième du type N. Il existe deux types d'exocytose ; l'exocytose rapide qui utilise comme support des petites vésicules synaptiques, et l'exocytose lente qui utilise des vésicules à cœur dense. La libération rapide des messagers ainsi que la forte concentration calcique nécessaire nécessite la proximité des canaux calciques avec la machinerie de l'exocytose. La synaptotagmine est considérée comme étant le senseur calcique qui déclenche l'exocytose rapide des neurotransmetteurs.

L'interaction entre $Ca_v\beta_{4a}$ et la synaptotagmine soulève la possibilité que le domaine amino-terminal de la $Ca_v\beta_{4a}$ serait impliqué dans le recrutement des vésicules synaptiques. Son effet sur la libération des neurotransmetteurs reste à étudier.

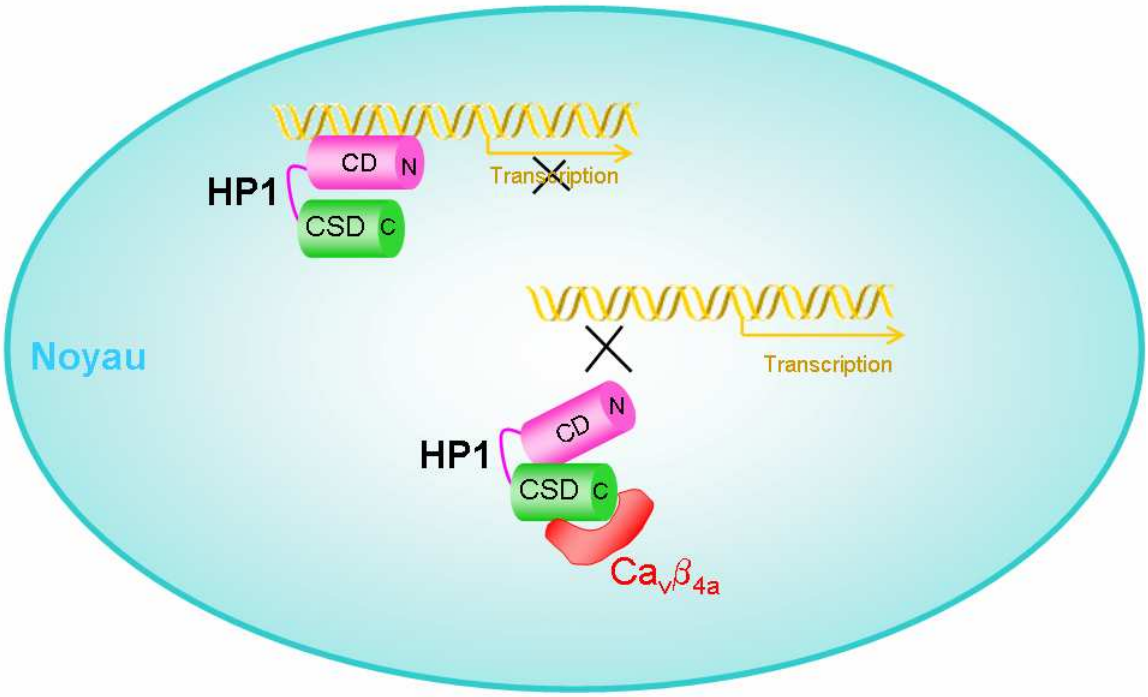


Figure 13: *L'interaction entre un variant de $Ca_v\beta_{4a}$ du poulet avec HP1, une protéine nucléaire responsable du silence transcriptionnel imposé aux gènes au niveau des chromatines (Hibino et al., 2003).*

En fait, la synaptotagmine interagit avec un site « syntprint » sur la boucle II-III de la sous-unité $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.2$ (Kim and Catterall, 1997; Sheng et al., 1997). Ce site a été également identifié sur les sous-unités $Ca_v1.2$ et $Ca_v2.3$ (Cohen et al., 2003). Ces sites « syntprint » interagissent également avec les autres protéines SNARE (Soluble NSF Attachement Protein Receptor), comme la syntaxine et la SNAP-25, deux protéines responsables de la reconnaissance entre la membrane de la vésicule synaptique et la membrane plasmique du compartiment cible (Figure 14).

La synaptotagmine n'entraîne aucune modification fonctionnelle quand elle est exprimée seule avec les canaux N et P/Q. A l'inverse, la coexpression de cette synaptotagmine avec les canaux et la syntaxine entraîne une suppression de l'inhibition induite par la syntaxine (Wiser et al., 1997). La fixation de la synaptotagmine, soit sur le canal, soit sur la syntaxine, représenterait le signal de suppression de l'inhibition du

canal. Enfin, la synaptotagmine exécute des effets fonctionnels sur le canal en présence d'autres $Ca_v\beta$, par exemple la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$, qui manque le domaine amino-terminal (Cohen et al., 2003; Zhong et al., 1999).

Enfin, étant donné que ce site « syntprint » n'existe pas sur toutes les sous-unités $Ca_v\alpha_1$; la question qui se pose est de savoir si le domaine amino-terminal de $Ca_v\beta_{4a}$ pourrait se substituer au site syntprint (Zamponi, 2003).

d- Son rôle dans la sécrétion d'insuline

Des résultats récents montrent l'implication directe de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ dans la modulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules pancréatiques β. A des concentrations élevées de glucose, la sous-unité $Ca_v\beta_3$ inhibe la sécrétion d'insuline (Berggren et al., 2004). En absence de la sous-unité $Ca_v\beta_3$, une augmentation de la fréquence des oscillations du Ca^{2+} intracellulaire est enregistrée, ainsi qu'une augmentation du relâchement du stock calcique via les récepteurs à l'IP_3. Cette augmentation des oscillations pourrait être à la base de l'augmentation de la sécrétion d'insuline dans les cellules β déficiente en $Ca_v\beta_3$. Dans ce contexte, deux voies de signalisation sont proposées : une régulation directe du récepteur à l'IP_3, et une réduction indirecte de la phospholipase C β (PLC_β). L'implication de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ dans la régulation d'insuline suggère l'idée d'une nouvelle cible dans le traitement du diabète de type 2. En bloquant la sous-unité $Ca_v\beta_3$ dans les cellules pancréatiques β, la sécrétion d'insuline aura lieu uniquement dans les cas d'hyperglycémie, ce qui constitue le traitement le plus efficace pour la diabète (Berggren et al., 2004).

e- Autres interactions protéine-protéine

Par la technique du double hybride, une interaction a été mise en évidence entre le domaine amino-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et le domaine LC2 de la protéine associée aux microtubules (MAP1A microtubule-associated-protein 1A). L'interaction a été confirmée mais pas encore caractérisée (Vendel et al., 2006b).

La sous-unité $Ca_v\beta_4$ semble être indispensable pour les fonctions des lymphocytes T. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dans les lymphocytes induit la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT, après sa déphosphorylation par la

calcineurine une phosphatase dépendante du calcium. Cette translocation nucléaire par voie Ca^{2+}/NFAT est cruciale pour le bon fonctionnement des cellules T, surtout la production des cytokines. En absence de $Ca_v\beta_4$, cette voie est rompue et donc la production des cytokines est altérée (Badou et al., 2005; Badou et al., 2006).

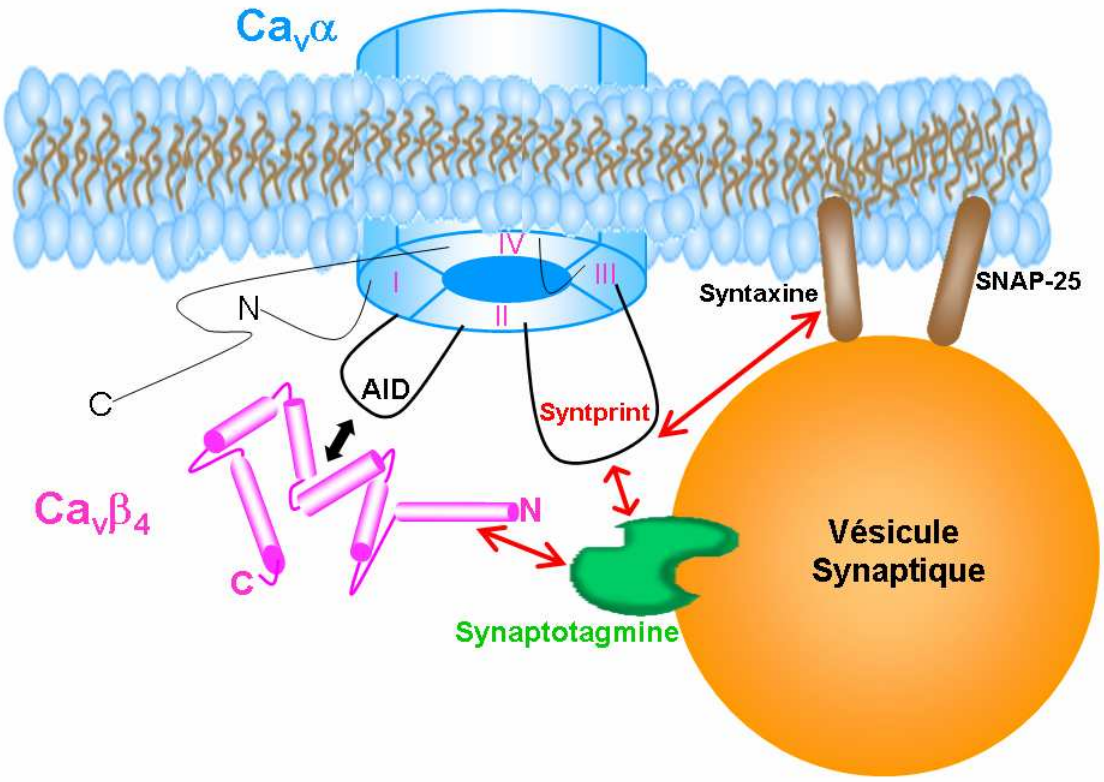


Figure 14: *L'interaction de la synaptotagmine avec le coté amino-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et le site « syntprint » sur la boucle II-III de la sous-unité $Ca_v\alpha$.*

6. Le domaine SH3-GK reconstitue une unité fonctionnelle

Une interaction intramoléculaire entre les domaines SH3 et GK a été identifiée dans la structure de PSD-95 (McGee and Bredt, 1999), une protéine de la famille MAGUK. Cette interaction est conservée dans toute la famille des MAGUK. Une interaction intermoléculaire est aussi détectée dans le cas où les domaines SH3 et GK de la protéine PSD-95 sont isolés. L'interaction intramoléculaire reste prédominante par

rapport à l'interaction intermoléculaire qui est masquée dans la protéine intacte ou de fusion. L'interaction intramoléculaire entre les domaines SH3 et GK est essentielle et joue un rôle physiologique dans les fonctions des MAGUKs (McGee and Bredt, 1999; McGee et al., 2001).

La structure de la sous-unité $Ca_v\beta$ repose surtout sur la présence des domaines SH3 et GK, qui s'avère indispensable à l'interaction avec AID. GK est responsable de cette interaction et SH3 soutient cette liaison (Opatowsky et al., 2003). Le motif SH3-GK est suffisant pour reconstituer les fonctions des $Ca_v\beta$ dans l'adressage membranaire de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ et dans l'augmentation de l'amplitude du courant, quand il est co-exprimé avec $Ca_v\alpha_1$ (Opatowsky et al., 2003).

La structure cristallographique de la sous-unité $Ca_v\beta$ révèle la présence des domaines SH3 et GK, ainsi que la similarité structurale avec les protéines MAGUKs. Comme pour les protéines MAGUKs, l'interaction intramoléculaire SH3-GK est indispensable pour le fonctionnement de la sous-unité $Ca_v\beta$. Des mutations dirigées dans le but de rompre l'interaction SH3-GK au sein de la $Ca_v\beta$ altèrent les cinétiques d'inactivation du canal et atteignent l'interaction $Ca_v\alpha_1/Ca_v\beta$. Deux mutations ponctuelles dans la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$, la première dans le domaine GK (P234R) et la deuxième dans le domaine SH3 (L93P), perturbent séparément l'interaction SH3-GK intramoléculaire (McGee et al., 2004; Takahashi et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus avec la délétion de sept acides aminés du domaine GK de la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$ (McGee et al., 2004). Ainsi, une sous-unité $Ca_v\beta$ fonctionnelle exige une interaction intermoléculaire SH3-GK.

Une interaction intermoléculaire entre SH3 et GK, suite à une coexpression de Nter-SH3 et GK-Cter de la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$, est capable de reconstituer une sous-unité $Ca_v\beta$ fonctionnelle. La sous-unité $Ca_v\beta$ reconstituée restitue l'amplitude du courant native, l'adressage membranaire du canal et l'effet hyperpolarisant sur la courbe d'activation (Takahashi et al., 2004). Les mutations qui perturbent l'interaction intramoléculaire, préviennent également l'interaction intermoléculaire SH3-GK, et donc la reconstitution de la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$. C'est le cas de la coexpression de Nter-SH3 avec GK*-Cter qui présente une délétion de cinq acides aminés (PYDVV) dans le

domaine GK (Takahashi et al., 2005). Par contre, la coexpression de Nter-SH3 avec GK-ΔC, dont le coté carboxy-terminal est délété de 83 acides aminés, est capable de reconstituer une sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$, sans reproduire complètement ses effets. Cela est du à la perturbation de l'orientation de l'interaction SH3/GK (Takahashi et al., 2005).

Finalement, les domaines SH3 et GK dont les domaines GK et SH3 respectifs portent des mutations qui rompent l'interaction intramoléculaire, sont capables d'interagir d'une façon intermoléculaire et de reconstituer les effets des sous-unités $Ca_v\beta$ (McGee et al., 2004). La figure 15 illustre les différentes formes de l'interaction SH3-GK.

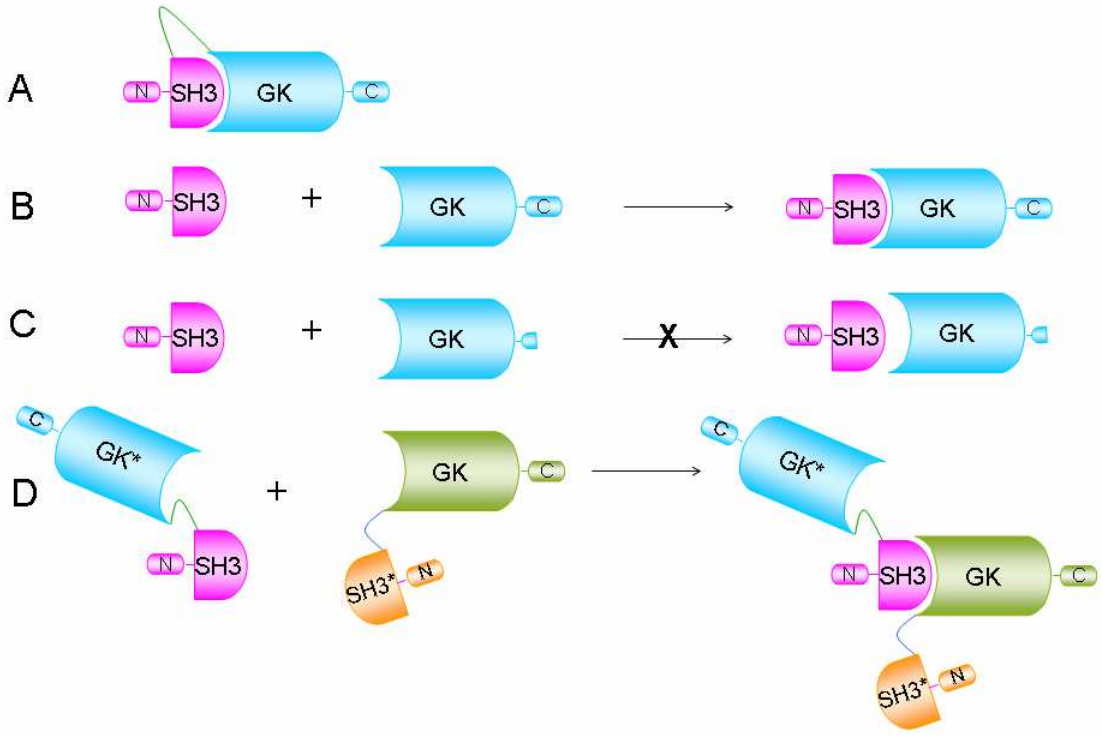


Figure 15: *L'interaction SH3/GK est un déterminant structural essentiel pour la modulation du canal.*
(A) L'interaction intramoléculaire SH3/GK est essentielle pour la modulation des propriétés de $Ca_v\alpha_1$ [(1,2,3)]. (B) La co-expression de N-SH3 et GK-C reconstitue une sous-unité $Ca_v\beta$ fonctionnelle. (C) Les mutations dans SH3 et GK et les délétions, qui préviennent l'interaction SH3/GK, touchent la biophysique du canal [(2,3)]. (D) Une interaction intermoléculaire pourrait avoir lieu entre les domaines SH3 et GK intacts [(3)].
[1] McGee et al. 2004, [2] Takahashi et al. 2004, [3] Takahachi et al. 2005.

7. Modèles d'études des sous-unités $Ca_v\beta$

Pour pouvoir mieux comprendre les diverses fonctions des sous-unités $Ca_v\beta$, et élucider leur implication dans les processus physiologiques dans différents tissus, plusieurs groupes ont procédé à inactiver les gènes codant pour chacune des sous-unités chez la souris (Tableau 5).

a- Souris déficientes en $Ca_v\beta_1$

La sous-unité $Ca_v\beta_1$ est exprimée dans une variété de tissus, mais surtout dans le muscle squelettique et cardiaque, et dans le cerveau. En inactivant le gène qui code pour la sous-unité $Ca_v\beta_1$, Gregg et *al* (Gregg et al., 1996) montrent que la souris déficiente en $Ca_v\beta_1$ exhibe une létalité périnatale par asphyxie. Les souris hétérozygotes pour ce gène sont asymptotiques et indistinctes des souris contrôles. Les embryons déficients en $Ca_v\beta_1$ présente une paralysie totale et une réduction éminente en masse musculaire avec une désorganisation de la structure musculaire. L'étude des myotubes néonatales déficientes en $Ca_v\beta_1$ révèle une réduction importante dans l'expression de la sous-unité $Ca_v\alpha1.1$ (α_{1S}) avec une diminution de 10 à 20 fois des courants de type L ce qui conduit par conséquence à l'absence du couplage excitation-contraction. Un phénotype squelettique normal peut être restauré suite à une transfection des myotubes déficientes en $Ca_v\beta_1$ par l'ADNc de la même sous-unité. Un modèle récent a été généré où la sous-unité est exprimée uniquement dans le muscle squelettique (Ball et al., 2002), ce qui permettra d'étudier l'absence de $Ca_v\beta_1$ dans le cerveau. Ce modèle a permis de révéler l'importance de la sous-unité $Ca_v\beta_1$ non seulement dans l'adressage et l'insertion de la sous-unité $Ca_v\alpha1.1$ dans la membrane, mais aussi un rôle vital dans l'assemblage du DHPR dans la jonction entre les tubules transverses et le réticulum sarcoplasmique.

b- Souris déficientes en $Ca_v\beta_2$

Les souris homozygotes déficientes du gène codant pour la sous-unité $Ca_v\beta_2$ exhibent une létalité embryonnaire due à l'absence de la contraction cardiaque (Ball et al., 2002). Les souris survivent en exprimant la sous-unité $Ca_v\beta_2$ uniquement dans le tissu cardiaque, mais ne restaurent pas un phénotype normal. Les souris qui

présentent une déficience de la sous-unité $Ca_v\beta_2$ dans le système nerveux central, sont moins sensibles à la lumière et exhibent un phénotype similaire à celui des patients exprimant une cécité nocturne stationnaire congénitale (CSNB2 congenital stationary night blindness), due à l'altération de l'adressage membranaire de la sous-unité $Ca_v\alpha1.4$ (α_{1F}). Une distribution anormale des canaux calciques dépendants du voltage dans la rétine semble être à la base de ce dysfonctionnement (Ball and Gregg, 2002; Ball et al., 2002). Ce modèle souligne non seulement l'importance de la sous-unité $Ca_v\beta_2$ dans la contraction cardiaque mais aussi son implication dans la transmission du signal des photorécepteurs jusqu'aux cellules bipolaires, via les synapses où elles sont normalement exprimées.

Tableau 5

Mutations dirigées ou spontanées au niveau des gènes des $Ca_v\beta$ chez la souris

Sous-unité	Mutations spontanées/ délétions dirigées	Phénotype
$Ca_v\beta_1$[1-2]	Souris transgénique, Délétion dirigée	Létalité périnatale, fœtus incapable de bouger, masse musculaire réduite avec des anomalies structurales, absence du couplage excitation-contraction, les souris transgéniques exprimant $Ca_v\beta_1$ dans leur muscle squelettique sont normales.
$Ca_v\beta_2$[2]	Souris transgénique, Délétion dirigée	Létalité embryonnaire, anomalies au niveau de la rétine chez la souris exprimant $Ca_v\beta_2$ dans le tissue cardiaque
$Ca_v\beta_3$[3]	Souris transgénique, Délétion dirigée	Apparence normale sans phénotype, pas de changement morphologique au niveau du cerveau, élévation de la pression artérielle lors d'un régime hypersalé.
$Ca_v\beta_4$[5]	Souris léthargique, Mutation spontanée	Ataxie, comportement léthargique, épilepsie myoclonique juvénile et idiopathique générale, masse corporelle réduite,déficience immunologique, fécondation réduite.

[1] Gregg et *al*. 1996; [2] Ball et *al*. 2002; [3] Namkung et *al*. 1998; [4] Burgess et *al*. 1997

c- Souris déficientes en $Ca_v\beta_3$

Au contraire, les souris déficientes en $Ca_v\beta_3$, sous-unité exprimée dans le cerveau, le cœur et l'aorte, sont viables et ne présentent aucune anomalie structurale ou comportementale (Namkung et al., 1998). Dans les neurones, l'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ affecte particulièrement les courants calciques de type N et L, qui sont d'une façon remarquable diminués mais pas totalement anéantis, de même qu'une altération des cinétiques du courant P/Q est enregistrée (Murakami et al., 2003). Apparemment, une substitution partielle de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ par les autres sous-unités présentes semble diminuer l'effet de sa déficience. Dans le système cardiovasculaire, les souris déficientes en $Ca_v\beta_3$ présente une augmentation de tension artérielle vis-à-vis des souris contrôles, suite à une diète riche en sel. Cela suggère un rôle de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ dans le maintien de la tension artérielle.

d- Souris déficientes en $Ca_v\beta_4$ (souris léthargique)

La souris léthargique (*lh/lh*) provient d'une insertion spontanée de quatre nucléotides du coté 5' du gène de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (*Cchb4*) induisant un décalage dans le cadre de lecture (Burgess et al., 1997). Cette mutation est à la base de l'absence d'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (McEnery et al., 1998). Ces mutants naturels déficients en $Ca_v\beta_4$ exhibent un phénotype neurologique complexe exprimant une ataxie chronique, une épilepsie absence et une hypoactivité. Un quatrième élément du phénotype a été récemment étudié et est constitué d'une dyskinésie paroxystique (Khan and Jinnah, 2002). La souris léthargique a été intensivement utilisée comme étant un modèle des épilepsies absences qui présente des brèves épisodes d'immobilité associées à des décharges de polypointes-ondes entre 2 et 4 Hz détectées par EEG. Le phénotype épileptique ressemble au profil comportemental, éléctroencéphalographique et pharmacologique des patients souffrant des épilepsies absences (Hosford et al., 1992).

Deux semaines après leur naissance, les souris homozygotes sont reconnues par une ataxie et un comportement léthargique caractérisé par une marche instable et une activité motrice lente, et quelques jours plus tard par des attaques motrices focales spontanées. La phase suivante consiste de brèves épisodes d'immobilité, accompagnée d'une décharge généralisée (Fletcher and Frankel, 1999). Parmi les anomalies des

enregistrements EEG, on peut dissocier notamment des attaques motrices considérées comme étant une dyskinésie paroxystique caractérisée par une contraction tonique des membres avec une prise de posture anormale soutenue du tronc (Khan and Jinnah, 2002).

Effectivement, aucune déficience structurale n'est observée chez la souris léthargique au niveau du cerveau, de la et des muscles (Burgess et al., 1997). Des efforts sont réalisés afin d'investiguer les mécanismes critiques qui régulent la décharge synchronisée au niveau du réseau neuronal thalamocortical qui génère l'incidence des absences. Les études montrent que l'activation des récepteurs $GABA_B$ est cruciale dans la génération des crises d'absences (Hosford et al., 1992; Hosford et al., 1995). En effet, l'expression des récepteurs $GABA_B$ est élevée dans la population neuronale thalamocorticale des souris léthargiques, en comparaison avec les souris non épileptiques, ce qui suggère l'implication de ces récepteurs dans le mécanisme pathophysiologique exprimant le phénotype neurologique des souris léthargiques. Mais d'une façon surprenante, l'effet inhibiteur gouverné par les récepteurs $GABA_B$ postsynaptiques (Caddick and Hosford, 1996), mais également présynaptiques (Caddick et al., 1999), ne sont pas altérées. Un autre mécanisme a été également étudié ; l'implication des récepteurs $GABA_A$ du noyau réticulaire thalamique dans les absences. En fait, l'activation des récepteurs $GABA_A$ dans le noyau réticulaire thalamique semble supprimer la génération des absences chez les souris léthargiques (Hosford et al., 1999). Au niveau des synapses, malgré l'absence d'une diminution de la transmission GABAergique, une diminution de la transmission glutamatergique via les récepteurs NMDA et non NMDA est reportée (Caddick et al., 1999). L'amplitude des courants excitateurs (ESPC), et non pas les courants inhibiteurs (ISPC) post-synaptiques, est réduite dans les neurones des souris léthargiques versus les souris contrôles non épileptiques.

Cette souris supporte une période critique entre 15 jours et 2 mois, où en plus de l'ataxie et l'épilepsie, elle présente une réduction éminente dans la masse corporelle en comparaison avec les souris contrôles, avec des déficiences immunologiques et une augmentation dans la mortalité. Après deux mois, les souris survivantes rattrapent leurs fonctions immunitaires et leur masse corporelle, mais exhibent toujours une fertilité réduite.

En fait, le manque d'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ semble être compensé par l'expression d'autres sous-unités. Le processus de substitution, provenant d'un pool préexistant d'ARNm de toutes les sous-unités, est caractéristique de la plasticité cérébrale au cours du développement et qui manque dans le cerveau mature (Burgess and Noebels, 1999). De toute façon, cette compensation est partielle fonctionnellement vu le phénotype pathophysiologique sévère du à la déficience en $Ca_v\beta_4$. Les autres sous-unités $Ca_v\beta$ ne parviennent pas à remplacer entièrement les fonctions vitales et critiques de la $Ca_v\beta_4$ dans le cerveau.

Deux études sur l'effet de l'altération de l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ sur les canaux calciques dépendants du voltage dans le cas de la souris léthargique ont été publiées (Lin et al., 1999; McEnery et al., 1998). Les deux études ont décrits une certaine plasticité dans l'expression des sous-unités $Ca_v\beta$ au niveau du système nerveux de la souris léthargique. L'étude de McEnery et al révèle une association entre l'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et une augmentation de l'expression globale des sous-unités $Ca_v\beta$, et en particulier, la sous-unité $Ca_v\beta_{1b}$. Une augmentation de l'expression des canaux calciques de type N est également reportée. Une incorporation des sous-unités $Ca_v\beta_{1b}$ dans les complexes $Ca_v2.2/Ca_v\beta$, exprimant les courants de type N, est la conséquence de l'augmentation de l'expression de cette sous-unité et l'absence de $Ca_v\beta_4$. En effet, les complexes calciques de type N assemblés chez la souris léthargique sont similaires à ceux exprimés dans le cerveau immature des rats. Ce qui suggère une expression inappropriée d'une population immature des canaux calciques de type N après le développement neuronal (McEnery et al., 1998).

L'étude de Lin et al décrit une augmentation de l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ dans le cerveau, associée à une diminution légère des courants calciques présynaptiques de type P/Q dans les neurones de Purkinje de la souris léthargique (Lin et al., 1999). En fait, les courants P/Q sont couplés sélectivement à la transmission glutamatergique au niveau des synapses, ce qui expliquerait la diminution de la transmission présynaptique glutamatergique, et non GABAergique chez la souris léthargique.

Malgré les études et les efforts réalisés pour comprendre le mécanisme produisant le phénotype neurologique complexe de la souris léthargique, très peu est connu sur l'implication des canaux calciques et de l'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. Probablement, la complexité du phénotype serait issue d'un processus pathologique multifactoriel provenant tout au long du développement neuronal de la souris léthargique.

8. Implication des $Ca_v\beta$ dans les pathologies humaines

Il est déjà assez clair qu'un déficit d'expression ou qu'une simple mutation du gène exprimant la sous-unité $Ca_v\beta$ peut conduire à un phénotype assez sévère dans les modèles de souris. Cela n'est pas surprenant, vu le rôle crucial des canaux calciques dans les processus physiologiques.

a- Neuropathologie

Plusieurs pathologies humaines issues d'une mutation ou d'un disfonctionnement d'une sous-unité auxiliaire des canaux calciques, ont été décrites. Entre autre, deux mutations humaines dans le gène codant pour la sous-unité $Ca_v\beta_4$ ont été enregistrées chez des patients souffrant d'une épilepsie idiopathique générale, d'une épilepsie juvénile myoclonique (JVM) et d'une ataxie convulsive (Escayg et al., 2000). La première mutation issue d'une terminaison prématurée (R482X) génère une protéine tronquée du coté carboxy-terminal, éliminant moins de 10% de sa séquence. La deuxième mutation est une simple substitution de nucléotide, résultant en la substitution d'une cystéine par une phénylalanine (C104F).

L'analyse fonctionnelle de ces mutants, dans un système d'expression hétérogène, ne révèle pas d'effets forts sur l'activité des canaux calciques. Les deux mutants sont capables de s'associer au canal ($Ca_v2.1$). Une faible augmentation de densité de courant est observée pour les deux mutants. Aucun effet n'est enregistré sur la cinétique d'activation. Le mutant R482X présente une faible diminution de la constante de temps rapide d'inactivation, mais pas le mutant C104F. Cet effet négligeable sur le canal soulève une interrogation : comment ces mutations peuvent-elles aboutir à un phénotype neurologique aussi marquant ?

b- Cardiomyopathologie

Une altération de l'activité des canaux calciques est décrite dans le cas d'insuffisance cardiaque humaine. Dans le cas d'une myopathie cardiaque associée à une insuffisance cardiaque, une diminution remarquable de 80% dans la quantité d'ARNm et de protéines des $Ca_v\beta$ est décrite. La sous-unité $Ca_v\beta_{1b}$ est détectée comme étant l'isoforme majeure dans le cas d'une myopathie cardiaque, d'autant plus que dans le tissu normal, la sous-unité majeure n'est que $Ca_v\beta_2$ (Hullin et al., 1999). De plus, les études montrent l'augmentation de l'expression d'une sous-unité $Ca_v\beta_3$ tronquée dans le ventricule gauche atteint d'une cardiomyopathie ischémique, en comparaison au tissu normal (Hullin et al., 2003). Vingt nucléotides manquent dans la sous-unité $Ca_v\beta_3$ tronquée au niveau du domaine d'interaction avec la sous-unité $Ca_v\alpha_1$. Apparemment, elle est capable de s'associer au canal et de moduler son activité mais d'une façon moins prononcée. Les conséquences pathophysiologiques dues aux changements d'expression des isoformes de la sous-unité $Ca_v\beta$, dans l'ischémie et l'insuffisance cardiaque, sont loin d'être élucidés.

Une étude très récente révèle également l'implication de la sous-unité $Ca_v\beta_2$ dans l'insuffisance cardiaque. En effet, l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_2$ ainsi que son ARNm est amplifiée avec l'augmentation de l'expression de la sous-unité $Ca_v1.2$, ce qui induit une hyperactivité des canaux calciques de type L au niveau des ventricules (Hullin et al., 2007).

c- Maladie autoimmune

Le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton (LEMS) est une pathologie humaine autoimmune associée dans 60% des cas à des carcinomes pulmonaires (small-cell lung carcinoma : SCLC) et caractérisée par des faiblesses musculaires et des neuropathies autonomes. Ataxie et dégénérescence cérébrale aiguë sont aussi reportées chez des patients atteints du syndrome de Lambert-Eaton. La faiblesse musculaire semble être la conséquence d'une diminution de la sécrétion des neurotransmetteurs. En fait, les sérums des patients génèrent des anticorps dirigés contre les composants des canaux calciques dépendants du voltage, au niveau des synapses et des jonctions neuromusculaires, induisant un disfonctionnement de la libération des

neurotransmetteurs. Au cours de la réponse immunitaire, les anticorps ont trois fonctions principales : se lier à l'antigène, ici il s'agit des canaux calciques, activer le système du complément et recruter des cellules immunocompétentes. Les anticorps protègent l'organisme en déclenchant la cascade du complément. Il s'agit d'un ensemble de protéines du plasma dont l'activation permet de détruire le pathogène et de faciliter la phagocytose, l'élimination des complexes immunes et la libération de molécules chimiotactiques. Mais aussi, ils protègent l'organisme par activation des cellules immunocompétentes. Après avoir reconnu un antigène grâce à sa partie variable, un anticorps peut se lier à des cellules du système immunitaire par sa partie constante. Ces interactions revêtent une grande importance dans le déroulement de la réponse immunitaire. Ainsi, les anticorps fixés sur un pathogène peuvent se lier aux macrophages et déclencher une phagocytose. Les lymphocytes NK (Natural Killer) peuvent exercer leur cytotoxicité et lyser les pathogènes qui portent l'antigène.

Des anticorps dirigés contre la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ du canal de type P/Q, induisent une diminution de la libération des acétylcholine suite un influx nerveux (Takamori et al., 2000). Dans certains cas, les anticorps détectés dans le sérum sont dirigés contre la sous-unité $Ca_v\beta$, ce qui prévient son interaction avec la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ (Raymond et al., 1999). Une activité aberrante des canaux calciques, issue de la dissociation de la sous-unité $Ca_v\beta$ du canal, altère les fonctions présynaptiques essentielles contrôlant la libération des neurotransmetteurs. Les anticorps, incapables de franchir la barrière hémato-méningite, n'atteignent pas le cerveau, d'où l'absence de symptômes pathologiques au niveau du système nerveux central.

d- Ataxie épisodique de type-2 (EA-2)

L'ataxie épisodique de type 2 est une ataxie cérébelleuse caractérisée par des épisodes aigus d'ataxie, de vertige et de nausée qui durent de quelques minutes à plusieurs jours. Des troubles de l'élocution, une diplopie, une dysarthrie, une dystonie, ou une hémiplégie accompagnent ces crises. Les patients atteints présentent une atrophie de cervelet et la moitié présente des migraines. Ces épisodes peuvent survenir de deux fois par an à quatre fois par semaine. Les crises peuvent être déclenchées par le stress, la caféine, l'alcool et la prise de phénytoine. Entre chaque crise, les individus sont

généralement asymptomatiques même si un nystagmus (mouvement anormal des yeux) ou une discrète ataxie peuvent subsister. La prévalence de cette affection est inconnue.

De transmission autosomique dominante, l'ataxie paroxystique est due à des mutations du gène *CACNA1A* (chromosome 19p13) codant pour la sous-unité $Ca_v2.1$ et impliquant les canaux P/Q. Ces mutations codent pour des sous-unités tronquées (Ophoff et al., 1996; Yue et al., 1998) et également pour des sous-unités avec des mutations ponctuelles (Denier et al., 2001; Imbrici et al., 2005; Tonelli et al., 2006; van den Maagdenberg et al., 2002).

Les études fonctionnelles réalisées sur les mutants impliqués dans l'ataxie de type 2 (EA-2) confirment l'expression d'une sous-unité non ou hypo-condructrice (Scoggan et al., 2006; Wan et al., 2005). Les mécanismes moléculaires par lesquels les sous-unités $Ca_v2.1$ mutantes engendrent cette pathologie restent un débat. Des études suggèrent que les sous-unités défectueuses créent une insuffisance éminente de courants P/Q (Imbrici et al., 2004) dans le cerveau. Plusieurs résultats présentent l'évidence que les sous-unités $Ca_v2.1$ non conductrices suppriment la contribution fonctionnelle des canaux $Ca_v2.1$ natifs par un mécanisme dominant-négatif (Arikkath and Campbell, 2003; Jeng et al., 2006). Cet effet dominant-négatif implique l'interaction de la sous-unité $Ca_v\beta$ avec le domaine AID des sous-unités $Ca_v2.1$. Effectivement, l'interaction des sous-unités mutantes avec les sous-unités $Ca_v\beta$ est à la base du disfonctionnement des sous-unités $Ca_v2.1$ natives (Raike et al., 2007). Les mutants $Ca_v2.1$ de l'ataxie type-2 possèdent le potentiel de séquestrer une quantité importante des sous-unités $Ca_v\beta$, réduisant ainsi l'effet fonctionnel des canaux calciques composés des sous-unités $Ca_v2.1$ dans les neurones.

e- <u>Ataxie spino-cérébelleuse de type 6 (SCA6)</u>

L'ataxie cérébelleuse de type 6 (SCA6) est une maladie autosomale dominante caractérisée par une ataxie, un nystagmus et une dysarthrie. Il s'agit d'une affection dégénérative qui se caractérise par une dégénérescence des cellules de Purkinje et granulaires du cervelet et de certaines cellules du noyau du l'olive inférieure. Les cellules se modifient, perdent leurs caractères spécifiques, pour se transformer en une substance

inerte. Ainsi, leur activité fonctionnelle n'existe plus. La maladie progresse lentement et inexorablement vers des troubles handicapants se caractérisant par une infirmité.

La mutation impliquée dans l'ataxie de type 6 consiste d'une expansion du codon CAG répétés 21 à 33 fois (normalement 4 à 16 répétitions) dans l'exon 47 du gène CACNA1A, codant pour la sous-unité $Ca_v2.1$. Cette expansion introduit une séquence polyglutaminergique (polyQ) à environ 100 résidus de l'extrémité carboxy-terminale du canal. Cette expansion polyQ confère une instabilité à la protéine mutante qui a pour conséquence la formation des agrégats cytosoliques de ces protéines, entraînant la mort cellulaire.

Au niveau fonctionnel, l'impact de cette expansion polyQ sur les canaux P/Q a été étudié. En fait, les effets biophysiques de cette mutation dépendent de l'isoforme de la $Ca_v\beta$ co-exprimée. En présence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, l'expansion polyglutaminergique déplace la dépendance au potentiel de l'activation vers des valeurs de potentiels plus hyperpolarisés et augmente la proportion de courant non inactivant. En conséquent, une grande quantité du ca^{2+} entre dans la cellule, ce qui explique les dégénérescences cellulaires associées. En ce qui concerne l'implication de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, parmi les sous-unités $Ca_v\beta$, elle présente une interaction unique avec l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité $Ca_v2.1$. L'expansion polyQ du coté carboxy-terminal altère la biophysique du canal probablement en interférant avec son interaction avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (Restituito et al., 2000b).

9. Développements thérapeutiques et pharmacologiques

a- <u>Implication dans le traitement de l'hypertension</u>

Des études récentes associent le rythme artériel anormal dans le cas d'une hypertension à une augmentation d'expression des canaux calciques dépendants du voltage de type L au niveau vasculaire. Actuellement, les médicaments visés pour traiter l'hypertension sont surtout constitués de bloqueurs organiques des canaux calciques (dihydropyridines, phenylalkylamines et benzothiazipines) (Dustan, 1996; Sonkusare et al., 2006). En raison des effets secondaires et des interactions indésirables, le développement de nouvelles thérapies contre l'hypertension doit être ciblée contre les sous-unités régulatrices des canaux calciques comme la sous-unité $Ca_v\beta$ (Dustan, 1996;

Waeber, 2002). Dans ce cas, l'altération de l'activité des sous-unités $Ca_v\beta$ aura un effet inhibiteur sur les canaux calciques sans bloquer complètement les courants. De même, des thérapies nouvelles ciblées contre l'assemblage $Ca_v\alpha_1$-β auraient comme effet de retenir le canal dans le réticulum endoplasmique et de prévenir sa translocation vers la membrane plasmique (Sonkusare et al., 2006).

b- Implication dans le traitement du diabète

Une étude récente sur les souris déficientes en $Ca_v\beta_3$ montre que l'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ stimule la synthèse de l'IP_3 dans les cellules pancréatiques β, induisant des oscillations calciques intracellulaires (Berggren et al., 2004). Ces oscillations sont responsables de l'homéostasie glycémique suite à la sécrétion d'insuline. Cela suggère qu'une nouvelle forme de thérapie dans le traitement du diabète de type II peut être développée. En bloquant les sous-unités $Ca_v\beta_3$ dans les cellules pancréatiques β, l'insuline pourrait être secrétée uniquement à forte concentration en glucose. Cette thérapie pourrait remplacer les traitements existants, qui agissent aussi bien en forte concentration en glucose qu'en faible concentration, ce qui peut induire dans le deuxième cas des attaques hypoglycémiques.

c- Implication dans le traitement de la schistosomiase

La schistosomiase est une maladie causée par le schistosome, un ver tropical parasite. Le praziquantel (PZQ) est le traitement potentiel contre les schistosomiases ; c'est un médicament qui présente des effets secondaires minimes et est actif sur toutes les espèces des schistosomes. Le mode d'action du PZQ n'est pas clair, mais il semble évident que cette molécule affecte l'homéostasie calcique via les canaux calciques dépendants du voltage. Des études suggèrent que la cible du PZQ est l'interaction $Ca_v\alpha_1$-$Ca_v\beta$ dans les schistosomes (Kohn et al., 2001). En fait, les sous-unités $Ca_v\beta$ schistosomes inhibent le courant du $Ca_v2.3$ mammifère ; cette inhibition est reversée par le PZQ. Ce mécanisme d'action du PZQ semble être celui à la base des effets thérapeutiques bénéfiques.

d- D'autres implications pharmacologiques

Etant donné que les agonistes DHP induisent une augmentation du courant L des sous-unités $Ca_v1.2$ exprimées seules, la sous-unité $Ca_v\beta$ influence à son tour les sites de fixation des ligands des canaux calciques. En général, $Ca_v\beta$ augmente le nombre des sites d'interaction avec les DHPs, tout en augmentant leur affinité (Welling et al., 1995). Plusieurs médicaments, comme le mibéfradil et le vérapamil, interagissent préférentiellement avec les canaux calciques inactifs, et donc leur habilité à inhiber le courant est ainsi affectée par les sous-unités $Ca_v\beta$ et leurs influences sur les cinétiques d'inactivation (Lacinova, 2005). De plus, une étude montre que la co-expression de la sous-unité $Ca_v\beta$ avec le canal $Ca_v1.1$ réduit la réponse agoniste du BayK8644 (Varadi et al., 1991).

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Malgré les efforts effectués pour comprendre les déterminants du phénotype épileptique des patients qui portent les mutations sur $Ca_v\beta_4$, les effets moléculaires de ces mutations demeurent inconnus.

Deux mutations humaines ont été enregistrées dans le gène CACNB4 codant pour $Ca_v\beta_4$, chez des patients atteints d'une épilepsie idiopathique générale, d'une épilepsie juvénile myoclonique (JVM) et d'une ataxie convulsive. La première mutation, issue d'une terminaison prématurée (R482X) génère une protéine tronquée de 38 acides aminés du coté carboxy-terminal. La deuxième est une mutation ponctuelle, résultant en la substitution d'une cystéine par une phénylalanine (C104F). En système d'expression hétérologue, les mutants n'ont pas un effet remarquable sur la régulation biophysique et l'adressage moléculaire du canal, par rapport à la sous-unité $Ca_v\beta_4$ sauvage (Escayg et al., 2000) ; en co-expression avec la sous-unité $Ca_v2.1$, les mutants de $Ca_v\beta_4$ sont toujours capables d'interagir avec le canal et d'assurer sa modulation. De plus, des interactions secondaires ont été identifiées entre l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et les extrémités carboxy et amino-terminales de la sous-unité $Ca_v2.1$ (Walker et al., 1998; Walker et al., 1999), et dans le cas du mutant R482X, une perte éventuelle de ces interactions pourrait également influencer la régulation biophysique du canal. Ainsi, ce phénotype neurologique n'est pas du à une altération de l'activité du canal mais probablement à d'autres fonctions propres à la sous-unité $Ca_v\beta_4$.

Durant les deux dernières décennies, la sous-unité $Ca_v\beta$ était considérée comme étant uniquement le partenaire de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ et son modulateur biophysique majeur qui gouverne la densité et les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant calcique. Aujourd'hui, d'autres fonctions ont été révélées et attribuées spécifiquement à la sous-unité $Ca_v\beta$.

La première étape, après la caractérisation de l'effet biophysique des $Ca_v\beta$ sur le canal (Birnbaumer et al., 1998; De Waard et al., 1994; De Waard et al., 1996), ainsi que l'adressage membranaire de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ par $Ca_v\beta$ (Bichet et al., 2000), était

l'identification de nouveaux partenaires spécifiques à la sous-unité $Ca_v\beta$: les membres de la famille RGK (Rem-Gem-Kir), des protéines G (GTPases) de petites masses moléculaires. Ces protéines interagissent directement avec la sous-unité $Ca_v\beta$ afin de moduler l'expression des canaux à la surface membranaire, en séquestrant les $Ca_v\beta$ dans le cytoplasme, et même dans le noyau (Beguin et al., 2006; Beguin et al., 2001; Chen et al., 2005; Finlin et al., 2006).

La résolution tridimensionnelle de la sous-unité $Ca_v\beta$ a exposé substantiellement l'interaction du domaine AID de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ avec l'ABP (AID binding pocket), un creux hydrophobe présent dans le domaine GK (guanylate kinase). La structure cristallographique révèle que cette interaction nécessite peu d'éléments structuraux de la sous-unité $Ca_v\beta$ permettant ainsi de conserver une large place à d'autres interactions moléculaires (Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegem et al., 2004). Cette structure révèle également le point de ressemblance structurale entre les sous-unités $Ca_v\beta$ et les protéines de la famille MAGUK (membrane-associated guanylate kinase), suggérant un rôle similaire pour la sous-unité $Ca_v\beta$ dans l'échafaudage protéique au niveau membranaire.

La première démonstration d'une fonction propre à $Ca_v\beta$, donc indépendante de la régulation du canal, est l'étude réalisée sur un variant de $Ca_v\beta_4$ exprimé dans la cochlée du poulet (Hibino et al., 2003). Ce variant, tronqué dans son domaine GK, est capable d'interagir avec une protéine nucléaire (HP1 heterochromatin protein), de se transloquer dans le noyau et par la suite de réguler le niveau de transcription génique. Une autre étude suggère également un rôle de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ indépendant de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$. Dans les cellules β pancréatiques, $Ca_v\beta_3$ inhibe la sécrétion d'insuline à des fortes concentrations de glucose. Ce mécanisme est loin d'être complètement élucidé (Berggren et al., 2004).

Ces études soulèvent une interrogation sur la divergence des fonctions des sous-unités auxiliaires des canaux calciques dépendants du voltage en général, et des sous-unités $Ca_v\beta$ en particulier, ainsi que sur la disponibilité de ces sous-unités qui sont, *à priori*, engagées dans la formation et la régulation des complexes calciques. Effectivement, des études ont déjà décrits la dissociation physiologique de la sous-unité

$Ca_v\beta$ des canaux, après l'adressage membranaire des sous-unités $Ca_v\alpha_1$ (Restituito et al., 2001; Sandoz et al., 2004). L'interaction $Ca_v\alpha_1$/ $Ca_v\beta$ semble réversible, un processus possible une fois le canal à la membrane (Hidalgo et al., 2006). Par conséquent, les sous-unités $Ca_v\beta$ seraient également disponibles librement dans le cytoplasme ou le noyau.

Toutes ces démonstrations indiquent que les sous-unités $Ca_v\beta$ ont une activité à temps partiel dans la régulation des canaux calciques, qui peut être complétée par des fonctions différentes. Cela nous a incité à penser que le phénotype neurologique sévère des patients, portant la mutation sur la sous-unité $Ca_v\beta_4$, est du à une fonction neuronale critique, probablement indépendante de la régulation du canal calcique. Cette fonction est clairement confirmée par un modèle de souris, où l'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ induit également un phénotype neurologique.

La souris léthargique est un modèle naturel déficient en sous-unité $Ca_v\beta_4$. L'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ provient d'une insertion spontanée de 4 nucléotides engendrant un décalage du cadre de lecture de la protéine. Cette souris souffre d'une ataxie et d'une épilepsie. On ignore pour l'instant comment l'absence de cette sous-unité peut aboutir à un tel phénotype assez marqué (Burgess et al., 1997). En fait, le manque d'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ semble être compensé partiellement par l'expression des autres isoformes. Il est évident que cette compensation ne parvient pas à substituer les fonctions critiques de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans le cerveau (Burgess et al., 1999).

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse était la recherche d'une nouvelle fonction de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans les neurones, qui pourrait être impliquée dans l'épilepsie. Des analyses de localisation de la $Ca_v\beta_4$ dans les neurones d'hippocampe durant la différenciation ont été faites, ainsi qu'une étude sur les déterminants structuraux influençant cette localisation. Je me suis contentée d'étudier également la mutation humaine (R482X), en réalisant une analyse comparative avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native, dans le but d'identifier les déterminants moléculaires et les fonctions neuronales déficientes responsables du phénotype neurologique exprimé chez les patients.

Diverses techniques ont été déployées dans cette étude ; la biologie moléculaire, les cultures des neurones primaires, l'immunocytochimie, l'immunohistochimie, la microscopie confocale, la biochimie, la transcriptomique ainsi que l'électrophysiologie.

Figure 16

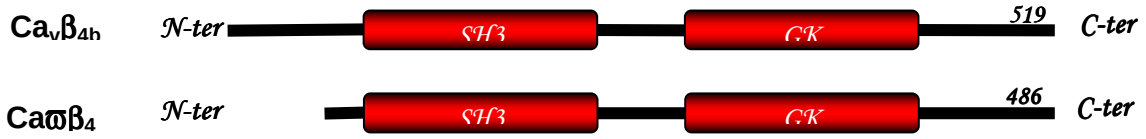


Figure 16 : *Les variants d'épissage de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. Deux variants ont été identifiés pour $Ca_v\beta_4$ dont l'épissage concerne surtout l'extrémité amino-terminale.*

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

La sous-unité $Ca_v\beta_4$ est fortement exprimée dans l'hippocampe de souris contrôle, tandis qu'elle est absente chez la souris léthargique.

L'épilepsie est une pathologie qui survient suite à une décharge électrique caractérisée par une hyperexcitabilité neuronale et une hypersynchronie générant ainsi des trains de potentiels. Les crises épileptiques généralisées impliquent un vaste réseau cortical ou cortico-sous-cortical. Par contre, les crises partielles prennent naissance au niveau d'un point de départ focal, dans une région cérébrale, avec une probabilité de diffusion vers des structures distantes par le biais de circuits de propagation.

L'hippocampe est une structure du système limbique particulièrement impliquée dans les épilepsies du lobe temporal. Les études réalisées sur des hippocampes épileptiques chez l'homme et dans des modèles animaux, montrent des modifications des mécanismes physiologiques comme par exemple les modifications de la transmission synaptique. On note également la mort des cellules nerveuses de la région CA3 de l'hippocampe, et en particulier, des cellules pyramidales (Ben-Ari, 1985). Une réorganisation des réseaux survivants est notamment décrite. Il s'agit du bourgeonnement des fibres moussues de l'hippocampe (Tauck and Nadler, 1985) (Represa et al., 1990). Les fibres moussues (axone des cellules granulaires de l'hippocampe) qui normalement innervent les cellules pyramidales de CA3, établissent des contacts synaptiques aberrants avec les cellules de la même couche, les cellules granulaires. Ce bourgeonnement et cette néosynaptogénèse sont responsables de la création de circuits excitateurs récurrents (Tauck and Nadler, 1985; Uruno et al., 1995) et pourraient contribuer au maintien de l'activité épileptiforme.

Des mutations sur le gène CACNB4 qui code pour la sous-unité $Ca_v\beta_4$ des canaux calciques dépendants du voltage ont été identifiée chez des patients qui souffrent d'une épilepsie myoclonique juvénile (JME) ou une épilepsie idiopathique généralisée (IGE) (Escayg et al., 2000). Des nombreuses études, utilisant l'IRM et les techniques de volumétrie et de morphométrie, ont reporté une anormalité structurale complexe au niveau de diverses régions cérébrales et particulièrement au niveau de l'hippocampe, du

corps callé et du lobe frontal (Tae et al., 2006; Woermann et al., 1998). Effectivement, une atrophie de l'hippocampe gauche, en comparaison avec celui du coté droite est confirmée (Tae et al., 2006).

La souris léthargique (*lh/lh*) est un modèle d'épilepsie généralisée non convulsive. Cette souris présente des absences motrices spontanées suivies par des épisodes de brèves secousses. Ce phénotype épileptique provient d'une mutation au niveau du gène CACNB4 codant pour la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (Burgess et al., 1997). Une insertion spontanée de quatre nucléotides induit un décalage dans le cadre de lecture de la protéine, ce qui explique la perte de plus de 60% du coté carboxy-terminal de la protéine (Burgess et al., 1997), mais aussi l'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ chez la souris léthargique (McEnery et al., 1998a). Probablement, le produit de la traduction est rapidement dégradé.

Aucune pathologie structurale au niveau du cerveau n'a été décrite chez la souris léthargique, et pour le moment, on ignore comment l'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ induit un tel phénotype épileptique, surtout qu'une substitution par les autres sous-unités ne compense pas totalement la déficience en $Ca_v\beta_4$. En fait, une diminution de la quantité globale des sous-unités $Ca_v\beta$ est reportée chez la souris léthargique versus la souris contrôle, tandis qu'une augmentation d'expression et d'incorporation des sous-unités $Ca_v\beta_{1b}$ (pas $Ca_v\beta_2$ ou $Ca_v\beta_3$) est démontrée dans les complexes calciques de type N (McEnery et al., 1998a). Puisque le niveau des ARNm des sous-unités $Ca_v\beta$ (sauf $Ca_v\beta_4$) est inchangée, l'augmentation de l'expression de $Ca_v\beta_{1b}$ reflète un mécanisme post-traductionnel (Lin et al., 1999).

Cette ambiguïté sur les déterminants de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ impliqués dans les neuropathologies m'a incitée à aller chercher, dans les structures les plus touchées par l'épilepsie comme l'hippocampe, de nouvelles fonctions associées à $Ca_v\beta_4$.

Une immunohistochimie des sous-unités $Ca_v\beta_4$ sur des coupes coronales, 20 µm d'épaisseur, de cerveau de souris normales et souris léthargiques a été réalisée (Figure 17.A). Les images, acquises par microscopie confocale, montrent l'absence du marquage de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ au niveau des coupes de cerveau issues de la souris léthargique. Cette observation correspond aux études déjà réalisées (McEnery et al., 1998a), et confirment la spécificité de l'anticorps dirigé contre les 16 derniers acides aminés du coté

carboxy-terminal de la sous unité $Ca_v\beta_4$. De même, elle montre la forte expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ au niveau de l'hippocampe.

Au niveau biochimique, un homogénat protéique a été préparé à partir des cerveaux totaux des souris léthargiques et des souris contrôles. Un Western blot, utilisant le même anticorps dirigé contre la sous-unité $Ca_v\beta_4$, confirme les résultats de l'immunohistochimie (Figure 17.B). En fait, une bande relative aux protéines extraites des cerveaux des souris contrôles, est détectée vers 60 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. Par contre, l'anticorps ne détecte rien au niveau des protéines extraites à partir des cerveaux léthargiques. L'anticorps anti-actine constitue un control intrinsèque aux échantillons.

Une fois la spécificité de l'anticorps confirmée, j'ai regardé au niveau des neurones primaires la localisation de la sous-unité $Ca_v\beta_4$.

Figure 17-A

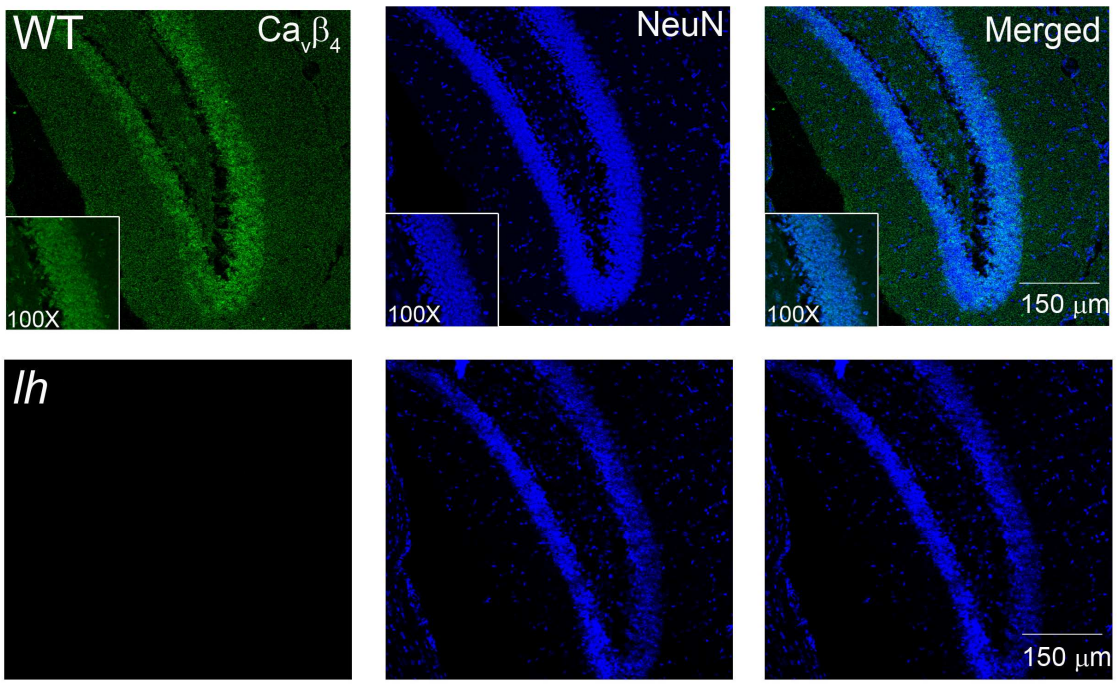


Figure 17-B

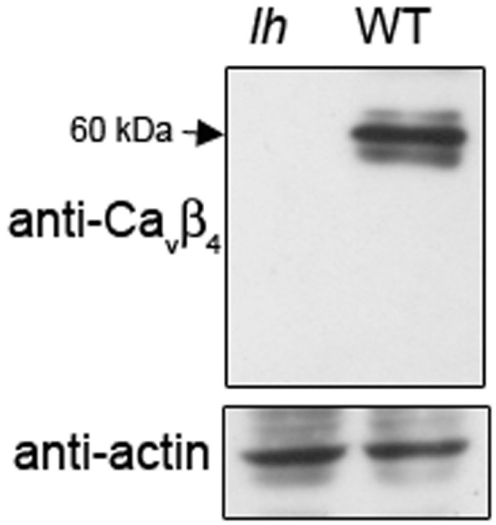


Figure 17 : *La sous-unité $Ca_v\beta_4$ est abondamment exprimée dans l'hippocampe de la souris contrôle et absente chez la souris léthargique.*
(A) Les images confocales d'une analyse immunohistochimique, sur des coupes coronales de cerveau de souris adultes, montrent la distribution de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans l'hippocampe de la souris normale et l'absence de l'expression de $Ca_v\beta_4$ dans celui de la souris léthargique.

La sous-unité $Ca_v\beta_4$, en vert, a été détectée par un anticorps primaire anti-$Ca_v\beta_4$ et un anticorps secondaire couplé à l'A488 (1ère colonne). Les neurones, en bleu, sont détectés par un marqueur nucléaire spécifique des neurones (NeuN), et un anticorps secondaire couplé à l'A596 (2ème colonne). Les images ont été superposées dans le logiciel Photoshop Professionnel (3ème colonne). Les images insérées sont au niveau de la région CA1 de l'hippocampe, au 100ème grossissement.
(B) Un Western blot des lysats protéiques de cerveaux de souris adultes léthargiques et contrôles montre la présence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (60 kDa) au niveau des cerveaux normaux mais pas léthargiques. L'actine constitue un contrôle interne.

La sous-unité $Ca_v\beta_4$ est exprimée différentiellement durant le développement des neurones primaires avec une translocation nucléaire synchronisée avec la différenciation neuronale chez la souris.

Plusieurs études ont décrits l'expression et la distribution des sous-unités $Ca_v\beta$ dans le cerveau et particulièrement dans l'hippocampe (Day et al., 1998). Une distribution différentielle des sous-unités $Ca_v\beta$ a été observée dans l'hippocampe des patients atteints d'une épilepsie du lobe temporal ; dans ce cas, les sous-unités $Ca_v\beta_1$ et $Ca_v\beta_2$ sont transloquées du corps cellulaire vers les dendrites (Lie et al., 1999).

Sachant que toutes les sous-unités $Ca_v\beta$ sont exprimées dans le cerveau, la concentration totale des sous-unités $Ca_v\beta$ dans le cerveau adulte est fortement plus élevée que la population des $Ca_v\beta$ dans le cerveau embryonnaire chez le rat (McEnery et al., 1998b).

L'immunomarquage des sous-unités $Ca_v\beta_4$ exprimées d'une façon endogène dans les neurones primaires d'hippocampe de souris à E18 en culture, révèle une expression différentielle durant la différentiation neuronale (Figure 18.A). L'immunocytochimie est réalisée en utilisant l'anticorps anti-$Ca_v\beta_4$ utilisé dans l'immunohistochimie précédente. Durant les 3 premiers jours de culture des neurones d'hippocampe, aucun marquage de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ n'est observé. A partir du $5^{ème}$ jour, un marquage cytoplasmique apparaît avec la différenciation neuronale et l'apparition des neurites. Au $9^{ème}$ jour, les sous-unités $Ca_v\beta_4$ sont également exprimées dans le noyau, indiquant une translocation des sous-unités $Ca_v\beta_4$ du cytoplasme vers le noyau. Cette translocation nucléaire assure une augmentation prépondérante de la concentration des sous-unités $Ca_v\beta_4$ dans le noyau, par rapport au cytoplasme et aux neurites au $18^{ème}$ jour.

Effectivement, l'absence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ durant les 3 premiers jours de culture, est complètement compatible avec une étude déjà réalisée sur la distribution de l'ARNm des différentes sous-unités $Ca_v\beta$ dans le cerveau de souris embryonnaire. Cette étude montre une très faible expression d'ARNm de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans le cerveau de souris de E13-E18 jusqu'à P0 (Tanaka et al., 1995). L'augmentation de l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ avec le développement est également reportée (McEnery et al., 1998b); la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est dix fois plus exprimée dans le cerveau adulte durant le développement post-natal chez le rat.

Les images acquises par microscopie confocale, pour l'étude immunocytologique, ont été quantifiées par le logiciel Leica. La représentation du pourcentage nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, par rapport à l'expression globale (cytoplasme et noyau), en fonction des jours de la culture *in vitro*, donne une courbe sigmoïde (Figure 18.B). Au $5^{ème}$ jour de la culture, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est exprimée à $20.9 \pm 5.3\%$ dans le noyau, tandis qu'au $18^{ème}$ jour, la concentration nucléaire monte à $81.1 \pm 5.4\%$, par rapport à la quantité

globale de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. L'ajustement des données indique que les neurones adultes disposent $79.4 \pm 4.8\%$ de leur sous-unités $Ca_v\beta_4$ dans le noyau.

L'histogramme du rapport nucléaire/cytoplasmique à différents jours de culture présente la variabilité de la distribution nucléaire de $Ca_v\beta_4$ entre les neurones en culture (Figure 18.C). Entre le 3ème et le 11ème jour, les neurones ne présentent pas une variabilité significative dans l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. La plus grande variabilité est observée au 18ème jour de culture avec des proportions allant de 2 (66% dans le noyau) jusqu'à 6 (83% dans le noyau). Des études biochimiques sont en cours afin de quantifier l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans les neurones d'hippocampe au cours de la différentiation.

Un double marquage avec un anti-$Ca_v\beta_4$ et un anti-tubuline III, un marqueur neuronal, montre que l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est uniquement neuronale (Figure 18.D).

La présence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans le noyau des neurones d'hippocampe, et sa translocation du cytoplasme vers le noyau, durant la différenciation neuronale, indique que cette protéine pourrait avoir des fonctions nucléaires inconnues impliquées dans le phénotype neurologique exprimé par les patients portant les mutations sur leur gène CACNB4, ainsi que chez la souris léthargique.

Le fait que la sous-unité $Ca_v\beta_4$, une protéine normalement cytoplasmique, modulatrice biophysique des canaux calciques et responsable de leur adressage membranaire, soit dans le noyau, n'est pas insolite. Un variant de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ identifié chez le poulet est susceptible d'interagir avec une protéine nucléaire, une protéine d'hétérochromatine (HP1γ), et est impliquée dans la répression transcriptionnelle des gènes (Hibino et al., 2003). Une autre étude réalisée dans un système d'expression hétérologue, décrit un mécanisme par lequel les protéines de la famille RGK (petites protéines G) interagissent avec la sous-unité $Ca_v\beta_3$ afin de prévenir l'interaction de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ avec la sous-unité $Ca_v\alpha_1$, et donc inhibent l'expression et l'activité des canaux calciques à la membrane plasmique. Cette interaction pourrait localiser et séquestrer les sous-unités $Ca_v\beta$ dans le noyau (Beguin et al., 2006).

Figure 18-A

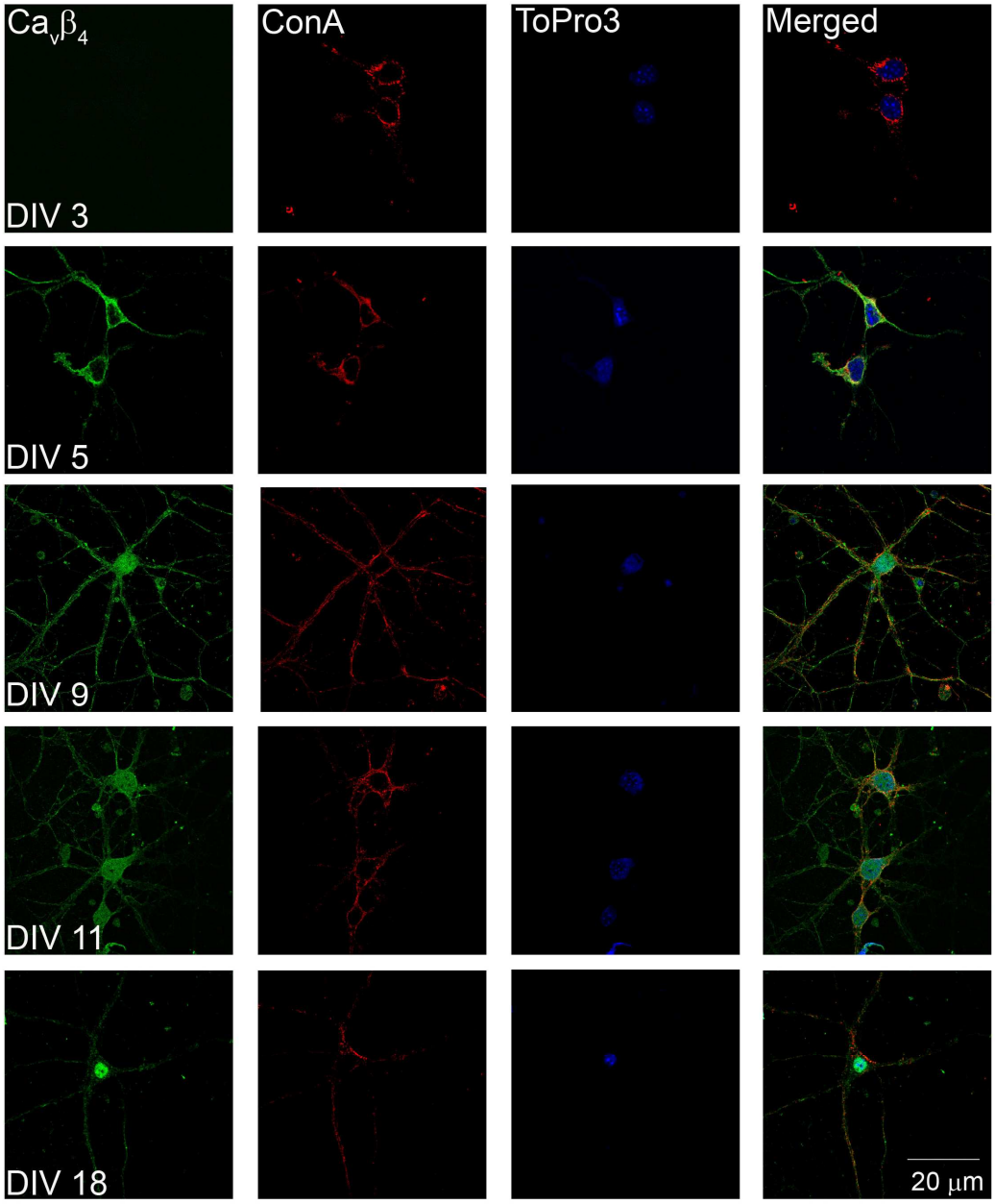
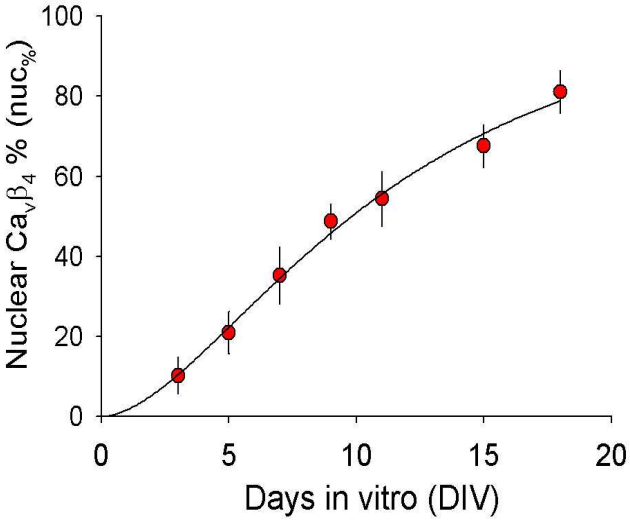


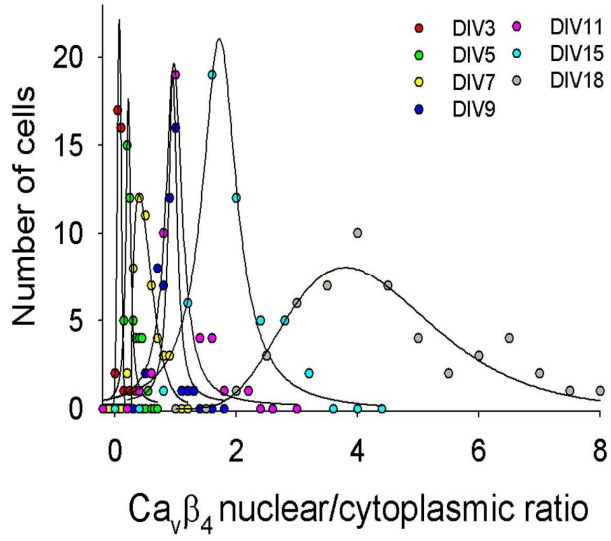
Figure 18 : *La sous-unité $Ca_v\beta_4$ est transloquée dans le noyau durant la différentiation neuronale.*
(A) Les images confocales présentent des neurones d'hippocampe, d'embryon E18 de souris, en culture primaire à DIV (jours in vitro) 3, 5, 9, 11 et 18. La couleur verte correspond au marquage immunocytochimie de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. Le rouge représente le marquage de la membrane par la concanavaline A (ConA) conjuguée à la rhodamine. Le bleu correspond au ToPro3, marqueur nucléaire. La superposition des images au 4ème colonne est réalisée par Photoshop Professionnel.

Figure 18-B



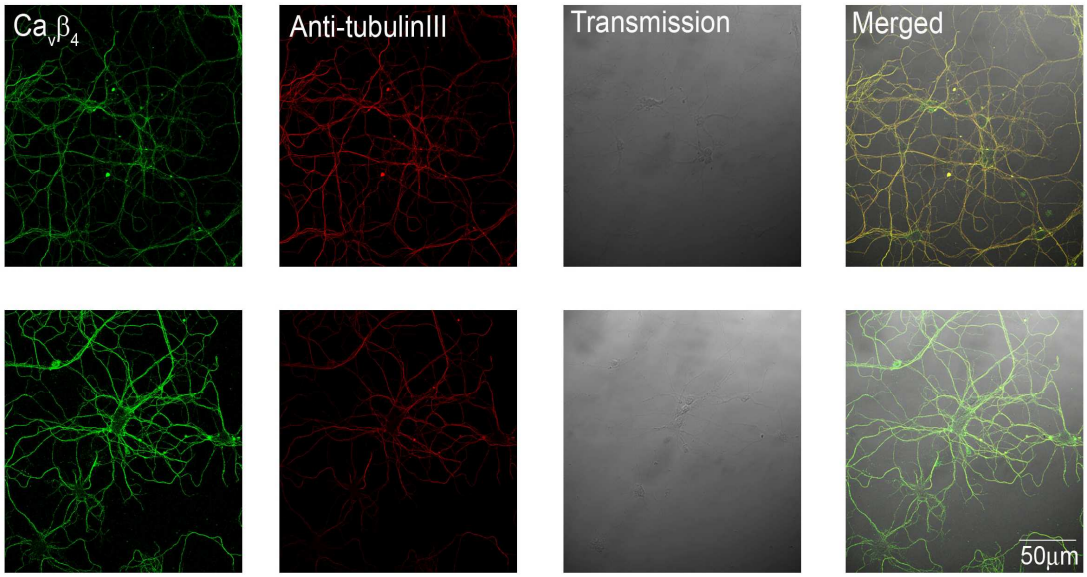
(B) La courbe représente le pourcentage de la quantité de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène totale dans le noyau des neurones d'hippocampe ($nuc_{\%}$) en fonction des jours de culture. Chaque point constitue la moyenne de cinquante cellules et pour chaque cellule quarante valeurs de ROI ont été mesurées. La courbe représente l'équation sigmoïde de type $nuc_{\%} = nuc_{max} / (1 + exp(-(DIV-DIV_{1/2})/b))$ avec un pourcentage maximal de $Ca_v\beta_4$ dans le noyau $nuc_{max} = 79.4 \pm 4.8\%$, $b = 3.0 \pm 0.4$ et $DIV_{1/2} = 8.1 \pm 0.6$, le temps en culture pour avoir la moitié de la quantité maximale de $Ca_v\beta_4$ localisée dans le noyau.

Figure 18-C



(C) L'histogramme représente la variabilité des rapports de la distribution nucléaire/cytoplasmique de la fluorescence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans les neurones d'hippocampe à différents jours de culture. N = 50 pour chaque point.

Figure 18-D



(D) Les images confocales montrent que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est exprimée uniquement dans les neurones d'hippocampes. Le vert correspond à $Ca_v\beta_4$ et le rouge à l'anti-tubuline III, un marqueur neuronal. Les images grises représentent les neurones en transmission. Les images superposées sont aussi présentées.

La translocation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est induite par un facteur de différenciation neuronale dans la lignée cellulaire NG108.15.

La différenciation des neuroblastes en neurones est associée à diverses modifications morphologiques et électriques. L'apparition des ramifications axonales et dendritiques, appelées neurites, constitue la majeure modification morphologique dans la différenciation neuronale. Durant la différenciation des neurones d'hippocampe, les courants à bas seuil (LVA) de type-T sont exprimés en premier, tandis que l'expression des courants à haut seuil (HVA), surtout de type L et N, se produit plus tard et synchronise avec l'extension des neurites. Dans les neurones matures, l'activité des canaux à haut seuil domine l'influx du courant calcique. Les courants de type T sont impliqués dans le processus de la différenciation neuronale. En fait, l'inactivation de ces canaux conduit à l'arrêt de l'extension des neurites et bloque l'expression des canaux à haut seuil (HVA) (Chemin et al., 2002).

La lignée cellulaire neuroblastome-gliome NG108.15, issue d'un hybridome rat x souris, exhibe une différenciation neuronale synchronisée en présence de l'AMPc. Cette lignée est considérée comme étant un modèle de développement neuronal, particulièrement du processus de la différenciation des neuroblastes en neurones. Les cellules NG108.15 différenciées par l'AMPc partagent avec les neurones plusieurs caractéristiques morphologiques, électrophysiologiques et pharmacologiques, comme l'extension des neurites, la formation des synapses et l'expression des canaux calciques. Comme les neurones, les cellules NG108.15 différenciées expriment en premier les courants (LVA) de type-T, ensuite les courants à haut seuil (HVA) (Freedman et al., 1984; Noronha-Blob et al., 1988).

Le fait que la lignée NG108.15 représente un modèle cellulaire de la différenciation neuronale m'a incitée à caractériser l'influence d'un facteur d'induction neuronale, ici l'AMPc, sur la localisation subcellulaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (Figure 19.A).

En fait, les cellules NG108.15 non différenciées ne présentent pas de neurites et n'exprime que les courants de type-T. Ainsi qu'à ce stade, les sous-unités $Ca_v\beta_4$ endogènes sont localisées dans le cytoplasme, malgré l'absence des courants HVA. Après l'induction de la différentiation neuronale par l'AMPc, les cellules présentent une localisation nucléaire progressive des sous-unités $Ca_v\beta_4$, à partir du $7^{ème}$ jour de la différenciation. Il est clair que la translocation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans les cellules NG108.15 est clairement moins prononcée que celle exhibée dans les neurones primaires d'hippocampe. Dans les cellules NG108.15, à partir du $7^{ème}$ jour, la translocation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ coïncide avec l'expression des courants à haut seuil ainsi que la prolongation des neurites.

Le pourcentage nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans les cellules NG108.15 a été quantifié (Figure 19.B). La valeur théorique maximale atteinte au $13^{ème}$ jour après l'induction de la différenciation, est de 55.8 ± 4.7%, une valeur significativement inférieure à celle calculée pour les neurones d'hippocampe.

L'histogramme récapitulant la variabilité de la distribution de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans les cellules NG108.15 à divers jours après différenciation, est présenté en fonction du rapport nucléaire/cytoplasmique de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (Figure 19.C).

Figure 19-A

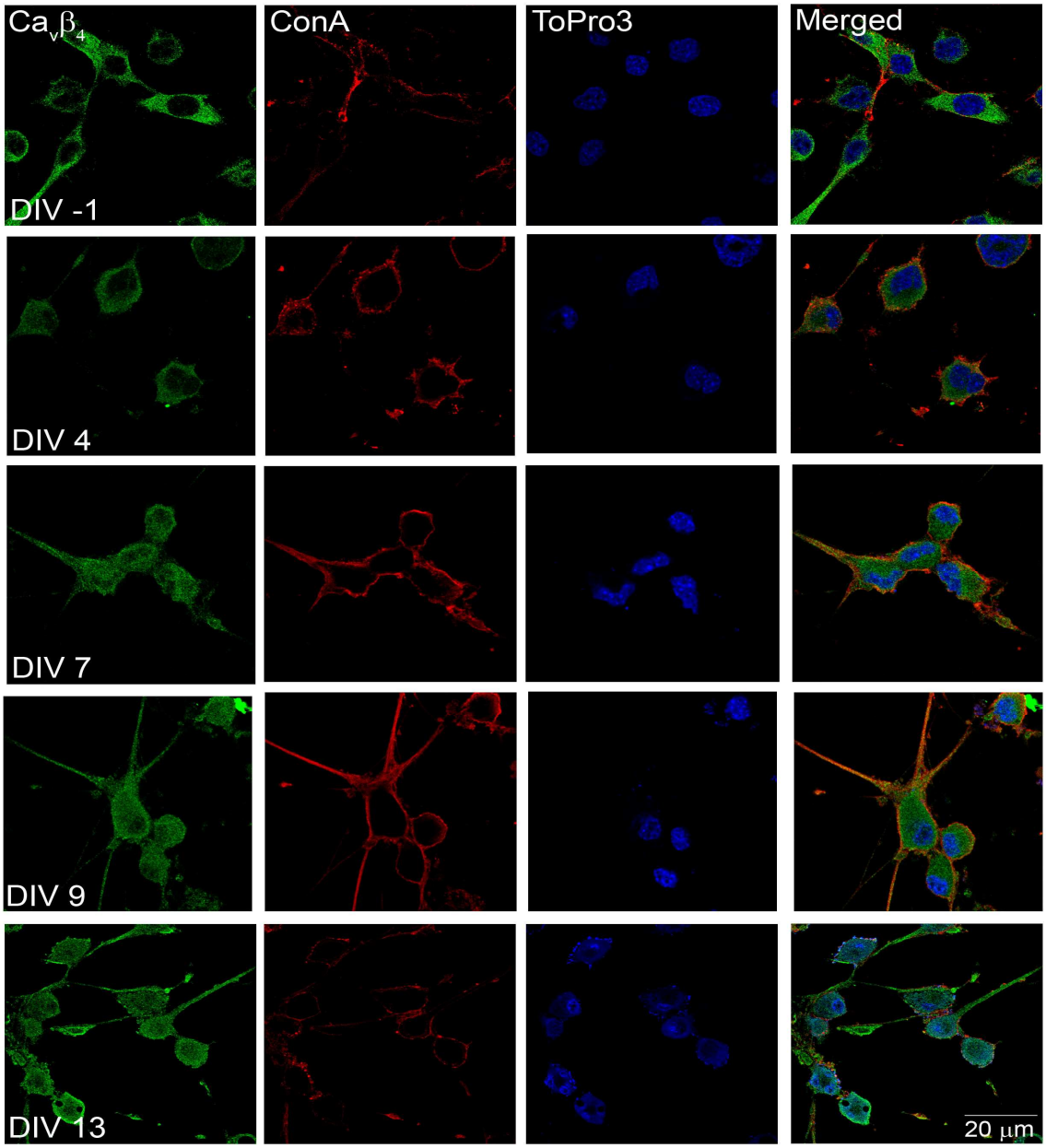
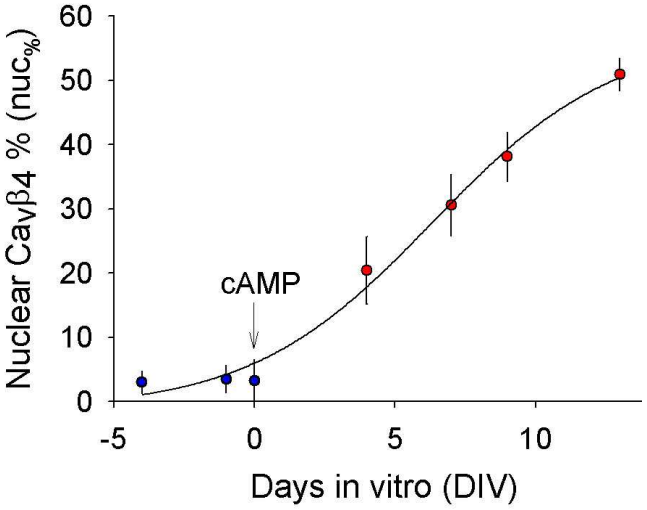


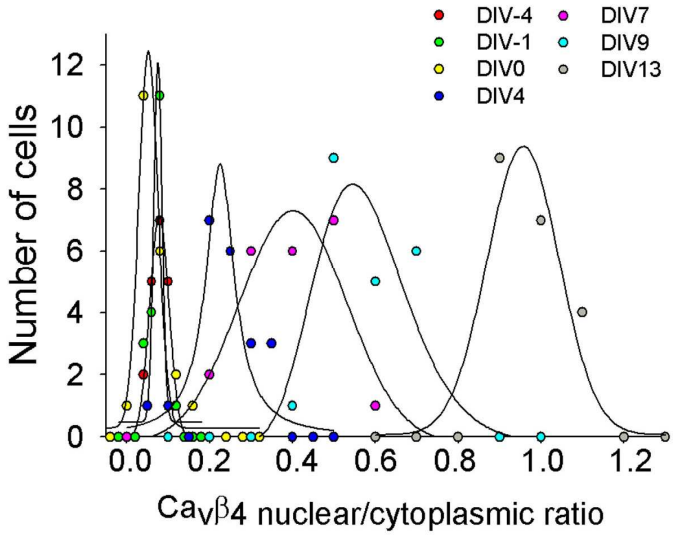
Figure 19 : *La différenciation neuronale induite par l'AMPc des cellules NG108.15 induit la translocation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$.*
(A) Les images confocales montrent des cellules NG108.15 en culture, d'un jour avant la différenciation, et 4, 7, 9 et 13 jours après différenciation avec l'AMPc (1 mM). Comme pour la Figure 15.A, le vert représente la sous-unité $Ca_v\beta_4$, le rouge correspond à la concanavaline A, et le bleu au ToPro3. La 4ème colonne représente la superposition des images acquises.

Figure 19-B



(B) La courbe représente le pourcentage de la quantité totale de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène dans les cellules NG108.15 ($nuc_{\%}$), mesuré comme dans la Fig. 1.A. L'équation de la courbe donne un nuc_{max}= 55.8 ± 4.7%, le pourcentage maximal de $Ca_v\beta_4$ dans le noyau, b= 3.0 ± 0.4, et $DIV_{1/2}$ = 6.3 ± 0.7, le temps en culture pour avoir la moitié de la quantité maximale de $Ca_v\beta_4$ localisée dans le noyau.

Figure 19-C



(C) L'histogramme représente la variabilité des rapports de la distribution nucléaire/cytoplasmique de la fluorescence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans les cellules NG108.15 à différents jours de culture. N = 50 pour chaque point.

La localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est également observée dans les systèmes d'expression hétérologues. Par contre, elle est perdue quand $Ca_v\beta_4$ est exprimée avec le complexe calcique, ainsi que dans le cas de la mutation R482X humaine.

La localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ en sur-expression a été déjà observée dans les cardiomyocytes (Colecraft et al., 2002) et dans les cellules COS-7 (Dolphin, 2003), sans commenter clairement cette différence par rapport aux autres sous-unités $Ca_v\beta$.

Dans les cellules HEK293 et également dans les cellules CHO, j'ai noté une localisation nucléaire de la sous-unité, quand elle est exprimée seule, et indépendamment des facteurs de différentiation (Figure 20.A et D). Les cellules ont été transfectées par un vecteur exprimant une protéine de fusion; la sous-unité $Ca_v\beta_4$ conjuguée dans son coté carboxy-terminal à la protéine EGFP (enhanced green fluorescent protein) (Figure 20.C).

L'EGFP est une petite protéine fluorescente de poids moléculaire égal à 25 kDa. Elle est diffusée de manière passive dans différents compartiments subcellulaires de la cellule, voire aussi dans le noyau (Brock et al., 1999). En comparant l'expression passive et diffuse de l'EGFP dans le cytoplasme et le noyau, la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP est exclusivement localisée dans le noyau.

La quantification des images confocales acquises présente un rapport nucléaire/cytoplasmique de la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP de 10.1 ± 3.3 dans les cellules HEK293 ainsi que 10.2 ± 3.5 dans les cellules CHO, un facteur de 10 en le comparant au rapport nucléaire/cytoplasmique de l'EGFP seule, étant de 1.0 ± 0.5 pour les cellules HEK293 et 1.0 ± 0.4 pour les cellules CHO (Figure 20.B et E). Ceci montre que la localisation nucléaire est reproductible dans différentes lignées cellulaires.

La co-expression des différentes sous-unités du canal calcique de type P/Q, $Ca_v\alpha_{2.1}$ et $Ca_v\alpha_2\delta_b$ prévient la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (Figure 20.A). En fait, les sous-unités $Ca_v\alpha$ sont adressées à la membrane plasmique suite à une interaction avec les sous-unités $Ca_v\beta$, qui masque un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique présent sur la boucle I-II. Ici, il s'agit des sous-unités $Ca_v\beta_4$ qui adressent

les canaux $Ca_v\alpha_{2.1}$ vers la membrane cellulaire selon une interaction qui implique le domaine AID. Outre l'interaction avec l'AID, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ partage particulièrement avec la sous-unité $Ca_v\alpha_{2.1}$ des interactions secondaires, dont l'affinité est presque 30 fois inférieures à l'interaction AID/ $Ca_v\beta_4$. Des études *in vitro* ont mis en évidence la présence de deux interactions secondaires qui impliquent l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et les deux extrémités amino- et carboxy-terminales de la sous-unité $Ca_v\alpha_{2.1}$ (Walker et al., 1998; Walker et al., 1999). L'existence de plusieurs interactions expliquerait probablement pourquoi la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est recrutée dans le cytoplasme suite à la co-expression du canal P/Q.

Le fait que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ soit dans le noyau des neurones quand les canaux sont exprimés, alors qu'elle est dans le cytoplasme des lignées cellulaires en co-exprimant les canaux P/Q n'est pas contradictoire. D'abord, il s'agit de deux systèmes différents ; une culture primaires et une lignée cellulaire. Donc, on ne peut pas établir une comparaison entre ces deux systèmes. Ensuite, outre les canaux P/Q, les neurones expriment plusieurs types des canaux calciques dépendants du voltage, et également plusieurs isoformes des sous-unités $Ca_v\beta$. Ce qui influencerait la localisation des sous-unités $Ca_v\beta_4$. Par contre, dans notre cas, les cellules HEK293 n'expriment que le canal P/Q et la sous-unité $Ca_v\beta_4$. Enfin, on ne peut pas vraiment contrôler le taux des transfections des lignées cellulaires et la durée de l'expression des plasmides transfectés, comme on ignore le rapport des protéines exprimées dans ce cas là. Probablement, une expression plus forte ou d'une durée plus longue de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, induirait sa translocation nucléaire dans les lignées cellulaires.

Dans les cellules HEK293, la détermination du rapport nucléaire/cytoplasmique de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ co-exprimée en présence de $Ca_v\alpha_{2.1}$ et $Ca_v\alpha_2\delta_b$ et qui vaut 0.25 ± 0.1, montre que la localisation des sous-unités $Ca_v\beta_4$ dans le noyau est prévenue d'un facteur 40 quand elles sont associées aux sous-unités $Ca_v\alpha_{2.1}$ et $Ca_v\alpha_2\delta_b$ (Figure 20.B).

Ces résultats indiquent que la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ peut être modulée par des facteurs extrinsèques, comme par exemple son association au complexe calcique.

Récemment, deux mutations dans le gène CACNB4 ont été identifiées codant pour la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (Escayg et al., 2000). Une de ses mutations génère un codon stop prématuré (R482X), ce qui élimine 38 acides aminés du coté carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. La protéine $Ca_v\beta_4$ tronquée est responsable d'un phénotype épileptique identifié chez les patients qui portent la mutation. Cette mutation ne présente pas d'effets marquants sur la biophysique du canal calcique dans un système d'expression hétérologue. Ainsi, les déterminants moléculaires associés à la mutation et provoquant ce phénotype neurologique restent inconnus.

La protéine de fusion, $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP représentant la protéine mutante couplée à l'EGFP (Figure 20.C) est exprimée dans les cellules CHO. Les images acquises par microscopie confocale (Figure 20.D) montre une différence dans la distribution subcellulaire du mutant $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP, par rapport à la protéine native $Ca_v\beta_4$-EGFP. Tandis que $Ca_v\beta_4$-EGFP est exclusivement nucléaire dans les cellules CHO, $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP est autant cytoplasmique que nucléaire. La distribution diffuse de la protéine mutante, $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP, ressemble à celle de l'EGFP. Cette ressemblance est confirmée par le rapport nucléaire/cytoplasmique correspondant à la distribution de $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP et équivalent à 0.98 ± 0.6. Cette valeur est presque égale à celle associée au rapport nucléaire/cytoplasmique de l'EGFP. Par contre, elle est significativement différente de celle du rapport nucléaire/cytoplasmique de $Ca_v\beta_4$-EGFP ($p \leq 0.001$) (Figure 20.E).

Cela suggère un rôle important de l'extrémité carboxy-terminale dans l'adressage nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. La différence de la distribution subcellulaire entre la protéine native et mutante, ainsi que la perte de l'adressage nucléaire de la sous-unité qui porte la mutation suggère une fonction nucléaire de $Ca_v\beta_4$ et une implication de cette fonction dans l'expression du phénotype épileptique.

Une étude biochimique a été réalisée afin de confirmer les résultats de la microscopie confocale, en montrant que la fluorescence verte est due à l'expression de la protéine de fusion, et pas uniquement à celle de l'EGFP qui s'est détachée de la protéine d'importance (Figure 20.F). Après fractionnement subcellulaire des cellules CHO transfectées par les constructions, entre cytoplasme et noyau, un Western anti-EGFP a été

réalisé. Ce dernier révèle la distribution uniforme de l'EGFP (25 kDa) entre la fraction cytoplasmique et la fraction nucléaire, similaire à la construction $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP (77 kDa). La présence d'une bande conséquente (82 kDa) au niveau de la fraction nucléaire confirme la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$.

Une remarque importante est la présence d'une dégradation protéolytique de $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP au niveau de la fraction cytoplasmique, ce qui reflète une plus grande sensibilité de la protéine mutante à la protéolyse par rapport à la protéine native. Cela dépendrait de l'influence de la mutation sur la stabilité de la structure globale de la protéine.

Figure 20-A

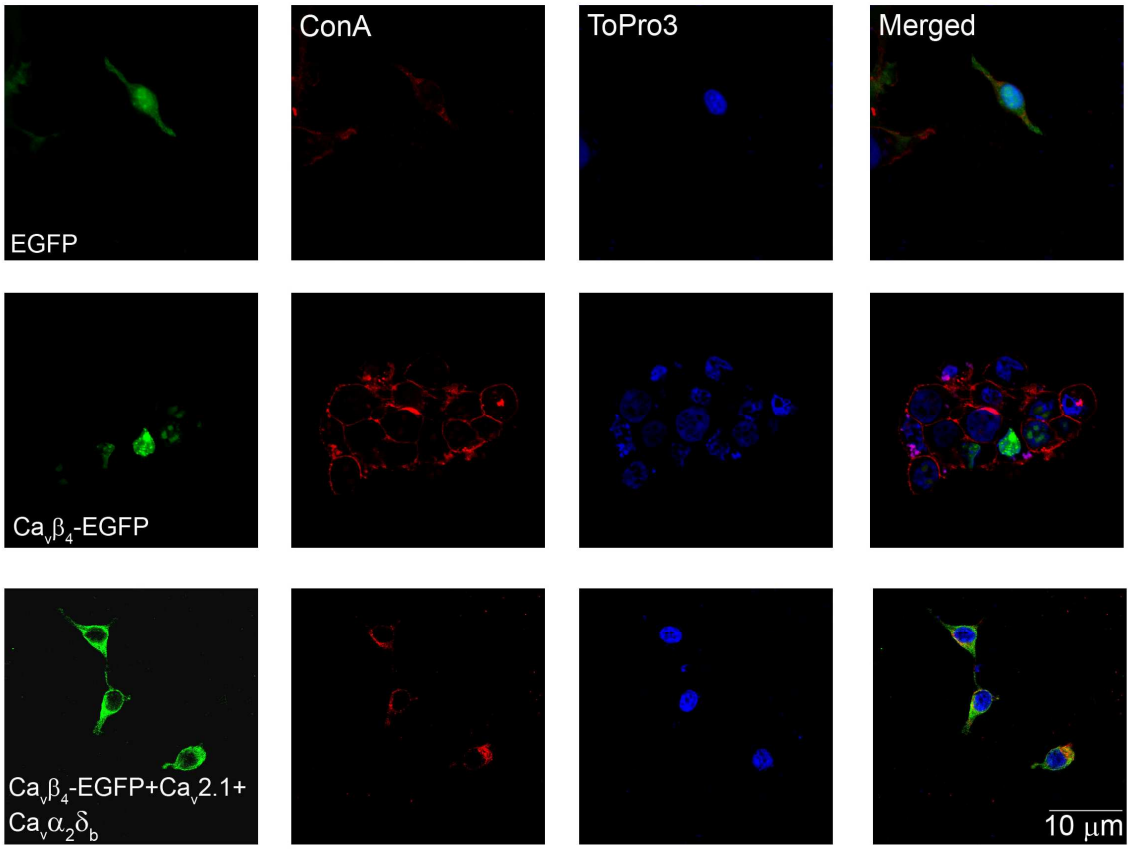


Figure 20 : *La localisation nucléaire est altérée par l'expression du canal calcique, et est totalement prévenue avec une mutation du coté carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, produisant une épilepsie juvénile myoclonique.*
(A) Les images confocales représentent des cellules HEK transfectées avec EGFP, $Ca_v\beta_4$-EGFP seule ou en coexpression avec $Ca_v2.1$ et $Ca_v\alpha_2\delta_b$, les sous-unités du canal calcique P/Q. La couleur verte représente la fluorescence des protéines conjuguées à l'EGFP, le rouge et le bleu respectivement à la ConA et ToPro3.

Figure 20-B

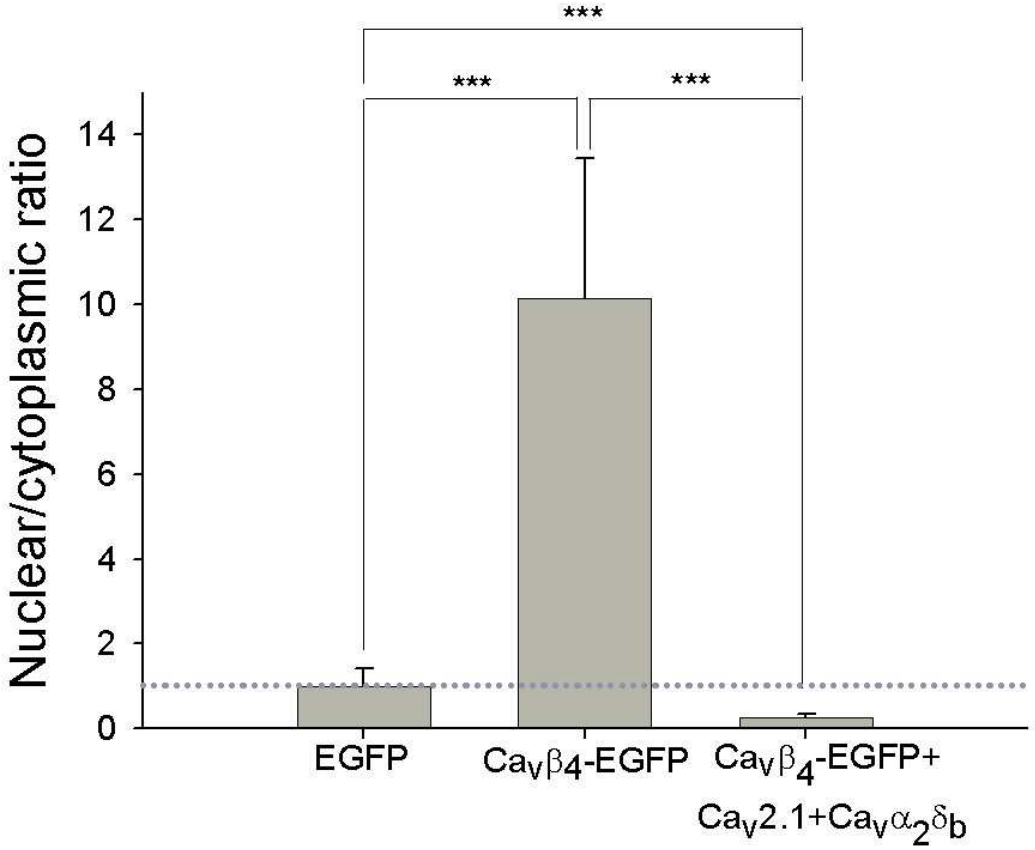
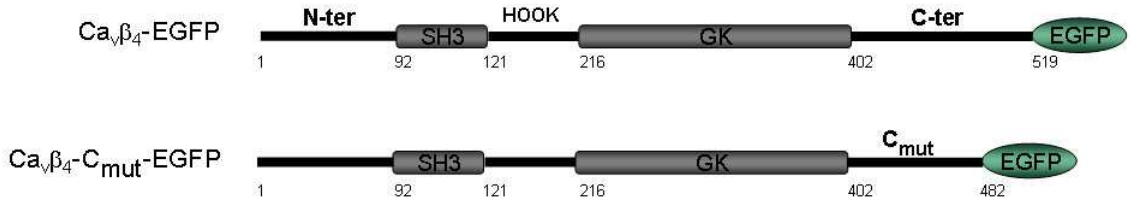


Figure 20-C



(B) La moyenne des rapports de la distribution nucléaire/cytoplasmique de la fluorescence de l'EGFP dans les cellules HEK293 transfectées (n = 50 pour chaque condition).
(C) Représentation schématique des constructions de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et de son mutant R482X $Ca_v\beta_4$-C_{mut} dans le vecteur pEGFP-N1.

Figure 20-D

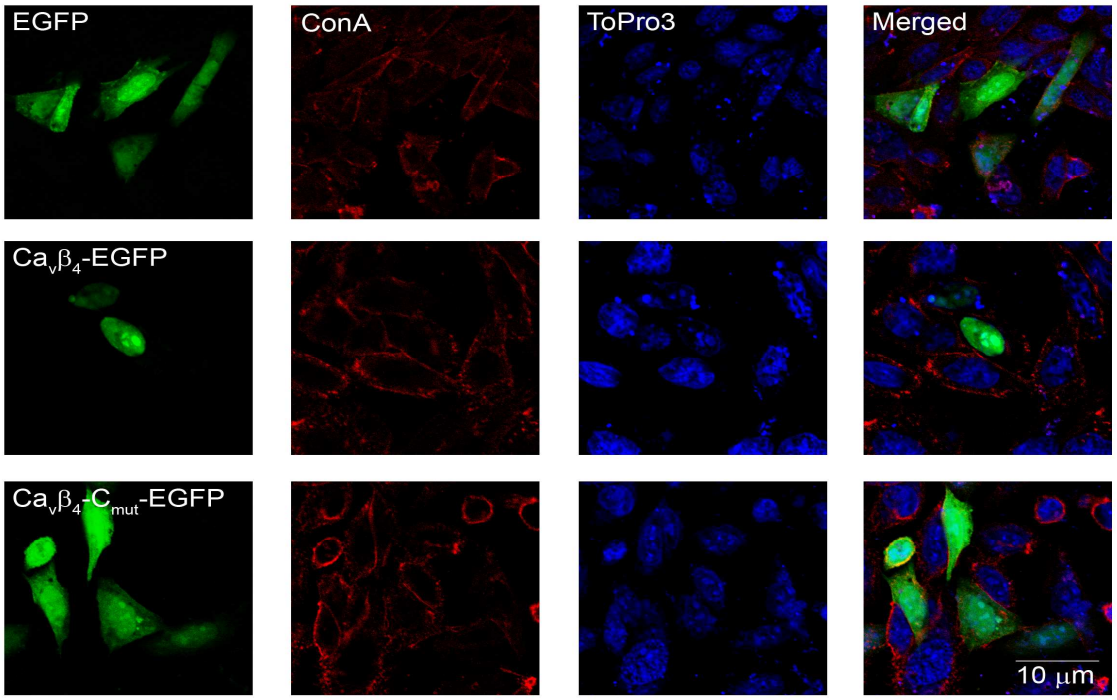


Figure 20-E

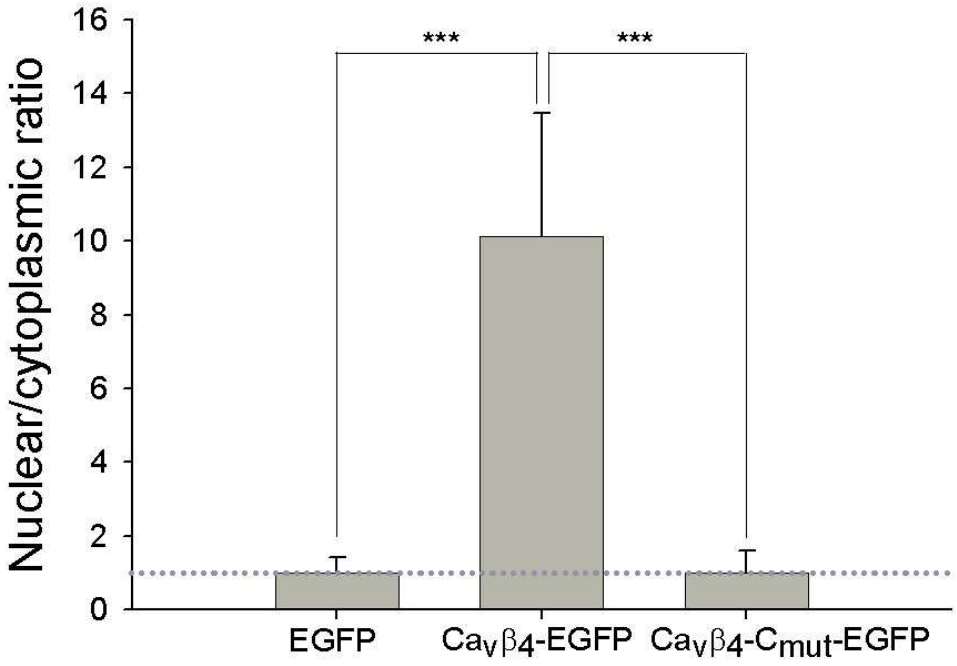
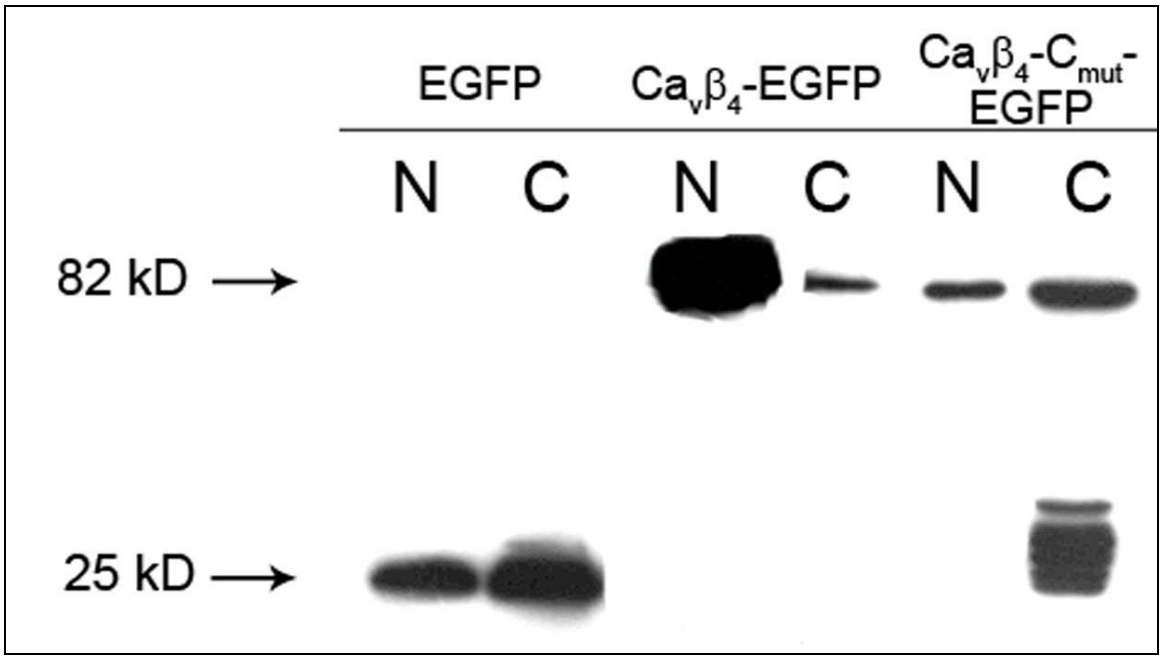


Figure 20-F



(D) Les images confocales représentent des cellules CHO transfectées par EGFP, $Ca_v\beta_4$-EGFP et $Ca_v\beta_4$-C_{mut} -EGFP. Les cellules sont fixées 24 h après transfection.
(E) La moyenne des rapports de la distribution nucléaire/cytoplasmique de la fluorescence de l'EGFP dans les cellules CHO transfectées (N = 50 pour chaque condition).
(F) Le western blot, réalisé avec un anti-EGFP, détecte l'EGFP dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques des cellules CHO transfectées par les différentes constructions.

La localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ n'est pas due à une séquence d'adressage nucléaire.

La perte de la localisation nucléaire de la construction $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP, associée à la délétion d'une séquence de 38 acides aminés, suggère que l'extrémité carboxy-terminale pourrait porter un signal d'adressage nucléaire.

Afin de tester cette idée, une construction exprimant uniquement le domaine carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, fusionnée à l'EGFP est réalisée (Figure 21.A). Les images confocales acquises sur les cellules CHO transfectées par la construction

Cter-EGFP, montrent une distribution différente que celle de $Ca_v\beta_4$-EGFP mais similaire à la distribution de l'EGFP seule (Figure 21.B). Ces résultats ont été confirmés avec la quantification de la fluorescence des cellules exprimant Cter-EGFP qui donne une valeur du rapport nucléaire/cytoplasmique égale à 1.1 ± 0.2, significativement différente que celle donnée par $Ca_v\beta_4$-EGFP ($p \leq 0.001$) mais presque égale à la valeur donnée par EGFP (Figure 21.C).

La distribution diffuse de la construction Cter-EGFP, similaire à la distribution diffuse de l'EGFP, indique que le domaine carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ ne porte aucun signal d'adressage nucléaire dans sa séquence. Ceci m'a incitée à examiner la présence d'une séquence d'adressage nucléaire détenue par un autre domaine de la sous-unité $Ca_v\beta_4$.

Plusieurs constructions exprimant différents domaines de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ fusionnés à l'EGFP ont été réalisées (Figure 21.A). Les transfections ont été faites également dans les cellules CHO. D'après l'analyse par microscopie confocale, aucune construction ne possède une localisation nucléaire similaire à celle de $Ca_v\beta_4$-EGFP. Toutes les constructions donnent une distribution diffuse similaire à celle de l'EGFP, sauf les constructions exprimant le domaine GK et la partie GK-Cter fusionnés à l'EGFP, qui présentent une localisation cytoplasmique particulière (Figure 21.B). Ces analyses ont été confirmées par la détermination du rapport nucléaire/cytoplasmique. Les constructions Nter-EGFP, SH3-EGFP, Nter-SH3-EGFP et SH3-HOOK-EGFP présentent un rapport nucléaire/cytoplasmique significativement différent que celui de $Ca_v\beta_4$-EGFP (10 fois moins), mais presque égal à celui de l'EGFP. Par contre, GK-EGFP et GK-Cter-EGFP avec des rapports nucléaires/cytoplasmiques, de 0.27 ± 0.2 et 0.26 ± 0.2 respectivement, sont significativement inférieurs que celui de l'EGFP, et démontrent à l'inverse une localisation essentiellement cytoplasmique (Figure 21.C).

Ces résultats ont aussi été confirmés par des études biochimiques. La distribution subcellulaire des protéines de fusion a été vérifiée après fractionnement cellulaire, par un Western blot anti-EGFP (Figure 21.D). GK-EGFP présente une bande unique au niveau de la fraction cytoplasmique, montrant la localisation cytoplasmique exclusive de cette construction. Par contre les autres constructions, représentées par SH3-EGFP, présentent

deux bandes quantitativement égales au niveau des fractions nucléaires et cytoplasmiques. Les mêmes résultats ont été obtenus en utilisant les cellules HEK293.

Ces observations indiquent que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ ne possède aucun signal d'adressage nucléaire dans sa séquence. Ainsi aucun domaine par lui-même n'est capable d'adresser la protéine vers le noyau, comme le fait la protéine native. L'adressage nucléaire pourrait donc être du à une interaction avec un partenaire protéique, qui lui-même porte une séquence d'adressage nucléaire, capable de localiser la sous-unité $Ca_v\beta_4$ vers le noyau. Seule la séquence wild-type possèderait cette capacité à interagir avec cette protéine, alors que la séquence mutante la perdrait en raison d'une conformation structurale différente (conformation permissive $Ca_v\beta_4$ versus conformation non permissive $Ca_v\beta_4$ mutante).

Figure 21-A

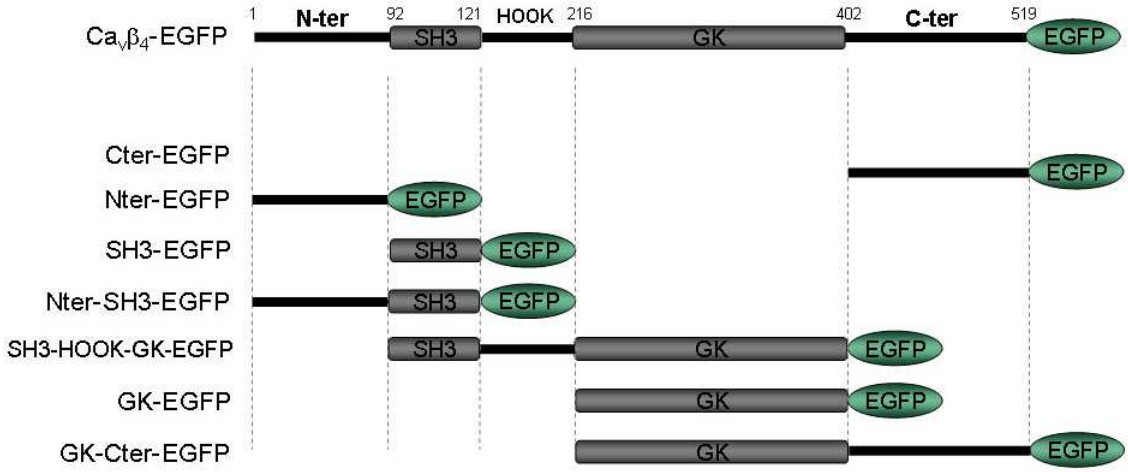


Figure 21 : *Absence d'une séquence d'adressage nucléaire dans la sous-unité $Ca_v\beta_4$.*
(A) Représentation schématique des différents fragments insérés dans le vecteur pEGFP-N1. Les constructions $Ca_v\beta_4$ sont en fusion avec l'EGFP du coté carboxy-terminal.
(B) Les images confocales des cellules CHO après 24 heures de transfection avec des différentes constructions représentatives ($Ca_v\beta_4$-EGFP, Nter-EGFP, SH3-EGFP, SH3-HOOK-GK-EGFP, GK-EGFP, et Cter-EGFP). Le vert correspond à la florescence de l'EGFP. Le rouge et le bleu représentent respectivement la concanavaline A et le ToPro3. (C) La moyenne des rapports de la distribution nucléaire/cytoplasmique de la fluorescence de l'EGFP dans les cellules CHO transfectées (n = 50 pour chaque condition). (D) Le western blot détecte l'EGFP dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques des cellules CHO transfectées par deux constructions représentatives GK-EGFP et SH3-EGFP.

Figure 21-B

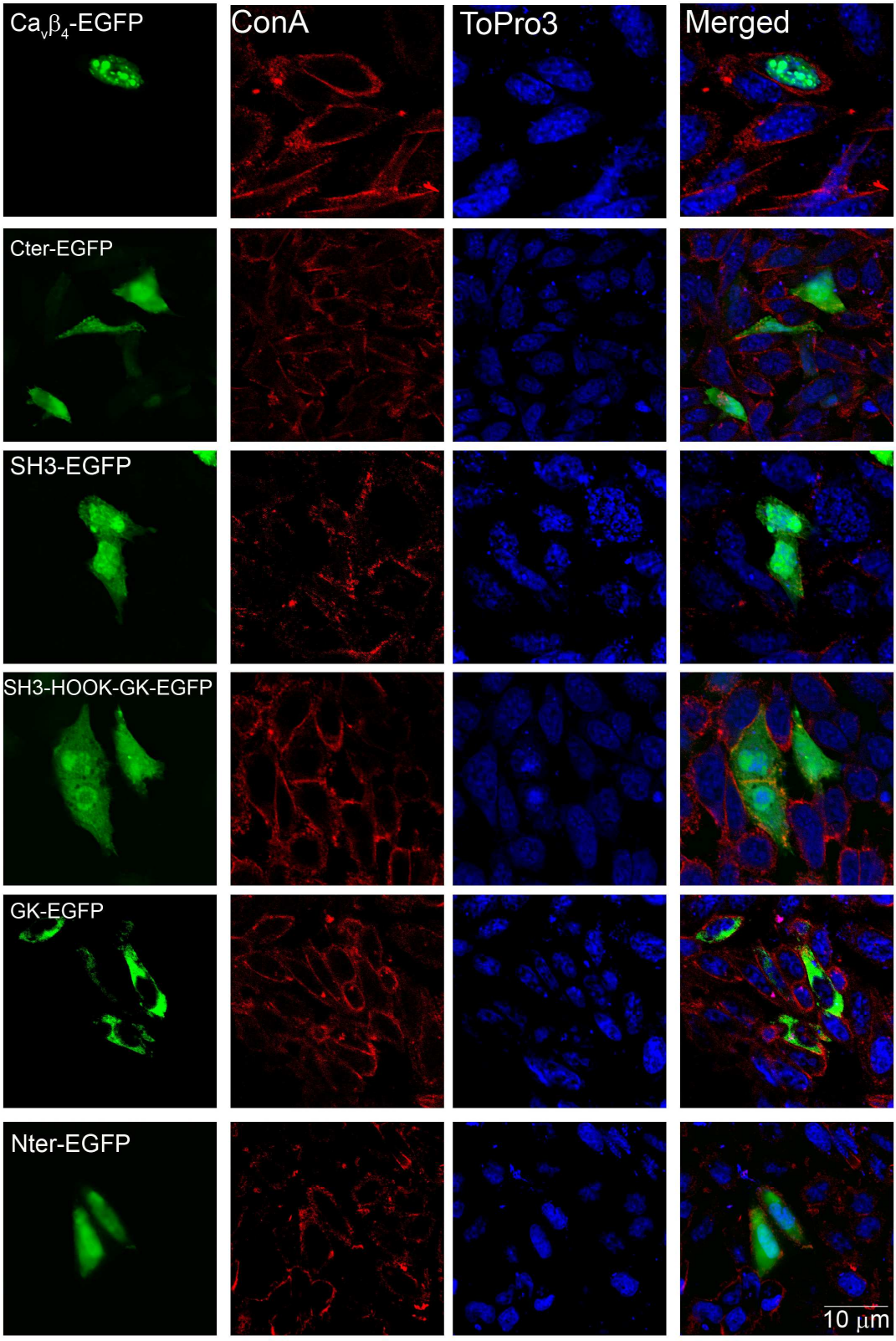

$Ca_v\beta_4$-EGFP
ConA
ToPro3
Merged
Cter-EGFP
SH3-EGFP
SH3-HOOK-GK-EGFP
GK-EGFP
Nter-EGFP
10 µm

Figure 21-C

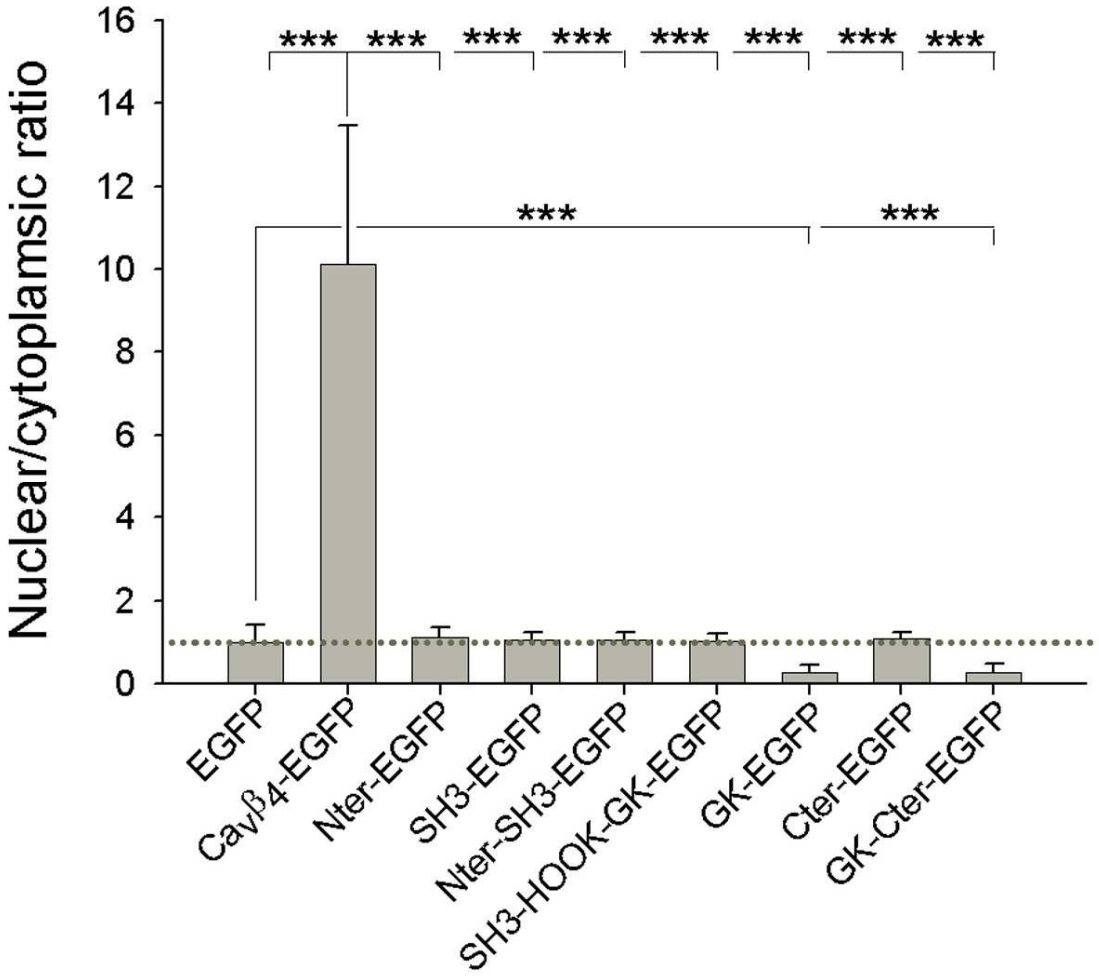
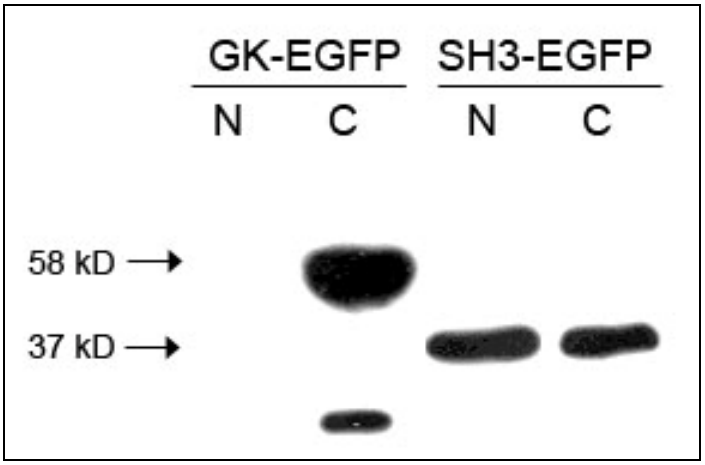


Figure 21-D



La mutation humaine R482X de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ rompt l'interaction intramoléculaire SH3/GK observée dans la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native. Cette interaction est primordiale pour la localisation nucléaire de $Ca_v\beta_4$.

La structure cristallographique de la sous-unité $Ca_v\beta$ a révélé l'appartenance de cette protéine à la famille MAGUK, avec sa structure qui repose sur les deux domaines SH3 et GK. Comme dans les protéines MAGUK, une interaction intramoléculaire SH3/GK a été identifiée au sein de la sous-unité $Ca_v\beta$. Cette interaction s'avère indispensable pour reconstituer les fonctions de la sous-unité $Ca_v\beta$ dans l'adressage membranaire et dans la modulation biophysique du canal. Des mutations dirigées , dans le domaine SH3 ou GK de la sous-unité $Ca_v\beta$, afin de rompre l'interaction intramoléculaire SH3/GK perturbent l'interaction $Ca_v\alpha/Ca_v\beta$ et altèrent les cinétiques d'inactivation (McGee et al., 2004; Takahashi et al., 2004).

Une interaction intermoléculaire entre les domaines SH3 et GK, établie suite à la co-expression de la partie Nter-SH3 avec la partie GK-Cter, est capable de reconstituer une sous-unité $Ca_v\beta$ fonctionnelle. La sous-unité $Ca_v\beta$ reconstituée restitue l'amplitude du courant native, l'adressage membranaire du canal et l'effet hyperpolarisant sur la courbe d'activation. Les mutations dirigées contre l'interaction SH3/GK préviennent l'interaction intermoléculaire de ces domaines, ainsi qu'une délétion de 84 acides aminés du coté carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta$ ne reconstitue pas l'effet complet de la sous-unité native. Cela est du à la perturbation de l'orientation de l'interaction SH3/GK (Takahashi et al., 2005).

Sachant que les domaines isolés de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ ne reproduisent pas la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, je me suis contentée d'étudier la localisation des deux fragments hemi-$Ca_v\beta_4$, Nter-SH3-EGFP et GK-Cter-myc, quand ils sont co-exprimés dans les cellules CHO. En fait, l'expression des deux domaines seuls produit une distribution passive comme celle de l'EGFP, dans le cas Nter-SH3-EGFP, et une localisation cytoplasmique exclusive dans le cas de GK-Cter-myc (Figure 22.A). La distribution de cette dernière reproduit exactement celle de GK-Cter conjuguée à l'EGFP, indiquant la neutralité des tags dans la distribution des constructions. La coexpression des

Figure 22-B

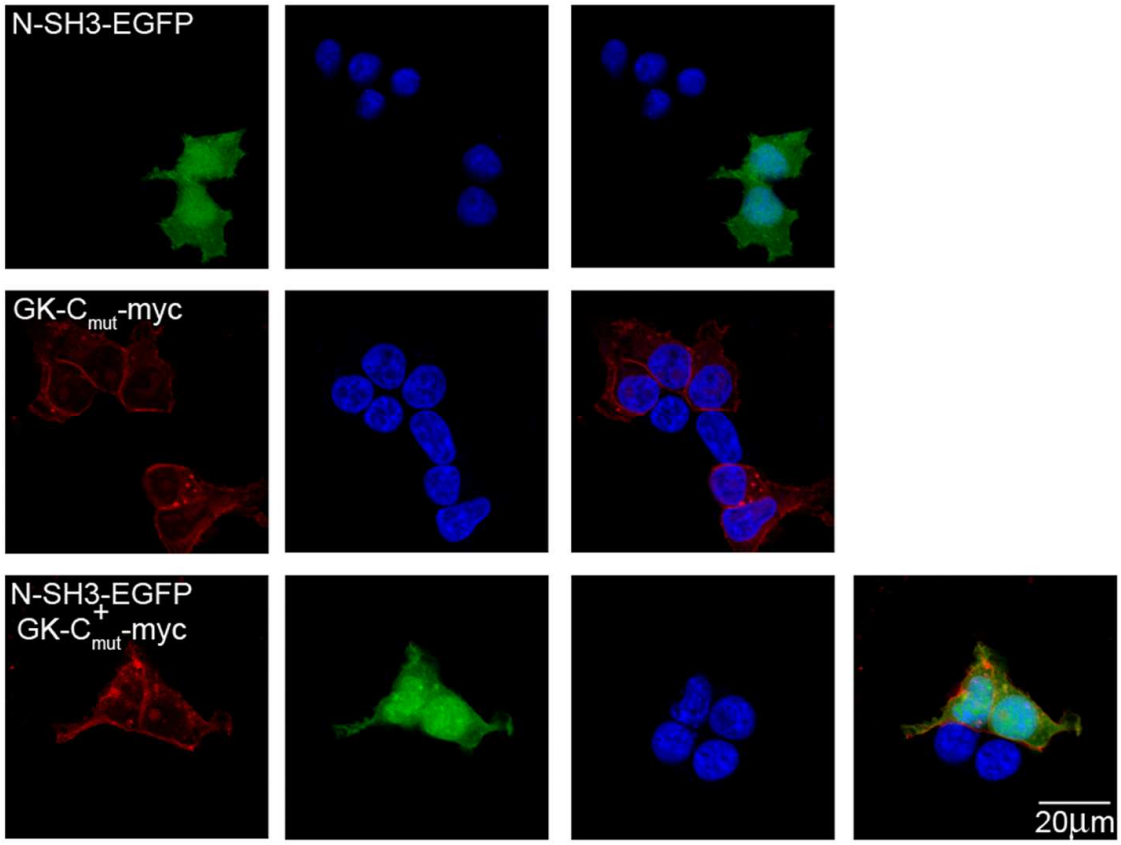


Figure 22-C

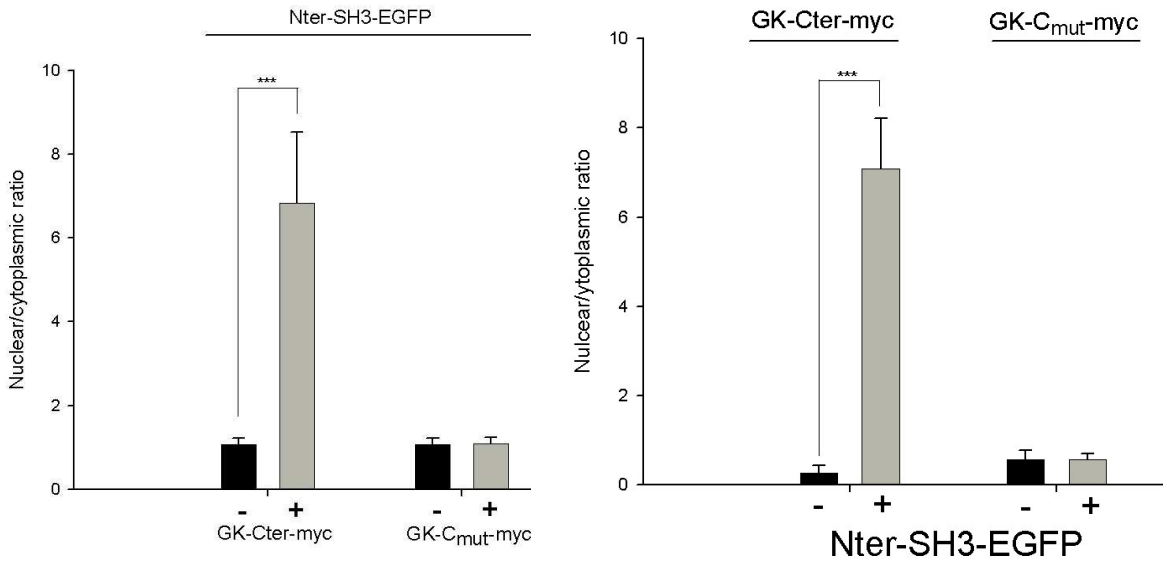
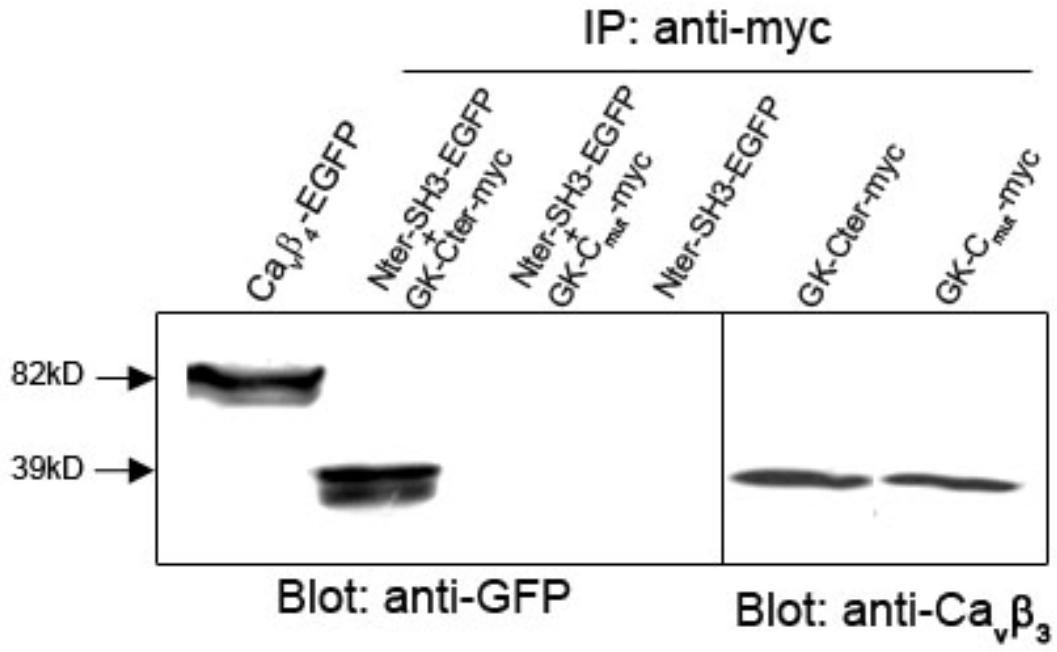


Figure 22-D



(C) La moyenne des rapports de la distribution nucléaire/cytoplasmique de la fluorescence de l'EGFP et de la détection de la séquence myc dans les cellules CHO transfectées pour les différentes conditions dans (A) et (B) (N = 30 pour chaque condition).
(D) Afin de vérifier l'interaction de Nter-SH3-EGFP avec GK-Cter-myc, d'une part et avec GK-C_{mut}-myc, d'autre part, la technique de co-immunoprécipitation a été réalisée. Le premier blot représente l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-myc et la détection de l'EGFP par un anti-GFP. La 1ère colonne représente le lysat des cellules exprimant Ca$_v\beta_4$-EGFP seule. La 2ème colonne correspond à Nter-SH3-EGFP détecté après immunoprécipitation de GK-Cter-myc, dans les cellules CHO exprimant les deux constructions. La 3ème colonne représente l'absence de la détection de Nter-SH3-EGFP après immunoprécipitation de GK-C_{mut}-myc, dans les cellules CHO exprimant les deux constructions. La 4ème colonne montre l'absence de la détection de Nter-SH3-EGFP après immunoprécipitation par un anti-myc, d'un lysat de cellules CHO exprimant uniquement Nter-SH3-EGFP. Le deuxième blot représente l'immunoprécipitation de GK-Cter-myc et GK-C_{mut}-myc par un anti-myc et la détection avec un anti- Ca$_v\beta$ polyclonal.

Afin de confirmer le rôle de l'interaction SH3/GK dans la localisation nucléaire de $Ca_v\beta_4$, une mutation L125P a été introduite dans le domaine SH3 de la sous-unité $Ca_v\beta_4$. En fait, une mutation ponctuelle dans le domaine SH3 de la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$ a été caractérisée. Il s'agit de la mutation L93P qui rompt l'interaction SH3/GK au sein de la sous-unité $Ca_v\beta_{2a}$ (McGee et al., 2004).

Ainsi, par alignement de séquence, j'ai identifié la lysine 125 dans le domaine SH3 de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, correspondante à la L93 de $Ca_v\beta_{2a}$. Effectivement, en transfectant les CHO par la construction $Ca_v\beta_4$-L125P-EGFP, une localisation cytoplasmique exclusive de la protéine est notée (Figure 22.E). La quantification de la fluorescence reflète cette distribution avec un rapport nucléaire/cytoplasmique égal à 0,26 ± 0,07 (Figure 22.F). Cette localisation cytoplasmique du mutant $Ca_v\beta_4$-L125P-EGFP confirme que la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dépend de l'interaction SH3-GK.

Egalement, une étude de co-immunoprécipitation à partir des lysats protéiques extraits des cellules CHO, co-transfectées par les deux constructions NSH3(L125P)-EGFP et GK-Cter-myc, montrent l'absence de l'interaction entre le domaine SH3 qui porte la mutation L125P et le domaine GK de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (Figure 22.G). Les lysat protéiques extraits à partir des cellules CHO transfectées par les constructions Nter-SH3(L125P)-EGFP et GK-Cter-myc seules, constituent les contrôles négatifs.

En effet, le deuxième mutant humain de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ identifié chez des patients atteints d'une ataxie, présente une mutation ponctuelle (C104F) dans le domaine SH3. Dans le but de vérifier s'il s'agit du même cas que la mutation L125P, des études en microscopie confocale et d'immunoprécipitation ont été réalisée. Effectivement, les images confocales montrent une localisation nucléaire, avec une distribution plus diffuse dans le cytoplasme du mutant $Ca_v\beta_4$-C104F-EGFP que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native (Figure 22.H). La quantification des images montre que cette distribution diffuse est moins prononcée que celle du mutant R482X ($Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP) avec un rapport nucléaire/cytoplasmique de 5.03 ± 0.1 (Figure 22.I). La co-immunoprécipitation des domaines NSH3(C104F)-EGFP et GK-Cter-myc montre une interaction entre ses deux domaines non perturbée par la mutation C104F.

Figure 22-E

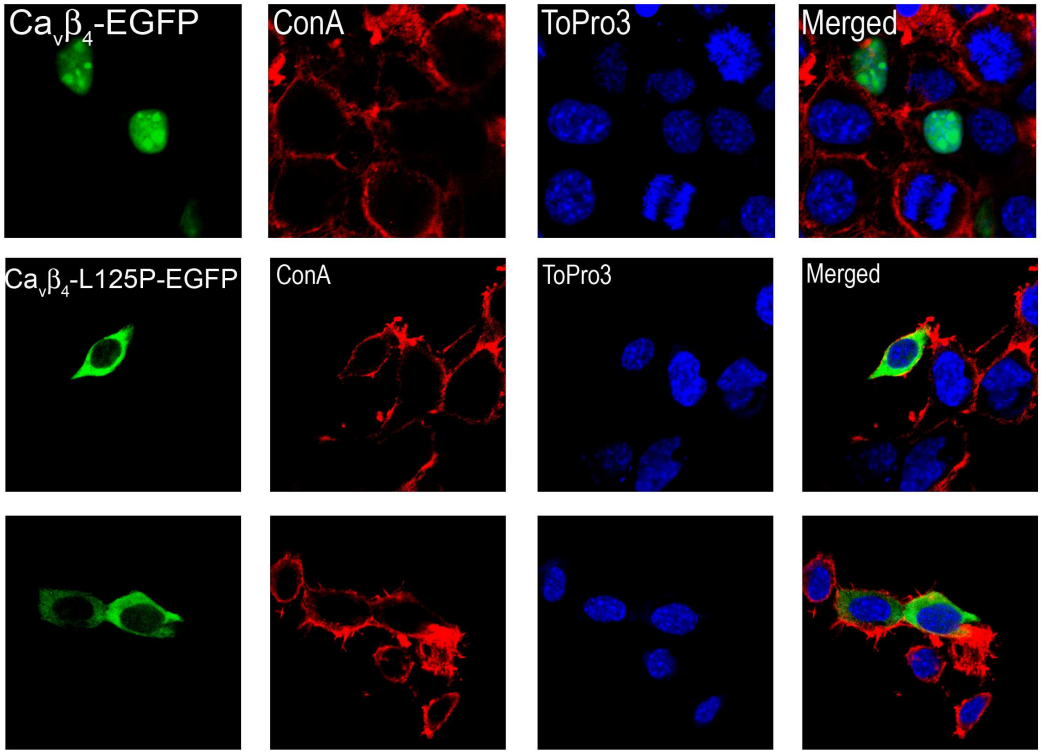
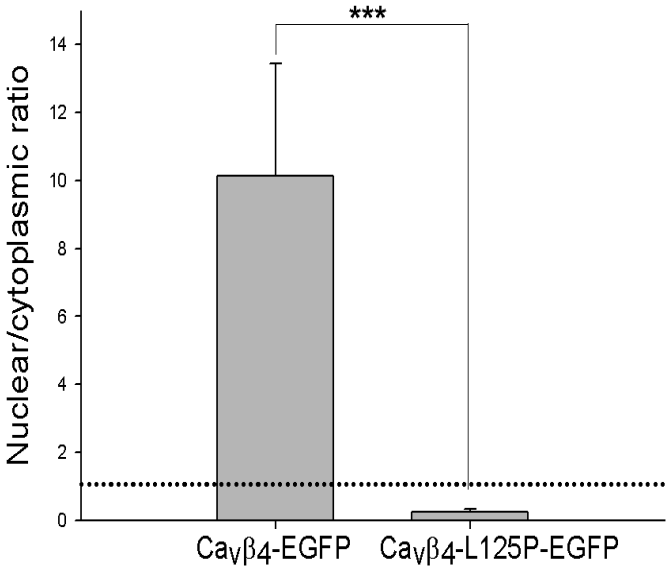
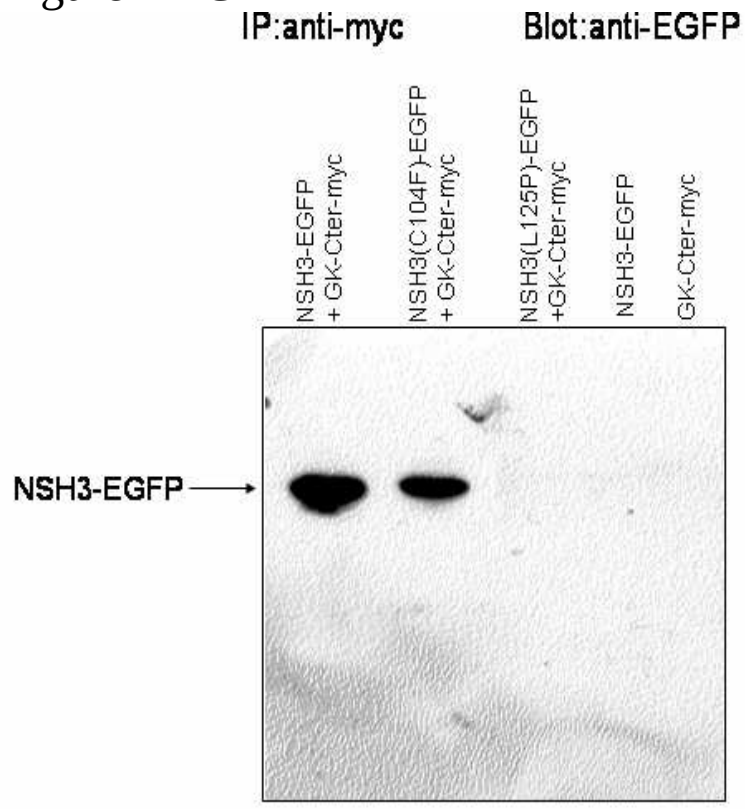


Figure 22-F



(E) Les images confocales montrent les cellules CHO transfectées avec la construction Ca$_v$β$_4$ –EGFP ou Ca$_v$β$_4$-L125P-EGFP (en vert). Cette dernière est localisée exclusivement dans le cytoplasme. En rouge, il s'agit du marquage membranaire avec la concanavaline-rhodamine et en bleu, du marquage nucléaire avec le ToPro3. (F) La quantification de la fluorescence montre la différence significative des moyennes du rapport nucléaire/cytoplasmique de chaque construction.

Figure 22-G



(G) La co-immunoprécipitation a été réalisée en utilisant un anticorps anti-myc, suivie par un Western blot pour détecter les constructions couplées à l'EGFP. Les lysats protéiques sont extraits à partir des cellules CHO transfectées GK-Cter-myc avec chacune des constructions suivantes, NSH3-EGFP, NSH3(C104F)-EGFP ou NSH3(L125P)-EGFP, ainsi qu'avec des cellules CHO transfectées uniquement avec NSH3-EGFP et GK-Cter-myc.
(H) Les images confocales montrent une distribution diffuse du mutant $Ca_v\beta_4$-C104F-EGFP en vert, le marquage membranaire en rouge et nucléaire en bleu, dans les cellules CHO.

Figure 22-H

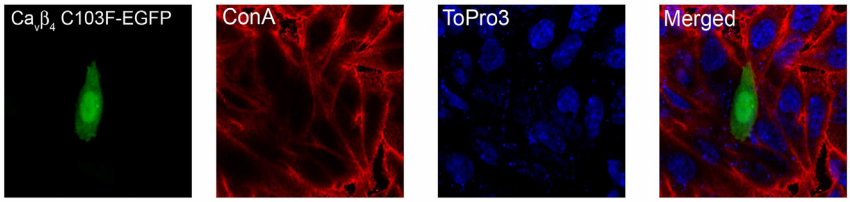
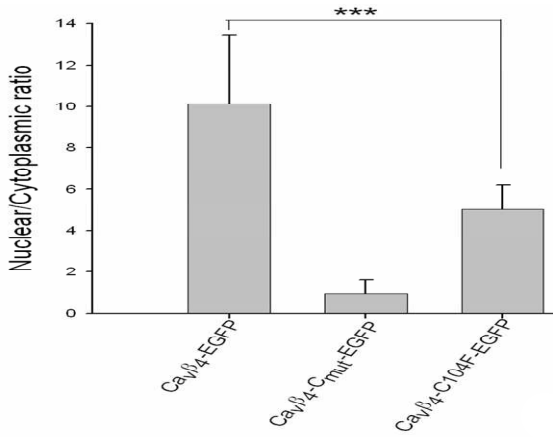


Figure 22-I



(I) Les rapports nucléaires/ cytoplasmiques calculés à partir de la quantification des images confocales montre une localisation nucléaire du mutant C104F moins prononcée que celle de la sous-unité WT, ainsi qu'un distribution moins diffuse que le mutant R482X.

Dans les neurones d'hippocampe, la sous-unité $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP sur-exprimée est exclusivement cytoplasmique. L'étude de son effet sur les fonctions cellulaires de la $Ca_v\beta_4$.

Afin de vérifier la localisation de la sous-unité qui porte la mutation dans un système de cellules primaires, des neurones d'hippocampe au 9ème jour de culture ont été transfectés par $Ca_v\beta_4$-EGFP et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP (Figure 23.A). La construction $Ca_v\beta_4$-EGFP exhibe la même distribution que celle de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ exprimée d'une façon endogène dans les neurones d'hippocampe. La localisation de $Ca_v\beta_4$-EGFP est nucléaire, par contre $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP est complètement exclue du noyau, et présente une distribution cytoplasmique dans les neurones d'hippocampe. Ces résultats ont été confirmés, encore une fois, par la quantification de la fluorescence (Figure 23.B). Le calcul du rapport nucléaire/cytoplasmique de la construction $Ca_v\beta_4$-EGFP transfectée donne une valeur égale à 3.14 ± 1.76 par contre, celle de $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP est égale à 0.32 ± 0.18. Cette différence dans le rapport de la distribution nucléaire/cytoplasmique est statistiquement significative ($p \leq 0.001$).

La localisation exclusive cytoplasmique de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ qui porte la mutation sur l'extrémité carboxy-terminale serait due à une déstructuration de la conformation native de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ suite à une interaction intermoléculaire SH3/GK défective (Figure 22).

Les neurones primaires d'hippocampe en culture expriment la totalité du complexe calcique, la sous-unité Ca_v et ses sous-unités régulatrices. Dans le but de déterminer l'effet de la localisation cytoplasmique du mutant $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP sur les courants calciques dans les neurones, vis-à-vis de l'expression de $Ca_v\beta_4$-EGFP, une étude électrophysiologique a été réalisée sur les neurones transfectés. La mesure de la densité du courant, définie comme étant le courant par unité de surface, a été mesurée en bloquant les courants sodiques par la tétrodoxine (TTX) et les courant de type L par la nifédipine (NIFE). En effet, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ interagit spécifiquement avec les canaux de type P/Q et un peu moins avec les canaux de type N. D'après les résultats électrophysiologiques, une augmentation de la densité du courant est enregistrée avec la

surexpression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP dans les neurones (6.1 ± 1.3) par rapport à l'expression endogène de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (3.2 ± 2.5). Par contre, une diminution de la densité du courant est notée en sur-exprimant la sous-unité mutante $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP (1.4 ± 0.5) par rapport à la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène (Figure 23.C).

Tandis que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est essentiellement localisée dans le noyau, l'augmentation de la densité du courant suite à la sur-expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP est due à la localisation cytoplasmique de cette sous-unité sur-exprimée (Figure 23-A) qui module l'activité biophysique des canaux calciques. Egalement, elle serait probablement due à l'augmentation de l'expression des canaux calciques et à leur adressage membranaire via les sous-unités $Ca_v\beta_4$ surexprimées.

Les patients épileptiques qui portent la mutation R482X sont hétérozygotes. Afin de vérifier si la sous-unité $Ca_v\beta_4$-C_{mut} exerce un effet négatif sur la localisation nucléaire des sous-unités $Ca_v\beta_4$ endogènes, une analyse immunocytochimique a été réalisée sur des neurones en culture, transfectés le 9ème jour par la construction $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP (Figure 23.D). En effet, la localisation cytoplasmique de $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP exprimée, après 24h et 48h, ne montre aucune influence sur la distribution native des sous-unités $Ca_v\beta_4$ endogènes, qui présentent une localisation nucléaire. Au 9ème jour en culture, la quantification de la fluorescence de $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP (0.33 ± 0.18) reflète la localisation cytoplasmique du mutant dans les neurones par rapport à la localisation nucléaire de la $Ca_v\beta_4$ endogène (1.05 ± 0.03). On note également la ressemblance de la distribution de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène, en présence et en absence de l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante (Figure 23.E). Cette constatation est probablement due au fait que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est déjà exprimée dans le noyau des neurones d'hippocampe au 7ème jour de culture, ce qui expliquerait l'effet négatif du mutant sur la localisation nucléaire de la $Ca_v\beta_4$ endogène. Tenant compte des difficultés techniques de la transfection des neurones à des jours précoces où $Ca_v\beta_4$ n'est encore que cytoplasmique, on s'est contenté des cellules CHO pour étudier l'effet de la mutation sur la localisation nucléaire de $Ca_v\beta_4$, en co-exprimant le mutant et $Ca_v\beta_4$-EGFP. Effectivement, l'expression de $Ca_v\beta_4$-C_{mut} influence la localisation nucléaire de $Ca_v\beta_4$-EGFP dans les cellules CHO, en empêchant une partie des sous-unités $Ca_v\beta_4$-EGFP de se localiser dans le noyau, et ainsi les

séquestrer dans le cytoplasme (Figure 23.F). La quantification des images confocales montre une différence importante et significative entre le ratio cytoplasmique/nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP exprimée en présence de la sous-unité mutante (5.36 ± 0.99) et la $Ca_v\beta_4$-EGFP exprimée seule (10.1 ± 3,3) (Figure 23.G). La même étude est en cours de réalisation dans les neurones d'hippocampe en co-exprimant $Ca_v\beta_4$-myc et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP.

Enfin, le mutant montre un effet négatif sur les courants calciques régulés par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène et notamment sur la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native. Comment le mutant exerce cet effet sur la sous-unité $Ca_v\beta_4$ demeure une question sans réponse. En effet, l'idée que les deux protéines interagissent ensemble est exclue. Une étude d'immunoprécipitation suivie par un western blot, à partir des cellules CHO co-transfectées par $Ca_v\beta_4$-myc et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP, montre que ses protéines n'interagissent pas (western non ajouté).

Figure 23-A

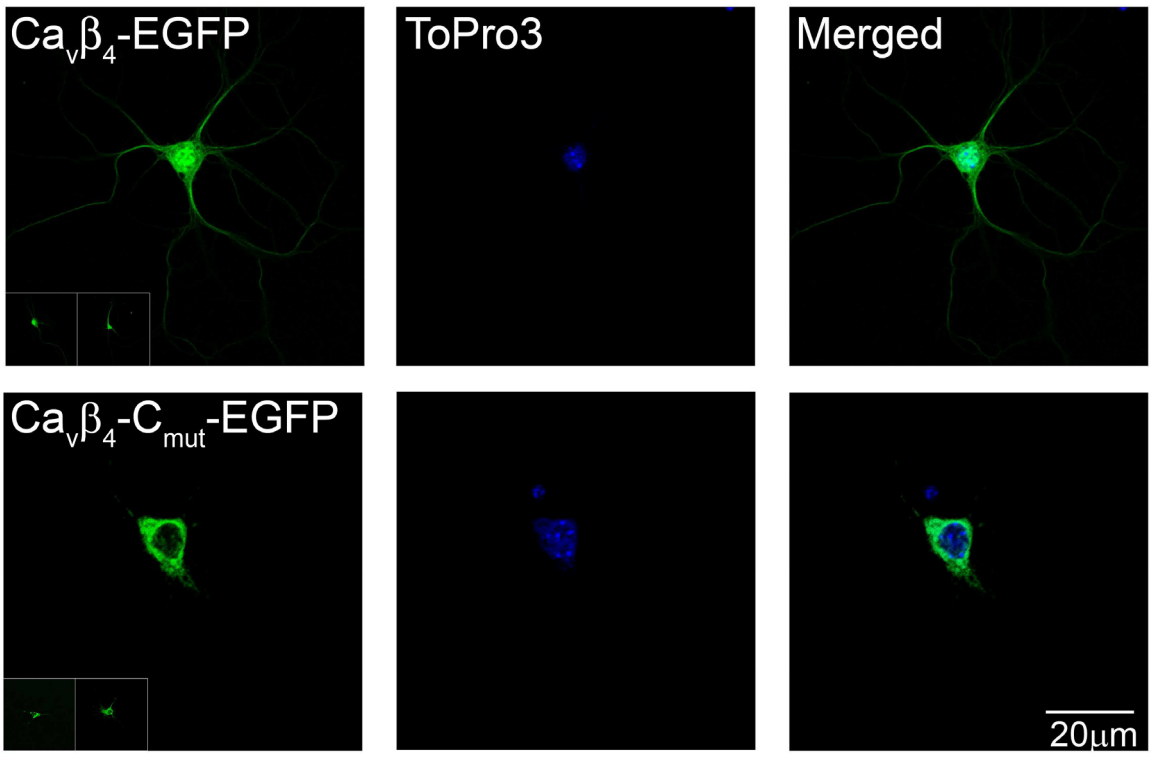


Figure 23-B

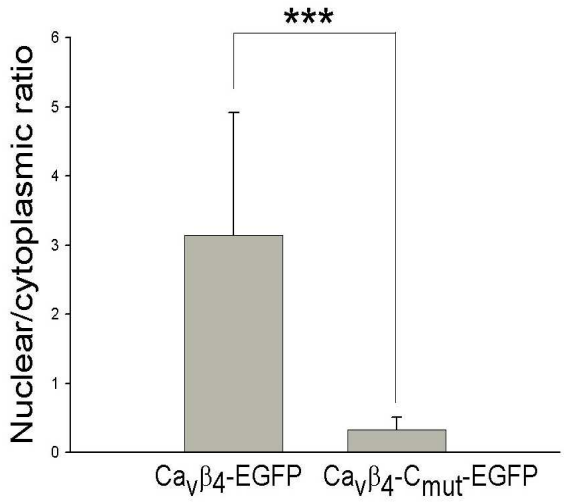
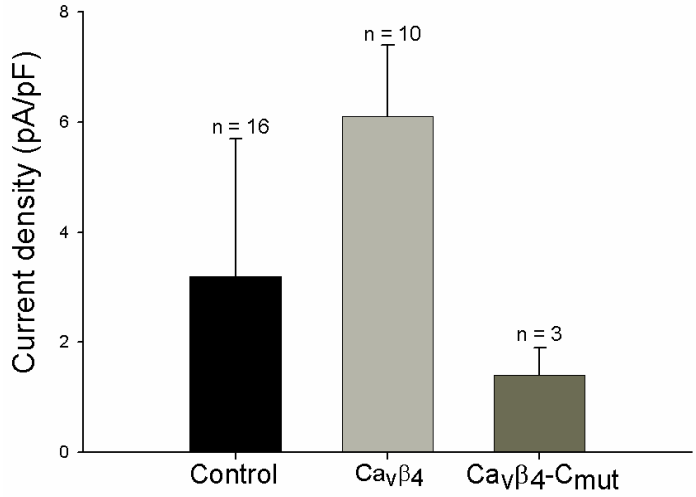


Figure 23 : *La localisation différentielle entre la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native et le mutant dans les neurones.*
(A) Les images confocales sont acquises sur des neurones embryonnaires (E18) d'hippocampe transfectés, au 9ème jour en culture, par $Ca_v\beta_4$-EGFP ou $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP. Le vert correspond à la fluorescence de l'EGFP, le rouge et le bleu respectivement à la concanavaline A et au ToPro3. (B) La moyenne des rapports de la distribution nucléaire/cytoplasmique de la fluorescence de l'EGFP dans les neurones transfectés par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native ou mutante (N =30 pour chaque condition).

Figure 23-C



(C) La densité du courant qui représente le courant calcique pour une unité de surface cellulaire est mesurée en présence de la tétrodoxine et la nifédipine, bloqueurs respectifs des courants sodiques et des courants calciques de type L. Le contrôle correspond à des neurones d'hippocampe à J9 en culture non transfectés. Les neurones ont été transfectés à J7 par les constructions $Ca_v\beta_4$-EGFP et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP. La densité du courant a été mesurée à J9.

Figure 23-D

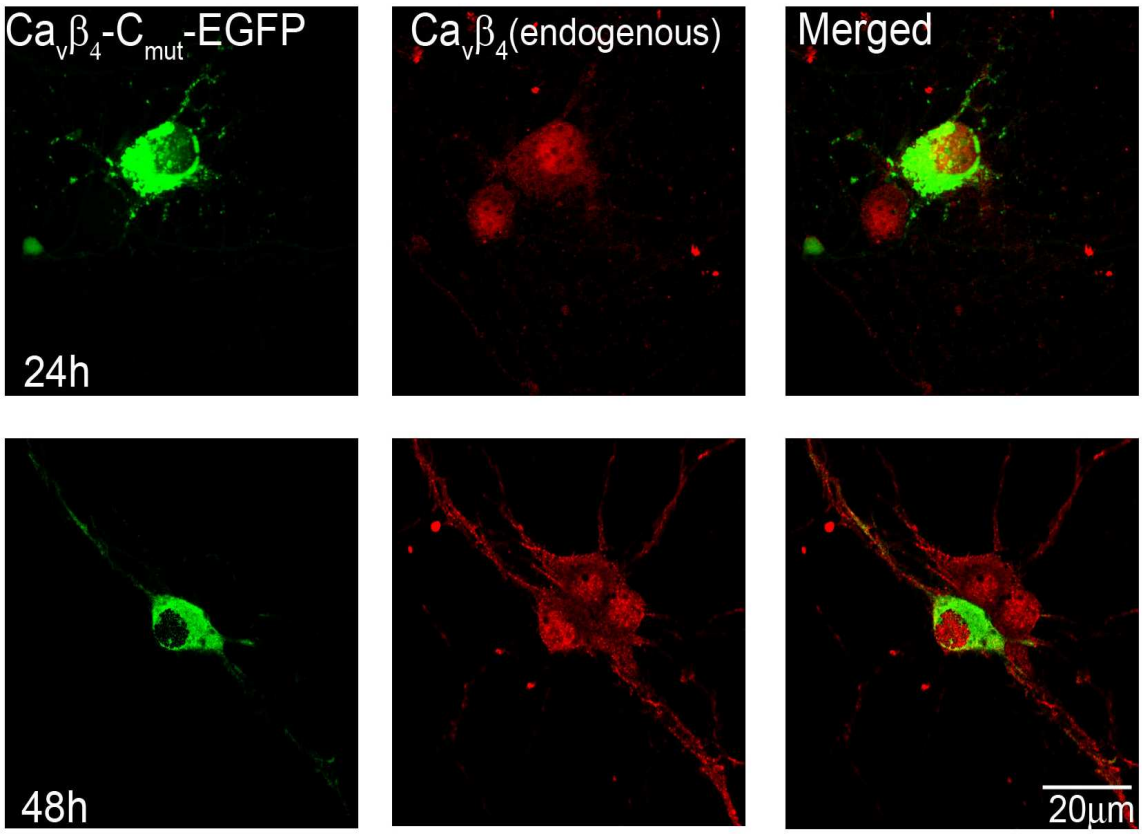
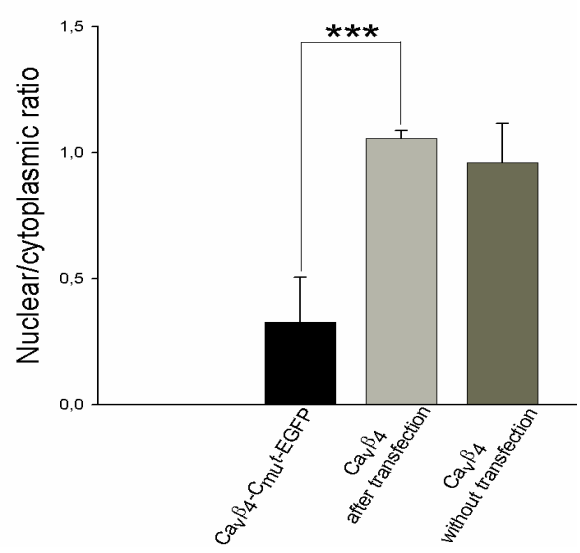


Figure 23-E



(D) Les images confocales présentent une immunocytochimie sur des neurones embryonnaires d'hippocampe transfectés au 9ème jour en culture par la construction Ca$_v$β$_4$-C$_{mut}$-EGFP, et fixés après 24 h ou 48 h. Le vert représente la fluorescence de l'EGFP fusionnée à la sous-unité Ca$_v$β$_4$ mutante. Le rouge représente la sous-unité Ca$_v$β$_4$ endogène détectée par un anti-Ca$_v$β$_4$ primaire, et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa596. La superposition est faite avec Photoshop Professionnel.

(E) La moyenne des rapports nucléaires/cytoplasmiques, dans les neurones à J9, de Ca$_v$β$_4$-C$_{mut}$-EGFP, de Ca$_v$β$_4$ endogène après la transfection par Ca$_v$β$_4$-C$_{mut}$-EGFP, et de Ca$_v$β$_4$ endogène sans transfection.

Figure 23-F

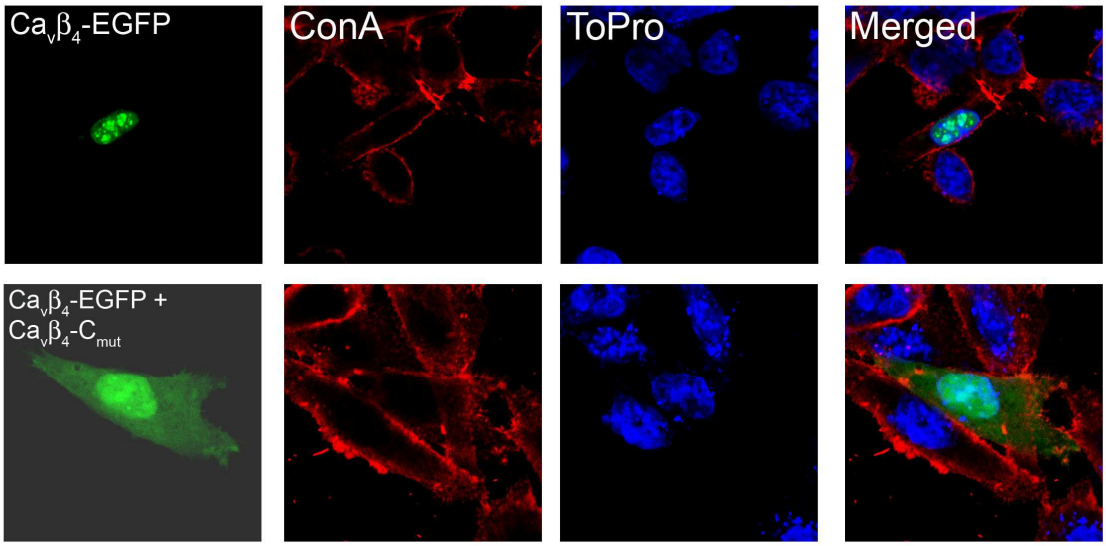
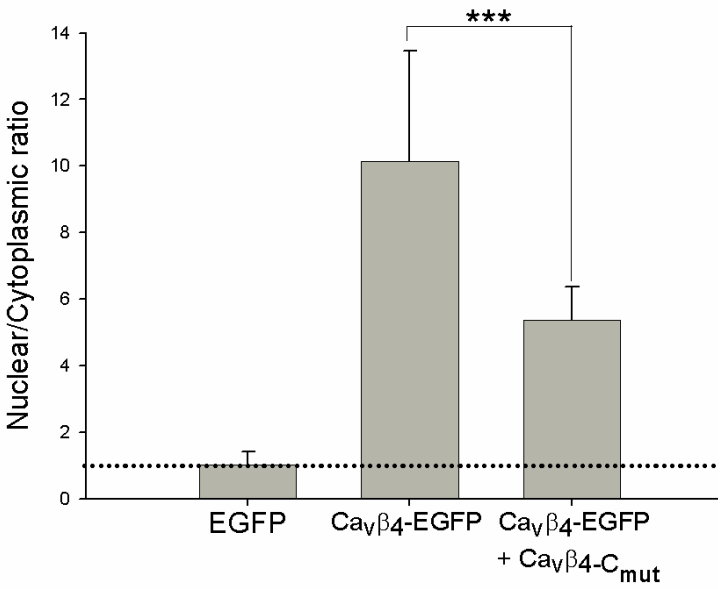


Figure 23-G



(F) Les images confocales représentent des cellules CHO transfectées par Ca_vb_4-EGFP en absence et en présence de Ca_vb_4-C_{mut}. La couleur rouge représente le marquage membranaire avec la concanavaline couplée à la Rhodamine, le bleu le marquage nucléaire avec le ToPro3. La superposition est réalisée dans Photshop.

(G) La moyenne des rapports nucléaires/cytoplasmiques, dans les CHO, de $X\alpha\varpi\beta_4$-EGFP, en absence et en présence de la sous-unité mutante $Ca_v\beta_4$-C_{mut}.

La sous-unité $Ca_v\beta_4$ interagit avec B56, SAPAP3 et mKIAA1152 alors que le mutant en est incapable. B56 recrute $Ca_v\beta_4$ dans le noyau, alors que SAPAP3 la maintient dans le cytoplasme.

En collaboration avec le labo du Dr. Mori, la technique du double hybride a été utilisée dans le but d'identifier de nouveaux partenaires de $Ca_v\beta_4$.

Cette technique consiste à pêcher des nouveaux partenaires à une protéine donnée « l'appât », ici la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et son mutant $Ca_v\beta_4$-C_{mut}. L'interaction entre la protéine et son partenaire va activer la transcription d'un gène rapporteur suite à l'activation de son promoteur. La protéine utilisée ici est la GAL4 ; son rôle est d'activer la transcription du gène de l'enzyme β-galactosidase impliquée dans la synthèse du galactose, l'indice de sélection. Les plasmides utilisés génèrent la protéine « appât » couplée au domaine d'interaction avec l'ADN de la protéine GAL4, et des protéines provenant d'une librairie couplées au domaine d'activation de GAL4. L'interaction entre l'appât et ses partenaires implique une interaction non directe entre les deux domaines de GAL4 ; le domaine d'interaction assure la fixation de GAL4 sur le promoteur et le domaine d'activation induit la transcription du gène rapporteur.

La librairie utilisée provient du cerveau de souris, clonée dans le vecteur pACT2. Alors que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est clonée dans le vecteur pGBK-T7. le criblage est fait dans les levures AH109. Les résultats du test β-galactosidase sortent une liste de protéines qui interagissent avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et $Ca_v\beta_4$-C_{mut} selon un signal assez fort (jusqu'à + 5). Ce signal reflète la luminescence de la réaction du dosage de l'activité de l'enzyme β-galactosidase exprimée par les levures. La figure 24.A récapitule la liste des protéines filtrées.

Parmi ces protéines, trois interagissent spécifiquement avec $Ca_v\beta_4$, mais pas avec $Ca_v\beta_4$-C_{mut} : les protéines B56, Dlgap3 et mKIAA1152.

La protéine B56 est une sous-unité régulatrice de la protéine sérine/thréonine phosphatase 2A (PP2A). PP2A est impliquée dans divers processus cellulaires, comme la transduction du signal, la régulation transcriptionnelle et la réplication de l'ADN. Elle existe dans la cellule sous la forme d'un complexe composé de 3 sous-unités : la sous-

unité A (65 kDa), responsable du rassemblement du complexe, la sous-unité catalytique C (36 kDa) et la sous-unité régulatrice B (Xu et al., 2006). Cette dernière possède plusieurs fonctions primordiales pour l'activité de la protéine phosphatase. La sous-unité B contient le signal d'adressage du complexe vers différents compartiments cellulaires et détermine la spécificité du substrat de l'enzyme, selon son expression tissulaire durant le développement. Il existe plusieurs familles de la sous-unité B. La famille B56 présente 5 isoformes ; $B56_{\alpha, \beta, \delta, \gamma}$ et $_{\varepsilon}$. Les isoformes α, β et ε localisent le complexe dans le cytoplasme, par contre δ et γ adressent le complexe vers le noyau (McCright et al., 1996).

Selon les résultats du double hybride, il s'agit de l'isoforme $B56_{\delta}$ qui interagit avec $Ca_v\beta_4$ et non pas avec le mutant. La localisation de cet isoforme varie entre le cytoplasme et le noyau. Fortement exprimée dans le cerveau adulte et notamment dans les neurones, $B56_{\delta}$ possède un signal d'adressage nucléaire (KR TVETEAVQML KDIKK). Durant la différenciation neuronale, une augmentation de l'expression de l'ARNm de $B56_{\delta}$ induit une augmentation considérable de l'expression de la protéine (McCright et al., 1996).

De ce fait, cette protéine constitue un candidat potentiel de la localisation nucléaire de $Ca_v\beta_4$ sachant que cette dernière ne possède aucun signal d'adressage. Son interaction avec la protéine $B56_{\delta}$ assurerait sa translocation dans le noyau, au cours de la différenciation neuronale. Ce qui ne serait pas le cas de la sous-unité $Ca_v\beta_4$-C_{mut} épileptique incapable de se localiser dans le noyau des neurones d'hippocampe.

La deuxième protéine candidate est la Dlgap3, pour « disc large homolog-associated protein 3 ». Ces protéines sont spécifiquement exprimées dans les neurones et enrichies dans la fraction PSD (post synaptic density). Elles sont associées aux protéines PSD-95/SAP90, d'où leur appellation SAPAPs. Les SAPAPs jouent un rôle potentiel dans le maintien de la structure de la zone PSD, en concentrant ses composants protéiques à la proximité de la membrane. Les SAPAPs interagissent avec la famille MAGUK via leur domaine guanylate kinase GK, mais pas leur domaine SH3 (Takeuchi et al., 1997). Ce qui explique son interaction avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$, membre de la famille MAGUK.

D'après nos résultats, la mutation du coté carboxy-terminal de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ déstructure le domaine GK et le rend incapable d'interagir avec le domaine SH3. Par conséquence, la même déstructuration empêcherait l'interaction avec les protéines SAPAPs. Ceci confirme, une fois de plus, nos résultats sur l'impact structural de la séquence carboxy-terminal sur la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante imposée par la délétion et qui la rend incapable d'interagir et d'être reconnue par ses partenaires.

Enfin, la troisième protéine est la mKIAA1152 dont la séquence cDNA a été identifiée par criblage du génome de souris. Cette protéine n'est pas encore caractérisée. Dans la suite, je me suis particulièrement intéressée par les deux protéines B56 et SAPAP3.

D'abord, une étude d'immunoprécipitation a été réalisée afin de vérifier l'interaction de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ avec les protéines criblées par double hybride. A partir des cellules CHO, co-transfectées par $Ca_v\beta_4$-EGFP et B56δ-myc, SAPAP3-myc ou mKIAA-myc, une co-immunoprécipitation par anti-myc, afin de précipiter les constructions conjuguées à la séquence myc, a été réalisée suivie par un western blot anti-EGFP pour détecter $Ca_v\beta_4$-EGFP (Figure 24.B).

Par contre, ces protéines n'interagissent pas avec le mutant R482X ($Ca_v\beta_4$-C_{mut}). Le lysat protéique des cellules CHO transfectées par B56δ-myc, SAPAP3-myc, mKIAA-myc ou $Ca_v\beta_4$-EGFP constitue le contrôle négatif. Un western blot anti-myc a été réalisé pour détecter l'expression des constructions conjuguée à la séquence myc dans les cellules co-transfectées par $Ca_v\beta_4$-EGFP (Figure 24.C).

Puisque les protéines criblées par double hybride interagissent notamment *in vitro* avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$, on a trouvé d'une importance de regarder leurs effets sur la distribution de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ quand elles sont co-exprimées dans une même cellule. Ainsi, des cellules CHO ont été co-transfectées par la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP et les différentes constructions B56δ-myc, SAPAP3-myc ou mKIAA-myc (Figure 24.D).

Figure 24-A

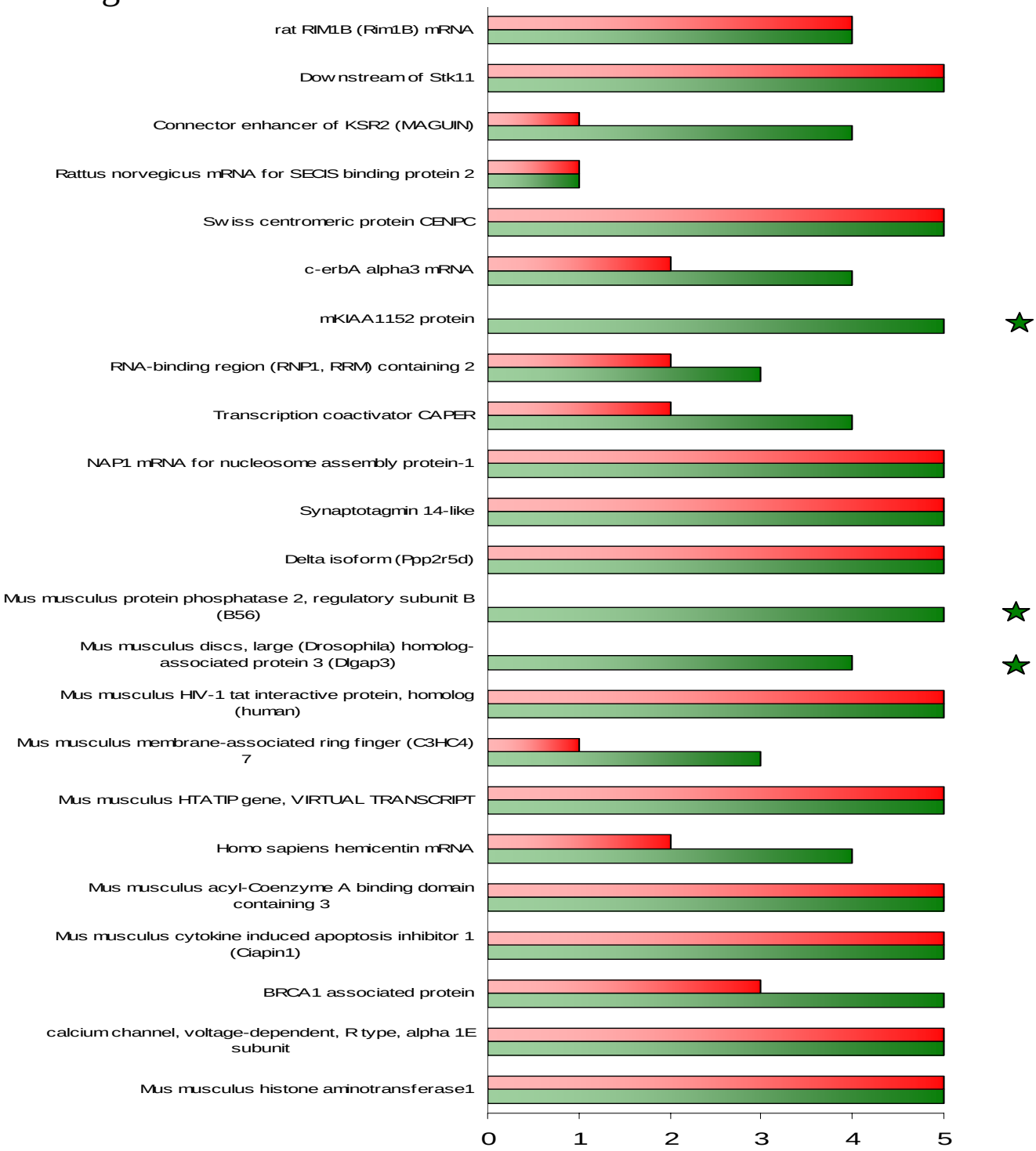
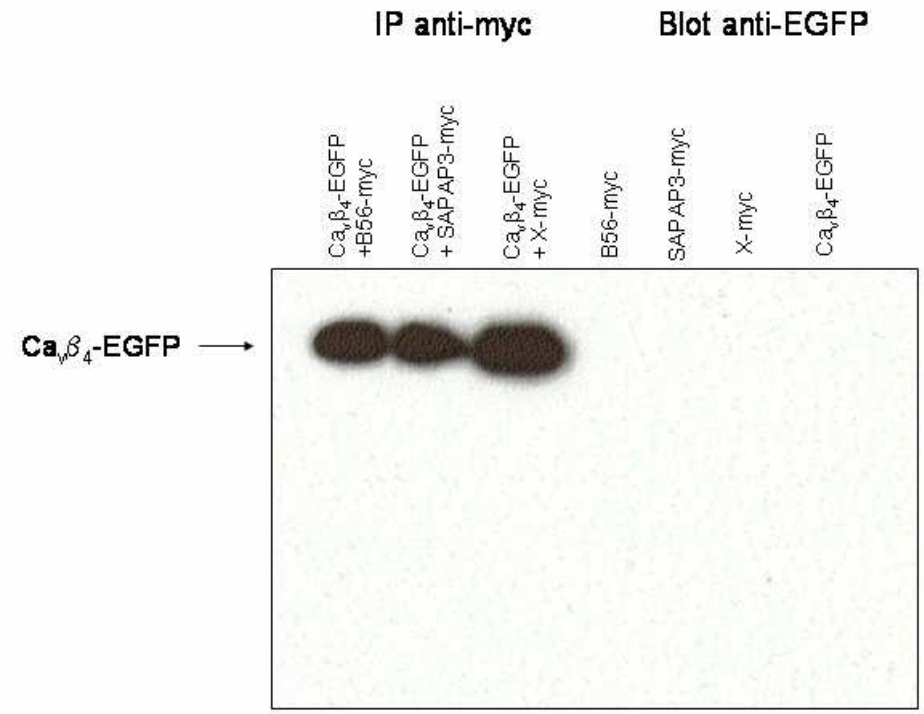


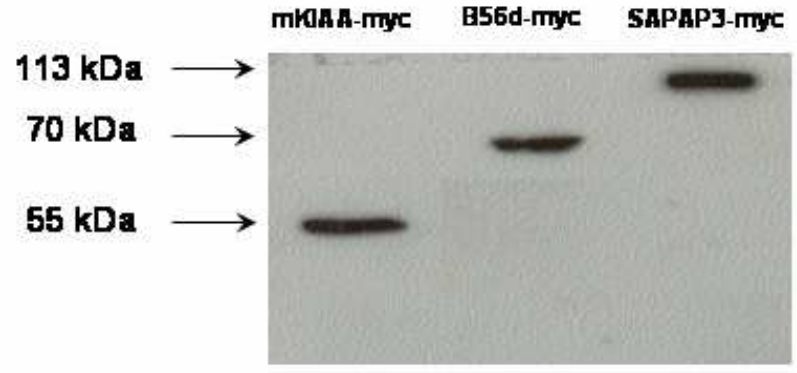
Figure 24 *: La sous-unité $Ca_v\beta_4$ interagit avec trois protéines, mais le mutant.*
(A) La liste de protéines criblées avec la technique du double hybride. Les barres vertes représentent l'interaction avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et les rouges, celle du mutant. Le plus fort signal obtenu correspond au niveau 5 de la luminescence. Aucun signal n'est obtenu avec B56, Dlgap3 et mKIAA1152 pour le mutant.

Figure 24-B



(B) Une co-immunoprécipitation a été réalisée afin de vérifier l'interaction entre $Ca_v\beta_4$ et les protéines criblées par double hybride. Les cellules ont été co-transfectées avec $Ca_v\beta_4$-EGFP et B56δ-myc, SAPAP3-myc ou mKIAA-myc. Des cellules transfectées avec chaque construction seule constitue le contrôle négatif. L'immunoprécipitation utilisant un anti-myc a été réalisée sur les lysats protéiques extraits des cellules transfectées. Ensuite un western blot est fait afin de détecter $Ca_v\beta_4$-EGFP.

Figure 24-C



(C) Afin de vérifier l'expression des constructions, un western est réalisé sur les cellules XHO χο−τρα νσφεχτ∫εσ αϖεχ Χα ϖβ4-EGFP et B56δ-myc, SAPAP3-myc ou mKIAA-myc, utilisant un anticorps anti-myc.

La protéine B56δ-myc, exprimée seule, est localisée dans le noyau des cellules CHO. En effet, la sous-unité B56δ de la phosphatase 2A porte un signal d'adressage nucléaire, ce qui expliquerait sa localisation nucléaire. Quand elle est exprimée avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP, elle reste toujours nucléaire, de même pour la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP, avec une distribution nucléaire similaire. Comme les deux protéines sont localisées par défaut dans le noyau, on ignore si l'expression de l'une influencerait la localisation de l'autre.

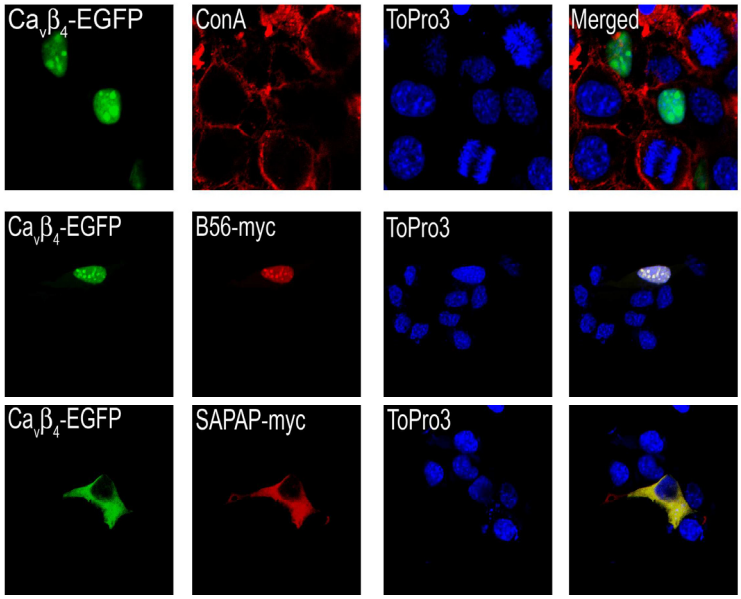
La protéine SAPAP3-myc exprimée seule est localisée dans le cytoplasme. Cette protéine interagit avec les domaines GK des protéines qui constituent le cytosquelette. Quand elle est co-exprimée avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP, elle reste cytoplasmique. Par contre, la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP change de localisation, et elle devient uniquement cytoplasmique. Puisque la sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP interagit avec SAPAP3, cette dernière aurait pour rôle de séquestrer $Ca_v\beta_4$-EGFP dans le cytoplasme.

En ce qui concerne la troisième protéine mKIAA-myc, on n'a pas pu la détecter par immunofluorescence. Il s'agit probablement d'un problème technique, ou plutôt d'un problème d'anticorps qui n'arrive pas à détecter la protéine.

La même étude a été faite avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP, en la co-exprimant avec les deux constructions B56δ-myc ou SAPAP3-myc. Puisque le mutant n'interagit pas avec ces deux protéines, aucun effet n'a été noté sur la distribution, ni du mutant, ni de B56δ-myc et SAPAP3-myc (Figure 24.E).

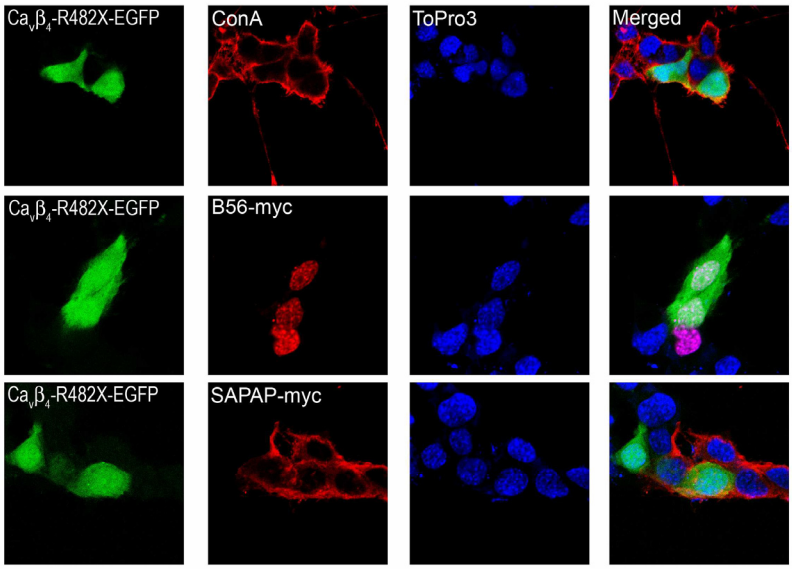
Dans les cellules CHO, on a montré que B56δ interagit avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$, ainsi que les deux protéines sont localisées dans le noyau. Ainsi, on ignore si B56δ est capable d'adresser $Ca_v\beta_4$ dans le noyau. Comme dans les neurones primaires, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène se déplace du cytoplasme vers le noyau durant la différenciation, ce système ne peut pas être utilisé pour confirmer l'influence de B56δ sur la localisation de $Ca_v\beta4$. Pour cela, les cellules NG108.15 constitue le système le plus adapté pour voir cette translocation. En effet, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène est exclusivement cytoplasmique dans les cellules NG108.15 non différenciées (Figure 19.A). La transfection et la sur-expression de la sous-unité B56δ-myc dans ces cellules induit une translocation de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ du cytoplasme vers le noyau (Figure 24.F).

Figure 24-D



(D) Les cellules CHO on été transfectées par $Ca_v\beta_4$-EGFP (en vert) seule ou co-transfectées avec B56δ-myc ou SAPAP3-myc. La couleur rouge (première ligne) s'agit du marquage membranaire. La couleur rouge de la deuxième troisième ligne, s'agit des constructions conjuguées à la séquence myc, détectées par un anticorps anti-myc. Le bleu correspond au marquage nucléaire par le ToPro3.

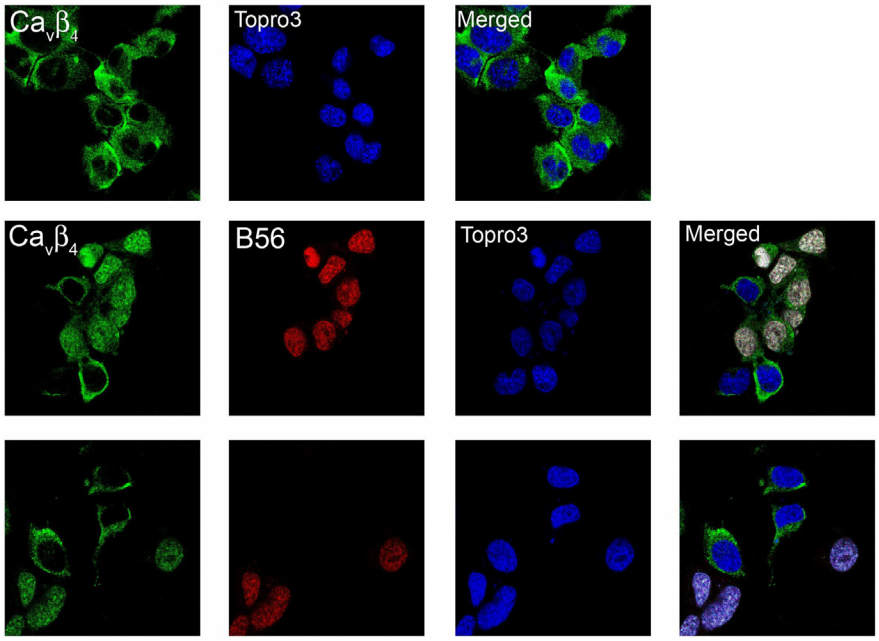
Figure 24-E



(E) Les cellules CHO on été transfectées par $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP (en vert) seule ou co-transfectées avec B56δ-myc ou SAPAP3-myc. La couleur rouge (première ligne) s'agit du marquage membranaire. La couleur rouge de la deuxième troisième ligne, s'agit des

constructions conjuguées à la séquence myc, détectées par un anticorps anti-myc. Le bleu correspond au marquage nucléaire par le ToPro3.

Figure 24-F



(F) Les images confocales montrent des cellules de la lignée cellulaire NG108.15 non différenciées. La couleur verte correspond à la sous-unité Ca$_v$β$_4$ endogène détecté par anti-Ca$_v$β$_4$. La couleur rouge correspond à la construction B56-myc détectée par un anti-myc. Dans les cellules qui expriment la protéine B56, la sous-unité Ca$_v$β$_4$ est localisée dans le noyau.

Parmi les protéines identifiées par le double hybride et capables d'interagir spécifiquement avec la sous-unité Ca$_v$β$_4$ native, et pas avec le mutant R482X, deux semblent être jouer un rôle important dans la localisation et la distribution de la sous-unité Ca$_v$β$_4$ dans les différents compartiments cellulaires. La protéine B56δ est capable d'adresser Ca$_v$β$_4$ dans le noyau, alors que SAPAP3 la recrute dans le cytoplasme. Les résultats primaires d'une étude d'électrophysiologie sur les cellules HEK293 de l'effet ses deux protéines sur le canal Ca$_v$2.1 de type P/Q, montre que B56δ inhiberait l'amplitude du courant alors que SAPAP3 toucherait plutôt les cinétiques d'inactivation. Cela suggère un rôle important de ces deux protéines dans les mécanismes de la

translocation nucléaire de $Ca_v\beta_4$ dans les neurones, ainsi que l'absence des ces interactions dans le cas du mutant humain R482X serait impliqué en partie dans le phénotype épileptique des patients.

L'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ influence l'activité transcriptionnelle des gènes, d'une façon différente que celle de la sous-unité mutante et du control négatif.

Lorsque l'on veut comprendre, comment des cellules « malades » expriment leurs caractéristiques en comparaison de cellules normales, il ne suffit pas d'analyser leurs mutations génétiques. Il faut pouvoir évaluer comment leurs gènes s'expriment dans des conditions pathologiques particulières. Cette « analyse d'expression » passe par l'analyse des transcrits d'ARN d'une cellule ou le « transcriptome ». En effet, les proportions de chaque ARN messager vont influer sur celles des différentes protéines synthétisées et, éventuellement, sur l'apparition d'un phénotype.

Ainsi, on s'est intéressé à comparer les niveaux d'expression des ARN messagers, dans une lignée cellulaire humaine HEK293 transfectée par $Ca_v\beta_4$-EGFP, $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP ou EGFP, dans le but de mettre en évidence des différences qui se révèleront peut-être décisives pour comprendre comment la mutation peut induire ce phénotype épileptique, par le biais d'une perte de localisation nucléaire. Après avoir isolé les cellules transfectées, l'étape suivante consistait à extraire les ARN totaux et à les marquer, avant de les hybrider avec des puces à ADN. Sous contrôle informatique, les signaux produits par l'hybridation sont captés par des scanners et sont interprétés par des logiciels informatiques. Enfin, une analyse statistique est nécessaire afin de préciser le degré de signification des résultats pour chaque gène et de caractériser finement l'expression différentielle des gènes. L'analyse transcriptomique a été réalisée par PartnerChip au CEA/EVRY.

L'ARN total extrait à partir des cellules transfectées par l'EGFP est utilisé comme référence. La qualité des hybridations des puces « Affymetrix » est déterminée par les ratios des intensités de signal des gènes de ménage GADPH et β-actin. Trois hybridations indépendantes (réplicats techniques) sont réalisées à partir de 10 échantillons d'ARN

(échantillons biologiques). Les puces répondent parfaitement aux critères de qualité attendus. L'analyse globale reflète l'homogénéité des réplicats techniques ainsi que la bonne expression du transgène avec un facteur d'induction supérieur à 40.

La première étape de la normalisation des données brutes Affymétrix dite de pre-processing, a pour but d'attribuer une valeur d'expression pour chaque transcrit. L'algorithme qui a été utilisé est le GC-RMA qui permet une normalisation interpuce et intrapuce des intensités en une seule. Les valeurs qui en sortent sont donc directement comparables et utilisables pour des analyses différentielles. Les tests statistiques utilisés sont des t-tests de Student. Les paramètres de filtre définissant les gènes régulés sont : un facteur d'induction de régulation supérieur à deux et une significativité définie par une p-value inférieure à 0.1.

Figure 25-A

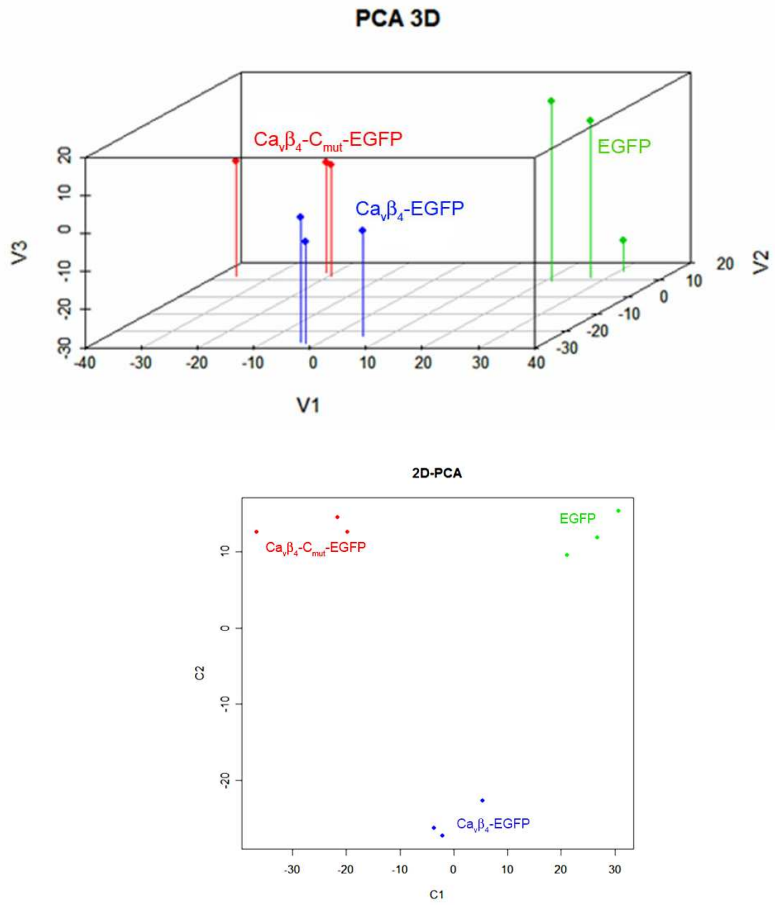
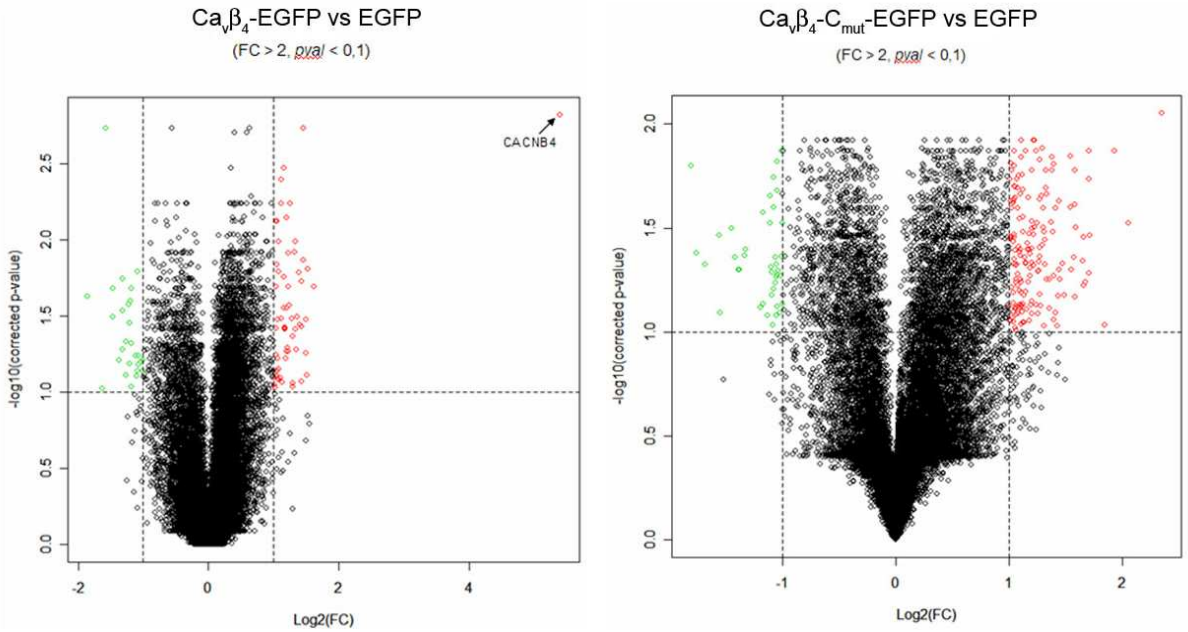


Figure 25-B


Ca$_v$β$_4$-EGFP vs EGFP
(FC > 2, pval < 0,1)
CACNB4
-log10(corrected p-value)
Log2(FC)
Ca$_v$β$_4$-C$_{mut}$-EGFP vs EGFP
(FC > 2, pval < 0,1)
-log10(corrected p-value)
Log2(FC)

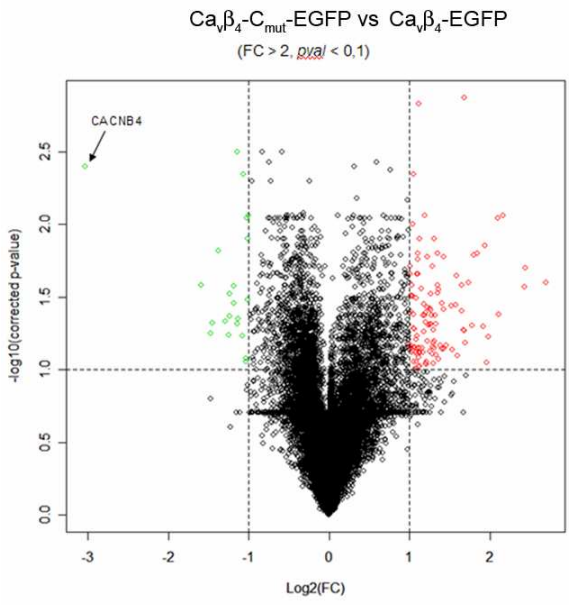

Ca$_v$β$_4$-C$_{mut}$-EGFP vs Ca$_v$β$_4$-EGFP
(FC > 2, pval < 0,1)
CACNB4
-log10(corrected p-value)
Log2(FC)

Figure 25-C

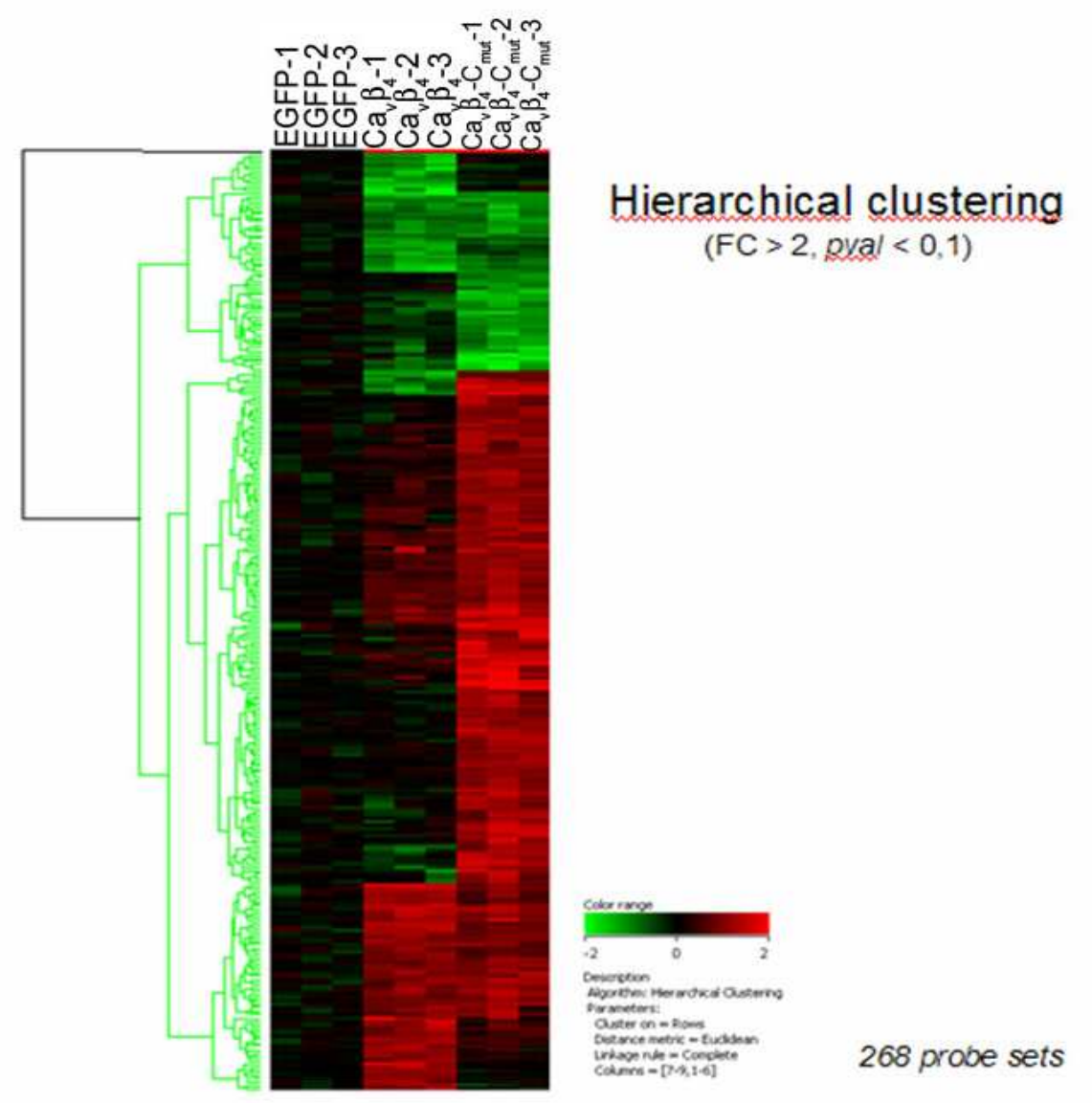


Figure 25 : *Analyses statistiques des puces dans les trois conditions, $Ca_v\beta_4$-EGFP, $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP ou EGFP.*
(A) Représentation de l'ensemble des résultats des hybridations selon la méthode de clustering par analyse de composante principale (APC).
(B) Représentation de l'ensemble des gènes régulés selon une analyse différentielle, par le test statistique « t-test » avec correction de la « p-value ». En rouge sont présentés les gènes up-régulés (UR), en vert les gènes down-régulés (DR).
(C) Représentation de l'ensemble des gènes régulés selon une analyse par clustering hiérarchique : ici sont présentés les 268 transcrits (probe set) régulés dans au moins 1 des 2 comparaisons ($Ca_v\beta_4$-EGFP vs EGFP et $Ca_v\beta_4$-C_{mu}-EGFP vs EGFP).

Dans la figure 25.A, chaque point représente une puce. Le rapprochement des points, reflète l'homogénéité des résultats, pour chaque condition. L'analyse en composantes principales (PCA) est une méthode statistique qui a pour but de comprendre et de visualiser comment les effets de phénomènes *à priori* isolés se combinent. Lorsque l'on ne considère que deux effets, il est usuel de caractériser leurs effets conjoints via le coefficient de corrélation (Figure 25.A PCA 2D). Lorsque l'on se place en dimension deux, les points disponibles tirés suivant la loi conjointe, peuvent être représentés sur un plan (C_1 et C_2). Lorsqu'il y a plus de deux effets, il y a trois coefficients de corrélations à prendre en compte : V_1, V_2 et V_3 (Figure 25.A PCA 3D). L'ACP est un moyen de classifier ces données en amas *(clusters)* corrélés.

Dans la figure 25-B, la valeur « FC » correspond au ratio des intensités $Ca_v\beta_4$-EGFP vs EGFP, $Ca_v\beta_4$-C_{mu}-EGFP vs EGFP ou $Ca_v\beta_4$-C_{mu}-EGFP vs $Ca_v\beta_4$-EGFP, si la valeur est supérieure à 1. Le test statistique (t-test) de Student est appliqué aux données, ainsi pour que ce ratio soit significatif, il faut que la valeur p-value soit inférieure à 0.1. Si le FC est supérieur à 2 et la p-value est inférieure à 0.1, alors le gène est significativement régulé. Cette figure représente les transcrits différentiellement exprimés. La figure 25-C permet de visualiser les modifications d'expression des gènes suivant les trois conditions d'expérimentation.

En faisant une étude comparative entre les gènes différentiellement régulés par le mutant versus $Ca_v\beta_4$ sauvage, on remarque que globalement la mutation supprime une répression transcriptionnelle imposée par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ sauvage sur les gènes. En effet, 22 gènes seulement sont down régulés par l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante couplée à l'EGFP et 114 gènes sont up régulés par $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP versus $Ca_v\beta_4$-EGFP, l'EGFP étant la référence. Ce qui présume que probablement la sous-unité $Ca_v\beta_4$ joue un rôle plutôt dans la répression transcriptionnelle ou le « gene silencing ». Ces résultats sont cohérents avec l'étude de (Hibino et al., 2003)), sur un variant $Ca_v\beta_{4c}$ qui interagit avec une protéine nucléaire, HP1γ et qui joue un rôle dans le « gene silencing ».

L'ensemble des gènes régulés par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ comprend des gènes qui contrôlent le développement neuronal et la migration axonale comme les Rho GTP-ases,

et l'intégrine, et qui contrôlent également l'activité immunitaire, et plusieurs autres voies de signalisation. La classification des gènes régulés est présentée dans la figure 26.A-B.

Parmi les gènes identifiés, un gène nous parait d'une haute importance, celui qui code pour les protéines GTPases RhoA. En effet, les membres de la famille des petites protéine G RhoA ont récemment été impliqués dans la régulation de la morphologie neuronale, dont le développement de la polarité neuronale, la croissance et le guidage axonal, l'élaboration de l'arbre dendritique, la plasticité synaptique.. De plus, les protéines RhoA paraissent impliquées, directement ou indirectement, dans certaines maladies neurologiques telles que le retard mental lié au chromosome X , les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Watabe-Uchida et al., 2006). D'une façon intéressante, l'expression du gène lié au syndrome du retard mental lié au chromosome X est également induite en réponse à la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante versus la native, et est répertorié dans la liste des gènes avec un facteur d'induction de 2.08.

En fait, les protéines RhoA inhibe la croissance des neurites, ainsi une inhibition des GTP-ases RhoA ou de leurs effecteurs, induit une régénération axonale et amélioration fonctionnelle suite aux lésions induites par une crise épileptique. Une surexpression et une activation des protéines RhoA est enregistrée chez les patients atteints des lésions cérébrales et souffrant des crises épileptiques (Brabeck et al., 2004; Dubreuil et al., 2006). Ceci peut expliquer en partie, la relation existante entre l'activation transcriptionnelle de la protéine RhoA, et le phénotype épileptique humain induit par la mutation. On peut donc imaginer que la sous-unité $Ca_v\beta_4$ joue un rôle dans l'inactivation du gène Rho, processus inversé par le mutant $Ca_v\beta_4$-C_{mut} incapable de se localiser dans le noyau.

D'autres gènes, qui possèdent également un rôle important dans la formation des synapses et l'organisation du cytosquelette des neurones, sont aussi différentiellement régulés par le mutant *versus* la protéine native, à l'image de l'intégrine α qui participe à la formation des synapses et au guidage axonal (Pinkstaff et al., 1999) et de la dystonine impliquée dans la neurodégénération (Brown et al., 1995).

Egalement, la distribution fonctionnelle des gènes différentiellement régulés par le mutant vs $Ca_v\beta_4$ montre qu'une grande proportion des transcrits correspond aux gènes associés à la transcription. Cette observation reflète les altérations du processus de la

transcription dues à la distribution subcellulaire du mutant, dont la localisation nucléaire est perturbée.

Figure 26-A

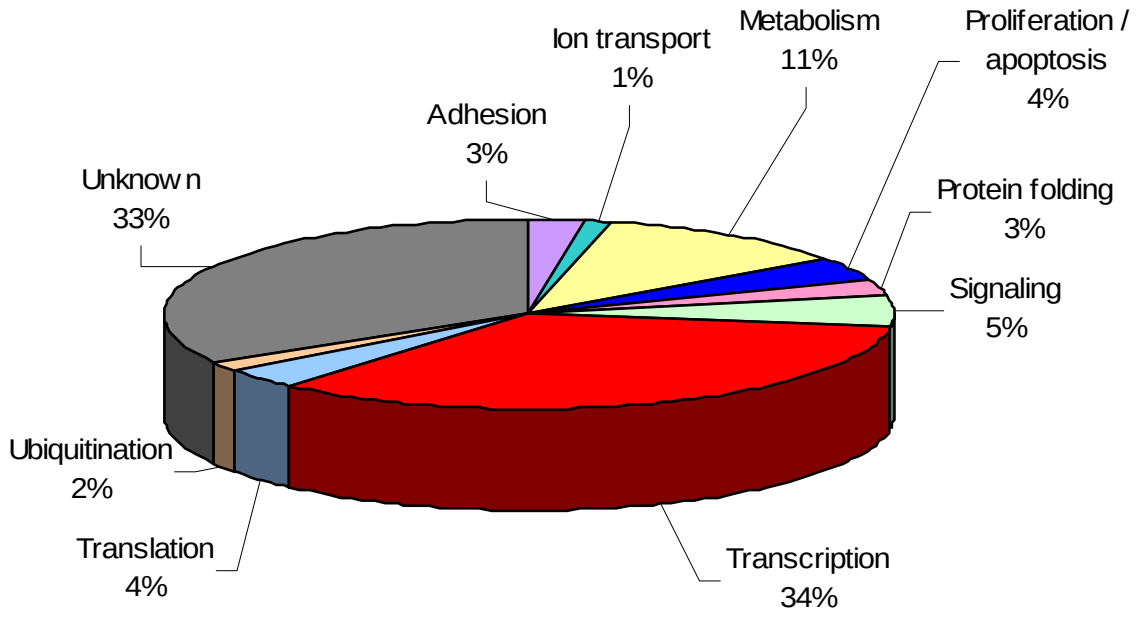


Figure 26-B

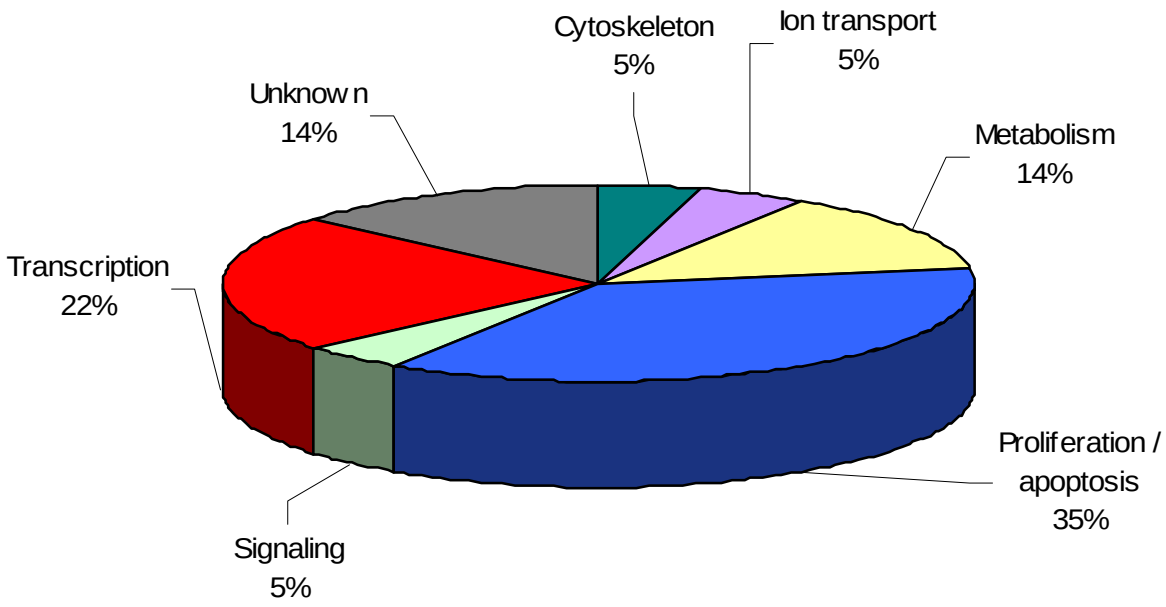
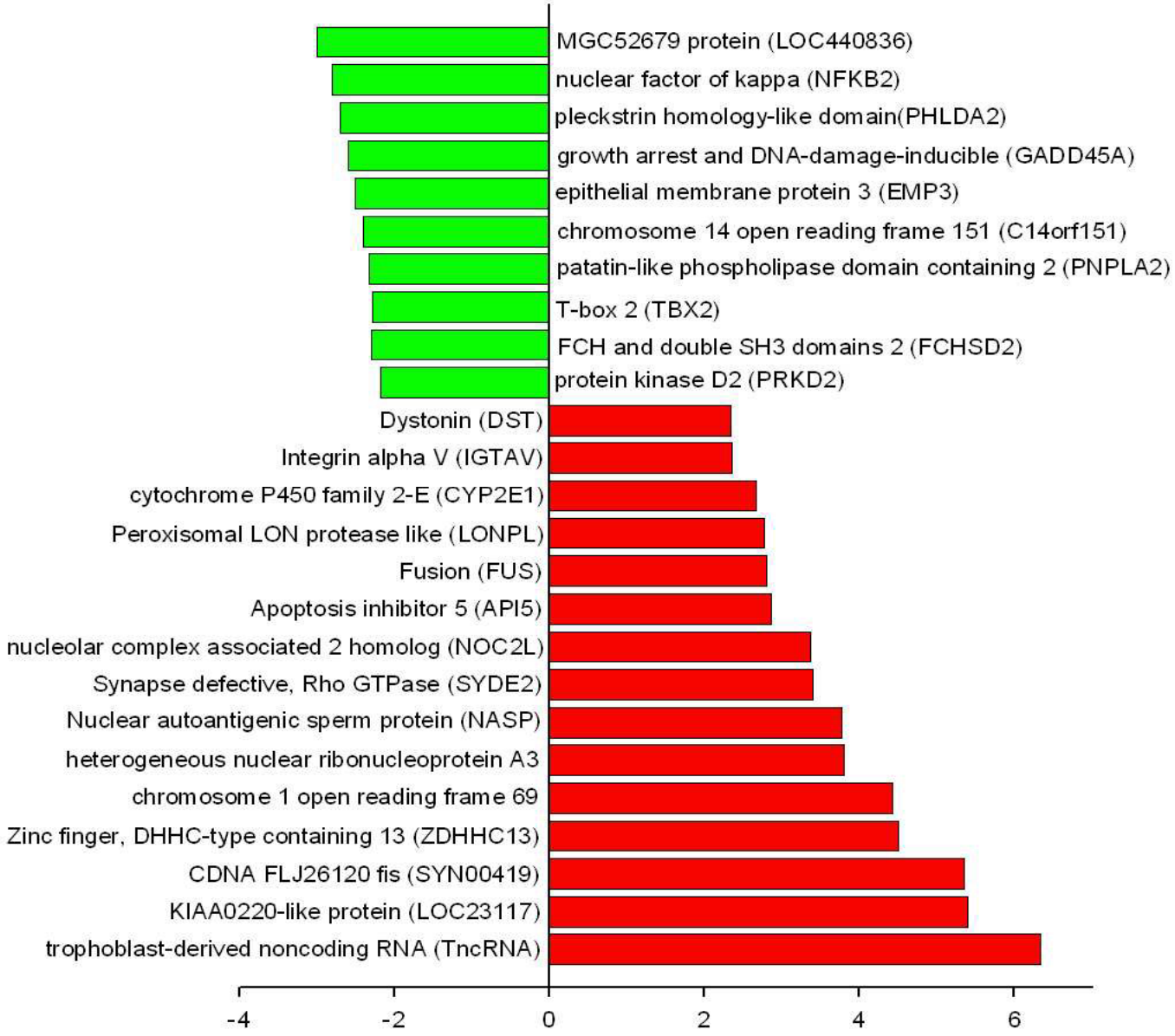


Figure 26-C



.

Figure 26 : *Expression différentielle des gènes régulés par le mutant versus la protéine native.*
Représentation graphique de la distribution fonctionnelle de 114 gènes différentiellement up régulés (A) et de 22 gènes down régulés (B) par le mutant $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP versus $Ca_v\beta_4$-EGFP. (C) Représentation des 25 premiers gènes up régulés (barres rouges) et down régulés (barres vertes) par le mutant versus la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native, en fonction de leur facteur d'induction.

La sous-unité $Ca_v\beta_4$ n'interagit pas avec la protéine nucléaire HP1γ, à l'image du variant $Ca_v\beta_{4c}$ identifié chez le poulet

Un variant de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ a été identifié au niveau de la cochlée du poulet et isolé par criblage des librairies de cDNA de la cochlée et du cerveau de poulet. Ce court isoforme $Ca_v\beta_{4c}$ semble toujours capable d'interagir avec le canal de type P/Q, mais son effet sur le courant est réduit relativement au long isoforme, isolé également au niveau du cerveau de poulet et homologue à la sous-unité $Ca_v\beta_4$ chez l'homme. Ce variant, et non pas le long isoforme, interagit avec une protéine nucléaire, HP1γ pour « heterochromatin proteins ». Ces protéines contiennent un chromo shadow domaine (CSD) et un chromo domaine, essentiel pour la répression transcriptionnelle. En effet, son interaction avec HP1γ relocalise $Ca_v\beta_{4c}$ dans le noyau et induit une inhibition de la répression transcriptionnelle imposée sur les gènes (Hibino et al., 2002).

Cette fonction nucléaire semble en harmonie avec nos résultats du transcriptome sur l'activité répressive imposée par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et renversée par le mutant $Ca_v\beta_4$-C_{mut}. Dans le but de vérifier si cette activité est aussi, dans notre cas, dépendante de l'interaction avec les protéines HP1γ, la distribution de HP1γ en présence de $Ca_v\beta_4$ ou de $Ca_v\beta_4$-C_{mut} a été étudiée. Cette expérience a été faite en collaboration avec l'équipe de F.Lesage. La protéine CHCB2 a été co-transfectée avec $Ca_v\beta_4$-EGFP ou $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP dans la lignée cellulaire MDCK pour Madin-Darby Canine Kidney. Aucune différence remarquable n'a été enregistrée pour la localisation de CHCB2 entre $Ca_v\beta_4$ et $Ca_v\beta_4$-C_{mut}, d'autant plus que HP1γ ne présente pas exactement la même distribution nucléaire que $Ca_v\beta_4$ (Figure 27). Une étude de co-immunoprécipitation a été réalisée pour confirmer qu'il n'existe pas une interaction entre la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et HP1γ.

Donc, à l'image du long isoforme du poulet, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ humaine n'interagit pas avec les protéines HP1γ. Autrement dit, sa localisation nucléaire et son effet sur la transcription doivent être dues à d'autres partenaires protéiques que nous avons recherchés par la technique du double hybride.

Figure 27

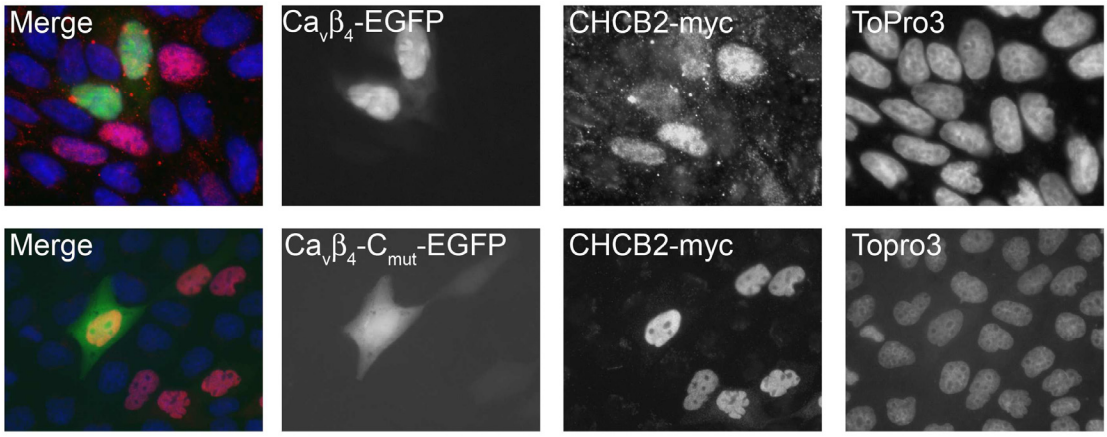


Figure 27 : *Co-transfection de CHCB2 avec $Ca_v\beta_4$-EGFP ou $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP dans la lignée MDCK. La protéine CHCB2 est conjuguée au tag myc et detectée par un anticorps anti-myc. Les noyaux sont marqués par le ToPro3. La superposition des images est réalisée dans Photoshop.*

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude révèle un coté non exploré de la sous-unité $Ca_v\beta$ auxiliaire au canal calcique : les déterminants moléculaires et structuraux qui seront probablement impliqués dans l'épilepsie chez les patients qui portent une mutation sur le gène CACNB4.

Etant donné que l'épilepsie implique essentiellement les neurones du lobe temporal et les structures limbiques, on s'est particulièrement intéressé à étudier les fonctions et la localisation de la sous-unité $Ca_v\beta$ dans les neurones primaires d'hippocampe.

La souris léthargique constitue un modèle naturel d'épilepsie humaine, qui permet d'étudier l'implication de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans cette pathologie neurologique. Dans notre étude, on s'est contenté d'utiliser cette souris, qui présente une déficience dans l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, étant un contrôle négatif pour notre anticorps anti-$Ca_v\beta_4$. Les études immunohistochimiques et biochimiques comparatives entre les souris léthargiques et normales montrent l'absence de l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ uniquement dans la souris léthargique, ce qui confirme la spécificité de l'anticorps.

Dans les neurones d'hippocampe embryonnaire (E18) en culture, une expression différentielle de la sous-unité $Ca_v\beta$ est reportée tout au long de la différenciation neuronale et de la synaptogenèse. Les premiers jours de la culture, une absence d'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est observée. Une expression cytoplasmique exclusive est reportée au $5^{ème}$ jour. Au $9^{ème}$ jour, une translocation nucléaire du cytoplasme vers le noyau a lieu. Au-delà du $11^{ème}$ jour, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ se trouve à une concentration très élevée (80%) dans le noyau par rapport au cytoplasme des neurones d'hippocampe, d'après la quantification des expériences immunocytochimiques. Ce processus est aussi observé dans la lignée cellulaire NG108.15, un système de différenciation neuronale qui mime la formation des synapses, le développement des neurites et l'expression des canaux calciques. En fait, la translocation nucléaire, dans les cellules NG108.15, est dépendante du facteur de différenciation neuronal, l'AMPc. La présence de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène dans le

noyau soulève une interrogation sur les fonctions nucléaires de $Ca_v\beta_4$ et les conditions de cette translocation du cytoplasme vers le noyau.

Afin d'identifier les déterminants de cette translocation, le clonage de différents domaines de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, dans un vecteur exprimant une protéine couplée à la protéine EGFP a été effectué. La sous-unité $Ca_v\beta_4$-EGFP, dans des systèmes d'expression hétérologue, est localisée dans le noyau. Aucun domaine de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ ne contient une séquence d'adressage nucléaire et toute délétion d'un domaine empêche cette localisation nucléaire. Également, la co-expression du canal $Ca_v2.1$ et de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ bloque sa localisation nucléaire. En effet, outre l'interaction AID-$Ca_v\beta$, $Ca_v\beta_4$ et $Ca_v2.1$ entament deux autres interactions secondaires, entre le coté carboxy-terminal de $Ca_v\beta_4$ et les deux extrémités amino-terminale et carboxy-terminale de $Ca_v2.1$ (Walker et al., 1998; Walker et al., 1999). Probablement, toutes ces interactions recruteront les sous-unités $Ca_v\beta_4$ dans le cytoplasme et empêcheront leur localisation nucléaire.

En co-exprimant les deux moitiés de la protéine, Nter-SH3 et GK-Cter, contenant chacune un domaine conservé et un terminal, une sous-unité $Ca_v\beta_4$ fonctionnelle se reconstitue et se localise dans le noyau. Chacune de ces constructions, exprimée seule, est localisée dans le cytoplasme. Ceci présume que cette translocation nucléaire est dépendante de la structure native de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, et que l'interaction SH3/GK est primordiale pour localiser $Ca_v\beta_4$ dans le noyau.

Comme nous étions spécialement intéressés par la mutation humaine de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ qui provoque un phénotype épileptique sévère, une étude comparative, entre la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native et la mutante a été faite.

Effectivement, la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante est touchée. La délétion de 38 acides aminés dans son extrémité carboxy-terminale empêche sa translocation nucléaire, d'un facteur 10, versus la sous-unité $Ca_v\beta_4$ native, dans les neurones d'hippocampe transfectés et également dans d'autres lignées cellulaire. Sachant que, dans les systèmes d'expression hétérologue, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante n'a pas d'effet marquant ni sur les cinétiques du canal calcique ni sur la régulation des protéines G en comparaison avec la sauvage, le phénotype neurologique exprimé chez les patients

portant la mutation peut être en partie lié à l'absence de la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante, voire lié à certaines fonctions nucléaires.

La co-expression des deux constructions, Nter-SH3 et GK-C_{mut}, est incapable de reconstituer une protéine localisée dans le noyau à l'image de la co-expression de Nter-SH3 et GK-Cter. D'après les résultats biochimiques et immunocytochimiques, la mutation dans le coté carboxy-terminal rompt l'interaction SH3/GK, probablement du à une déstructuration du domaine GK, ce qui empêche la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante. Une mutation ponctuelle (L125P) au niveau du domaine SH3 de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ rompt l'interaction intramoléculaire SH3/GK (McGee et al., 2004). La localisation cytoplasmique exclusive de ce mutant confirme l'implication de la SH3/GK dans la translocation nucléaire.

Contrairement à la sous-unité $Ca_v\beta_4$, ce mutant est incapable d'interagir avec la protéine (Dlgap3) de la famille des SAPAPs, constituants principaux de la zone PSD au niveau post-synaptique. Cette protéine interagit avec le domaine GK des protéines MAGUK, dont la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est membre. Probablement faute d'une déstructuration, cette protéine ne reconnaît plus le GK de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante. En effet, la protéine SAPAP3 interagit avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$ et re-localise cette dernière dans le cytoplasme. Les protéines SAPAP sont fortement localisées dans la zone PSD au niveau des dendrites. Notamment, plusieurs études ont localisé la sous-unité $Ca_v\beta_4$ dans les dendrites (Lie et al., 1999; Ludwig et al., 1997). Une interaction entre ses deux protéines influencerait les propriétés biophysiques des canaux calciques et jouerait un rôle dans la formation des synapses ou dans la transmission synaptique. Ainsi, l'absence de l'interaction $Ca_v\beta_4$-R482X et SAPAP3 pourrait perturber les courants calciques au niveau des dendrites ainsi que la transmission synaptique.

Comme la sous-unité $Ca_v\beta_4$ ne possède pas un signal d'adressage nucléaire, cette protéine interagit avec un autre partenaire qui possède cette séquence afin de se localiser dans le noyau. D'après les résultats du double hybride, cette protéine pourrait être la sous-unité régulatrice B de la phosphatase PP2A, B56δ. L'interaction entre cette protéine et la sous-unité $Ca_v\beta_4$ a été confirmée en utilisant des systèmes d'expression hétérologues. De plus, dans les cellules NG108.15 non différenciées où la sous-unité

$Ca_v\beta_4$ est cytoplasmique et exclue du noyau, l'expression de la protéine B56δ re-localise la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène dans le noyau de ces cellules. Par contre, cette protéine n'interagit pas avec $Ca_v\beta_4$-R482X, par la suite elle est incapable d'adresser le mutant vers le noyau. Ce qui expliquerait la localisation cytoplasmique de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante dans les neurones. Notamment, B56δ interagit avec la sous-unité $Ca_v\beta_4$ via le domaine GK. La co-expression de B56δ et le domaine GK de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ induit une redistribution du domaine GK ; exprimé seule, le domaine GK est cytoplasmique alors qu'en présence de B56δ, sa localisation devient diffuse dans le noyau et le cytoplasme.

Afin de vérifier l'effet de la translocation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ sur la régulation transcriptionnelle, une analyse transcriptomique est réalisée. Puisque la sous-unité épileptique est incapable de se localiser dans le noyau, les deux sous-unités montrent un profil de régulation différentiel. Effectivement, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ présente un effet répresseur sur l'expression génique, inversé par l'absence de la localisation nucléaire de la sous-unité épileptique. La transcription de 108 gènes se trouve réprimée par l'expression de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ versus la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante. Parmi les gènes régulés, plusieurs sont impliqués dans le développement neuronal comme les protéines RhoA, la dystonine et l'intégrine, ainsi que dans diverses fonctions cellulaires.

Les protéines Rho, appartenant à la superfamille des petites GTPases Ras, sont impliquées dans la polarité neuronale, la croissance des neurites et la formation du cytosquelette dendritique. Parmi les GTPases, les protéines RhoA ont un effet inhibiteur sur la croissance axonale. Chez l'homme, les protéines RhoA jouent un rôle dans certaines maladies neurologiques telles que le retard mental lié à l'X, dont le gène est également up régulé par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante versus $Ca_v\beta_4$. Elles sont également impliquées dans les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Dans l'hippocampe, une augmentation d'expression et d'activité de la protéine RhoA est enregistrée dans le cas des crises épileptiques et en réponse à des lésions cérébrales.

Ainsi, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ serait probablement impliquée dans la répression de l'activité transcriptionnelle, à l'image du variant $Ca_v\beta_{4c}$ identifié chez le poulet, mais sans

engager une interaction avec la protéine nucléaire HP1γ. Par contre, le mutant humain de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, inverse cette activité en raison de sa localisation cytoplasmique dans les neurones. Ainsi, le gène RhoA, réprimé par $Ca_v\beta_4$, est activé dans le cas de la mutation et donc son expression serait impliquée dans le phénotype épileptique des patients.

Outre son phénotype épileptique, la souris léthargique montre également des anomalies au niveau du système immunitaire et des problèmes de fertilité. Dans la liste des gènes régulés par la sous-unité $Ca_v\beta_4$, on trouve le gène TncRNA pour « trophoblast-derived non coding RNA ». En fait, la séquence d'acide ribonucléotide exprimé par le gène TncRNA au niveau du trophoblaste réprime l'activité du gène exprimant le complexe majeur d'histocompatibilité (Peyman, 1999). D'après une étude récente, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ semble être indispensable pour les fonctions des lymphocytes T, et son absence altère la production des cytokines (Badou et al., 2006).

Egalement parmi ces gènes, deux sont impliqués dans des activités spermatiques. Ce qui pourrait expliquer la fertilité réduite des souris léthargiques. Des études plus approfondies seront nécessaires afin d'étudier la lien entre la régulation génique et, les déficiences immunologiques et la réduction de fertilité.

En effet, un deuxième mutant (C104F) de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ a été identifié chez des patients qui présentent également des épilepsies et des ataxies. La mutation C104F est localisée au sein du domaine SH3 de la sous-unité $Ca_v\beta_4$, et ceci soulève une interrogation sur l'effet de cette mutation sur l'interaction SH3/GK, essentielle aux fonctions des sous-unités $Ca_v\beta$ et évidemment à sa localisation nucléaire. Dans ce contexte, j'ai regardé la localisation de ce mutant dans les cellules CHO, afin de la comparer à la sous-unité native $Ca_v\beta_4$ ainsi qu'à la mutation R482X. Effectivement, la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$-C104F-EGFP est touchée. La mutation C104F prévient la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ d'un facteur 2, mais d'une façon beaucoup moins prononcée que la mutation R482X. En effet, les études biochimiques montrent que l'interaction SH3/GK n'est pas touchée dans le cas de la mutation C104F du domaine SH3.

En conclusion, la sous-unité $Ca_v\beta_4$, identifiée comme étant une protéine régulatrice du complexe calcique, possède d'autres fonctions probablement indépendantes de la sous-unité Ca_v. Dans les neurones d'hippocampe, la sous-unité $Ca_v\beta_4$ est transloquée du cytoplasme vers le noyau durant le développement neuronal et la synaptogenèse, et en réponse à des facteurs de différenciation neuronale. La translocation nucléaire est probablement assurée, par la protéine B56 qui porte un signal de localisation nucléaire et dont le rôle est de re-localiser ses partenaires dans le noyau. La localisation nucléaire dans le noyau a pour rôle de réprimer l'activité transcriptionnelle de certains gènes. Des patients, souffrant d'une épilepsie myoclonique juvénile ou des ataxies convulsives, portent des mutations sur la sous-unité $Ca_v\beta_4$. Ce phénotype épileptique pourrait être lié en partie à l'absence de la localisation nucléaire de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ mutante, incapable d'interagir certaines protéines comme B56. En conséquence, les gènes normalement réprimés par la sous-unité $Ca_v\beta_4$ nucléaire, seront activés dans le cas de la $Ca_v\beta_4$ mutante, comme par exemple, le gène codant pour les protéines Rho impliquées dans les maladies neurodégénératives et épileptiques.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Biologie moléculaire

Les constructions sont préparées à partir d'un plasmide codant pour une protéine chimère $Ca_v\beta_4$-GFP (green fluorescent protein). L'objectif de ces constructions est de sous cloner les différents domaines de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (L02315) dans le vecteur pEGFP-N1 (4.7Kb) de Clontech. Les inserts sont amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) en utilisant des amorces spécifiques pour chaque construction.

Les amorces correspondant à chaque construction sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Insert	Amorce Sens
	Amorce Anti-sens
GK-Cter	5'-ACCCAAGCTTACCATGGCAAAACAGAAGCAGAAAGTGACGGAGCAC-3'
	5'-CGGGGTACCGTAAGCCTATGTCGGGAGTCATGGCTGCATCCCCCA-3'
SH3-HOOK-GK	5'-ACCCAAGCTTACCATGGAAGAGGACCGGGAAGCGATTCGGCAAGA-3'
	5'-CGGGGTACCGTGGTGGCACGCCAATATGCCTCCAGGTACT-3'
Nter-SH3	5'-ACCCAAGCTTACCATGTCGTCCTCCTACGCCAAGAACGGGGCGGCGGA-3'
	5'-CGGGGTACCGTTTTCTGTTCCTGTTGAATCCGTATGTTCTCCAA-3'
SH3-HOOK	5'-ACCCAAGCTTACCATGGAAGAGGACCGGGAAGCGATTCGGCAAGA-3'
	5'-CGGGGTACCGTTGGCACAACATCATACGGAGGAATGTGCTCCGT-3'
GK	5'-ACCCCAGCTTACCATGGTGCCATCAATGCGTCCTGTGGT
	5'-CGGGGTACCGTGGTGGCACGCCAATATGCCTCCAGGTACT-3'
C-ter	5'-ACCCAAGCTTACCATGGCCACCCACACAAGCAGTAGCACCCCTATG-3'
	5'-CGGGGTACCGTAAGCCTATGTCGGGAGTCATGGCTGCATCCCCCA-3'
N-ter	5'-ACCCAAGCTTACCATGTCGTCCTCCTACGCCAAGAACGGGGCGGCGGA-3'
	5'-CGGGGTACCGTTTTGGACTTCGCTCTCTCAAGCTGGATAGCT-3'
Mutant	5'-ACCCAAGCTTACCATGTCGTCCTCCTACGCCAAGAACGGGGCGGCGGA-3'
	5'-CGGGGTACCGTTCGGCTGTGCTGGGAGCTGGAGGACAAG-3'

La PCR a été réalisée suivant le protocole du « HotStar HiFidelity Polymerase Kit » de Qiagen.

$[ADNc]_f$	3 ng
$[dNTP]_f$	250 µM
$[Amorce\ sens]_f$	1 µM
$[Amorce\ antisens]_f$	1 µM
$[MgCl_2]_f$	100 µM
$[Taq]_f$	0.1 µl
$[H_2O]_f$	QSP 20 µl

La température d'hybridation (T°C) dépend des propriétés intrinsèques des amorces.
Le programme appliqué du thermocycleur (Stratagene) est le suivant :

Nombre de cycle	Action – Durée	Température
1 cycle	Dénaturation – 15 min	95°C
35 cycles	Dénaturation – 45 secs Hybridation – 45 secs Elongation – 90 secs	95°C T°C 72°C
1 cycle	Terminaison – 10 min	72°C

Après migration sur gel d'agarose et vérification de la taille de la séquence amplifiée, la bande est coupée et l'insert est extrait sur colonne utilisant le « QIAquick Gel Extraction Kit » de Qiagen.

Les produits de PCR, autrement dit l'insert, ainsi que le vecteur pEGFP-N1 sont digérés par les deux enzymes KpnI et HindIII (Fermentas) et ensuite purifiés sur colonne. La ligation est faite selon le protocole du « Rapid Kit Ligation » de Roche. Cette ligation va être utilisée pour transformer les bactéries XL10-Gold, des bactéries ultracompétentes commercialisées par Stratagene, en suivant le protocole donné dans le kit.

A partir des clones positifs produisant le vecteur d'intérêt, des grandes quantités d'ADN sont préparées en utilisant le «Qiagen Maxi-Prep kit ». La quantité d'ADN purifiée est estimée sur gel d'agarose et dosée par spectrophotométrie.

Mutagenèse dirigée

Les mutations ont été insérées sur le cDNA de la sous-unité $Ca_v\beta_4$ (L02315) sous-clonée dans le vecteur pEGFP-N1 (Promega). Les amorces correspondant à chaque mutant sont répertoriées dans le tableau ci-dessous. L'introduction de certains sites de restriction a été effectuée utilisant le logiciel WatCut (http//:watcut.waterloo.ca).

Mutant	Amorce sens
	Amorce anti-sens
C104F	AAAACGAATGTGAGCTACTTTGGTGCCCTGGATGAGGATGTG
	CACATCCTCATCCAGGGCACCAAAGTAGCTCACATTCGTTTT
L125P	GACGCCAAGGACTTTCCTCACATTAAAGAG
	CTCTTTAATGTGAGGAAAGTCCTTGGCGTC

Le protocole et les solutions utilisées pour la réaction d'amplification, la digestion du plasmide natif, ainsi que les bactéries compétentes (XL-10 Gold) sont fournis dans le QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Le criblage des clones mutés est fait par digestion enzymatique et par séquençage après avoir purifié une petite quantité du plasmide par «Qiagen Mini-Prep kit». Des grandes quantités du plasmide muté sont ensuite préparées en utilisant le «Qiagen Maxi-Prep kit ».

La lignée des souris

Les souris léthargiques (B6EiC3H-a/A-lh) homozygotes désignées par (*Cacnb4*$^{lh/lh}$) et les souris non léthargiques hétérozygotes, issues de la même lignée, désignées par (*Cacnb4*$^{lh/-}$) ont été achetées auprès de « The Jackson Laboratery » (Bar Harbor, ME). La lignée est maintenue en croisant le male homozygote (*lh/lh*) avec la femelle hétérozygote (*lh/-*) afin de produire 50% de souris homozygotes (*lh/lh*) dans la

progéniture, sachant que les femelles léthargiques homozygotes sont moins fertiles que les femelles hétérozygotes. Au 14ème jour de la naissance, les souris homozygotes sont distinguées, de leur génération hétérozygote normale, par leur phénotype ataxique.

Culture des lignées cellulaires

Les cellules HEK293 et CHO sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de Gibco contenant 10% du sérum et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Le milieu est changé tous les deux jours, et les cellules sont repiquées à 5% toutes les semaines.

La lignée NG108.15 est maintenue en culture dans un milieu DMEM avec 10% de sérum de veau foetal et 1% d'antibiotiques, et supplémenté avec 1/50 du Hypoxantine-Aminoptérine-Thymidine (HAT) de Eurobio. La différenciation des cellules NG108.15 est induite tout en diminuant la quantité du sérum dans le milieu de 10% à 1%, ainsi que par l'ajout de 1 mM de dibutyril-AMPc (Sigma, St louis, MO).

Culture primaire des cellules d'hippocampes embryonnaires

Les lamelles couvertes par la poly-lysine (Sigma), sont bien rincées avec de l'eau stérile, et ensuite incubée avec le milieu d'incubation. Il s'agit d'un milieu DMEM (Gibco) avec du sérum de veau feotal 10%. Par contre, le milieu d'entretien consiste du milieu DMEM supplémenté avec du B27 et du N2 (Gibco) avec 1% d'antibiotiques.

Après la dissection des embryons de souris au 18ème jour, les hippocampes sont incubés pour 20 min à 37°C dans des tubes contenant de la trypsine-EDTA 1X dans du Hank's BSS (Borate saline solution) 1X (Gibco). Cette incubation est une digestion enzymatique des tissus des hippocampes, suivie par une dissociation mécanique (à l'aide d'une pipette pasteur) dans du BSS 1X, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Les cellules dissociées sont étalées dans les boites contenant les lamelles et le milieu d'incubation pour deux heures, avant de remplacer le milieu d'incubation par le milieu d'entretien.

Transfections cellulaires

La transfection des lignées cellulaires est réalisée en utilisant la solution JetPEI qui forme un complexe avec l'ADN et permet donc la pénétration du complexe à l'intérieur des cellules. Le protocole est fourni avec le kit PolyPlus - JetPEI de Qbiogene.
La transfection des neurones d'hippocampe est beaucoup plus délicate.
Les solutions stocks utilisées sont les suivantes :

NMEM-B27 (pH 7.8)

MEM (4°C)	1X
Sodium Pyruvate	1 mM
HEPES	15 mM
Glutamax	2 mM
B27	1X
D-glucose	10 mM

Tampon de transfection 2XBBS

50 mM BES (Sigma)
1.5 mM Na_2HPO_4
280 mM NaCl

Tampon de lavage (pH7.3)

NaCl	135 mM
HEPES	20 mM
KCl	4 mM
Na_2HPO_4	1 mM
$CaCl_2$	2 mM
$MgCl_2$	1 mM
D-Glucose	10 mM

La transfection est réalisée au 9ème jour de culture dans des boites B35. Le milieu de culture de neurones est remplacé par 2 ml du milieu de transfection NMEM-B27 et conservé à 37°C pour un usage ultérieur. 3 µg d'ADN sont mélangés avec une solution de $CaCl_2$ (250 mM) pour obtenir un volume total de 60 µl. Ensuite, 60 µl de 2XBBS y sont

ajoutés et mélangés délicatement. Ce complexe est déposé immédiatement goutte à goutte sur les neurones. Une incubation sans CO_2 pendant 1 heure 45 min à 37°C, en présence du complexe est indispensable pour assurer la bonne transfection des neurones. Les cellules sont ensuite lavées avec le tampon de lavage préchauffé, avant de remettre l'ancien milieu de culture complété par un milieu neuf.

Immunocytochimie des cultures cellulaires

Ce protocole est appliqué pour l'immunomarquage des cultures primaires d'hippocampe ainsi que pour les cellules transfectées par des vecteurs exprimant la EGFP.

Après avoir lavé avec du tampon phosphate PBS (invitrogen), les cellules sont fixées avec une solution paraformaldhéyde (PFA) 4% dans du PBS pendant 10 à 15 min. Pour marquer la membrane cytoplasmique, la concanavaline conjuguée à la Rhodamine (1:1000 AbCys) est ajoutée pendant 3-5 min, après lavage avec du PBS. Le triton 0.1X/PBS est ensuite utilisé pour perméabiliser la membrane durant 5 min.

Pour visualiser la sous-unité $Ca_v\beta_4$ endogène dans les neurones, un anticorps de chèvre (1:500) dirigé contre les derniers 14 acides aminés du coté carboxyterminal de la protéine (Goat Anti-CACNB4 - Everst Biotech) est ainsi ajouté pendant 1 heure, bien après avoir saturé les sites non spécifiques avec du 1X BSA dans du PBS. L'anticorps secondaire est un anti-chèvre couplé au fluochrome Alexa-488 (Molecular Probes).

Après un lavage avec du PBS, le ToPro3 (1 :1000, Molecular Probes) est ajouté pour marquer le noyau. Après 20 min, le milieu de montage (Vectashield – AbCys) est ajouté avant l'application de la lamelle.

Pour visualiser la protéine chimère contenant le domaine GK-Cter fusionné avec un domaine myc, un anticorps primaire anti-myc biotine (Santa Cruz) suivi par la Cy3-strepatavidine (Amersham).

Immunohistochimie des coupes d'hippocampe

Les coupes sont réalisées sur des souris léthargiques lh/lh adultes (B6EiC3S5n a/A-Cacnab4<lh>/3, Jackson Laboratory) et des souris contrôles.

Sous anesthésie générale, une injection ventriculaire continue d'une solution héparine est réalisée afin d'évacuer le sang et laver le système vasculaire cérébrale. Une injection de paraformaldhéyde 4% est réalisée ensuite afin de fixer les tissues. Les cerveaux sont ensuite disséqués et incubés une heure dans une solution de cryoprotection, constitué du sucrose 15% dans du PBS, avant de les couvrir par le milieu Tissue-Tek (Torrance, CA), un gel qui protège contre la dessication pendant la congélation. Des coupes coronales de cerveau de 200 µm d'épaisseur sont préparées par un cryostat.

Après une réhydratation dans une solution Triton 0.1X/ PBS, les coupes sont saturées par une solution 3% du BSA dans PBS pour une trentaine de minute. Une incubation sur la nuit est effectuée avec les anticorps primaires : l'anti-$Ca_v\beta_4$ (1:100, Everst Biotech) et le NeuN, un anticorps contre les noyaux neuronaux (1 :100, Chemicon) à -4°C. Les coupes sont ensuite lavées par une solution Triton 0.1X/PBS, 3 fois 5 minutes chacune. Les anticorps secondaires, respectivement conjugués à l'Alexa Fluor 488 et l'Alexa Fluor 546, sont incubés pendant deux heures à température ambiante. Les coupes sont lavées et le milieu de montage (Vectashield) est ensuite ajouté. Les images sont acquises par un microscope confocal (TCS-SP2) et sont superposées dans Photoshop Professionel.

Fractionnement subcellulaire

Deux jours après la transfection par les constructions fusionnées à la EGFP, les cellules sont culottées et reprises dans le tampon de lyse pendant 20 min sur la glace. Le tampon de lyse est constitué de 10 mM Tris, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0,5% Triton dans du PBS avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche). Afin de dissocier le culot et lyser les cellules, il faut pipeter plusieurs fois avec une seringue (25 gauge). Une centrifugation 5 minutes à 2000 rpm permet la séparation de l'extrait cytosolique (le surnageant) des noyaux (le culot). Les culots sont repris dans du tampon de lyse. Tous les échantillons sont soniqués et sont dosés par spectrophotométrie, selon la méthode de Bradford.

Préparation d'homogénat protéique à partir du cerveau

Les cerveaux des souris adultes léthargiques et contrôles sont extraits et les hippocampes sont disséqués. Ces derniers sont découpés en petit morceaux et repris dans un tampon de lyse constitué de 20 mM Tris/HCl, 10% glycérol, 10 mM $MgCl_2$, 300 Unité/ml DNaseI, 0.32 M sucrose et des inhibiteurs de protéase (Roche). Après une heure d'incubation sur glace, les tissus sont broyés à l'aide d'un piston (potter) durant au moins 5 minutes. Ensuite, les tissus broyés sont pipetés 25 fois avec une seringue (23 gauge), et 25 fois avec une seringue (25 gauge), avant de les passer à la sonication. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 30 minutes à 1000 g, puis le surnageant contenant les protéines est récupérée. La concentration est estimée par spectrophotométrie, selon la méthode de Bradford.

Immunoprécipitation

Après extraction protéique à partir des cellules transfectées par les constructions exprimant des protéines conjuguées à la séquence « myc », 500 µg d'extrait protéique total sont incubés, pendant une heure à température ambiante, avec 20 µg d'anticorps anti-myc couplé à la biotine (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Le complexe est ensuite immobilisé sur des billes magnétiques couplées à la streptavidine (Dynabeads® Streptavidin M-280) saturées, pendant une heure, par du 1% BSA diluée dans du PBS. L'incubation du complexe avec les billes se fait à température ambiante sous agitation pendant une heure. Pour éliminer les liaisons non spécifiques, les billes sont lavées 3 fois avec du PBS. Les protéines sont éluées par une solution dénaturante (SDS 2%, 1,2 M Tris-Cl pH 6.8, glycérol 40%, β mercapto-éthanol 20% et bleu de bromophénol) et les échantillons sont chauffés à l'eau bouillante pour 5 minutes.

Western Blotting

Une quantité de protéine égale est déposée, pour chaque échantillon, sur le gel. Le gel SDS-PAGE utilisé pour faire migrer et séparer les protéines consiste d'un gel de séparation 12% et un gel de concentration 4%.

Gel séparation 12%	Gel concentration 4%	Tampon de migration
Tris pH 8.9	Tris pH6.8	Tris-Glycine (TG) 1X
Acryl-Bis	Acryl-Bis	SDS 1%
SDS 10%	SDS 10%	H_2O qsp 1L
PSA	PSA	
TEMED	TEMED	
H_2O qsp 7 ml	H_2O qsp 4 ml	

Une heure est suffisante pour assurer le transfert du gel vers la membrane Wattman, dans un tampon de transfert (SDS 0.025%, TG 1X, Méthanol 20%).
La membrane est bloquée pendant une heure par une solution de lait 10% dans du PBS/Tween 0.1%.

En ce qui concerne le « western blotting » des protéines extraites par fractionnement cellulaire, une première incubation de la membrane, d'une heure avec l'anticorps anti-GFP souris (1:300, Santa Cruz), est suivie d'une deuxième avec l'anti-souris conjugué à l'HRP (Horseradish Peroxydase, 1 :10000, Molecular Probes), juste avant la révélation.

Par contre, pour le western après extraction des protéines tissulaires, une heure d'incubation avec l'anti-$Ca_v\beta_4$ chèvre (1:1000) (Goat Anti-CACNB4 - Everst Biotech) est suivie par une heure d'incubation avec l'anti-chèvre couplé à l'HRP (1:10000, Molecular Probes).

Marquage métabolique (pulse chase) et immunoprécipitation

Le marquage métabolique de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ a été réalisé dans le but de suivre sa dégradation protéolytique endogène.

Les cellules HEK296 sont transfectées par les ADNc codant pour la sous-unité $Ca_v\beta_3$, au moment où elles atteignent une confluence de 40% dans les boites (6 cm de diamètre). 24 heures après la transfection, le milieu de culture est remplacé par un milieu qui manque la méthionine et la cystéine (methionine and cysteine-free DMEM – Sigma), supplémenté par 5% de sérum. C'est la période d'épuisement « starvation period » qui consiste en 30 min d'incubation à 37°C. Le marquage est induit par l'ajout de 500 µCi de

[^{35}S]-L-méthionine et 2 mM L-cystéine pendant 40 min à 37°C. Pour éliminer la radioactivité du milieu, les boites sont lavées avec du PBS avant de rajouter le milieu de culture normal (DMEM + 10% SVF). Après 24 hrs de marquage, les cellules sont lavées et récoltées dans du PBS. Après 5 min de centrifugation à 1000 rpm, le culot cellulaire est lysé par 1 ml de PBS supplémenté avec 0.5% triton X-100 avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche). Le lysat est soniqué et centrifugé 15 min à 221 g pour éliminer la membrane et les débris cellulaires. Le surnageant est gardé pour l'immunoprécipitation.

200 µg de protéines sont incubés pendant 1 heure avec un IgG polyclonal anti-$Ca_v\beta_3$ dirigé contre la totalité de la séquence de la sous-unité $Ca_v\beta_3$. Par la suite, le complexe $Ca_v\beta_3$-IgG est immobilisé sur les billes de sépharose couplées à la protéine A. Les protéines éluées sont chargées et séparées sur gel SDS-PAGE de 12%. Ce gel est fixé pendant 30 min avec une solution de méthanol 50% et d'acide acétique 10%, suivi par un traitement par une solution 10% de glycérol pendant 30 min. Les bandes radioactives sont révélées par une autoradiographie de 24 hrs.

Préparation des ARN pour analyse transcriptomique

L'étude du transcriptome consiste de quatre conditions : $Ca_v\beta_4$-EGFP, $Ca_v\beta_4$-C_{mut}-EGFP, GK-EGFP et GFP ; GK-EGFP et EGFP étant les deux contrôles de référence par rapport à $Ca_v\beta_4$ WT et mutant.

10 boites de culture 10 cm de diamètre ont été utilisées pour chaque condition. Les cellules HEK293 sont transfectées à une confluence de 50% par les cDNAs exprimant WT $Ca_v\beta_4$-EGFP, Mut $Ca_v\beta_4$-EGFP, GK-EGFP et EGFP. Après 2 jours de transfection, les cellules sont lavées et reprises dans du PBS contenant des inhibiteurs de protéases. Les cellules sont filtrées, pour éviter les amas cellulaires juste avant de les passer au FACS (fluorescence-activated cell sorting). Au moins 6.10^6 cellules exprimant la EGFP ou la protéine d'intérêt couplée à la EGFP sont triées et séparées pour extraction d'ARN. L'ARN total est isolé en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen) et élué dans 30 µl dans de l'eau RNase-free. L'ARN a été analysé par gel électrophorèse pour vérifier la présence des 2 bandes ribosomales 28S et 18S et par spectrophotométrie pour évaluer la pureté et la concentration. La quantité moyenne d'ARN total extraite pour chaque condition est autour de 90 µg.

Transcriptome

L'analyse transcriptomique est réalisée en collaboration avec PartnerChip (Evry-France) en utilisant des puces commercialisées par Affymetrix (GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array). Presque 15 µg d'ARN total est utilisé pour chaque puce et 3 puces pour chaque condition. Les ARN complémentaires (cRNA) sont préparés suivant le protocole fourni par Affymetrix. En effet, une transcription inverse est effectuée à partir de l'ARN total afin de générer des cDNA double brin, en utilisant une amorce T7-oligo (DT) et la transcriptase Superscript II Reverse. Une transcription *in vitro* a été ensuite réalisée en présence de la polymérase T7 RNA et des nucléotides biotinylés afin d'amplifier et de marquer l'ARN complémentaire (cRNA). Finalement, 20 µg du cRNA sont fragmentés, par voie chimique, en moins de 200 fragments nucléotidiques qui seront hybridés, sur la nuit, avec les puces Affymetrix U133 Plus 2.0. La procédure des lavages et du marquage avec la streptavidine-phycoerythrine (SAPE) est réalisée avec « Affymetrix Fluidics Station 450 » et les puces sont finalement scannées par « Affymetrix Genechip Scanner 3000 ».

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le logiciel Bioconductor (http://bioconductor.org) qui permet de vérifier la qualité des hybridations et de traiter les données statistiques. Les étapes suivantes, le prétraitement et la normalisation, sont évaluées par l'algorithme GC-RMA. L'analyse de la principale composante (PCA) est utilisée afin de visualiser la variabilité biologique et technique entre les échantillons, en appliquant le Test t de Student.

Afin d'identifier significativement les transcrits régulés, deux paramètres de filtrage ont été fixés : un facteur de régulation supérieur à 2 et une significativité (p-value) inférieure à 0.1. La procédure Benjamini-Hocheberg (Benjamini and Hochberg, J R Stat Soc B, 1995) est utilisée pour ajuster la p-value et donc pour contrôler les proportions prévues des valeurs faux-positives (FDR pour False Discovery Rate). Les graphiques PCA et Volcano sont générés par le logiciel Bioconductor, tandis que l'anayse hiérarchique par amas (hierarchical clustering analysis) par le logiciel ArrayAssist (Affymetrix).

Criblage par la technique du double hybride

La sous-unité $Ca_v\beta_4$ (L02315) et son mutant R482X, sous clonés dans le vecteur pGBK-T7, ont été utilisés comme appât afin de cribler une banque du cerveau de souris pACT2, dans les levures AH109 (Clontech). Après transformation, les bactéries ont été étalées sur un milieu synthétique pourvu d'adénine, histidine, leucine et tryptophane. Le test de l'activité de l'enzyme β-galactosidase a été réalisé sur les colonies His^+. Parmi les bactéries transformées, 15 sont $LacZ^+$ pour la $Ca_v\beta_4$ WT. Les 15 clones criblés par $Ca_v\beta_4$ sont ensuite testés avec le mutant R482X/pGBK-T7. Uniquement 12 clones interagissent avec le mutant R482X.

Les enregistrements éléctrophyisologiques

Les courants calciques globaux sont enregistrés, selon la technique patch-clamp, en configuration cellule entière et sont ensuite analysés par le logiciel Biopatch (BioLogic, France). Les pipettes en verre utilisées sont du type Corning # 7052 (Gardner Glass, Co., CA). La résistance des pipettes est entre 5 et 7MΩ. Les courant sont amplifiés par Axopatch 200B amplifier (axon Instruments).

Les courant K^+ sont bloqués par le milieu interne de la pipette constitué (en mM) : CsCl 110, HEPES 10, $MgCl_2$ 5, EGTA 10, Na-ATP 4 et Na-GTP 0.1, pH 7.2 (ajusté avec CsOH). Le milieu externe consiste en (mM) : $BaCl_2$ 10, TEA-Cl 125, HEPES 10, glucose 15, pH 7.2.

ANNEXE I

ANNEXE I

European Journal of Neuroscience, Vol. 23, pp. 2311–2320, 2006

Two PEST-like motifs regulate $Ca2^{+}$/calpain-mediated cleavage of the $Ca_V\beta_3$ subunit and provide important determinants for neuronal Ca^{2+} channel activity

Alejandro Sandoval[1,2,*], Norma Oviedo[1,3,*], Abir Tadmouri[4], Traudy Avila[1], Michel De Waard[4] and Ricardo Felix[5]

*A.S. and N.O. contributed equally to this work.
[1]Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic
Institute (Cinvestav-IPN), Mexico City, Mexico
[2]School of Medicine FES Iztacala and
[3]Department of Molecular Biology and Biotechnology, Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico,
Mexico City, Mexico
[4]INSERM U607/DRDC, Commissariat à l'énergie atomique, Grenoble, Cedex, France
[5]Departamento de Biologia Celular, Cinvestav-IPN, Avenida IPN 2508, Colonia Zacatenco, México D.F., CP 07300

Keywords: β subunit, Ca^{2+} channels, calpain, human embryonic kidney-293 cells, membrane-associated guanylate kinase proteins, PEST sequences

INTRODUCTION

La modélisation de la structure cristallographique de la sous-unité $Ca_v\beta$ révèle une homologie avec les protéines de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK). Cette structure propose cinq domaines dont deux sont assez conservés parmi les isoformes de $Ca_v\beta$, le domaine type 3 src-homology (SH3) et le domaine guanylate kinase (GK). Ces deux domaines sont indispensables pour reconstituer une régulation complète de la sous-unité Ca_v, la sous-unité principale du canal, par les $Ca_v\beta$. Des études ont montré l'implication du carboxy terminus des sous-unités $Ca_v\beta$ dans l'adressage membranaire alors que l'amino terminus a été associé à la régulation de l'inactivation du canal. D'autre part, des mutations dirigées contre des sérines conservées présentes dans des séquences consensus de phosphorylation par la protéine kinase suggèrent un rôle de la phosphorylation dans la régulation des propriétés de la sous-unité $Ca_v\beta$.

Toutes ces études soulignent l'importance des domaines intramoléculaires dans la physiologie des sous-unités $Ca_v\beta$. Dans cet article, on a identifié sur la sous-unité $Ca_v\beta_3$ deux séquences PEST consensus contenant un signal potentiel de protéolyse, dont une se trouve dans le domaine SH3 et l'autre du coté carboxy terminal de la sous-unité. In vitro, ces séquences sont sensibles à très faibles concentrations, à la dégradation par la calpaïne, une protéase dont l'activité dépend du Ca^{2+}. Les mutants de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ qui manquent ces séquences PEST, induisent une diminution d'amplitude du courant calcique global en comparant à la sous-unité $Ca_v\beta_3$ sauvage et modifient les propriétés de la cinétique d'inactivation du canal. Notre étude suggère un processus protéolytique de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ qui pouvait être d'une importance dans la régulation fonctionnelle des canaux calciques dans les neurones.

European Journal of Neuroscience, Vol. 23, pp. 2311 2320, 2006 doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04749.x

Two PEST-like motifs regulate Ca^{2+}/calpain-mediated cleavage of the $Ca_V\beta_3$ subunit and provide important determinants for neuronal Ca^{2+} channel activity

Alejandro Sandoval,[1,2,*] Norma Oviedo,[1,3,*] Abir Tadmouri,[4] Traudy Avila,[1] Michel De Waard[4] and Ricardo Felix[5]
[1]Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Cinvestav-IPN), Mexico City, Mexico
[2]School of Medicine FES Iztacala and
[3]Department of Molecular Biology and Biotechnology, Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico
[4]INSERM U607/DRDC, Commissariat à l'énergie atomique, Grenoble, Cedex, France
[5]Departamento de Biología Celular, Cinvestav-IPN, Avenida IPN 2508, Colonia Zacatenco, México D.F., CP 07300

Keywords: β subunit, Ca^{2+} channels, calpain, human embryonic kidney-293 cells, membrane-associated guanylate kinase proteins, PEST sequences

Abstract

An increase in intracellular Ca^{2+} due to voltage-gated Ca^{2+} (Ca_V) channel opening represents an important trigger for a number of second-messenger-mediated effects ranging from neurotransmitter release to gene activation. Ca^{2+} entry occurs through the principal pore-forming protein but several ancillary subunits are known to more precisely tune ion influx. Among them, the $Ca_V\beta$ subunits are perhaps the most important, given that they largely influence the biophysical and pharmacological properties of the channel. Notably, several functional features may be associated with specific structural regions of the $Ca_V\beta$ subunits emphasizing the relevance of intramolecular domains in the physiology of these proteins. In the current report, we show that $Ca_V\beta_3$ contains two PEST motifs and undergoes Ca^{2+}-dependent degradation which can be prevented by the specific calpain inhibitor calpeptin. Using mutant constructs lacking the PEST motifs, we present evidence that they are necessary for the cleavage of $Ca_V\beta_3$ by calpain. Furthermore, the deletion of the PEST sequences did not affect the binding of $Ca_V\beta_3$ to the ion-conducting $Ca_V2.2$ subunit and, when expressed in human embryonic kidney-293 cells, the PEST motif-deleted $Ca_V\beta_3$ significantly increased whole-cell current density and retarded channel inactivation. Consistent with this observation, calpeptin treatment of human embryonic kidney-293 cells expressing wild-type $Ca_V\beta_3$ resulted in an increase in current amplitude. Together, these findings suggest that calpain-mediated $Ca_V\beta_3$ proteolysis may be an essential process for Ca^{2+} channel functional regulation.

Introduction

The major function of the voltage-gated Ca^{2+} (Ca_V) channels is to convert changes in membrane potential into an intracellular calcium signal. Transient rises of intracellular calcium trigger or regulate diverse intracellular events, including metabolic processes, muscle contraction, secretion of hormones and neurotransmitters, cell differentiation and gene expression. Several types of Ca_V channels have been characterized and designated L, N, P/Q, R and T. These channel types can be grouped into two major functional classes: high voltage- and low voltage-activated channels. The high voltage-activated Ca_V channel permeation pathway is formed by its α_1 subunit, which is encoded by a family of seven genes (Catterall *et al.*, 2003). The current through these channels may be modulated by distinct structural modifications including the association with auxiliary subunits: the disulfide-linked $Ca_V\alpha_2\delta$, intracellular $Ca_V\beta$ and transmembrane $Ca_V\gamma$ subunits, which also represent gene families (Arikkath & Campbell, 2003).

Correspondence: Dr Ricardo Felix, as above.
E-mail: rfelix@fisio.cinvestav.mx

*A.S. and N.O. contributed equally to this work.

Received 2 July 2005, revised 13 February 2006, accepted 16 February 2006

Among the auxiliary proteins, the $Ca_V\beta$ subunit plays a crucial role in the formation and behavior of all functional high voltage-activated Ca_V channels. Four different types of $Ca_V\beta$ subunits (β_1 β_4) have been identified, each with multiple splicing variants (Walker & De Waard, 1998; Arikkath & Campbell, 2003; Dolphin, 2003). The $Ca_V\beta$ proteins do not cross the plasma membrane but can directly interact with the $Ca_V\alpha_1$ subunit and are important for trafficking and expression of the kinetic properties of the channel (Walker & De Waard, 1998; Arikkath & Campbell, 2003; Dolphin, 2003). The physiological importance of the $Ca_V\beta$ subunits is demonstrated by the severe phenotypes of mutant and knockout mice (Gregg *et al.*, 1996; Burgess *et al.*, 1997; McEnery *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 2002). In-depth understanding of how the $Ca_V\beta$ auxiliary subunits modulate the activity of the ion-conducting $Ca_V\alpha_1$ subunits is essential for insights into the operation of high voltage-activated Ca_V channels in both normal and disease states.

Detailed structural modeling of $Ca_V\beta$ subunits has proposed five discrete domains homologous to the membrane-associated guanylate kinase protein family. Structural models have been proposed for the type 3 src-homology and guanylate kinase-like domains (Hanlon *et al.*, 1999; Opatowsky *et al.*, 2003, 2004; Chen *et al.*, 2004; McGee *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004). Type 3 src-homology and

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

guanylate kinase domains are both necessary to recapitulate full modulatory effects of $Ca_V\beta$ on the pore-forming $Ca_V\alpha_1$ protein (Takahashi *et al.*, 2004; McGee *et al.*, 2004). Likewise, the C-terminus of $Ca_V\beta$ is associated with membrane targeting properties (Bogdanov *et al.*, 2000) and the N-terminus appears to be involved in the regulation of channel inactivation (Olcese *et al.*, 1994; Restituito *et al.*, 2000; Stotz *et al.*, 2004). Site-directed mutagenesis of conserved serine residues in consensus sites for protein kinase phosphorylation suggests a role for phosphorylation in tuning the functional properties and pharmacological sensitivities of the $Ca_V\beta$ subunits (De Waard *et al.*, 1994; Gerhardstein *et al.*, 1999; Kohn *et al.*, 2003).

These studies point to the importance of intramolecular domains in the physiology of the $Ca_V\beta$ subunits. In the current report, we show that $Ca_V\beta_3$ contains two PEST-like sequences (potential signals for rapid protein degradation), one in the type 3 src-homology domain and another in the C-terminal end of the protein. These sequences are sensitive *in vitro* to low concentrations of calpain (a Ca^{2+}-dependent protease). We further found that $Ca_V\beta_3$ mutants lacking the PEST sequences induced an increase in whole-cell Ca^{2+} current amplitude compared with wild-type $Ca_V\beta_3$ and caused a change in channel inactivation kinetic properties. Our findings suggest that $Ca_V\beta_3$ proteolytic cleavage may be an essential process for Ca^{2+} channel functional regulation.

Materials and methods

Cell culture and recombinant voltage-gated Ca^{2+} channel expression

Human embryonic kidney (HEK)-293 cells (from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose supplemented with 10% horse serum, 2 mM L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate and 50 μg/mL gentamycin at 37 °C in a 5% CO_2/95% air humidified atmosphere. After splitting the cells on the previous day and seeding at ~60% confluency, cells were transfected using the Lipofectamine Plus reagent (Gibco BRL) with 1.2 μg plasmid cDNA encoding the rabbit brain N-type Ca^{2+} channel $Ca_V2.2$ pore-forming subunit (formerly α_{1B}; GenBank accession number D14157) (Fujita *et al.*, 1993) in combination with 1.2 μg cDNA coding the rat brain $Ca_V\alpha_2\delta$-1 (M86621) (Kim *et al.*, 1992) and 1.2 μg cDNA of the rat brain $Ca_V\beta_3$ (M88751) (Castellano *et al.*, 1993) or its mutants (see below). For electrophysiology, 0.36 μg of a plasmid cDNA encoding the green fluorescent protein (Green-Lantern; Gibco BRL) was added to the transfection mixture to select positively transfected cells.

Deletions of $Ca_V\beta_3$ PEST regions

The different deletions in the $Ca_V\beta_3$ subunit were obtained by the QuikChange XL-mutagenesis kit QCM (Stratagene), following a two-stage polymerase chain reaction protocol for deletions (Wang & Malcolm, 2002). The PEST regions 1 and 2 (amino acid residues 24 37 and 397 411, respectively) were subjected to deletion through duplex oligonucleotides that comprised the adjacent nucleotidic sequences to these regions. The forward oligonucleotides were 5′-GTTCAGCCGACTCTACACCAGAGAGTGCCCGGCGAGAA-GTGG-3′ and 5′-GAGGAGCATTCACCCCTGGAGCAGGCCTGG-ACCGGATCTTCACAG-3′ for PEST1 and PEST2, respectively. Reverse oligonucleotides were complementary to these sequences. In step I of the procedure, two extension reactions were performed in separate tubes, one containing the forward primer and the other including the reverse and complementary primer. Five polymerization cycles were conducted at 95 °C for 30 s, 55 °C for 1 min and 68 °C for 14 min. After that, both reactions were mixed and the standard QCM procedure continued for 16 cycles. In addition to the single PEST deletions, a double-deletion cDNA clone was obtained from the first plasmid harboring the PEST1 deletion in combination with the duplex oligonucleotides for the PEST2 deletion. Deletions were confirmed by either restriction endonuclease analysis (using endonucleases *Hind*III and *Xba*I) or automatic sequencing using an ABI PRISM 310 sequence analyser (Perkin-Elmer Applied Biosystems) and primers for the T7 and SP6 promoters.

In vitro *transcription and translation*

In vitro transcription/translation assays were performed using the TNT™ Quick Coupled transcription/translation system kit (Promega). Briefly, 2 μg of plasmid DNA was added to 41 μL of TNT™ quick master mix containing 1 μL of [^{35}S]-methionine (1000 Ci/mmol) at 2.5 mCi/mL (Amersham Pharmacia Biotech) to a final volume of 50 μL and incubated at 30 °C for 120 min. Proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) (see below) and labeled proteins were detected by film exposure for 48 h.

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting

Microsomes from transfected HEK-293 cells were obtained as described elsewhere (Felix *et al.*, 1997; Gurnett *et al.*, 1997) and proteins were separated on 10% SDS PAGE gels according to the method of Laemmli (1970). Samples were heated at 90 °C for 5 min and 100 μg of protein/slot was loaded on gels. Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes and developed with enhanced chemiluminescence as previously described (Felix *et al.*, 1997; Gurnett *et al.*, 1997). The anti-$Ca_V\beta_3$ specific antibody was a sheep polyclonal antibody (1 : 1000 dilution; Sh0049) and the secondary antibody was a rabbit anti-sheep IgG horseradish peroxidase (Zymed) used at a dilution of 1 : 4000.

Pull-down experiments

As mentioned earlier, [^{35}S]-labeled proteins (wild-type β_3, $\beta_3\Delta$P1, $\beta_3\Delta$P2 and $\beta_3\Delta$P1 2) were expressed *in vitro* using a coupled transcription/translation system as indicated by the manufacturer (TNT™ Kit, Promega). For pull-down assays, 75 μL of hydrated glutathione-agarose beads (Sigma) was incubated, respectively, with 20 μg of glutathione S-transferase (GST) fused to alpha1 interaction domain of $Ca_v2.2$ (Sandoz *et al.*, 2001) or GST alone for 2 h at 4 °C. In order to saturate non-specific free sites, GST-alpha1 interaction domain of $Ca_v2.2$ and GST beads were incubated with 0.1 mg/mL bovine serum albumin overnight at 4 °C. [^{35}S]-Labeled proteins were incubated with the beads for 1 h at room temperature. The beads were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) three times and the proteins, bound to beads, were eluted in denaturing buffer and analysed on SDS PAGE by autoradiography.

Electrophysiology

At 48 h after transfection, cells expressing the green fluorescent protein reporter gene were subjected to the whole-cell mode of the patch clamp technique (Hamill *et al.*, 1981). In brief, Ba^{2+} currents through Ca^{2+} channels were recorded with an Axopatch 200B

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

amplifier (Axon Instruments) and acquired on-line using a Digidata 1320A interface with PCLAMP8 software (Axon Instruments). After establishing the whole-cell mode, capacitive transients were cancelled with the amplifier. Currents were obtained from a holding potential of −80 mV and by applying test pulses every 20 s. Leak and residual capacitance currents were subtracted on-line by a P/4 protocol. Current signals were filtered at 2 kHz (internal four-pole Bessel filter) and digitized at 5.71 kHz. Membrane capacitance (C_m) was determined as described previously (Avila *et al.*, 2004) and used to normalize currents. The bath recording solution contained (in mM): $BaCl_2$, 10; TEA-Cl, 125; HEPES, 10 and glucose, 10, pH 7.3. The internal solution consisted of (in mM): CsCl, 110; $MgCl_2$, 5; EGTA, 10; HEPES, 10; Na-ATP, 4 and guanosine-5′-triphosphate, 0.1, pH 7.3. Experiments were performed at room temperature (~25 °C).

Pulse chase and immunoprecipitation experiments

Dishes (6 cm diameter) with 40% confluent HEK-293 cells were transfected with cDNA encoding the wild-type $Ca_V\beta_3$ or its ΔPEST mutants. At 24 h later, the protein labeling condition was set by incubating the cells for 30 min in methionine- and cysteine-free Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum (starvation period). Labeling was induced by adding 500 μCi [^{35}S]-L-methionine and 2 mM L-cysteine to each plate for 40 min at 37 °C. To remove radioactive media, dishes were washed with PBS. Subsequently, normal Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum was added to plates (except the $t = 0$ sample, which represents the start time of the chase). At $t = 24$ h, all plates were washed with ice-cold PBS. Cells were then scraped in 10 mL ice-cold PBS and transferred to a tube to remove the supernatant by centrifugation. Labeled cells were lysed with 1 mL PBS supplemented with 0.5% triton X-100 and a cocktail of protease inhibitors (complete, Mini, EDTA-free, Roche). Lysates were sonicated and centrifuged at 221 ***g*** for 15 min. The supernatants were used for immunoprecipitation experiments. A total of 200 μg proteins of each sample was incubated with anti-$Ca_V\beta_3$ polyclonal IgG for 1 h at room temperature (~25 °C). This polyclonal antibody was described elsewhere (Bichet *et al.*, 2000) but was raised against the full-length sequence of $Ca_V\beta_3$. Subsequently, the $Ca_V\beta_3$ IgG complex was immobilized by Protein A sepharose beads. Eluted proteins were then loaded on a 12% SDS PAGE gel. After protein separation, the gel was treated for 30 min with a fixation solution (50% methanol, 10% acetic acid) and for 30 min with a solution of 10% glycerol, before a 24-h autoradiography exposure.

Data analysis

The data are given as mean ± SEM. Statistical differences between two means were determined by Student's *t*-tests ($P < 0.05$). Current inactivation was fitted with single exponential equations of the form $A \times \exp(t/\tau) + c$, where A is the initial amplitude (pA), t is time (ms), τ is the time constant for inactivation and c is a constant.

Results

Although important progress in the structure function relationship of the $Ca_V\beta$ subunits has been made recently (Richards *et al.*, 2004), almost nothing is known about the mechanism and determinants of recognition for proteolytic degradation of these proteins. In this context, PEST domains are short sequences (10 60 residues) enriched in proline (P), glutamic/aspartic (E), serine (S) and threonine (T) residues found in many short-lived eukaryotic proteins that play a role in their degradation (Rechsteiner & Rogers, 1996). Using the PESTFIND algorithm (available at the URL http://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/) we found one conserved (N-terminal; PEST1) and one variable (C-terminal; PEST2) PEST sequence in the $Ca_V\beta$ proteins. In the rat brain $Ca_V\beta_3$ subunit, the PEST1 region comprises amino acid residues 24 37, whereas PEST2 consists of amino acid residues 397 411 (Fig. 1A). PEST1 scored +9.47 and PEST2 +11.52, respectively. These findings prompted us to investigate the importance of the PEST sequences in the susceptibility of $Ca_V\beta_3$ to proteolytic degradation. It is worth mentioning that the $Ca_V\beta_3$ subunit is the major $Ca_V\beta$ constituent of the $Ca_V2.2$ channel complex (Scott *et al.*, 1996), which plays a pivotal role in regulating neurotransmitter release and controlling endocrine secretion.

By using a two-stage polymerase chain reaction protocol (see Materials and methods), we first created two single (ΔP1 and ΔP2) and one double (ΔP1-2) PEST domain deletion in the $Ca_V\beta_3$ sequence. The plasmids containing the full-length sequence and the constructs harboring the deletions were initially examined using a cell-free transcription/translation system. All the cDNA clones directed the synthesis *in vitro* of polypeptides of the expected molecular weights (Fig. 1B). Next, the wild-type $Ca_V\beta_3$ and its three PEST-deleted versions were expressed in HEK-293 cells and analysed by immunoblotting using polyclonal antibodies directed against a fusion protein of the C-terminus of $Ca_V\beta_3$ (Liu *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1996). This analysis revealed a single immunoreactive protein band with a molecular mass of ~58 kDa in microsomes from transfected cells, which corresponds to the full-length $Ca_V\beta_3$ (Fig. 1C). The antibodies also recognized the PEST-truncated proteins by showing shifts in the mobility from 58 kDa down to ~50 55 kDa on 10% SDS PAGE gels (Fig. 1C). These findings, combined with the lack of endogenous $Ca_V\beta_3$ subunit, make the HEK-293 cell line a good cell model to investigate the importance of the PEST sequences in $Ca_V\beta_3$ function.

We next questioned whether the PEST domains of $Ca_V\beta_3$ were molecular substrates for *in vitro* degradation by Ca^{2+}-dependent endogenous proteases. This was tested through a comparative analysis of Ca^{2+}-mediated proteolysis using the $Ca_V\beta_3$ mutant lacking both PEST regions (ΔP1-2) and the full-length $Ca_V\beta_3$ subunit as substrates. Figure 2A shows that recombinant $Ca_V\beta_3$ expressed in HEK-293 cells was partially cleaved by endogenous proteases in the presence of $CaCl_2$. Though significant degradation was observed, proteolysis was not complete; this could be explained by the fact that besides Ca^{2+} no other agent was used to induce proteolysis. In addition, endogenous molecules that activate proteolytic activity (e.g. by reducing the Ca^{2+} requirement) may be lacking in the cell homogenates employed in these assays. Hence, when Ca^{2+} was present, the specific anti-$Ca_V\beta_3$ antibody detected additional bands that should correspond to $Ca_V\beta_3$ fragments following the cleavage of the full-length $Ca_V\beta_3$ by Ca^{2+}-dependent endogenous proteases. As expected, this proteolytic breakdown of $Ca_V\beta_3$ was prevented by adding EDTA to the incubation buffer used for the experiments. Unlike the full-length $Ca_V\beta_3$ subunit, the ΔP1-2 mutant was stable in the presence of Ca^{2+} and did not undergo proteolysis in the EDTA-containing buffer (Fig. 2A). Likewise, examination of gels stained with Coomassie blue provided initial evidence that a ~58 000-Da polypeptide (presumably the $Ca_V\beta$) is susceptible to Ca^{2+}/calpain-induced proteolysis. Hence, microsomes of HEK-293 cells expressing the $Ca_V\beta_3$ subunit were analysed on 10% SDS PAGE gels stained with Coomassie blue. As shown in Fig. 2B, a 20-min treatment of the microsomes with μ-calpain produced a dose-dependent change in the levels of the ~58-kDa protein in the gels. In contrast, the levels of the ~58-kDa polypeptide were unaffected when the Ca^{2+} chelator EDTA or the calpain inhibitor calpeptin was

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

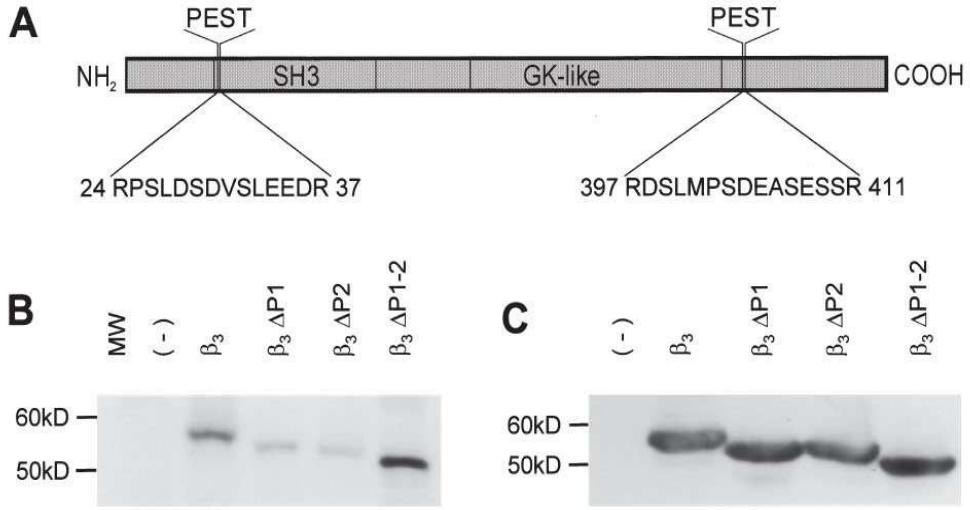


FIG. 1. Identification and deletion of the PEST-like sequences in the $Ca_V\beta_3$ subunit. (A) Schematic representation of the functional domains of $Ca_V\beta_3$ and the putative PEST sequences. Two potential PEST regions with scores of +9.47 (residues 24–37) and +11.52 (residues 397–411) were found in the amino acid sequence of $Ca_V\beta_3$ when analysed with the PESTFIND software. SH3, type 3 src-homology; GK-like, guanylate kinase domain. (B) Autoradiogram of *in vitro* translated [^{35}S]-methionine-labeled wild-type (β_3) and PEST deletion mutants of the $Ca_V\beta_3$ subunit (ΔP1, ΔP2 and ΔP1-2) resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; 5 μL of each translation reaction was run per lane. (C) Western blot analysis of membranes from untransfected human embryonic kidney (HEK)-293 cells ( ) or cells expressing the wild-type (β_3) and $Ca_V\beta_3$ PEST deletion mutants (ΔP1, ΔP2 and ΔP1-2).

included in the assay. These data corroborate that the HEK-293 cell line possesses basal calpain activity (Shimada *et al.*, 2005) and suggest that the wild-type $Ca_V\beta_3$ subunit is a target of this protease.

We next sought to determine whether the PEST regions found in $Ca_V\beta_3$ were substrates of calpain. To this end, proteolysis experiments of wild-type and mutant $Ca_V\beta_3$ proteins were conducted according to a protocol described elsewhere (Shumway *et al.*, 1999). Briefly, calpain activity was indirectly determined by assessing the extent of Ca^{2+}-induced degradation of $Ca_V\beta_3$ ΔP1-2 mutant subunits compared with the wild-type protein degradation (Fig. 2C). Inhibitors such as EDTA and calpeptin were used in the assay to ascertain the specificity of calpain activity. As described above, incubation with Ca^{2+} (750 μM) caused degradation of $Ca_V\beta_3$ which was prevented in the presence of EDTA or calpeptin. On the other hand, examination of the $Ca_V\beta_3$ ΔP1-2 mutant by western blot demonstrated that this protein does not undergo endogenous Ca^{2+}/calpain-induced proteolytic cleavage, illustrating the importance of the PEST sequences (Fig. 2C).

As a more direct test of the contributing role of the PEST domains as calpain substrates, we examined the proteolytic profile of the $Ca_V\beta_3$ subunit mutants in which the PEST sequences had been removed. $Ca_V\beta_3$ was produced by *in vitro* translation in the rabbit reticulocyte lysate and then mixed with increasing concentrations of calpain in the presence of Ca^{2+} to activate the protease. The results indicated that the *in vitro* translated $Ca_V\beta_3$ protein is indeed susceptible to exogenous calpain breakdown in a dose- and Ca^{2+}-dependent manner. Notably, calpain concentrations of ~10 nM were sufficient to significantly degrade the *in vitro* translated $Ca_V\beta_3$ and this effect was prevented when EDTA (consistent with the Ca^{2+} requirement of calpain) or the calpain inhibitor calpeptin was present. Of note, these experiments were performed by adding exogenous calpain, in contrast to those in which the protein was degraded showing two additional bands (where proteolysis was mediated by endogenous Ca^{2+}-dependent proteases; Fig. 2A). We next questioned whether either the N- or the C-terminal PEST domains of $Ca_V\beta_3$ were molecular determinants for the efficiency of *in vivo* degradation by calpain. Recombinant $Ca_V\beta_3$ proteins lacking amino acid residues 24–37 (ΔP1) and 397–411 (ΔP1-2) expressed in HEK-293 cells were subjected to increasing concentrations of μ-calpain and probed by western blot. Although at a concentration of 90 nM (in the presence of 750 μM Ca^{2+}), the ΔP1-2 mutant proteins were almost completely degraded, proteolytic breakdown of these proteins seemed to be reduced in comparison to the full-length $Ca_V\beta_3$ at equal concentrations of calpain (not shown). Despite the fact that the internal concentration was unknown, we surmise that a low concentration of the protease, in conjunction with the over-expression of our protein, explains that the effect is only partial. In contrast, when exogenous calpain was added, the proteolysis seemed to be more potent. These results suggest that the PEST sequences within the $Ca_V\beta_3$ subunit promote its degradation by μ-calpain. In line with this, when the double PEST deletion mutant protein (ΔP1-2) was incubated with calpain, we detected a significant decline in proteolysis relative to that of the single mutants. Some of the input protein still remained following incubation with 50 nM calpain (Fig. 2D). Taken together, these data suggest that deletion of the PEST sequences produced $Ca_V\beta_3$ subunits that were more resistant to cleavage by calpain than the full-length protein and provide evidence that the extent of proteolysis depends on the presence of the PEST sequences.

In order to exclude the possibility that the reduced proteolytic sensitivity shown by the ΔP1-2 mutant may be the result of gross structural alterations in the $Ca_V\beta_3$ protein caused by the amino acid deletion, we next tested whether the ΔPEST mutated versions of $Ca_V\beta_3$ could directly associate with the $Ca_V\alpha_1$ subunit through the alpha1 interaction domain, the main channel structure involved in the $Ca_V\alpha_1$–$Ca_V\beta$ subunit interaction. To this end, we used a GST-fusion protein encoding a short fragment of the intracellular I–II loop of the $Ca_V2.2$ subunit carrying the alpha1 interaction domain region (GST-alpha1 interaction domain of $Ca_V2.2$) and compared its binding to the

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

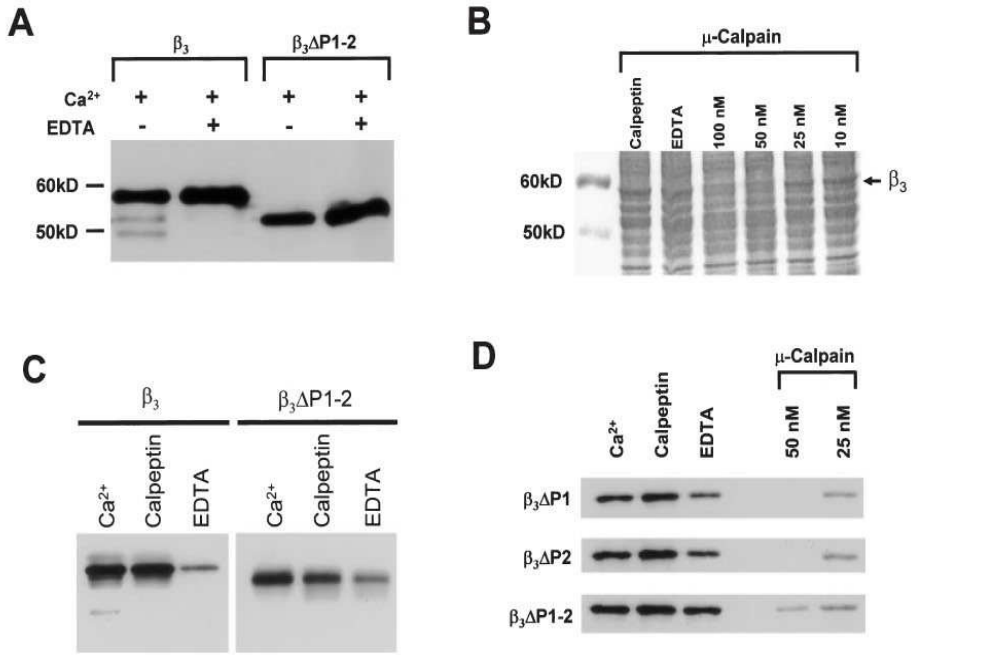


FIG. 2. The $Ca_V\beta_3$ subunit is cleaved by Ca^{2+}-dependent proteases. (A) Recombinant $Ca_V\beta_3$ ΔP1-2 protein is more stable than the wild-type $Ca_V\beta_3$ to endogenous Ca^{2+}-dependent proteases. Lanes 1 and 2, proteolytic breakdown of wild-type $Ca_V\beta_3$ (β_3) heterologously expressed in HEK-293 cells; 200 μg of microsomes was incubated with Ca^{2+} (750 μM) at 30 °C for 20 min in the absence or presence of EDTA (1.5 mM). No proteolytic degradation was observed (lanes 3 4) when the PEST-like regions were deleted (ΔP1-2). (B) Coomassie-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis in a 10% resolving gel using Laemmli buffer system. Lanes: 1, control; 2 7, microsomes from HEK-293 cells expressing the wild-type $Ca_V\beta_3$ incubated for 20 min at 30 °C with Ca^{2+}, EDTA or calpeptin or exposed to increasing concentrations of μ-calpain. (C) Degradation of the $Ca_V\beta_3$ subunits in the presence of Ca^{2+} and a calpain protease inhibitor. $Ca_V\beta_3$ subunits were incubated at 30 °C for 20 min with 750 μM Ca^{2+}, 180 nM of calpeptin or 1.5 mM EDTA. The full-length (β_3) or the double PEST deletion mutant (ΔP1-2) are indicated. (D) ΔPEST mutant $Ca_V\beta_3$ proteins were incubated for 20 min at 30 °C with Ca^{2+}, EDTA or calpeptin as indicated above or exposed to two increasing doses of μ-calpain as listed (in the presence of 750 μM Ca^{2+}). In each case, one representative of at least two independent degradation experiments of wild-type and mutant $Ca_V\beta_3$ proteins is presented.

in vitro synthesized [^{35}S]-β_3 wild-type and mutant proteins (Fig. 3). As can be seen, all of the [^{35}S]-$Ca_V\beta_3$ subunits maintained the ability to bind the GST-alpha1 interaction domain of $Ca_V2.2$ fusion protein, indicating that the deletions in the PEST regions do not affect the association of these subunits to the purified GST fusion protein.

To extend these findings, we next investigated the functional repercussion of the PEST deletions in $Ca_V\beta_3$ by electrophysiological recording. The whole-cell mode of the patch clamp technique was used to study the macroscopic Ba^{2+} currents (I_{Ba}) through recombinant N-type Ca_V channels (composed of $Ca_V2.2$ and $\alpha_2\delta$-1) in HEK-293 cells transiently expressing wild-type $Ca_V\beta_3$ or its mutants. Figure 4A shows representative current traces recorded during depolarizing voltage steps to +10 mV from a holding potential of −80 mV. Control experiments carried out using cells transfected with the wild-type $Ca_V\beta_3$ showed that the average current density (peak current amplitude divided by the respective value of C_m) was −141 ± 24 pA/pF. Recordings performed in cells transfected with the PEST deletions revealed an up-regulation of the macroscopic Ba^{2+} current. As can be seen in Fig. 4B, I_{Ba} density measured at +10 mV was significantly increased (~60%) in cells expressing the double PEST deletion (ΔP1-2). Similar results, with nearly the same level of I_{Ba} up-regulation, were also observed in cells expressing the single PEST deletions (ΔP1 and ΔP2).

The above-described data are further illustrated in Fig. 4C, which shows the I_{Ba} density as a function of the voltage step in transfected cells. These current density–voltage relationships indicate that I_{Ba} is activated at potentials positive to −20 mV and reaches its peak at potentials close to +10 mV. The stimulatory effects of PEST deletions

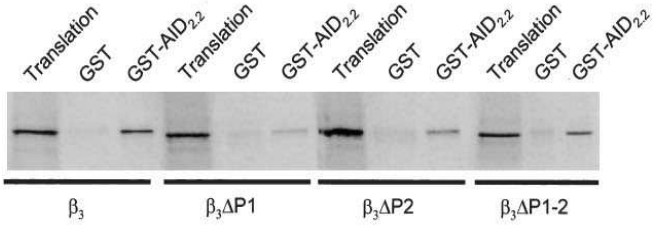


FIG. 3. Deletion of the PEST-like sequences did not alter the specific binding of the mutant $Ca_V\beta_3$ to the $Ca_V\alpha_1$ subunit. Determination of $Ca_V\beta_3$ binding to the alpha1 interaction domain (AID) of the $Ca_V2.2$ subunit. Capacity of the wild-type and mutant [^{35}S]-$Ca_V\beta_3$ subunits to interact with the fusion protein GST-$AID_{2.2}$ was assayed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. Translation represents the equivalent volume of *in vitro* translation of [^{35}S]-$Ca_V\beta_3$ used in the binding assays.

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

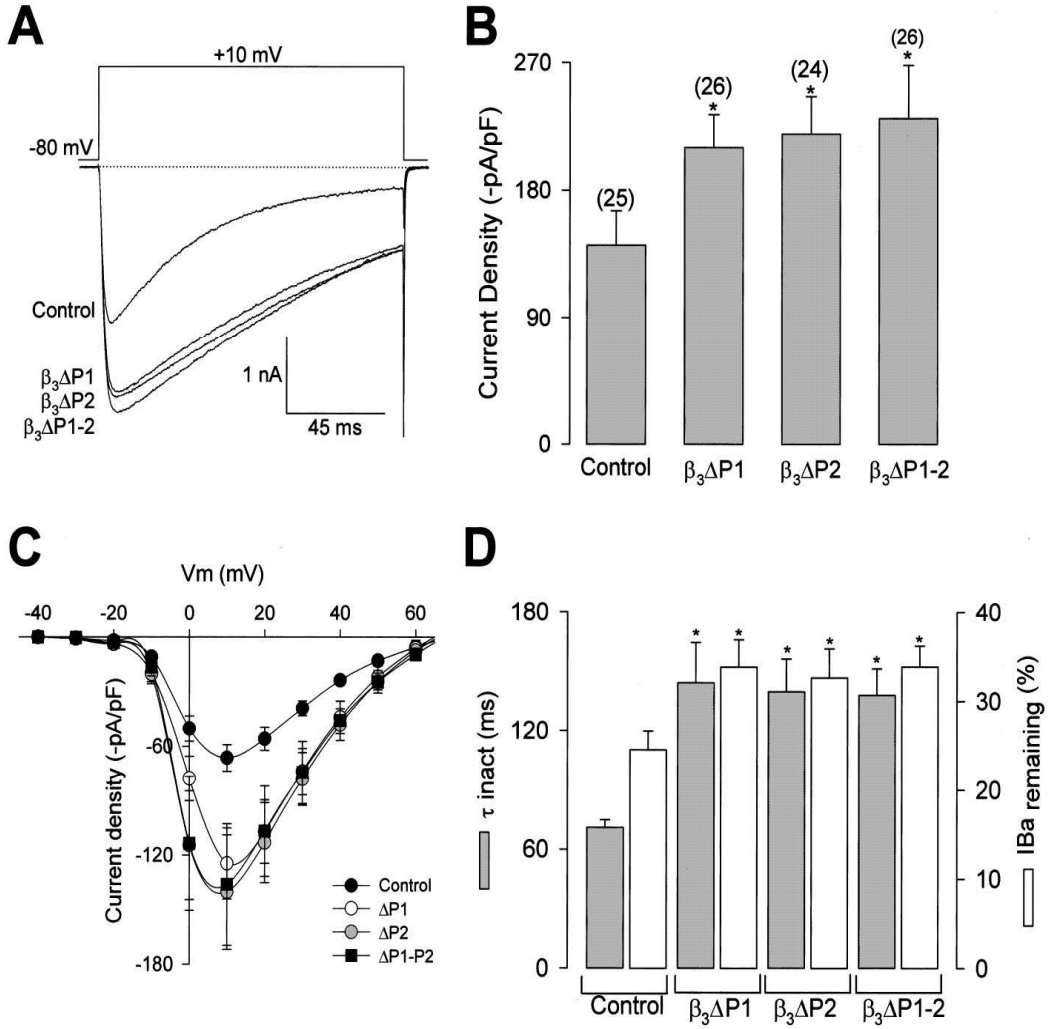


FIG. 4. Deletion of the PEST-like sequences alters whole-cell Ba^{2+} current (I_{Ba}) in HEK-293 cells. (A) Superimposed representative I_{Ba} recordings obtained from HEK-293 cells coexpressing neuronal recombinant $Ca_V2.2/\alpha_2\delta$-1 channels and the wild-type $Ca_V\beta_3$ subunit (control) or its PEST deletion mutants (ΔP1, ΔP2 and ΔP1-2) in response to 140-ms test pulses to +10 mV from the holding potential of −80 mV. (B) Comparison of peak I_{Ba} densities in $Ca_V2.2/\alpha_2\delta$-1 channels coexpressed with wild-type $Ca_V\beta_3$ or the PEST-deficient mutants. Data are expressed as mean ± SEM and the number of recorded cells is indicated in parentheses. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (*$P < 0.05$). (C) I_{Ba} density–voltage relationship averages for HEK-293 cells coexpressing neuronal recombinant $Ca_V2.2/\alpha_2\delta$-1 channels and the wild-type $Ca_V\beta_3$ subunit (control; ●, $n = 6$) or its single (ΔP1; ○, $n = 7$; ΔP2; grey-filled circle, $n = 6$) and double PEST deletion mutants (ΔP1-2; ■, $n = 7$). Currents were elicited by 11 140-ms depolarizing pulses between −40 and +60 mV in 10-mV increments from a holding potential of −80 mV. (D) Comparison of inactivation time constants (τ_{inact}; grey-filled bar) and percentage of inactivated channels at the end of a test pulse to +10 mV (open bars) for I_{Ba} through $Ca_V2.2/\alpha_2\delta$-1 channels coexpressing the wild-type $Ca_V\beta_3$ subunit or its ΔPEST mutants. The time course of inactivation was typically best fit with a monoexponential function. Bars represent mean ± SEM values of 25 cells in each condition. *Statistically significant results (*t*-test; $P < 0.05$).

on current densities were observed at almost all potentials explored. Interestingly, we noticed that PEST deletions also altered the macroscopic kinetic properties. Normalized currents obtained from either control or cells expressing $Ca_V\beta_3$ mutant subunits showed that the temporal course of the current traces was different (Fig. 4A). Though neither the time to peak nor the time constant for the activation of the current was apparently modified (data not shown), the time constant for the inactivation (τ_{inact}) and the percentage of current remaining after 140-ms activating pulses were significantly different between control and cells expressing the mutant subunits (Fig. 4D). It is worth mentioning that the use of Ba^{2+} as the charge carrier in these experiments may reduce Ca^{2+}-dependent inactivation. Together, these results suggest that the PEST sequences may also be important for determining the effects of $Ca_V\beta$ subunits on channel voltage-dependent inactivation properties. Alternatively, it is also possible that kinetic modifications may be induced by PEST1 deletion through a non-specific structural alteration of the $Ca_V\beta_3$ subunit. On the other hand, the PEST2 region is less likely to be involved in such a

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

non-specific effect as previous studies have demonstrated that the third variable region (V3) of the protein (where PEST2 is located) may not be necessary for inactivation (Wittemann *et al.*, 2000; Opatowsky *et al.*, 2003).

Given that the deletion of the PEST sequences in $Ca_V\beta_3$ resulted in mutant proteins more resistant to calpain cleavage (Fig. 2) that enhanced functional expression levels of Ca_V channels (Fig. 4C), we speculated that the calpain system may be responsible for the regulated degradation of the $Ca_V\beta_3$ subunit *in vivo*. Hence, the observed increase in current density through Ca_V channels containing mutant subunits may be the result of an increased stability of these proteins in intact cells. If this was the case, inhibition of calpain activity *in vivo* would decrease $Ca_V\beta_3$ wild-type turnover enhancing the availability of $Ca_V\beta_3$ and promoting the trafficking of the channels to the plasma membrane. Therefore, in order to see whether calpain degrades $Ca_V\beta_3$ under physiological conditions, we treated the HEK-293 cell line cultures with a specific calpain inhibitor. Traces in Fig. 5A exemplify representative records of membrane currents through recombinant channels of the $Ca_V2.2/\alpha_2\delta$-1 class coexpressing wild-type $Ca_V\beta_3$ obtained in untreated (control) HEK-293 cells and in cells exposed to calpeptin (25 μM). As can be seen, there was no significant change in whole-cell I_{Ba} in cells treated for 3 h with the inhibitor. In contrast, longer exposure (6 h) to calpeptin resulted in a significant increase in I_{Ba} density (Fig. 5B). On the other hand, there was no significant effect on I_{Ba} density in HEK-293 cells expressing recombinant channels that included the $Ca_V\beta_3$ PEST mutant subunits after calpeptin treatment (Fig. 5C and D), consistent with the idea that calpain proteolysis affects $Ca_V\beta_3$ activity through the presence of PEST sequences. Taken as a whole, the results presented above suggest that calpain may be a physiological regulator of $Ca_V\beta_3$ protein turnover.

Lastly, as mentioned earlier, our data showed that the deletion of PEST-like sequences decreases the degradation of $Ca_V\beta_3$ subunit *in vitro* (Fig. 2); we therefore aimed to reproduce these results *in vivo*. In order to determine whether the PEST region deletions affected protein stability, half-lives of the wild-type $Ca_V\beta_3$ subunit and its mutants were measured in metabolic pulse-chase experiments (Fig. 6). In these experiments, HEK-293 cells transiently transfected with the cDNA encoding the $Ca_V\beta_3$ subunits were labeled for 30 min with [^{35}S]-methionine/cysteine and chased with unlabeled methionine and cysteine. After 24 h of chase, proteins were immunoprecipitated with a polyclonal anti-β_3 raised against the full-length $Ca_V\beta_3$ sequence to reveal most of the proteolytic fragments. As can be seen, the wild-type protein was synthesized as a band with a molecular mass of ~58 kDa which underwent progressive degradation (~85% was degraded after 24 h). This result is consistent with the idea that proteins containing PEST sequences usually have short half-lives, and is also consistent with our finding that $Ca_V\beta_3$ may be the target of proteolytic breakdown under physiological conditions. With the ΔPEST mutants, however, less degradation occurred during the 24 h of chase (~28, ~32 and 45% for ΔP1-2, ΔP1 and ΔP2, respectively). This finding suggests that the elevated surface expression of the channels containing the $Ca_V\beta_3$ mutant proteins may be related to enhanced protein half-life.

Discussion

A number of proteins related to the metabolism or functions of intracellular Ca^{2+} have been reported to be substrates for calpain, including Ca_V channels. Initially, the demonstration that the $Ca_V\alpha_1$ subunit was sensitive to calpain suggested a possible mechanism for regulation of Ca_V channel function. In the skeletal muscle, the C-terminal domain of the $Ca_V\alpha1.1$ subunit is sensitive to proteolysis by μ-calpain (De Jongh *et al.*, 1994). This proteolytic cleavage is thought to remove a major site of phosphorylation providing a mechanism for modifying the cAMP-dependent regulation of L-type Ca^{2+} channels. In addition, calpain proteolysis has been shown to affect the functional activity of Ca_V channels. In patch clamp studies, Ca^{2+} currents decline progressively due to 'rundown' which depends on the intracellular Ca^{2+} concentration. This led to the proposal that Ca_V channels could be degraded by a Ca^{2+}-dependent protease. Interestingly, Ca^{2+} current rundown in myocytes has been shown to be accelerated by calpain and retarded by the physiological calpain inhibitor calpastatin, suggesting that these proteins may be involved in the regulation of channel activity and/or turnover (Belles *et al.*, 1988; Romanin *et al.*, 1991).

At first glance, the first PEST region which is highly conserved across species and $Ca_V\beta$ subunits appears of particular interest. The last few amino acids of this region contribute to an alpha helix that precedes the beta strands of the type 3 src-homology domain in several crystal structures of $Ca_V\beta_{2a}$ (Opatowsky *et al.*, 2004; Van Petegem *et al.*, 2004). Hence, if conserved sequence mediates conserved function, the findings for $Ca_V\beta_3$ might be generalized to the entire family of $Ca_V\beta$ subunits. In addition, as documented in the Results, both PEST regions showed modulatory effects on the functional expression of neuronal recombinant Ca_V channels.

In the present work, we show that calpain proteolysis may also affect the $Ca_V\beta_3$ auxiliary subunit, providing a novel mechanism for modifying the regulation of Ca_V channels. As mentioned earlier, it has been suggested that calpain may cleave proteins near regions containing PEST sequences (Rechsteiner & Rogers, 1996). It is proposed that these regions increase the local Ca^{2+} concentration and, in turn, activate calpain. Analysis of the $Ca_V\beta_3$ sequence using the PESTFIND computer program revealed two PEST-like domains in the protein (Fig. 1A). Notably, though the presence of the PEST regions in the sequences of the $Ca_V\beta$ subunits and their possible roles in subunit degradation were suggested initially several years ago (Ruth *et al.*, 1989; Perez-Reyes *et al.*, 1992), their physiological relevance remains virtually unexplored. It is worth mentioning that proteins containing PEST sequences typically have short half-lives (~2 h) in intact cells compared with most other proteins (> 24 h). In these proteins, removal or disruption of the PEST sequence increases the half-life of the protein whereas insertion or creation of a new PEST sequence within a PEST sequence-free protein decreases this half-life. Interestingly, it has been shown that the recombinant $Ca_V\beta_3$ subunit, when expressed alone in a mammalian cell line, is rapidly turned over (2 6 h) (Bogdanov *et al.*, 2000). In contrast to our observations on the recombinant $Ca_V\beta_3$ used in this study (Fig. 6), which is consistent with a rapid turnover of the protein, it has been noted that the half-life of native $Ca_V\beta$ subunits is about 50 h (Berrow *et al.*, 1995). Though the reason for this discrepancy is unknown, it is possible that the association of the native $Ca_V\beta$ subunits with membrane-bound proteins increases their stability.

It is also worth mentioning that proteolytic cleavage within a PEST sequence may not only serve for protein degradation. In this regard, an exciting possibility is that proteolytic cleavage of the full-length $Ca_V\beta_3$ may result in the generation of short forms of the protein with potential physiological actions. This is particularly important after the identification of several novel fully functional short variants of the $Ca_V\beta_1$ and $Ca_V\beta_2$ subunits (Foell *et al.*, 2004; Harry *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2005). In this context, our work might suggest that, in addition to the splice isoforms generated through the genetically encoded deletions of specific regions in the $Ca_V\beta$ gene, smaller functional variants could also be formed by post-transcriptional processing of the protein.

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

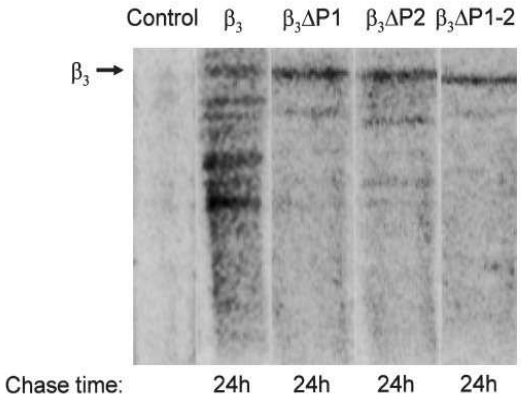


FIG. 6. The ΔPEST mutations have an increased protein half-life. Wild-type $Ca_V\beta_3$ subunit and its ΔPEST mutant half-lives were determined in HEK-293 cells 24 h after transfection. Cells were pulse-labeled for 40 min at 37 °C with 500 μCi/μL [^{35}S]-L-methionine-containing media. After the pulse, radioactive medium was replaced by complete medium; cells were lysed after a 24-h chase period in complete media and analysed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. An immunoprecipication with a polyclonal anti-β_3 IgG was performed to purify $Ca_V\beta_3$ variants and their proteolytic fragments. Lanes: 1, control precipitation (incubation of protein A sepharose beads with protein extracts containing [^{35}S]-wild-type $Ca_V\beta_3$); 2 5, endogenous proteolytic degradation of the wild-type $Ca_V\beta_3$ subunit and its PEST mutations ΔP1, ΔP2 and ΔP1-2 after immunoprecipitation by the anti-β_3 IgGs.

into cells. Whilst the $Ca_V\alpha_1$ subunit contains inherent determinants of inactivation, association with different $Ca_V\beta$ subunits determines their overall inactivation rate (Birnbaumer *et al.*, 1998; Walker & De Waard, 1998; Dolphin, 2003). Though the precise mechanisms of voltage-dependent inactivation are not well understood, it is clear that subunit composition differentially affects the inactivation properties of Ca_V channels. In general, whole-cell patch clamp studies indicate that coexpression of $Ca_V\beta_{1b}$, β_{2a} and β_4 with $Ca_V\alpha_1$ subunits modifies the inactivation rate less markedly than $Ca_V\beta_3$ (Dolphin, 2003). Interestingly, our functional studies on the effects of the PEST sequences using $Ca_V\beta_3$ mutant subunits suggested a role for these regions in the regulation of neuronal N-type recombinant Ca_V channel activity by inactivation (Fig. 4D).

In response to membrane depolarization, control Ca_V channels quickly activate and this is followed by rapid inactivation (Fig. 4A). In contrast, the channels containing mutant $Ca_V\beta_3$ subunits lacking the PEST regions displayed slower inactivation kinetics, resulting in a much smaller fraction of inactivated channels at the end of the test pulse (Fig. 4D). In each case, the half-activation potentials closely aligned with those observed in the presence of the wild-type $Ca_V\beta_3$ subunit and therefore any putative effects of the mutant subunits on inactivation kinetics would be unlikely to be due to altered voltage dependence of activation gating. Interestingly, a variable region (V1) found at the N-terminal of $Ca_V\beta_3$, comprised of a short 14-amino-acid stretch, has recently been reported as a critical site for voltage-induced inactivation (Stotz *et al.*, 2004). In addition, a second variable region (V2), in combination with one of the conserved domains of the protein, can also contribute to regulate $Ca_V2.2$ inactivation (Stotz *et al.*, 2004). However, the PEST1 sequence in $Ca_V\beta_3$ is not located in a variable region of the protein, suggesting the presence of numerous domains in $Ca_V\beta_3$ capable of conferring rapid inactivation kinetics.

Although diverse studies with $Ca_V\beta$ subunits suggest that some of their effects on channel activity require phosphorylation (Dolphin, 2003), little is known regarding the role of this process in Ca_V channel inactivation. By using the NETPHOS 2.0 software (available at the URL http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) which produces predictions for serine, threonine and tyrosine phosphorylation sites in eukaryotic proteins (Blom *et al.*, 1999), we found numerous phosphorylation sites for protein kinases on the $Ca_V\beta_3$ PEST-like sequences. Proteolysis of $Ca_V\beta_3$ by calpain would remove the phosphorylation consensus sites and the potential regulation of Ca_V channel inactivation through phosphorylation at these sites would also be abolished. Further studies are necessary to define whether the protein kinase-mediated regulation of the $Ca_V\beta_3$ subunit may be directly involved in the regulation of the inactivation process.

The biochemical and electrophysiological studies described in the present study show that the $Ca_V\beta_3$ auxiliary subunit is sensitive to μ-calpain digestion within its PEST-like regions and suggest that this enzyme may play a critical role in regulating $Ca_V\beta_3$ turnover. In addition, the results provide evidence that the $Ca_V\beta_3$ PEST-like sequences might be regulatory segments that influence the voltage-dependent inactivation properties of Ca_V channels. Lastly, if conserved sequence mediates conserved function, it would be interesting to investigate whether the findings for $Ca_V\beta_3$ could be generalized to the entire family of $Ca_V\beta$ subunits.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conacyt and The Miguel Aleman Foundation to R.F. Doctoral (A.S.) and postdoctoral (N.O.) fellowships from Conacyt are gratefully acknowledged. We are indebted to Drs B.A. Adams (Utah State University) and K.P. Campbell (University of Iowa) for their generous gift of the cDNA clones and antibodies. We thank G. Aguilar for assistance with DNA sequencing as well as A. Andrade and L. Escobedo for expert technical assistance.

Abbreviations

Ca_V, voltage-gated Ca^{2+} HEK, human embryonic kidney; GST, glutathione S-transferase; I_{Ba}, Ba^{2+} current; PBS, phosphate-buffered saline; SDS PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

References

Arikkath, J. & Campbell, K.P. (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 298 307.

Avila, G., Sandoval, A. & Felix, R. (2004) Intramembrane charge movement associated with endogenous K^+ channel activity in HEK-293 cells. *Cell Mol. Neurobiol.*, **24**, 317 330.

Ball, S.L., Powers, P.A., Shin, H.S., Morgans, C.W., Peachey, N.S. & Gregg, R.G. (2002) Role of the β_2 subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 1595 1603.

Belles, B., Hescheler, J., Trautwein, W., Blomgren, K. & Karlsson, J.O. (1988) A possible physiological role of the Ca-dependent protease calpain and its inhibitor calpastatin on the Ca current in guinea pig myocytes. *Pflugers Arch.*, **412**, 554 556.

Berrow, N.S., Campbell, V., Fitzgerald, E.M., Brickley, K. & Dolphin, A.C. (1995) Antisense depletion of β-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J. Physiol.*, **482**, 481 491.

Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. & De Waard, M. (2000) The I II loop of the Ca^{2+} channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the β subunit. *Neuron*, **25**, 177 190.

Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J. & Stefani, E. (1998) Structures and functions of calcium channel β subunits. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 357 375.

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.*, **294**, 1351–1362.

Bogdanov, Y., Brice, N.L., Canti, C., Page, K.M., Li, M., Volsen, S.G. & Dolphin, A.C. (2000) Acidic motif responsible for plasma membrane association of the voltage-dependent calcium channel β_{1b} subunit. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 894–902.

Burgess, D.L., Jones, J.M., Meisler, M.H. & Noebels, J.L. (1997) Mutation of the Ca^{2+} channel β subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell*, **88**, 385–392.

Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L. & Perez-Reyes, E. (1993) Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *J. Biol. Chem.*, **268**, 3450–3455.

Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P. & Perez-Reyes, E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol. Rev.*, **55**, 579–581.

Chen, Y.H., Li, M.H., Zhang, Y., He, L.L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., Shen, Y., Zhang, H., Tong, L. & Yang, J. (2004) Structural basis of the α1-β subunit interaction of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Nature*, **429**, 675–680.

Cohen, R.M., Foell, J.D., Balijepalli, R.C., Shah, V., Hell, J.W. & Kamp, T.J. (2005) Unique modulation of L-type Ca^{2+} channels by short auxiliary β_{1d} subunit present in cardiac muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288**, H2363–H2374.

De Jongh, K.S., Colvin, A.A., Wang, K.K. & Catterall, W.A. (1994) Differential proteolysis of the full-length form of the L-type calcium channel α_1 subunit by calpain. *J. Neurochem.*, **63**, 1558–1564.

De Waard, M., Pragnell, M. & Campbell, K.P. (1994) Ca^{2+} channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron*, **13**, 495–503.

Dolphin, A.C. (2003) β subunits of voltage-gated calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **35**, 599–620.

Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M. & Campbell, K.P. (1997) Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca^{2+} channel α2δ subunit. *J. Neurosci.*, **15**, 6884–6891.

Foell, J.D., Balijepalli, R.C., Delisle, B.P., Yunker, A.M., Robia, S.L., Walker, J.W., McEnery, M.W., January, C.T. & Kamp, T.J. (2004) Molecular heterogeneity of calcium channel beta-subunits in canine and human heart: evidence for differential subcellular localization. *Physiol. Genom.*, **17**, 183–200.

Fujita, Y., Mynlieff, M., Dirksen, R.T., Kim, M.S., Niidome, T., Nakai, J., Friedrich, T., Iwabe, N., Miyata, T., Furuichi, T., Furutama, D., Mikoshiba, K., Mori, Y. & Beam, K.G. (1993) Primary structure and functional expression of the omega-conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron*, **10**, 585–598.

Gerhardstein, B.L., Puri, T.S., Chien, A.J. & Hosey, M.M. (1999) Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the β_2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*, **38**, 10 361–10 370.

Gregg, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J.A., Coronado, R. & Powers, P.A. (1996) Absence of the β subunit (*cchb1)* of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the α_1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13 961–13 966.

Gurnett, C.A., Felix, R. & Campbell, K.P. (1997) Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ and α1 subunits. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18 508–18 512.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85–100.

Hanlon, M.R., Berrow, N.S., Dolphin, A.C. & Wallace, B.A. (1999) Modelling of a voltage-dependent Ca^{2+} channel β subunit as a basis for understanding its functional properties. *FEBS Lett.*, **445**, 366–370.

Harry, J.B., Kobrinsky, E., Abernethy, D.R. & Soldatov, N.M. (2004) New short splice variants of the human cardiac $Ca_V\beta_2$ subunit: redefining the major functional motifs implemented in modulation of the $Ca_V1.2$ channel. *J. Biol. Chem.*, **279**, 46 367–46 372.

Kim, H.L., Kim, H., Lee, P., King, R.G. & Chin, H. (1992) Rat brain expresses an alternatively spliced form of the dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channel α_2 subunit. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **89**, 3251–3255.

Kohn, A.B., Roberts-Misterly, J.M., Anderson, P.A., Khan, N. & Greenberg, R.M. (2003) Specific sites in the Beta Interaction Domain of a schistosome Ca^{2+} channel β subunit are key to its role in sensitivity to the anti-schistosomal drug praziquantel. *Parasitology*, **127** (4), 349–356.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.

Liu, H., De Waard, M., Scott, V.E., Gurnett, C.A., Lennon, V.A. & Campbell, K.P. (1996) Identification of three subunits of the high affinity omega-conotoxin MVIIC-sensitive Ca^{2+} channel. *J. Biol. Chem.*, **271**, 13 804–13 810.

McEnery, M.W., Copeland, T.D. & Vance, C.L. (1998) Altered expression and assembly of N-type calcium channel α_{1B} and β subunits in epileptic lethargic (lh/lh) mouse. *J. Biol. Chem.*, **273**, 21 435–21 438.

McGee, A.W., Nunziato, D.A., Maltez, J.M., Prehoda, K.E., Pitt, G.S. & Bredt, D.S. (2004) Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits. *Neuron*, **42**, 89–99.

Olcese, R., Qin, N., Schneider, T., Neely, A., Wei, X., Stefani, E. & Birnbaumer, L. (1994) The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron*, **13**, 1433–1438.

Opatowsky, Y., Chomsky-Hecht, O., Kang, M.G., Campbell, K.P. & Hirsch, J.A. (2003) The voltage-dependent calcium channel β subunit contains two stable interacting domains. *J. Biol. Chem.*, **278**, 52323–52332.

Opatowsky, Y., Chen, C.C., Campbell, K.P. & Hirsch, J.A. (2004) Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel β subunit functional core and its complex with the α_1 interaction domain. *Neuron*, **42**, 387–399.

Perez-Reyes, E., Castellano, A., Kim, H.S., Bertrand, P., Baggstrom, E., Lacerda, A.E., Wei, X.Y. & Birnbaumer, L. (1992) Cloning and expression of a cardiac/brain β subunit of the L-type calcium channel. *J. Biol. Chem.*, **25**, 1792–1797.

Rechsteiner, M. & Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 267–271.

Restituito, S., Cens, T., Barrere, C., Geib, S., Galas, S., De Waard, M. & Charnet, P. (2000) The β_{2a} subunit is a molecular groom for the Ca^{2+} channel inactivation gate. *J. Neurosci.*, **20**, 9046–9052.

Richards, M.W., Butcher, A.J. & Dolphin, A.C. (2004) Ca^{2+} channel β-subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**, 626–632.

Romanin, C., Grösswagen, P. & Schindler, H. (1991) Calpastatin and nucleotides stabilise cardiac calcium channel activity in excised patches. *Pflugers Arch.*, **418**, 86–92.

Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H.E., Flockerzi, V. & Hofmann, F. (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, **245**, 1115–1118.

Sandoz, G., Bichet, D., Cornet, V., Mori, Y., Felix, R. & De Waard, M. (2001) Distinct properties and differential beta subunit regulation of two C-terminal isoforms of the P/Q-type Ca^{2+}-channel α_{1A} subunit. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 987–997.

Scott, V.E., De Waard, M., Liu, H., Gurnett, C.A., Venzke, D.P., Lennon, V.A. & Campbell, K.P. (1996) β subunit heterogeneity in N-type Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.*, **271**, 3207–3212.

Shimada, M., Mahon, M.J., Greer, P.A. & Segre, G.V. (2005) The receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide is hydrolyzed and its signaling properties are altered by directly binding the calpain small subunit. *Endocrinology*, **146**, 2336–2344.

Shumway, S.D., Maki, M. & Miyamoto, S. (1999) The PEST domain of IκBα is necessary and sufficient for in vitro degradation by μ-calpain. *J. Biol. Chem.*, **274**, 30 874–30 881.

Stotz, S.C., Barr, W., McRory, J.E., Chen, L., Jarvis, S.E. & Zamponi, G.W. (2004) Several structural domains contribute to the regulation of N-type calcium channel inactivation by the beta 3 subunit. *J. Biol. Chem.*, **279**, 3793–3800.

Takahashi, S.X., Miriyala, J. & Colecraft, H.M. (2004) Membrane-associated guanylate kinase-like properties of β-subunits required for modulation of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7193–7198.

Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C. & Minor, D.L. Jr (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel β-subunit and an α-subunit domain. *Nature*, **429**, 671–675.

Walker, D. & De Waard, M. (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca^{2+} channels: role in channel function. *Trends Neurosci.*, **21**, 148–154.

Wang, W. & Malcolm, B.A. (2002) Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Meth. Mol. Biol.*, **182**, 37–43.

Wittemann, S., Mark, M.D., Rettig, J. & Herlitze, S. (2000) Synaptic localization and presynaptic function of calcium channel beta 4-subunits in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, **275**, 37 807–37 814.

© The Authors (2006). Journal Compilation © Federation of European Neuroscience Societies and Blackwell Publishing Ltd

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'analyse de la séquence de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ par le logiciel PESTFIND révèle la présence de deux domaines PEST like dans la protéine. Les domaines PEST sont des séquences qui portent un signal protéolytique. En fait, ces séquences augmentent la concentration locale du Ca^{2+}, et active par la suite la calpaïne qui agit en hydrolysant la protéine à proximité des séquences PEST. Dans cet article, on a présenté l'évidence de la présence de ces séquences et leur sensibilité à la protéolyse par la calpaïne en suggérant un nouveau mécanisme de régulation des canaux calciques dépendants du voltage.

En fait, les protéines contenant des séquences PEST ont une courte durée de vie (2h) en comparant à d'autres protéines (24h). Dans notre étude, on a montré que la délétion d'une ou des deux séquences PEST inhibent la protéolyse de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ et allonge sa durée de vie dans les lignées cellulaires mammaires.

Notamment, l'augmentation de l'amplitude des courants calciques induite par les sous-unités $Ca_v\beta_3$ qui manquent les séquences PEST, dans les HEK-293, suggère également que ces mutants sont plus stables que la sous-unité $Ca_v\beta_3$ intacte. La délétion des séquences PEST rend les mutants de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ moins accessibles à la dégradation par la calpaïne. La stabilité de ces mutants permet d'assurer l'adressage membranaire de la sous-unité Ca_v en inhibant le signal de rétention imposé par le réticulum endoplasmique et tout en augmentant l'expression des canaux calciques à la membrane.

La calpeptine, un inhibiteur de la calpaïne endogène exprimée dans les cellules HEK-293 a été utilisée afin de vérifier son effet sur le canal N sur-exprimé ($Ca_v2.2$/ $Ca_v\beta_3$/$Ca_v\alpha_2\delta$). Effectivement, la présence de la calpeptine (25 μM pour 6h) augmente significativement l'amplitude du courant, d'un facteur 2 par rapport au contrôle, indiquant l'inhibition de la protéolyse et de la dégradation de la sous-unité $Ca_v\beta_3$.

Sandoval et al (Sandoval et al., 2007) refait la même étude, utilisant une concentration plus forte de la calpeptine pour la même durée, et montre un effet moins prononcé et non significatif sur l'augmentation du courant . De mon point de vue, dans

cette dernière étude, le nombre des cellules enregistrées (n = 7 tandis que 16 pour notre étude) n'est pas satisfaisant pour qu'on puisse dire que les résultats sont contradictoires.

Du coté biophysique du canal, notre étude sur les effets des séquences PEST utilisant des sous-unités mutantes montre un rôle de ces domaines dans la régulation de la cinétique d'inactivation des canaux Ca_v neuronaux de type N. En réponse à une dépolarisation membranaire, les canaux Ca_v contrôles s'activent et s'inactivent rapidement. Par contre, les canaux associés aux sous-unités mutantes présentent une cinétique d'inactivation lente avec une fraction des canaux restant actifs à la fin de la dépolarisation.

Plusieurs études suggèrent l'importance de la phosphorylation des sous-unités $Ca_v\beta$ sur la régulation des Ca_v. En utilisant le programme (NETPHOS2.0) de prédiction des sites de phosphorylation, plusieurs sites de phosphorylation par la protéine kinase sont identifiés dans les séquences PEST de la sous-unité $Ca_v\beta_3$. La protéolyse de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ par la calpaïne pourrait éliminer les sites consensus de phosphorylation, et par conséquence toucher les cinétiques d'inactivation du canal associées à ces sites. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de décrire l'implication de la phosphorylation des sous-unités $Ca_v\beta$ par la protéine kinase dans la régulation des cinétiques d'inactivation.

Dans ce contexte, le clivage protéolytique par la calpaïne pourrait non seulement servir à la dégradation totale de la protéine mais aussi à la génération de petites formes de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ avec des fonctions physiologiques potentielles. Après l'identification des petits isoformes des sous-unités $Ca_v\beta_1$ et $Ca_v\beta_2$ codés génétiquement, notre étude suggère que des petits variants fonctionnels peuvent aussi être générés par des processus post-transcriptionnels propre à la protéine.

En fait, la première séquence PEST sur la sous-unité $Ca_v\beta_3$ est hautement conservée parmi toutes les sous-unités $Ca_v\beta$. Ceci parait d'une importance particulière si ça pourrait être généralisé à toute la famille des $Ca_v\beta$.

L'expérience de co-précipitation montre que la sous-unité $Ca_v\beta_3$ interagit mieux avec le canal, que les trois mutants PEST. Probablement, la délétion des séquences PEST toucherait la structure de la sous-unité $Ca_v\beta_3$ ainsi que son interaction avec le canal,

sachant que les mutants peuvent interagir avec le canal et moduler ses propriétés biophysiques.

Les études biochimiques et électrophysiologiques décrites dans ce papier présentent l'évidence de la sensibilité des domaines PEST de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta_3$ à la digestion par la calpaïne et suggèrent un rôle critique de cette enzyme dans la dégradation de la $Ca_v\beta_3$. D'autant plus, les résultats montrent que les domaines PEST sont probablement des séquences régulatrices qui influencent les propriétés d'inactivation des canaux Ca_v.

ANNEXE II

ANNEXE II

Pflügers Arch, European Journal of Physiology, 2007; 454(1):115-29

Importance of voltage-dependent inactivation in N-type calcium channel regulation by G-proteins

Norbert Weiss, Abir Tadmouri, Mohamad Mikati, Michel Ronjat & Michel De Waard

N. Weiss : A. Tadmouri : M. Ronjat : M. De Waard (*)
Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies,
Inserm U607, CEA,
17 rue des Martyrs,
38054 Grenoble Cedex 09, France
* e-mail: michel.de-waard@cea.fr
M. Mikati
Department of Pediatrics,
American University of Beirut Medical Center,
Beirut, Lebanon
N. Weiss : A. Tadmouri : M. Ronjat : M. De Waard
Commissariat à l'Energie Atomique,
Grenoble, France
N. Weiss : A. Tadmouri : M. Ronjat : M. De Waard
Université Joseph Fourier,
Grenoble, France

Keywords: N-type calcium channel, $Ca_v2.2$ subunit, G-protein, G-protein coupled receptor, μ-opioid receptor, inactivation, β subunit.

Pflügers Arch - Eur J Physiol
DOI 10.1007/s00424-006-0184-0

ION CHANNELS

Importance of voltage-dependent inactivation in N-type calcium channel regulation by G-proteins

Norbert Weiss · Abir Tadmouri · Mohamad Mikati · Michel Ronjat · Michel De Waard

Received: 9 October 2006 / Accepted: 29 October 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Direct regulation of N-type calcium channels by G-proteins is essential to control neuronal excitability and neurotransmitter release. Binding of the $G_{\beta\gamma}$ dimer directly onto the channel is characterized by a marked current inhibition ("ON" effect), whereas the pore opening- and time-dependent dissociation of this complex from the channel produce a characteristic set of biophysical modifications ("OFF" effects). Although G-protein dissociation is linked to channel opening, the contribution of channel inactivation to G-protein regulation has been poorly studied. Here, the role of channel inactivation was assessed by examining time-dependent G-protein de-inhibition of $Ca_v2.2$ channels in the presence of various inactivation-altering β subunit constructs. G-protein activation was produced via μ-opioid receptor activation using the DAMGO agonist. Whereas the "ON" effect of G-protein regulation is independent of the type of β subunit, the "OFF" effects were critically affected by channel inactivation. Channel inactivation acts as a synergistic factor to channel activation for the speed of G-protein dissociation. However, fast inactivating channels also reduce the temporal window of opportunity for G-protein dissociation, resulting in a reduced extent of current recovery, whereas slow inactivating channels undergo a far more complete recovery from inhibition. Taken together, these results provide novel insights on the role of channel inactivation in N-type channel regulation by G-proteins and contribute to the understanding of the physiological consequence of channel inactivation in the modulation of synaptic activity by G-protein coupled receptors.

Keywords N-type calcium channel · $Ca_v2.2$ subunit · G-protein · G-protein coupled receptor · μ-opioid receptor · inactivation · β subunit

Abbreviations

GI	G-protein inhibition
GPCR	G-protein coupled receptor
DAMGO	(D-Ala^2,Me-Phe^4,glycinol^5)-enkephalin
rMOR	rat μ-opioid receptor
PCR	polymerase chain reaction
RI	recovery from inhibition
NS	non-statistically significant

N. Weiss · A. Tadmouri · M. Ronjat · M. De Waard (✉)
Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies,
Inserm U607, CEA,
17 rue des Martyrs,
38054 Grenoble Cedex 09, France
e-mail: michel.de-waard@cea.fr

M. Mikati
Department of Pediatrics,
American University of Beirut Medical Center,
Beirut, Lebanon

N. Weiss · A. Tadmouri · M. Ronjat · M. De Waard
Commissariat à l'Energie Atomique,
Grenoble, France

N. Weiss · A. Tadmouri · M. Ronjat · M. De Waard
Université Joseph Fourier,
Grenoble, France

Introduction

Voltage-dependent N-type calcium channels play a crucial role in neurotransmitter release at the central and peripheral synapse [3, 47]. Several subtypes of N-type channels, which differ in their inactivation properties either because of differences in subunit composition [43] or because they represent splice variants [5, 28], are known to exist. N-type

channels are strongly regulated by G-protein coupled receptors (GPCR) [4, 18, 25, 29, 30]. Direct regulation by G-proteins involves the binding of the $G_{\beta\gamma}$ dimer [22, 27] on various structural determinants of $Ca_v2.2$, the pore-forming subunit of N-type channels [1, 11, 15, 23, 34, 38, 44, 53]. This regulation is characterized by typical biophysical modifications of channel properties [16], including (1) a marked current inhibition [7, 51], (2) a slowing of activation kinetics [30], (3) a depolarizing shift of the voltage-dependence of activation [4], (4) a current facilitation after prepulse depolarization [26, 42], and (5) a modification of inactivation kinetics [52]. Current inhibition has been attributed to $G_{\beta\gamma}$ binding onto the channel ("ON" effect), whereas all other channel modifications are a consequence of a variable time-dependent dissociation of $G_{\beta\gamma}$ from the channel ("OFF" effects) [49]. Although the dissociation of $G_{\beta\gamma}$ was previously described as voltage-dependent [17], it was then suggested that channel opening after membrane depolarization was more likely responsible for the removal of $G_{\beta\gamma}$ [35]. More recently, we have shown that the voltage-dependence of the time constant of $G_{\beta\gamma}$ dissociation was directly correlated to the voltage-dependence of channel activation suggesting that $G_{\beta\gamma}$ dissociation is in fact intrinsically voltage-independent [49].

Although $G_{\beta\gamma}$ dissociation, and the resultant characteristic biophysical changes associated with it, has been correlated with channel activation, the contribution of channel inactivation in G-protein regulation has been barely studied. Evidence that such a link may exist has emerged from a pioneering study from the group of Prof. Catterall [23] in which it was demonstrated that mutations of the β-subunit binding domain of $Ca_v2.1$, known to affect inactivation, also modifies G-protein modulation. A slower inactivating channel, in which the Arg residue of the QQIER motif of this domain was substituted by Glu, enhanced the prepulse facilitation suggesting that the extent of G-protein dissociation was enhanced. However, establishing a specific relationship between channel inactivation and G-protein regulation with mutants of such a motif is rendered difficult because this motif is also a $G_{\beta\gamma}$-binding determinant [15, 23, 53]. Indeed, mutations of this motif are expected to decrease the affinity of G-proteins for the channel and, hence, may facilitate G-protein dissociation. Differences in G-protein regulation of $Ca_v2.2$ channels have also been reported if the channel is associated to β subunit that induces different inactivation kinetics [12, 20, 31]. However, a formal link between channel inactivation and G-protein regulation was not established in any of these studies.

In this study, we analyzed how modifying channel inactivation kinetics could affect the parameters of G-protein dissociation (time constant and extent of dissociation). We used a method of analysis that was recently developed on N-type channels for extracting all parameters of G-protein regulation at regular potential values, independently of the use of prepulse depolarizations [48]. The objective was to perform a study in which the structural properties of the pore-forming subunit would remain unaltered to keep the known G-protein binding determinants of the channel functionally intact. Structural analogues of β subunits, known or expected to modify channel inactivation properties, were used [14, 32, 40]. It is concluded that fast inactivation accelerates G-protein dissociation from the channel, whereas slow inactivation slows down the process. However, channel inactivation also reduces the temporal window of opportunity in which G-protein dissociation can be observed. Far less recovery is observed for channels that undergo fast inactivation, whereas slow inactivating channels display almost complete G-protein dissociation. With regard to the landmark effects of G-protein regulation, it is concluded that the "ON" effect (extent of G-protein inhibition) is independent of the type of inactivation provided by β subunits, whereas all "OFF" effects (slowing of activation and inactivation kinetics, shift of the voltage-dependence of activation) are largely influenced by the kinetics of channel inactivation induced by the β constructs. These results better explain the major differences that can be observed in the regulation of functionally distinct N-type channels. Furthermore, they provide an insight of the potential influence of channel inactivation in modulating G-protein regulation of N-type channels at the synaptic level.

Materials and methods

Materials

The cDNAs used in this study were rabbit $Ca_v2.2$ (GenBank accession number D14157), rat β_{1b} (X61394), rat β_{2a} (M80545), rat β_3 (M88751), rat β_4 (L02315), and rat μ-opioid receptor (rMOR, provided by Dr. Charnet). (D-Ala^2,Me-Phe^4,glycinol^5)-enkephalin (DAMGO) was from Bachem (Bubendorf, Germany).

Molecular biology

The CD8–β_{1b} chimera was generated by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the full-length β_{1b} using oligonucleotide primers 5′-CGCGGATCCGTCCAGAAGAGCGGCATGTCCCGGGGCCCTTACCCA-3′ (forward) and 5′-ACGTGAATTCGCGGATGTAGACGCCTTGTCCCCAGCCCTCCAG-3′ (reverse), and the PCR product was subcloned into the *Bam*HI and *Eco*RI sites of the pcDNA3-CD8-βARK-myc vector after removing the βARK insert (vector generously provided by D. Lang,

Geneva University, Geneva, Switzerland). The truncated N-terminal β_{1b} construct ($\beta_{1b\,\Delta N}$, coding for amino acid residues 58 to 597) was performed as described above using the primers 5′-CGCGGATCCACCATGGGCTCAGCA GAGTCCTACACGAGCCGGCCGTCAGAC-3′ (forward) and 5′-CGGGGTACCGCGGATGTAGACGCCTTGTCCC CAGCCCTCCAGCTC-3′ (reverse), and the PCR product was subcloned into the *Kpn*I and *Bam*HI sites of the pcDNA3.1(−) vector (Invitrogen). The truncated N-terminal β_3 construct ($\beta_{3\,\Delta N}$, coding for amino acid residues 16 to 484) was performed using the primers 5′-CGCGGATCCAC C A T G G G T T C A G C C G A C T C C T A C A C C A G C CGCCCCTCTCTGGAC-3′ (forward) and 5′-CGGGG T A C C G T A G C T G T C T T T A G G C C A A G G C C G G TTACGCTGCCAGTT-3′ (reverse), and the PCR product was subcloned into the *Kpn*I and *Bam*HI sites of the pcDNA3.1(−) vector.

Transient expression in *Xenopus* oocytes

Stage V and VI oocytes were surgically removed from anesthetized adult *Xenopus laevis* and treated for 2–3 h with 2 mg/ml collagenase type 1A (Sigma). Injection into the cytoplasm of cells was performed with 46 nl of various cRNA mixture in vitro transcribed using the SP6 or T7 m Message mMachine Kit (Ambion, Cambridgeshire, UK; 0.3 μg/μl $Ca_v2.2$+0.3 μg/μl μ-opioid receptor+0.1 μg/μl of one of the different calcium channel β constructs). Cells were incubated at 19°C in defined nutrient oocyte medium as described [19].

Electrophysiological recording

After incubation for 2–4 days, macroscopic currents were recorded at room temperature (22–24°C) using a two-electrode voltage-clamp in a bathing medium containing (in millimolar): $Ba(OH)_2$ 40, NaOH 50, KCl 3, HEPES 10, niflumic acid 0.5, pH 7.4 with methanesulfonic acid. Electrodes filled with (in millimolar) KCl 140, EGTA 10, and HEPES 10 (pH 7.2) had resistances between 0.5 and 1 MΩ. Macroscopic currents were recorded using Digidata 1322A and GeneClamp 500B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA). Acquisition and analyses were performed using the pClamp 8 software (Axon Instruments). Recordings were filtered at 2 kHz. Leak current subtraction was performed on-line by a P/4 procedure. DAMGO was applied at 10 μM by superfusion of the cells at 1 ml/min. All recordings were performed within 1 min after DAMGO produced maximal current inhibition. We observed that this procedure fully minimized voltage-independent G-protein regulation that took place later, about 5–10 min after DAMGO application (data not shown). Hence, the inhibition by DAMGO was fully reversible as assessed by washout experiments. Also, no rundown was observed during the time course of these experiments. Cells that presented signs of prepulse facilitation before μ-opioid receptor activation (tonic inhibition) were discarded from the analyses.

Analyses of the parameters of G-protein regulation

The method used to extract all biophysical parameters of G-protein regulation (GI_{t_0}, the initial extent of G-protein inhibition before the start of depolarization, τ, the time constant of G-protein unbinding from the channel, and RI, the extent of recovery from inhibition at the end of a 500-ms test pulse, unless specified in the text) were described elsewhere [48]. The key steps required to extract these parameters are briefly summarized in Fig. 1. This method is analogous to the method that relies on the use of prepulses but avoids many of the pitfalls of the latter (use of an interpulse potential that favors G-protein re-association, differences in the rate of channel inactivation between control and G-protein regulated channels, and facilitation that occurs during the control test pulse) [48].

Mathematical and statistical analyses

Current–voltage relationships (I/V) were fitted with the modified Boltzmann equation $I_{(V)} = (G_{max} \times (V - E))/\left(1 + \exp\left(-\left(V - V_{1/2}\right)/k\right)\right)$ where $I_{(V)}$ represents the maximal current amplitude in response to a depolarization at the potential V, G_{max} is the maximal conductance, E is the inversion potential of the Ba^{2+}, and k is a slope factor. All data are given as mean±SEM for n number observations and statistical significance (p) was calculated using Student's t test. Statistical significance for scatter plot analysis was performed using the Spearman rank order correlation test.

Results

N-type current inhibition by G-proteins is independent of the β subunit species

G-protein inhibition is generally studied through the measurement of the peak currents. However, this approach does not take into account the fact that, at the time to peak, a considerable proportion of G-proteins has already dissociated from the channel during depolarization. To better estimate the real extent of N-type current inhibition by G-proteins, we used the technical approach described in Fig. 1 to measure GI_{t_0}, the maximum extent of G-protein inhibition before the start of the G-protein unbinding process. Representative current inhibition and kinetic alterations are shown for $Ca_v2.2$ channels co-expressed with the β_{1b}, β_{2a}, β_3, or β_4 subunit (Fig. 2a, top panel) and

the corresponding GI_{t_0} values were quantified (Fig. 2a, bottom panel). The β subunits did not alter significantly the maximum extents of inhibition that ranged between 59.2±1.4% ($Ca_v2.2/\beta_{2a}$ channels, n=25) and 62.4±1.8% ($Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels, n=25; Fig. 2b). In the following part of this study, three other β subunit constructs have been co-expressed with $Ca_v2.2$, $\beta_{1b\ \Delta N}$, CD8–β_{1b}, and $\beta_{3\ \Delta N}$. As for the wild-type β isoforms, GI_{t_0} varied not significantly (p>0.05) between 58.4±1.8% ($\beta_{1b\ \Delta N}$, n=9) and 63.5±1.3% (CD8–β_{1b}, n=10).

The two parameters that are relevant for the "OFF" effects, τ (the time constant of G-protein unbinding from the channel), and RI (the extent of current recovery from G-protein inhibition after a 500-ms depolarization) will be used to investigate the role of N-type channel inactivation in G-protein regulation. GI_{t_0} is not a time-dependent parameter and cannot be influenced by the time course of inactivation.

Current recovery from G-protein inhibition is altered when the inactivation kinetics of $Ca_v2.2$ channels are modulated by β subunits

Auxiliary β subunits are known to influence the inactivation kinetics of $Ca_v2.2$ channels with a rank order of potency, from the fastest to the slowest, of $\beta_3 \geq \beta_4 > \beta_{1b} >> \beta_{2a}$ [45]. Representative control current traces at 10 mV for $Ca_v2.2$ channels co-expressed with each type of β subunit are shown in Fig. 3a (left panel). As expected from former reports, the β_3 subunit produces the fastest inactivation, whereas β_{2a} induced the slowest inactivation. The β_{1b} and β_4 subunits induce intermediate inactivation kinetics. In agreement with previous reports [12, 20], β subunits markedly affect G-protein regulation. Here, we investigated how channel inactivation affects the kinetics of G-protein departure from the channel and the extent RI. The time constants τ of G-protein dissociation were extracted from the $I_{\text{G-proteins unbinding}}$ traces for each combination of channels (Fig. 3a, middle panel), whereas RI was calculated as the extent of dissociation by comparing the current levels of I_{DAMGO}, $I_{\text{DAMGO wo unbinding}}$, and I_{Control} after 500 ms of depolarization (Fig. 3a, right panel). The data show that both τ and RI values are differentially affected by the kinetics of channel inactivation. Average parameters are reported in Fig. 3b (for τ) and Fig. 3c (for RI). The time constant τ of recovery from G-protein inhibition is 2.9-fold faster for the fastest inactivating channel ($Ca_v2.2/\beta_3$, 37.5±3.3 ms, n=13) than the slowest inactivating channel ($Ca_v2.2/\beta_{2a}$, 107.8±2.7 ms, n=22). Interestingly, the rank order for the speed of recovery from G-protein inhibition ($\beta_3 \geq \beta_4 > \beta_{1b} >> \beta_{2a}$) is similar to that observed for inactivation kinetics. Indeed, Student's t tests demonstrate that differences between β subunits are all highly statistically significant ($p \leq 0.001$) except between β_3 and β_4 were the difference is less pronounced ($p \leq 0.05$; Fig. 3b). Thus, it is concluded that the speed of channel inactivation imposed by each type of β subunit impacts the time constant of recovery from G-protein inhibition. Channel inactivation appears as a "synergistic factor" to channel activation [49] for the speed of G-protein dissociation. Next, the effects of β subunits were investigated on RI values (Fig. 3c). Two of the β subunits (β_3 and β_4) have closely related RI values (56.9±1.8% (n=21) vs 56.8±1.2% (n=34)). In contrast, β_{1b} and β_{2a} statistically decrease (45.0±1.3%, n=24) and increase (96.1±1.4%, n=29) RI values, respectively. From these data, it is clear that faster recovery from inhibition is not necessarily associated with an elevated RI value. Although channel inactivation accelerates the kinetics of G-protein dissociation from the channel, it also reduces the time window in which the process can be completed. In these data, a relationship seems to exist between channel inactivation conferred by β subunits and G-protein dissociation. However, it is unclear whether this link is only due to the kinetics of inactivation conferred by β subunits or also to differences in molecular identities. In order to precisely assess this first observation, we examined how structural modifications of individual β subunits, known to alter channel inactivation, affect the recovery parameters from G-protein inhibition.

Deletion of a β subunit determinant important for fast inactivation alters recovery from G-protein inhibition

Important determinants for the control of inactivation rate have been identified in the past on β subunits [32, 37]. Deletion of the amino terminus of β subunits is known to slow down channel inactivation [14]. According to the data of Fig. 3, slowing of inactivation should increase both the time constant τ of recovery from G-protein inhibition and the extent of RI. Figure 4a,b illustrates the extent of slowing in inactivation kinetics of $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels when the first 57 amino acids of β_{1b} subunit at the N-terminus are deleted ($\beta_{1b\ \Delta N}$). The amount of inactivation at the end of a 500-ms depolarization at 10 mV shows a 2.2-fold decrease from 58.4±1.6% (n=22) to 26.2±2.3% (n=10; Fig. 4b). Representative traces of DAMGO regulation of $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ and $Ca_v2.2/\beta_{1b\ \Delta N}$ currents demonstrate that the deletion of the N terminus of β_{1b} produces a significant modification in G-protein regulation (Fig. 4c, left panel). Notably, DAMGO-inhibited $Ca_v2.2/\beta_{1b\ \Delta N}$ currents display much slower activation kinetics (quantified in Fig. 8c). The analysis of the time course of $I_{\text{G-proteins unbinding}}$ traces in the presence of truncated β_{1b} reveals a slower time course (Fig. 4c, middle panel). Also, the deletion of the N terminus of β_{1b} leads to an increased recovery from G-protein inhibition (Fig. 4c, right panel). Statistical analyses

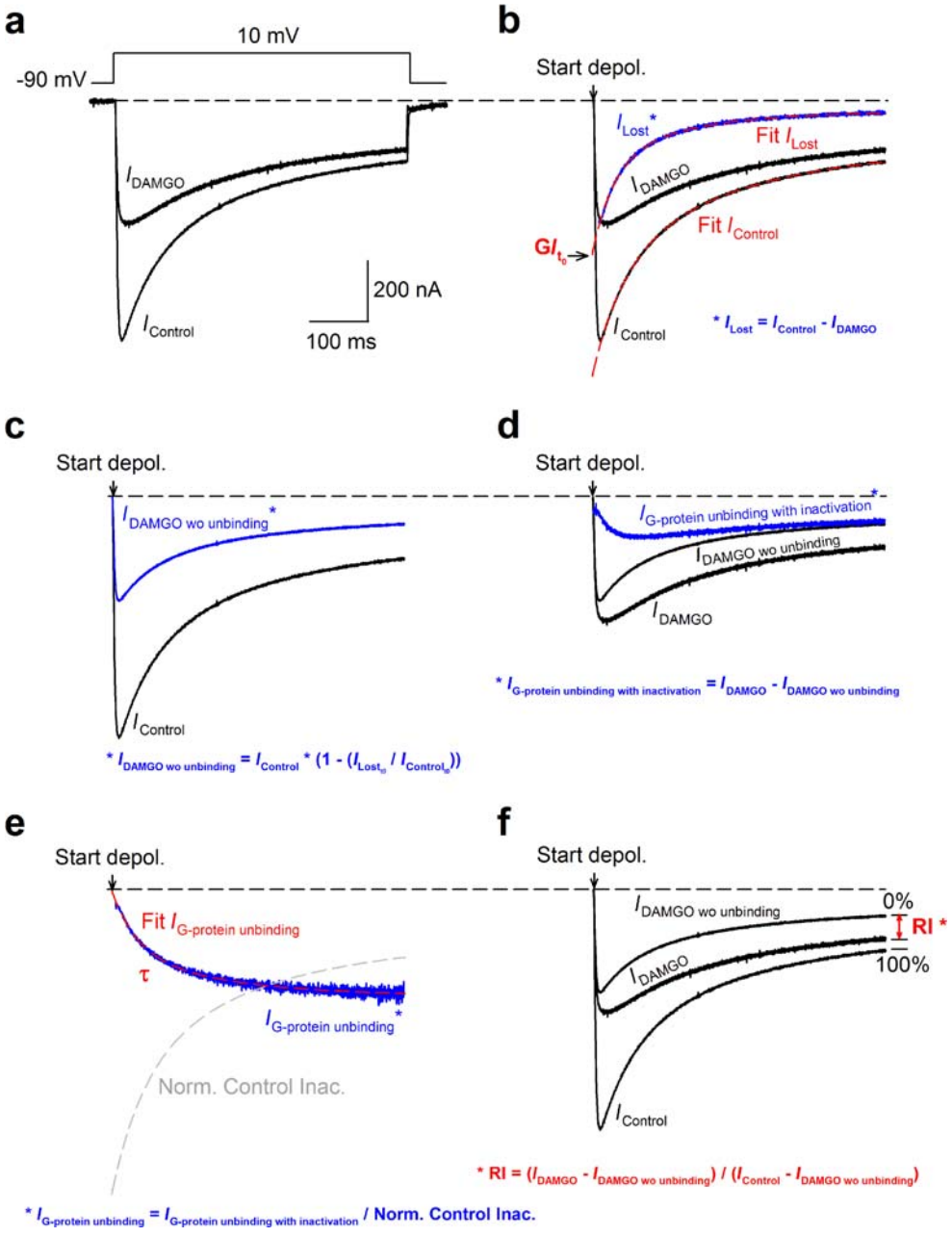


Fig. 1 Illustration of steps leading to the determination of the biophysical parameters of N-type currents regulation by G-proteins according to [48]. **a** Representative $Ca_v2.2/\beta_3$ current traces elicited at 10 mV for control ($I_{Control}$) and DAMGO (I_{DAMGO}) conditions. **b** Subtracting I_{DAMGO} from $I_{Control}$ results in I_{Lost} (*blue trace*), the evolution of the lost current under G-protein activation. $I_{Control}$ and I_{Lost} are then extrapolated to $t=0$ ms (the start of the depolarization) by fitting traces (*red dashed lines*) with a single and double exponential, respectively, to determine GI_{t_0}, the maximal extent of G-protein inhibition. **c** $I_{DAMGO\ without\ unbinding}$ ($I_{DAMGO\ wo\ unbinding}$, *blue trace*) represents an estimate of the amount of control current that is present in I_{DAMGO} and is obtained by the following equation: $I_{DAMGO\,without\,unbinding} = I_{Control} \times \left(1 - \left(I_{Lost_{t_0}} \middle/ I_{Control_{t_0}}\right)\right)$. **d** Subtracting $I_{DAMGO\ wo\ unbinding}$ from I_{DAMGO} results in $I_{G\text{-}protein\ unbinding\ with\ inactivation}$ (*blue trace*), the evolution of inhibited current that recovers from G-protein inhibition after depolarization. **e** $I_{G\text{-}protein\ unbinding\ with\ inactivation}$ is divided by the fit trace (normalized to 1) describing inactivation kinetics of the control current (*gray dashed line*) to reveal the net kinetics of G-protein dissociation ($I_{G\text{-}protein\ unbinding}$, *blue trace*) from the channels. A fit of $I_{G\text{-}protein\ unbinding}$ (*red dashed line*) by a mono-exponential decrease provides the time constant τ of G-protein dissociation from the channel. **f** The percentage of recovery from G-protein inhibition (*RI*, in *red*) at the end of 500 ms pulse is measured as $RI = \left(I_{DAMGO} - I_{DAMGO\,wo\,unbinding}\right) \big/ \left(I_{Control} - I_{DAMGO\,wo\,unbinding}\right) \times 100$. *Arrows* indicate the start of the depolarization

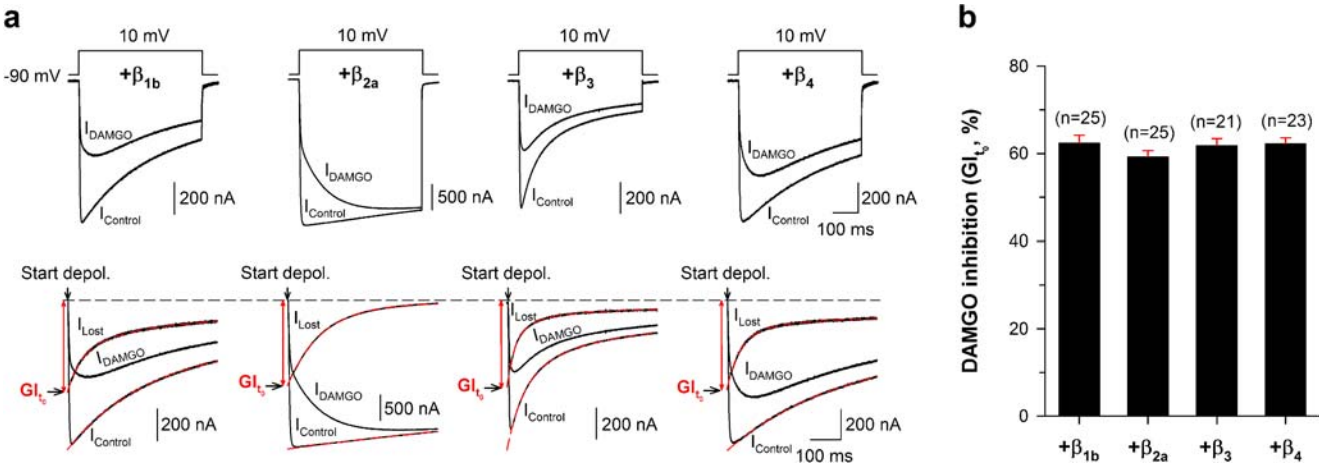


Fig. 2 Maximal G-protein inhibition of N-type currents is independent of the type of β subunits. **a** Representative current traces elicited at 10 mV before ($I_{Control}$) and under 10 μM DAMGO application (I_{DAMGO}) for $Ca_v2.2$ channels co-expressed with the β_{1b}, β_{2a}, β_3, or β_4 subunit (*top panel*). Corresponding traces allowing the measurement of the maximal DAMGO inhibition at the start of the depolarization (GI_{t_0}) are also shown for each experimental condition (*bottom panel*). $I_{Control}$ and I_{Lost} (obtained by subtracting I_{DAMGO} from $I_{Control}$) were fitted by a mono- and a double exponential, respectively (*red dashed lines*), to better estimate the maximal extent of DAMGO-inhibited current before the start of the depolarization (GI_{t_0}). The *red double arrow* indicates the extent the DAMGO-inhibited current at t=0 ms. Traces were normalized at the maximal value of $I_{Control}$ at t=0 ms to easily compare the extent of current inhibition. **b** Block diagram representation of GI_{t_0} for each experimental condition. Data are expressed as mean±SEM (in *red*) for n studied cells

show a significant increase in the time constant τ of recovery (2.0-fold) from 60.0±2.0 ms (n=24) to 118.6±2.5 ms (n=10; Fig. 4d) and an increase in the RI values (1.8-fold) from 45.0±1.3% (n=24) to 79.6±2.5% (n=9) by the deletion of the N terminus of β_{1b} (Fig. 4e).

To confirm that these effects are independent of the nature of the β subunit involved, similar experiments were conducted with a 15-amino acid N-terminal truncated β_3 subunit $\beta_{3\ \Delta N}$. As for $\beta_{1b\ \Delta N}$, $\beta_{3\ \Delta N}$ produces a slowing of channel inactivation kinetics. After 500 ms at 10 mV, $Ca_v2.2/\beta_3$ channels inactivate by 68.9±1.7% (n=21) compared to 41.1±1.1% (n=10) for $Ca_v2.2/\beta_{3\ \Delta N}$ channels (Fig. 5a,b). As expected, DAMGO inhibition of $Ca_v2.2/\beta_{3\ \Delta N}$ channels produces currents with slower activation and inactivation kinetics than $Ca_v2.2/\beta_3$ channels (shift of the time to peak of the current from 20.7±2.5 ms with β_3 (n=21) to 77.0±7.6 ms with $\beta_{3\ \Delta N}$ (n=10); Fig. 5c, left panel). Moreover, the time course of $I_{G\text{-proteins unbinding}}$ was slowed down with the N-terminal truncation of β_3 (Fig. 5c, middle panel), and the recovery from inhibition was enhanced (Fig. 5c, right panel). Quantification of these effects reveals a statistically significant slowing (1.8-fold) of the time constant of recovery τ from G-protein inhibition from 37.5±3.3 ms (n=13) to 67.4±4.5 ms (n=10; see Fig. 5d) and an increase of RI values (1.2-fold) from 56.9±1.8% (n=21) to 66.9±2.1% (n=10; see Fig. 5e). However, the time constant of recovery in the presence of $\beta_{3\ \Delta N}$ remains fast compared to the inactivation kinetics, which may explain the lower increase in RI values compared to what has been measured with $\beta_{1b\ \Delta N}$. Also, the starting value of RI is high for β_3 (56.9%) compared to β_{1b} (45.0%), which limits the possibility of increase.

Slowing of channel inactivation by membrane anchoring of β subunit also alters the properties of recovery from G-protein inhibition

Another approach to modulate channel inactivation is to modify the docking of the β subunits to the plasma membrane [13, 40]. For that purpose, we expressed a membrane-inserted CD8 linked to the β_{1b} subunit (CD8–β_{1b}) along with $Ca_v2.2$. As shown in earlier studies using the same strategy but with a different β subunit [2, 40], membrane anchoring of the β_{1b} subunit significantly slows down the inactivation kinetics (Fig. 6a). Indeed, inactivation was reduced by 1.5-fold from 58.4±1.6% (n=22) to 38.1±1.8% (n=10; see Fig. 6b). Membrane anchoring of β_{1b} via CD8 slowed down the DAMGO-inhibited current activation kinetics (Fig. 6c, left panel). Under DAMGO inhibition, a greater shift of the time to peak of the current was observed for CD8–β_{1b} than for β_{1b} (from 57.0±4.1 ms with β_{1b} (n=12) to 168.8±7.0 ms with CD8–β_{1b} (n=10)). Also, recovery from inhibition was slowed 1.9-fold from 60.0±2.0 ms (n=24) to 112.3±5.4 ms (n=8; Fig. 6d), whereas RI increased 1.3-fold from 45.0±1.3% (n=24) to 58.0±1.9% (n=9; see Fig. 6e).

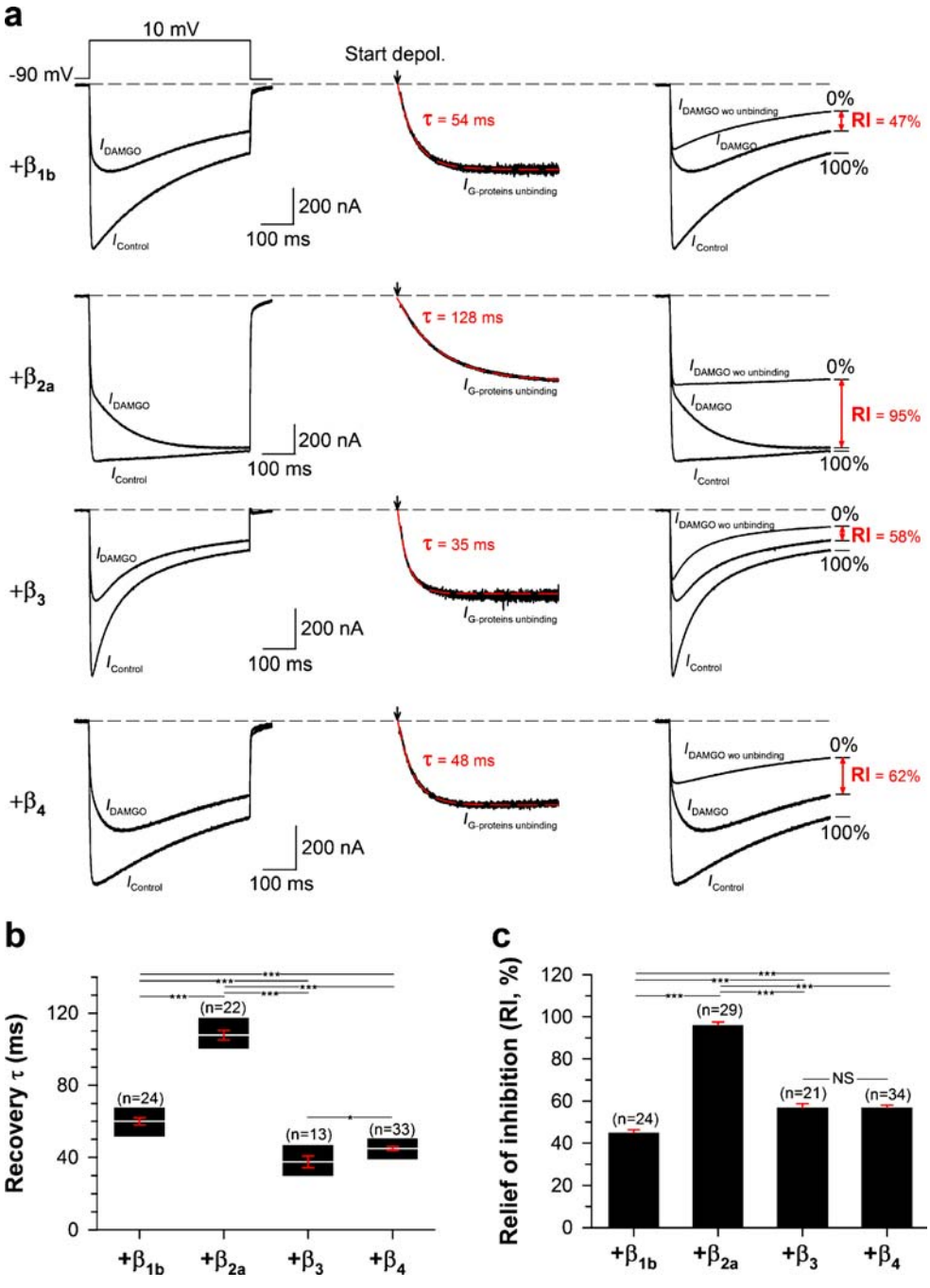


Fig. 3 Influence of β subunits on the recovery of N-type channel inhibition by G-proteins. **a** Representative current traces before ($I_{Control}$) and during application of 10 μM DAMGO (I_{DAMGO}) are shown at 10 mV for $Ca_v2.2$ channels expressed with β_{1a}, β_{2a}, β_3, or β_4 subunit (*left panel*). Corresponding $I_{G\text{-protein unbinding}}$ traces are shown for each condition (*middle panel*) and were fitted by a mono-exponential decrease (*red dashed line*) to determine the time constant τ of G-protein unbinding from the channel. The *arrow* indicates the start of the depolarization. Traces were normalized to better compare kinetics. Traces that allowed the measurement of RI values (in *red*) are also shown for each condition (*right panel*). **b** *Box plot* representation of the time constant τ of G-protein unbinding as a function of the type of β subunit co-expressed with $Ca_v2.2$ channels. The number of cells studied is indicated in *parentheses*. **c** Block diagram representation of RI values measured after 500 ms depolarization as a function of the type of the β subunit expressed with $Ca_v2.2$ channels. Data are expressed as mean±SEM (in *red*) for *n* studied cells. Statistical *t* test: *NS* not statistically significant, *single asterisk* $p \leq 0.05$, *two asterisks* $p \leq 0.01$, *three asterisks* $p \leq 0.001$

Inactivation limits the maximum observable recovery from G-protein inhibition

As demonstrated above, inactivation influences both the time constant of recovery and the maximal observable recovery from inhibition. To study the effect of channel inactivation on the maximum recovery from inhibition independently of the time constant of recovery, we compared RI values and inactivation at a fixed time constant of recovery. The time constant of recovery from inhibition shows a voltage dependence similar to that of channel opening [49]. An example of this voltage dependence is illustrated in Fig. 7a (left panel) for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels. A plot of the time constant of recovery as a function of membrane depolarization indicates a great extent of variation in τ values (Fig. 7a, middle panel). This voltage dependency of τ values was observed for all channel combinations (data not shown). We then chose to impose the τ value to 50±5 ms for all expressed channel combinations by selecting the appropriate recordings from the set of traces obtained at various test

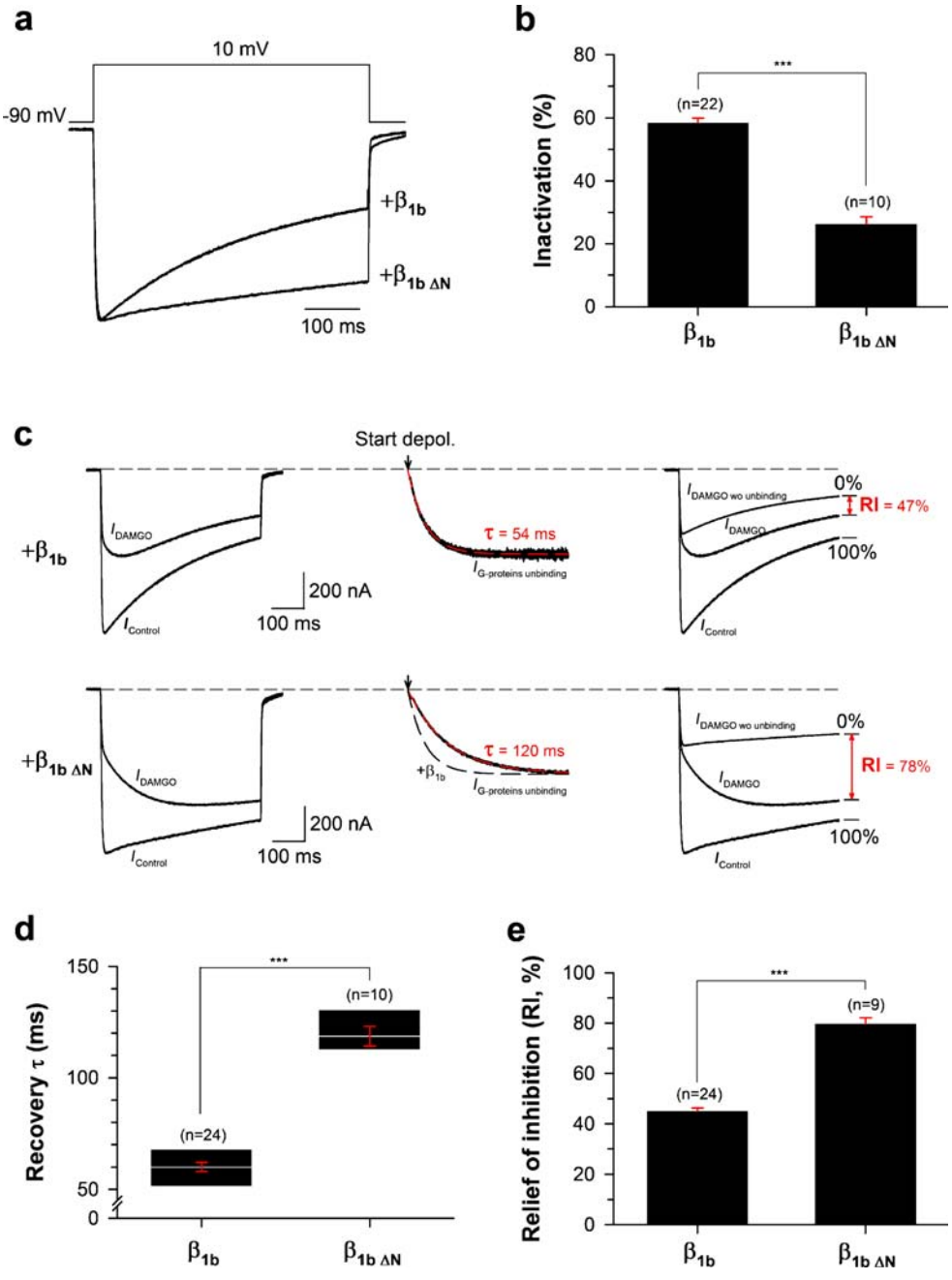


Fig. 4 Slowing of inactivation kinetics by N-terminal truncated β_{1b} subunit modifies the recovery of N-type current inhibition by G-proteins. **a** Representative current elicited by a step depolarization at 10 mV for $Ca_v2.2$ channels co-expressed with the wild-type β_{1b} subunit or with the N-terminal truncated subunit. Current traces were normalized to facilitate comparison of the kinetics and extent of inactivation. **b** Block diagram representation of the extent of inactivated current after 500 ms depolarization. **c** Representative current traces before ($I_{Control}$) and during application of 10 μM DAMGO (I_{DAMGO}) are shown at 10 mV for $Ca_v2.2$ channels co-expressed with the wild-type β_{1b} subunit or with the truncated subunit (*left panel*). Corresponding normalized $I_{G\text{-protein unbinding}}$ traces fitted by a mono-exponential decrease (*red dashed line*) are shown for each condition (*middle panel*). The *arrow* indicates the start of the depolarization. The *black dotted line* represents the $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channel condition shown for comparison. Corresponding traces, which allowed the measure of RI values (in *red*), are also shown for each experimental condition (*right panel*). **d** Box plot representation of time constants τ of recovery from G-protein inhibition at 10 mV for each experimental condition. **e** Block diagram representation of RI values after 500 ms depolarization at 10 mV for each experimental condition. Data are expressed as mean±SEM (in *red*) for *n* studied cells. Statistical *t* test: *three asterisks* denote $p \leq 0.001$

potentials (Fig. 7a, right panel). This τ value was chosen because it allows the incorporation of a large number of recordings in the analysis. Also, with a τ of 50 ms, the RI value at 500 ms after depolarization has reached saturation (95% of recovery after 150 ms of depolarization). For traces that underwent a recovery from inhibition with a τ value of 50±5 ms, we measured the extent of RI and of inactivation, both at 500 ms. Representative examples for different channel combinations ($Ca_v2.2$ along with either β_{2a}, β_4, or β_{1b} from the slowest to the fastest inactivation) are shown in Fig. 7b (left panel) where the RI values and the extent of inactivation (right panel) are measured in each experimental condition. Figure 7c shows the negative correlation existing between the extent of maximum recovery from inhibition and the extent of inactivation (statistically significant at $p<0.001$, $n=62$). These results demonstrate that the only restriction to observe a complete current recovery from G-protein inhibition is the inactivation process. Indeed, channels that have almost no inactivation ($Ca_v2.2$ / β_{2a}) show a complete recovery from inhibition. The curve predicts that, for completely non-inactivating channels, 100% of the current would recover from inhibition. These results confirm that the experimental protocol used herein to minimize voltage-independent

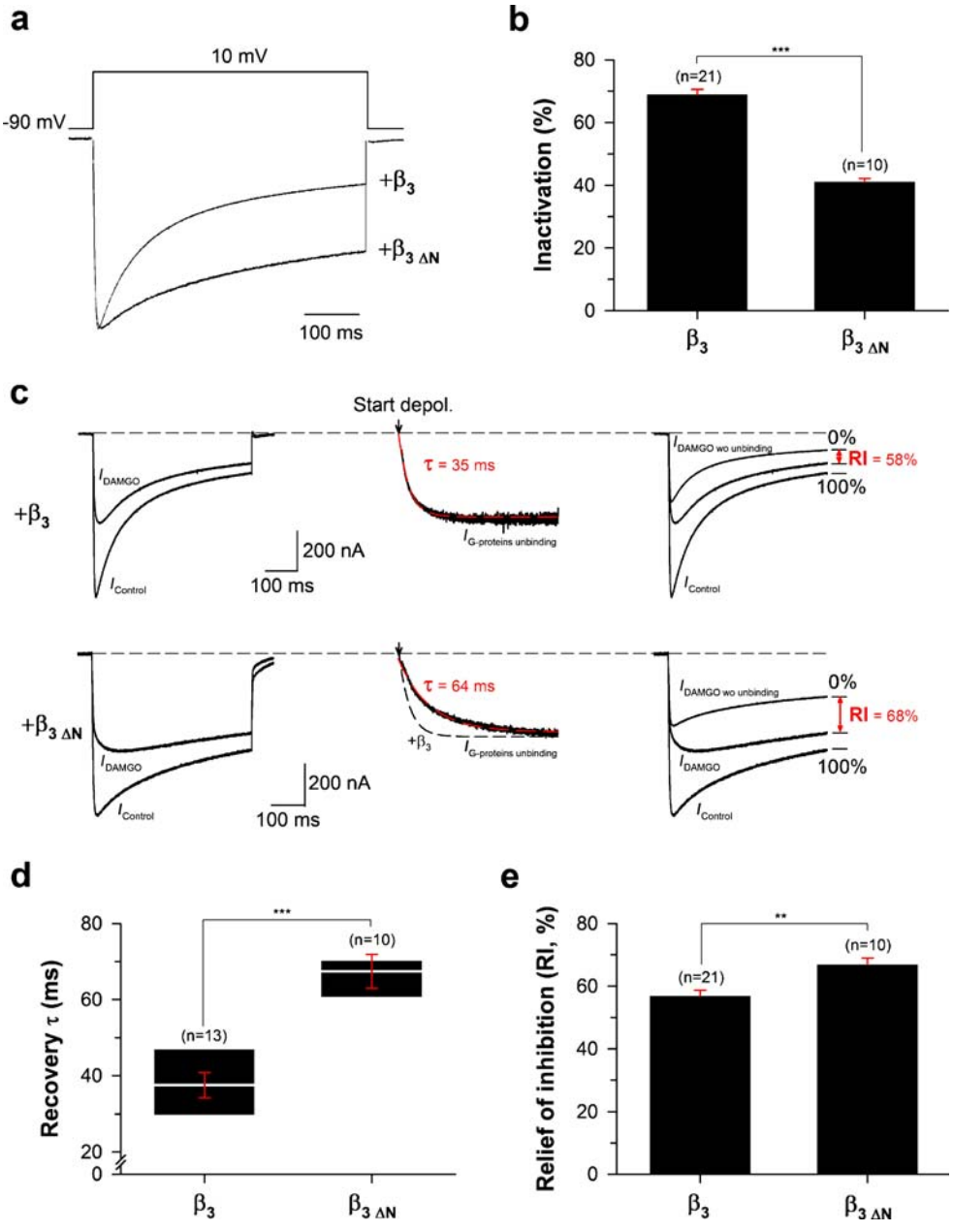


Fig. 5 Slower inactivation kinetics induced by N-terminal truncated β_3 subunit also modifies recovery of N-type current inhibition by G-proteins. Legends as in Fig. 4 but for cells expressing $Ca_v2.2$ channels in combination with the wild-type β_3 subunit or with the N-terminal truncated subunit. Data are expressed as mean±SEM (in *red*) for *n* studied cells. Statistical *t* test: *two asterisks* denote $p \leq 0.01$, while *three asterisks* denote $p \leq 0.001$

inhibition was fully functional. Conversely, channels that present the most inactivation present the smallest amount of recovery from inhibition.

Differences in calcium channel inactivation generate drastic differences in the biophysical characteristics of G-protein regulation

Since recovery from G-protein inhibition induces an apparent slowing of activation and inactivation kinetics, and shifts the voltage dependence of activation towards depolarized values [49], differences in channel inactivation that affect the recovery process should also affect the biophysical effects of G-proteins on N-type channels. Calcium currents are generally measured at peak amplitudes. The consequences of this protocol are shown for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ and $Ca_v2.2/\beta_{1b\ \Delta N}$ channels that present different inactivation kinetics (Fig. 8a,b). Several observations can be raised. First, it is observed that the slowing of the $Ca_v2.2$ inactivation induced by truncating the N terminus of β_{1b} is responsible for a drastic slowing of activation kinetics under DAMGO application. This effect is most pronounced at low potential values and is significantly reduced at high potential values. These effects are quantified in Fig. 8c. For instance, at 0 mV, the average shift of the time to peak for $Ca_v2.2/\beta_{1b\ \Delta N}$ channels (307.7±

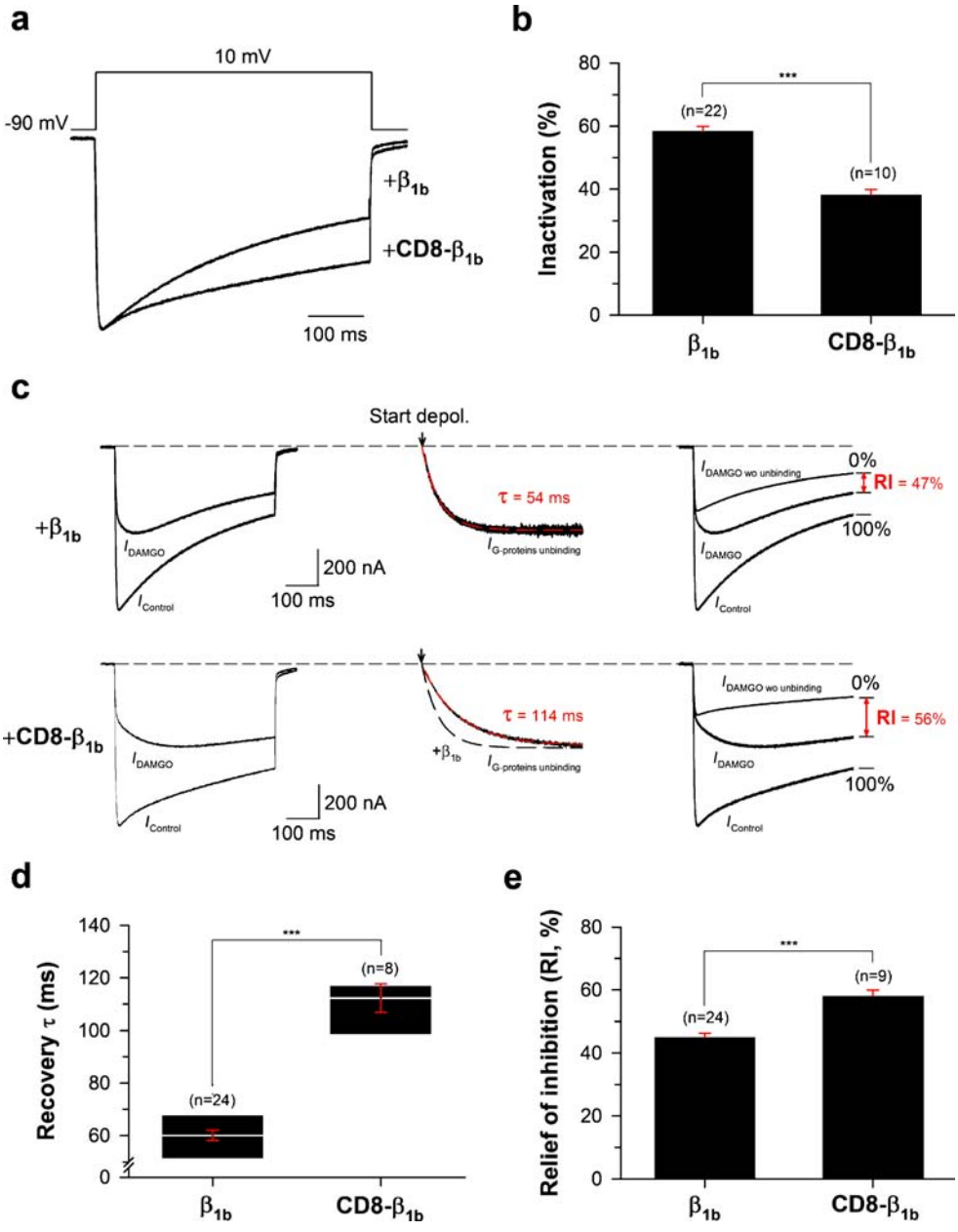


Fig. 6 Slowing of inactivation kinetics by membrane anchoring of β_{1b} subunit modifies recovery of N-type current inhibition by G-proteins. Legends as in Fig. 4 but for cells expressing $Ca_v2.2$ channels in combination with the wild-type β_{1b} subunit or with the membrane-linked CD8 $-\beta_{1b}$ subunit. Data are expressed as mean±SEM (in *red*) for *n* studied cells. Statistical *t* test: *three asterisks* denote $p \leq 0.001$

9.0 ms, $n=10$) is, on average, 9.2-fold greater than that observed for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels (33.4±5.2 ms, $n=19$; Fig. 8c). Differences in slowing of activation kinetics, triggered by the two β subunits, remain statistically significant for potential values up to 30 mV. Above 30 mV, the convergence of both curves can be explained by the fact that recovery from G-protein inhibition becomes too rapid to be influenced by changes in inactivation kinetics. Second, at the time points of the peak of the current, slowing of inactivation by the N-terminal truncation of β_{1b} induces (1) a hyperpolarizing shift of the voltage dependence of RI_{peak} values, and (2) an increase in RI_{peak} values for potentials equal or below 30 mV (Fig. 8d). Since RI_{peak} values represent a voltage-dependent gain of current that is added to the unblocked fraction of control currents under G-protein regulation, they apparently modify the voltage dependence of channel activation (*I*/*V* curves) and reduce the level of DAMGO inhibition [49]. For the $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels, the average half-activation potential values were significantly shifted by 6.4 ± 0.9 mV ($n=13$) under DAMGO inhibition, whereas for the $Ca_v2.2/\beta_{1b\,\Delta N}$ channels, a nonsignificant shift by 1.9±0.5 mV ($n=10$) was determined (Fig. 8e,f). This difference in behavior can readily be explained by the voltage dependence of RI_{peak} values. In the case of $Ca_v2.2/\beta_{1b}$, the maximal RI_{peak} occurs at 30 mV (Fig. 8d), a depolarizing shift of 20 mV

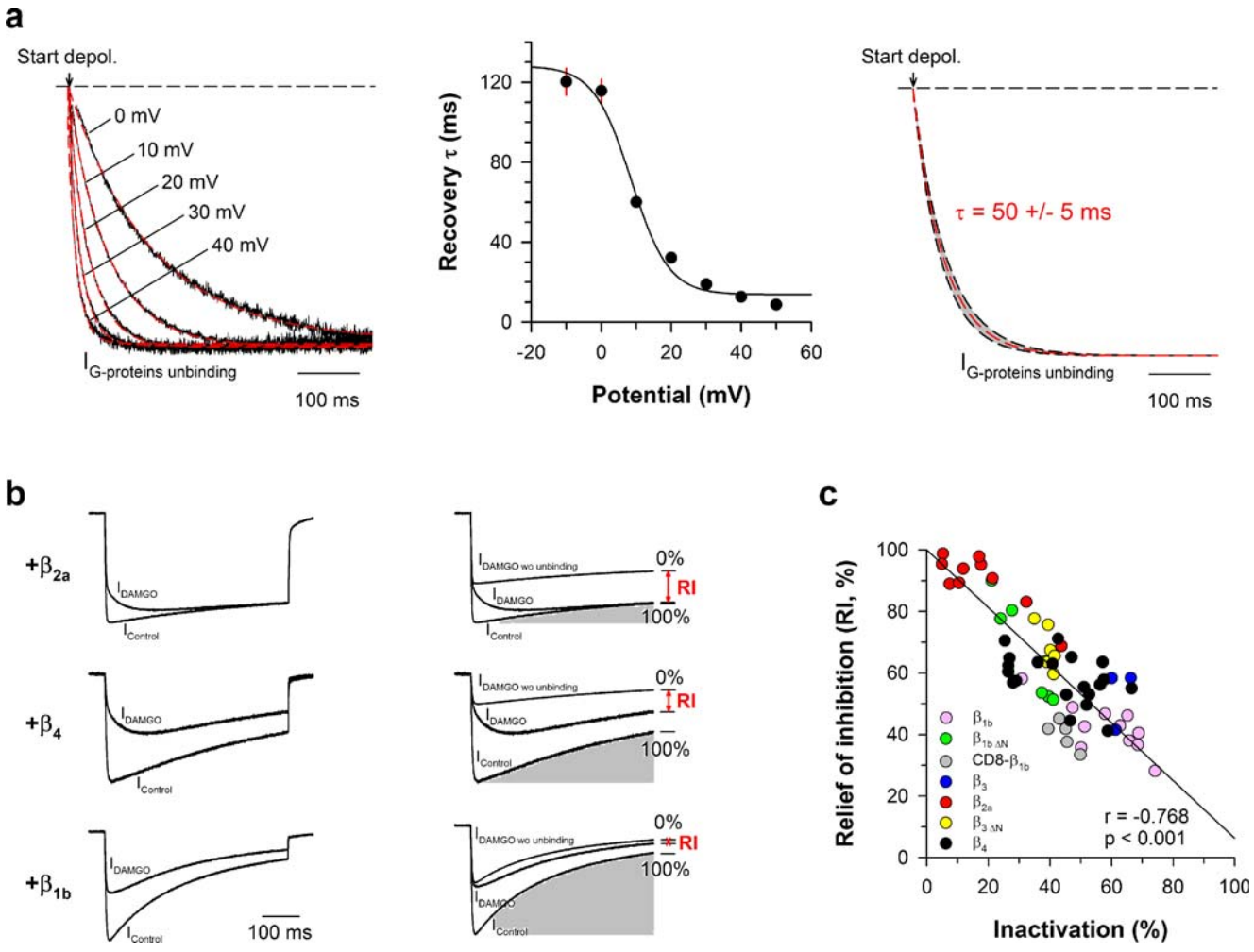


Fig. 7 The extent of N-type channel inactivation correlates with the extent of current recovery from G-protein inhibition. **a** An example of the influence of membrane potential values on the time constant τ of current recovery from G-protein inhibition is shown for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels. Normalized $I_{\text{G-protein unbinding}}$ traces fitted by a mono-exponential decrease (*red dashed line*) are shown for a range of potentials from 0 to +40 mV (*left panel*). The *arrow* indicates the start of the depolarization. Traces were superimposed to facilitate kinetic comparisons. Corresponding voltage-dependence of the time constant τ of current recovery from G-protein inhibition (n=13) is shown (*middle panel*). Data are expressed as mean±SEM (in *red*) and were fitted with a sigmoid function. Scheme illustrating normalized $I_{\text{G-protein unbinding trace}}$ for a defined time constant τ of 50±5 ms (*red* and *black lines*, respectively; right panel). The *gray area* represents the accepted variation in τ values (±10%) for the incorporation of current traces in our subsequent analyses. The *arrow* indicates the virtual start of the depolarization. **b** Representative normalized current traces before (I_{Control}) and under 10 μM DAMGO application (I_{DAMGO}) for $Ca_v2.2$ expressed in combination with β_{2a}, β_4, or β_{1b} subunit at +20, +10, and +10 mV, respectively (*left panel*). Traces were selected on the basis of the measured recovery G-protein inhibition time constant τ (between 45 and 55 ms). Corresponding traces allowing the measurement of RI values (in *red*) after a 500-ms depolarization (*right panel*). The *gray area* represents the extent of current inactivation during a 500-ms depolarization. **c** Scattered plot representation of RI values after a 500-ms depolarization as a function of the extent of inactivation. Values are shown for various $Ca_v2.2/\beta$ combinations (n=62) showing a time constant τ of recovery from G-protein inhibition of 50±5 ms independently of the test potential. Fitting these values by a linear curve provided a linear regression coefficient of −0.768, which is statistically significant at p <0.001 (Spearman rank order correlation test)

compared to control $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ currents, which is responsible for the depolarizing shift of the *I*/*V* curve under DAMGO inhibition (Fig. 8e). Conversely, for $Ca_v2.2/\beta_{1b\ \Delta N}$, the maximal RI_{peak} value is observed at 10 mV (Fig. 8d), which is −5 mV hyperpolarized to the control $Ca_v2.2/\beta_{1b\ \Delta N}$ peak currents and, therefore, influences far less the *I*/*V* curve under DAMGO inhibition (Fig. 8f). Finally, it should be noted that with a slowing of inactivation kinetics, the resultant increase in RI_{peak} values (Fig. 8d, for potentials below 40 mV) produces an apparent reduction in DAMGO inhibition that is clearly evident when one compares the effect of DAMGO on *I*/*V* curves of $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ and $Ca_v2.2/\beta_{1b\ \Delta N}$ (Fig. 8e,f).

In conclusion, these data indicate that slowing of channel inactivation kinetics increases the slowing of the time to peak by DAMGO, whereas it reduces both the peak current inhibition and the depolarizing shift of the voltage dependence of activation.

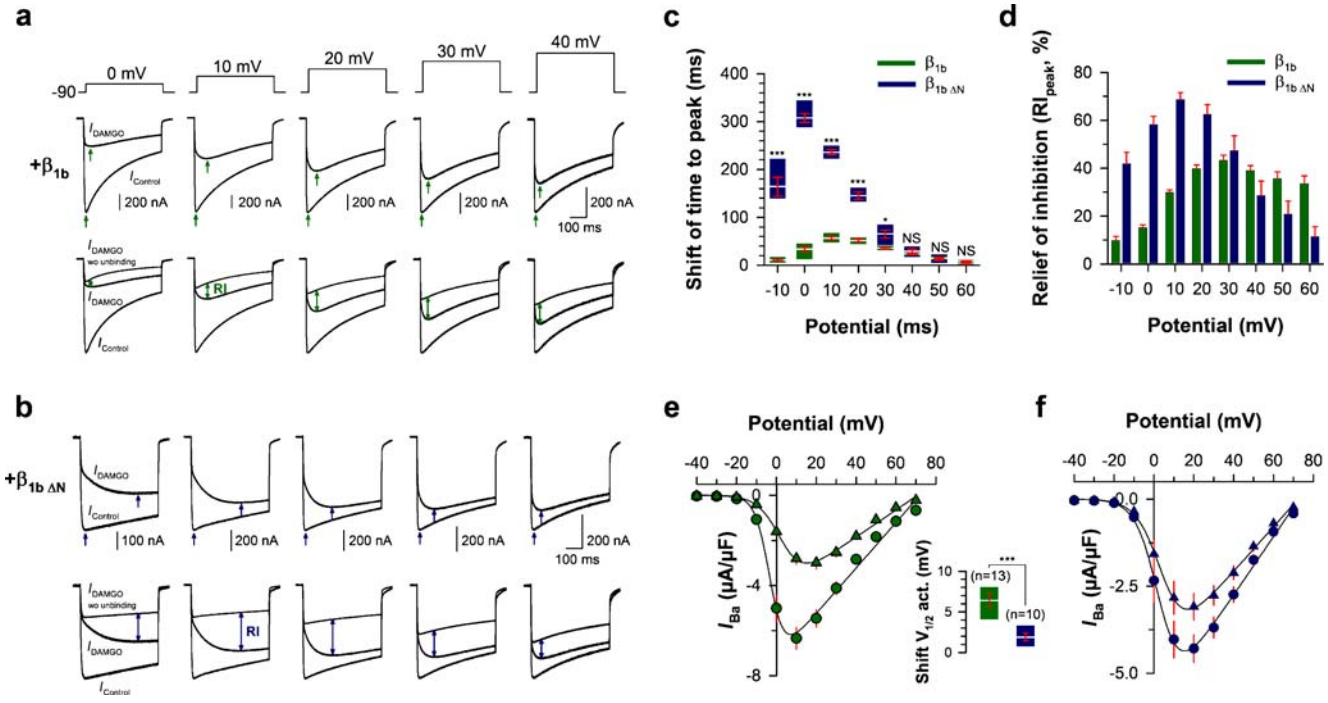


Fig. 8 Effect of channel inactivation on characteristic biophysical changes induced by G-protein activation. Representative current traces before ($I_{Control}$) and under 10 μM DAMGO application (I_{DAMGO}) and corresponding traces allowing the measurement of RI values are shown for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ (**a**) and $Ca_v2.2/\beta_{1b\,\Delta N}$ (**b**) at various membrane potentials illustrating DAMGO effects on channel activation kinetics and current recovery from G-protein inhibition in two conditions of channel inactivation. *Arrows* indicate the time to peak of the currents for control and DAMGO conditions (top panels). The time to peak of DAMGO-inhibited currents (I_{DAMGO}) was also indicated on RI traces (*arrows* in *lower panels*). *Double arrows* indicate the extent of current recovery from G-protein inhibition at these time points (RI_{peak}). **c** Box plot representation of the shift of the current time to peak induced by DAMGO application for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels (*green boxes*, $n=14$) and $Ca_v2.2/\beta_{1b\,\Delta N}$ channels (*blue boxes*, $n=10$) as a function of membrane potential. **d** Histogram representation of RI_{peak} values at the peak of DAMGO currents (I_{DAMGO}) for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels (*green bars*, $n=14$) and $Ca_v2.2/\beta_{1b\,\Delta N}$ channels (*blue bars*, $n=10$) as a function of membrane potential. Current–voltage relationship (I/V) were performed for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ channels (*green plots*, $n=13$; **e**) and $Ca_v2.2/\beta_{1b\,\Delta N}$ channels (*blue plots*, $n=10$; **f**) for control (*circle symbol*) and DAMGO-inhibited (*triangle symbols*) currents measured at their peak. Data were fitted with a modified Boltzmann equation as described in the "Materials and methods" section. The *insert* represents the shift of the half-maximum current activation potential ($V_{1/2}$) induced by DAMGO application for $Ca_v2.2/\beta_{1b}$ (*green box*, $n=13$) and $Ca_v2.2/\beta_{1b\,\Delta N}$ channels (*blue box*, $n=10$). Data are expressed as mean±SEM (in *red*) for *n* studied cells. Statistical *t* test: *NS* not statistically significant, *single asterisk* $p \le 0.05$, *two asterisks* $p \le 0.01$, *three asterisks* $p \le 0.001$

Discussion

Relevant parameters to study the influence of inactivation on N-type channel regulation by G-proteins

N-type channel regulation by G-proteins can be described accurately by three parameters: the G-protein inhibition level at the onset of depolarization (GI_{t_0}), the time constant of recovery from inhibition (τ), and the maximal extent of recovery from inhibition (RI). GI_{t_0} is indicative of the "ON" effect, whereas τ and RI are the quantitative parameters leading to all "OFF" effects of the G-protein regulation [49]. Since GI_{t_0} is a quantitative index of the extent of G-protein inhibition at the start of the depolarization, i.e., at a time point where no inactivation has yet occurred, inactivation cannot influence this parameter. On the other hand, G-protein dissociation is a time-dependent process at any given membrane potential and can thus be affected by channel inactivation since both processes occur within a similar timescale. In this study, we aimed at investigating this issue and came up with two novel conclusions. First, channel inactivation kinetics influences the speed of G-protein dissociation, and second, removal of G-proteins occurs within a time window that is closely controlled by inactivation. Hence, the speed of G-protein dissociation and the time window during which this process may occur control the extent of current recovery from G-protein inhibition at any given time. These conclusions were derived from the use of a recent biophysical method of analysis of N-type calcium channel regulation by G-proteins, which is independent of potential changes in channel inactivation behavior while G-proteins are bound onto the channels [48].

G-protein inhibition is completely reversible during depolarization provided that the channel has slow inactivation

There are two physiological ways to terminate direct G-protein regulation on N-type calcium channels: (1) the end of GPCR stimulation by recapture or degradation of the agonist (experimentally mimicked by washout of the bath medium), and (2) membrane depolarization by trains of action potentials (experimentally simulated by a prepulse application). Whereas the first one always leads to a complete recovery from G-protein inhibition, the second one produces a transient and variable recovery. Interestingly, a very slowly inactivating channel, such as the one produced by the combination of $Ca_v2.2$ and β_{2a} subunits, can lead to a complete recovery from G-protein inhibition after membrane depolarization, whereas a fast inactivating channel, such as the one produced by the co-expression of the β_{1b} subunit, leads only to a partial recovery. For slow inactivating channels, the time window for G-protein dissociation is large since channel inactivation does not interfere with the process. Conversely, for fast inactivating channels, the time window for G-proteins to unbind from the channel is considerably reduced since inactivation prevents the observation of a complete recovery from inhibition. For these channels, the extent of recovery from inhibition is controlled by both the speed of G-protein dissociation and the time window of opportunity. Hence, the speed of current recovery from G-protein inhibition is controlled by channel inactivation and by channel opening as previously shown [49], whereas the time window opportunity of this process is only controlled by channel inactivation. It is likely that both parameters (the time constant of recovery τ and the time window of opportunity) are under the control of additional molecular players or channel-modifying agents such as phosphorylation that may act on one or the other parameters in an independent manner, and could contribute to a fine control of the direct G-protein regulation.

There is an unexpected relationship between the channel inactivation kinetics and the kinetics of current recovery from G-protein inhibition

One surprising observation from this study is that fast inactivation accelerates the speed of current recovery from G-protein inhibition, whereas slower inactivation slows down G-protein dissociation from the channel. This was first demonstrated through the use of different β subunit isoforms (see also [12, 20]), and then confirmed with β subunit constructs known to modify channel inactivation kinetics. Besides this functional correlation, there might be a structural basis that underlies a mechanistic link between channel inactivation and G-protein dissociation. Indeed, Herlitze et al. [23] illustrated that an R to A mutation of the QXXER motif (one of the $G_{\beta\gamma}$-binding determinant within the I–II linker of $Ca_v2.x$ channels [15]) slows both the inactivation kinetics and the recovery from G-protein inhibition. The I–II loop of $Ca_v2.2$ appears as a particularly interesting structural determinant for supporting G-protein dissociation. First, it contains several $G_{\beta\gamma}$-binding determinants whose functional role remain unclear [11, 15, 23, 33, 53, 54]. Second, this loop is known to contribute to fast inactivation [21, 23, 46]) possibly through a hinged lid mechanism that would impede the ion pore [46]. Third, some of the residues of the QXXER motif have been found to contribute to inactivation in a voltage-sensitive manner [41]. A possible working hypothesis for the contribution of the I–II loop to G-protein regulation can be proposed: (1) the channel openings provide an initial destabilizing event favoring G-protein dissociation, and (2) the hinged lid movement of the I–II loop triggered by the inactivation process further accelerates G-protein dissociation through an additional decrease in affinity between $G_{\beta\gamma}$ and the channel.

However, there is an alternative possibility based on the expected relationship between channel opening probability and rate of G-protein dissociation [49]. At the potential at which we performed this study (10 mV), all channel combinations are at their maximal activation (data not shown) and should produce maximal opening probabilities. Nevertheless, we cannot rule out that the various β subunits and structural analogues introduce differences in the maximal opening probabilities of the channel thereby explaining differences in the rate of G protein dissociation, e.g., β_{2a} with a lower opening probability and, thus, slower recovery from inhibition. However, this would imply that anything that leads to a slowing of inactivation kinetics, through a modification of β subunit structure, produces a reduced opening probability. The likelihood of this hypothesis is probably low, but cannot be dismissed.

Inactivation differentially affects each characteristic biophysical channel modification induced during G-protein regulation

Since time-dependent G-protein dissociation is responsible for the characteristic biophysical modifications of the channel [49], inactivation, by altering the parameters of the recovery from inhibition, plays a crucial role in the phenotype of G-protein regulation. Two extreme case scenarios were observed. G-protein regulation of slowly inactivating channels, such as $Ca_v2.2/\beta_{1b\ \Delta N}$, induces an important slowing of the activation kinetics, but no or little depolarizing shift of the voltage dependence of activation and less peak current inhibition. Conversely, faster inacti-

vating channels, such as $Ca_v2.2/\beta_{1b}$, present reduced slowing of activation kinetics, but a greater peak current inhibition and a marked depolarizing shift of the voltage dependence of activation. These data point to the fact that characteristic biophysical changes of the channel under G-protein regulation should not be correlated with each other. Indeed, an important shift of the time to peak is not necessarily associated with an important depolarizing shift of the voltage dependence of activation or a greater peak current reduction. Thus, it seems important to be cautious on the absence of a particular phenotype of G-protein regulation that does not necessarily reflect the lack of direct G-protein inhibition.

Physiological implications of channel inactivation in G-protein regulation

N-type channels are rather heterogeneous by their inactivation properties because of differences in subunit composition [43] or in alternative splicing [5, 28]. Very little information is available on the targeting determinants that lead to N-type channel insertion at the synapse. However, a contribution of the β subunits and of specific C-terminal sequences of $Ca_v2.2$ is thought to be involved in the sorting of mature channels [24]. An epileptic lethargic phenotype in mouse is known to arise from the loss of expression of the β_4 subunit, which is accompanied by a β-subunit reshuffling in the N-type channels [9]. These animals present an altered excitatory synaptic transmission suggesting the occurrence of a modification in channel composition and/or regulation at the synapse [10]. Synaptic terminals that arise from single axons present a surprising heterogeneity in calcium channel composition and in processing capabilities [39]. One of the synaptic properties most influenced by calcium channel subtypes is presynaptic inhibition by G-proteins. Evidence has been provided that the extent of N-type current facilitation (hence, current recovery from G-protein inhibition) is dependent on both the duration [8] and the frequency of action potentials (AP) [36, 50]. Low frequencies of AP produce no or little recovery, whereas high-frequency action potentials more dramatically enhance recovery. Hence, slowly inactivating channels should allow much better recovery from G-protein inhibition than fastly inactivating channels, thereby further enhancing the processing abilities of synaptic terminals. In that sense, a model of synaptic integration has been proposed by the group of Dr. Zamponi [6] that would be implicated in short-term synaptic facilitation or depression. It should be noted that the inactivation of calcium channels does not only rely on a voltage-dependent component and that other modulatory signals (calcium-dependent inactivation, phosphorylation) need to find a place in the integration pathway.

Conclusion

These data permit a better understanding of the role of inactivation in N-type calcium channel regulation by G-proteins and will call attention to the contribution of the different β subunits in physiological responses at the synapse.

Acknowledgements We thank Dr. Pierre Charnet and Dr. Yasuo Mori for providing the cDNAs encoding the rat μ-opioid receptor and the rabbit $Ca_v2.2$ channel, respectively. We are indebted to Dr. Anne Feltz, Dr. Lubica Lacinova, Dr. Michel Vivaudou, and Dr. Eric Hosy for critical evaluation of this work. We thank Sandrine Geib for her contribution to the CD8–β_{1b} construct.

References

1. Agler HL, Evans J, Tay LH, Anderson MJ, Colecraft HM, Yue DT (2005) G protein-gated inhibitory module of N-type ($Ca_v2.2$) Ca^{2+} channels. Neuron 46:891–904
2. Ahern CA, Sheridan DC, Cheng W, Mortenson L, Nataraj P, Allen P, De Waard M, Coronado R (2003) Ca^{2+} current and charge movements in skeletal myotubes promoted by the β-subunit of the dihydropyridine receptor in the absence of ryanodine receptor type 1. Biophys J 84:942–959
3. Artalejo CR, Adams ME, Fox AP (1994) Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. Nature 367:72–76
4. Bean BP (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. Nature 340:153–156
5. Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, Helton TD, Lipscombe D (2004) Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. Neuron 41:127–138
6. Bertram R, Swanson J, Yousef M, Feng ZP, Zamponi GW (2003) A minimal model for G protein-mediated synaptic facilitation and depression. J Neurophysiol 90:1643–1653
7. Boland LM, Bean BP (1993) Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. J Neurosci 13:516–533
8. Brody DL, Patil PG, Mulle JG, Snutch TP, Yue DT (1997) Bursts of action potential waveforms relieve G-protein inhibition of recombinant P/Q-type Ca^{2+} channels in HEK 293 cells. J Physiol 499(Pt 3):637–644
9. Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL (1997) Mutation of the Ca^{2+} channel β subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. Cell 88:385–392
10. Caddick SJ, Wang C, Fletcher CF, Jenkins NA, Copeland NG, Hosford DA (1999) Excitatory but not inhibitory synaptic transmission is reduced in lethargic (Cacnb4(lh)) and tottering (Cacna1atg) mouse thalami. J Neurophysiol 81:2066–2074
11. Canti C, Page KM, Stephens GJ, Dolphin AC (1999) Identification of residues in the N terminus of α_{1B} critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by $G_{\beta\gamma}$. J Neurosci 19:6855–6864
12. Canti C, Bogdanov Y, Dolphin AC (2000) Interaction between G proteins and accessory subunits in the regulation of α_{1B} calcium channels in Xenopus oocytes. J Physiol 527(Pt 3):419–432
13. Chien AJ, Carr KM, Shirokov RE, Rios E, Hosey MM (1996) Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium

channel β_{2a} subunit and effects on channel function. J Biol Chem 271:26465–26468
14. De Waard M, Pragnell M, Campbell KP (1994) Ca^{2+} channel regulation by a conserved β subunit domain. Neuron 13:495–503
15. De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP (1997) Direct binding of G-protein βγ complex to voltage-dependent calcium channels. Nature 385:446–450
16. De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A (2005) How do G proteins directly control neuronal Ca^{2+} channel function? Trends Pharmacol Sci 26:427–436
17. Doupnik CA, Pun RY (1994) G-protein activation mediates prepulse facilitation of Ca^{2+} channel currents in bovine chromaffin cells. J Membr Biol 140:47–56
18. Dunlap K, Fischbach GD (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. J Physiol 317:519–535
19. Eppig JJ, Dumont JN (1976) Defined nutrient medium for the in vitro maintenance of Xenopus laevis oocytes. In Vitro 12:418–427
20. Feng ZP, Arnot MI, Doering CJ, Zamponi GW (2001) Calcium channel β subunits differentially regulate the inhibition of N-type channels by individual G_β isoforms. J Biol Chem 276:45051–45058
21. Geib S, Sandoz G, Cornet V, Mabrouk K, Fund-Saunier O, Bichet D, Villaz M, Hoshi T, Sabatier JM, De Waard M (2002) The interaction between the I–II loop and the III–IV loop of $Ca_v2.1$ contributes to voltage-dependent inactivation in a β-dependent manner. J Biol Chem 277:10003–10013
22. Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996) Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein βγ subunits. Nature 380:258–262
23. Herlitze S, Hockerman GH, Scheuer T, Catterall WA (1997) Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel α_{1A} subunit. Proc Natl Acad Sci USA 94:1512–1516
24. Herlitze S, Xie M, Han J, Hummer A, Melnik-Martinez KV, Moreno RL, Mark MD (2003) Targeting mechanisms of high voltage-activated Ca^{2+} channels. J Bioenerg Biomembr 35:621–637
25. Hille B (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. Trends Neurosci 17:531–536
26. Ikeda SR (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. J Physiol 439:181–214
27. Ikeda SR (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein βγ subunits. Nature 380:255–258
28. Lin Z, Haus S, Edgerton J, Lipscombe D (1997) Identification of functionally distinct isoforms of the N-type Ca^{2+} channel in rat sympathetic ganglia and brain. Neuron 18:153–166
29. Lipscombe D, Kongsamut S, Tsien RW (1989) α-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. Nature 340:639–642
30. Marchetti C, Carbone E, Lux HD (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on Ca^{2+} channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. Pflugers Arch 406:104–111
31. Meir A, Dolphin AC (2002) Kinetics and $G_{\beta\gamma}$ modulation of $Ca_v2.2$ channels with different auxiliary β subunits. Pflugers Arch 444:263–275
32. Olcese R, Qin N, Schneider T, Neely A, Wei X, Stefani E, Birnbaumer L (1994) The amino terminus of a calcium channel β subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. Neuron 13:1433–1438
33. Page KM, Stephens GJ, Berrow NS, Dolphin AC (1997) The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. J Neurosci 17:1330–1338
34. Page KM, Canti C, Stephens GJ, Berrow NS, Dolphin AC (1998) Identification of the amino terminus of neuronal Ca2+ channel α_1 subunits α_{1B} and α_{1E} as an essential determinant of G-protein modulation. J Neurosci 18:4815–4824
35. Patil PG, de Leon M, Reed RR, Dubel S, Snutch TP, Yue DT (1996) Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. Biophys J 71:2509–2521
36. Penington NJ, Kelly JS, Fox AP (1991) A study of the mechanism of Ca^{2+} current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons. J Neurosci 11:3594–3609
37. Qin N, Olcese R, Zhou J, Cabello OA, Birnbaumer L, Stefani E (1996) Identification of a second region of the β-subunit involved in regulation of calcium channel inactivation. Am J Physiol 271: C1539–C1545
38. Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Direct interaction of $G_{\beta\gamma}$ with a C-terminal $G_{\beta\gamma}$-binding domain of the Ca^{2+} channel α_1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. Proc Natl Acad Sci USA 94:8866–8871
39. Reid CA, Bekkers JM, Clements JD (2003) Presynaptic Ca^{2+} channels: a functional patchwork. Trends Neurosci 26:683–687
40. Restituito S, Cens T, Barrere C, Geib S, Galas S, De Waard M, Charnet P (2000) The β_{2a} subunit is a molecular groom for the Ca^{2+} channel inactivation gate. J Neurosci 20:9046–9052
41. Sandoz G, Lopez-Gonzalez I, Stamboulian S, Weiss N, Arnoult C, De Waard M (2004) Repositioning of charged I–II loop amino acid residues within the electric field by β subunit as a novel working hypothesis for the control of fast P/Q calcium channel inactivation. Eur J Neurosci 19:1759–1772
42. Scott RH, Dolphin AC (1990) Voltage-dependent modulation of rat sensory neurone calcium channel currents by G protein activation: effect of a dihydropyridine antagonist. Br J Pharmacol 99:629–630
43. Scott VE, De Waard M, Liu H, Gurnett CA, Venzke DP, Lennon VA, Campbell KP (1996) β subunit heterogeneity in N-type Ca^{2+} channels. J Biol Chem 271:3207–3212
44. Simen AA, Lee CC, Simen BB, Bindokas VP, Miller RJ (2001) The C terminus of the Ca^{2+} channel α_{1B} subunit mediates selective inhibition by G-protein-coupled receptors. J Neurosci 21:7587–7597
45. Stephens GJ, Page KM, Bogdanov Y, Dolphin AC (2000) The α_{1B} Ca^{2+} channel amino terminus contributes determinants for β subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. J Physiol 525(Pt 2):377–390
46. Stotz SC, Hamid J, Spaetgens RL, Jarvis SE, Zamponi GW (2000) Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? J Biol Chem 275:24575–24582
47. Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. Nature 366:156–158
48. Weiss N, De Waard M (2006) Introducing an alternative biophysical method to analyze direct G protein regulation of voltage-dependent calcium channels. J Neurosci Methods. DOI 10.1016/j.jneumeth.2006.08.010
49. Weiss N, Arnoult C, Feltz A, De Waard M (2006) Contribution of the kinetics of G protein dissociation to the characteristic modifications of N-type calcium channel activity. Neurosci Res 56:332–343
50. Williams S, Serafin M, Muhlethaler M, Bernheim L (1997) Facilitation of N-type calcium current is dependent on the frequency of action potential-like depolarizations in dissociated cholinergic basal forebrain neurons of the guinea pig. J Neurosci 17:1625–1632
51. Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. Trends Neurosci 20:204–212
52. Zamponi GW (2001) Determinants of G protein inhibition of presynaptic calcium channels. Cell Biochem Biophys 34:79–94
53. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α_1 subunit. Nature 385:442–446
54. Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW (1996) Multiple structural elements in voltage-dependent Ca^{2+} channels support their inhibition by G proteins. Neuron 17:991–1003

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahern, C. A., Powers, P. A., Biddlecome, G. H., Roethe, L., Vallejo, P., Mortenson, L., Strube, C., Campbell, K. P., Coronado, R., and Gregg, R. G. (2001). Modulation of L-type Ca2+ current but not activation of Ca2+ release by the gamma1 subunit of the dihydropyridine receptor of skeletal muscle. BMC Physiol *1*, 8.

Arikkath, J., and Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. Curr Opin Neurobiol *13*, 298-307.

Arikkath, J., Chen, C. C., Ahern, C., Allamand, V., Flanagan, J. D., Coronado, R., Gregg, R. G., and Campbell, K. P. (2003). Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels. J Biol Chem *278*, 1212-1219.

Arnoult, C., Cardullo, R. A., Lemos, J. R., and Florman, H. M. (1996). Activation of mouse sperm T-type Ca2+ channels by adhesion to the egg zona pellucida. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 13004-13009.

Badou, A., Basavappa, S., Desai, R., Peng, Y. Q., Matza, D., Mehal, W. Z., Kaczmarek, L. K., Boulpaep, E. L., and Flavell, R. A. (2005). Requirement of voltage-gated calcium channel beta4 subunit for T lymphocyte functions. Science *307*, 117-121.

Badou, A., Jha, M. K., Matza, D., Mehal, W. Z., Freichel, M., Flockerzi, V., and Flavell, R. A. (2006). Critical role for the beta regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 15529-15534.

Ball, S. L., and Gregg, R. G. (2002). Using mutant mice to study the role of voltage-gated calcium channels in the retina. Adv Exp Med Biol *514*, 439-450.

Ball, S. L., Powers, P. A., Shin, H. S., Morgans, C. W., Peachey, N. S., and Gregg, R. G. (2002). Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. Invest Ophthalmol Vis Sci *43*, 1595-1603.

Barclay, J., Balaguero, N., Mione, M., Ackerman, S. L., Letts, V. A., Brodbeck, J., Canti, C., Meir, A., Page, K. M., Kusumi, K., *et al.* (2001). Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the Cacna2d2 gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. J Neurosci *21*, 6095-6104.

Bean, B. P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. J Gen Physiol *86*, 1-30.

Bean, B. P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. Nature *340*, 153-156.

Bech-Hansen, N. T., Naylor, M. J., Maybaum, T. A., Pearce, W. G., Koop, B., Fishman, G. A., Mets, M., Musarella, M. A., and Boycott, K. M. (1998). Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. Nat Genet *19*, 264-267.

Beguin, P., Mahalakshmi, R. N., Nagashima, K., Cher, D. H., Ikeda, H., Yamada, Y., Seino, Y., and Hunziker, W. (2006). Nuclear sequestration of beta-subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca2+ channel regulation. J Mol Biol *355*, 34-46.

Beguin, P., Nagashima, K., Gonoi, T., Shibasaki, T., Takahashi, K., Kashima, Y., Ozaki, N., Geering, K., Iwanaga, T., and Seino, S. (2001). Regulation of Ca2+ channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. Nature *411*, 701-706.

Beguin, P., Ng, Y. J., Krause, C., Mahalakshmi, R. N., Ng, M. Y., and Hunziker, W. (2007). RGK small GTP-binding proteins interact with the nucleotide kinase domain of Ca2+-channel beta -subunits via an uncommon effector-binding domain. J Biol Chem.

Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. Neuroscience *14*, 375-403.

Berggren, P. O., Yang, S. N., Murakami, M., Efanov, A. M., Uhles, S., Kohler, M., Moede, T., Fernstrom, A., Appelskog, I. B., Aspinwall, C. A., *et al.* (2004). Removal of Ca2+ channel beta3 subunit enhances Ca2+ oscillation frequency and insulin exocytosis. Cell *119*, 273-284.

Berrou, L., Klein, H., Bernatchez, G., and Parent, L. (2002). A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels. Biophys J *83*, 1429-1442.

Berrow, N. S., Campbell, V., Fitzgerald, E. M., Brickley, K., and Dolphin, A. C. (1995). Antisense depletion of beta-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. J Physiol *482 (Pt 3)*, 481-491.

Bezprozvanny, I., Scheller, R. H., and Tsien, R. W. (1995). Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. Nature *378*, 623-626.

Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., and De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca2+ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. Neuron *25*, 177-190.

Biel, M., Ruth, P., Bosse, E., Hullin, R., Stuhmer, W., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1990). Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. FEBS Lett *269*, 409-412.

Birnbaumer, L., Campbell, K. P., Catterall, W. A., Harpold, M. M., Hofmann, F., Horne, W. A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., and et al. (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. Neuron *13*, 505-506.

Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J., and Stefani, E. (1998). Structures and functions of calcium channel beta subunits. J Bioenerg Biomembr *30*, 357-375.

Blaszczyk, J., Li, Y., Yan, H., and Ji, X. (2001). Crystal structure of unligated guanylate kinase from yeast reveals GMP-induced conformational changes. J Mol Biol *307*, 247-257.

Bogdanov, Y., Brice, N. L., Canti, C., Page, K. M., Li, M., Volsen, S. G., and Dolphin, A. C. (2000). Acidic motif responsible for plasma membrane association of the voltage-dependent calcium channel beta1b subunit. Eur J Neurosci *12*, 894-902.

Bourinet, E., Charnet, P., Tomlinson, W. J., Stea, A., Snutch, T. P., and Nargeot, J. (1994). Voltage-dependent facilitation of a neuronal alpha 1C L-type calcium channel. Embo J *13*, 5032-5039.

Bourinet, E., Soong, T. W., Stea, A., and Snutch, T. P. (1996). Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 1486-1491.

Brabeck, C., Beschorner, R., Conrad, S., Mittelbronn, M., Bekure, K., Meyermann, R., Schluesener, H. J., and Schwab, J. M. (2004). Lesional expression of RhoA and RhoB following traumatic brain injury in humans. J Neurotrauma *21*, 697-706.

Brock, R., Hamelers, I. H., and Jovin, T. M. (1999). Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. Cytometry *35*, 353-362.

Brodbeck, J., Davies, A., Courtney, J. M., Meir, A., Balaguero, N., Canti, C., Moss, F. J., Page, K. M., Pratt, W. S., Hunt, S. P., *et al.* (2002). The ducky mutation in Cacna2d2 results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated alpha 2 delta-2 protein with abnormal function. J Biol Chem *277*, 7684-7693.

Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Rossant, J., and Kothary, R. (1995). The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. Nat Genet *10*, 301-306.

Burgess, D. L., Jones, J. M., Meisler, M. H., and Noebels, J. L. (1997). Mutation of the Ca2+ channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. Cell *88*, 385-392.

Burgess, D. L., and Noebels, J. L. (1999). Voltage-dependent calcium channel mutations in neurological disease. Ann N Y Acad Sci *868*, 199-212.

Burke, S. P., Adams, M. E., and Taylor, C. P. (1993). Inhibition of endogenous glutamate release from hippocampal tissue by Ca2+ channel toxins. Eur J Pharmacol *238*, 383-386.

Caddick, S. J., and Hosford, D. A. (1996). GABAB-activated gK+ in thalamic neurons in the lethargic (lh/lh) mouse model of generalized absence seizures. Neurosci Lett *205*, 29-32.

Caddick, S. J., Wang, C., Fletcher, C. F., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Hosford, D. A. (1999). Excitatory but not inhibitory synaptic transmission is reduced in lethargic (Cacnb4(lh)) and tottering (Cacna1atg) mouse thalami. J Neurophysiol *81*, 2066-2074.

Canti, C., Bogdanov, Y., and Dolphin, A. C. (2000). Interaction between G proteins and accessory subunits in the regulation of 1B calcium channels in Xenopus oocytes. J Physiol *527 Pt 3*, 419-432.

Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. Pharmacol Rev *57*, 411-425.

Catterall, W. A., and Striessnig, J. (1992). Receptor sites for Ca2+ channel antagonists. Trends Pharmacol Sci *13*, 256-262.

Cens, T., Mangoni, M. E., Richard, S., Nargeot, J., and Charnet, P. (1996). Coexpression of the beta2 subunit does not induce voltage-dependent facilitation of the class C L-type Ca channel. Pflugers Arch *431*, 771-774.

Charvin, N., L'Eveque, C., Walker, D., Berton, F., Raymond, C., Kataoka, M., Shoji-Kasai, Y., Takahashi, M., De Waard, M., and Seagar, M. J. (1997). Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. Embo J *16*, 4591-4596.

Chemin, J., Nargeot, J., and Lory, P. (2002). Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neuritogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. J Neurosci *22*, 6856-6862.

Chen, H., Puhl, H. L., 3rd, Niu, S. L., Mitchell, D. C., and Ikeda, S. R. (2005). Expression of Rem2, an RGK family small GTPase, reduces N-type calcium current without affecting channel surface density. J Neurosci *25*, 9762-9772.

Chen, J., DeVivo, M., Dingus, J., Harry, A., Li, J., Sui, J., Carty, D. J., Blank, J. L., Exton, J. H., Stoffel, R. H., and et al. (1995). A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. Science *268*, 1166-1169.

Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., Bredt, D. S., and Nicoll, R. A. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. Nature *408*, 936-943.

Chen, Y. H., Li, M. H., Zhang, Y., He, L. L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., Shen, Y., Zhang, H., Tong, L., and Yang, J. (2004). Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca2+ channels. Nature *429*, 675-680.

Chien, A. J., Carr, K. M., Shirokov, R. E., Rios, E., and Hosey, M. M. (1996). Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function. J Biol Chem *271*, 26465-26468.

Chien, A. J., Zhao, X., Shirokov, R. E., Puri, T. S., Chang, C. F., Sun, D., Rios, E., and Hosey, M. M. (1995). Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca2+ channels. J Biol Chem *270*, 30036-30044.

Chishti, A. H. (1998). Function of p55 and its nonerythroid homologues. Curr Opin Hematol *5*, 116-121.

Chu, P. J., Robertson, H. M., and Best, P. M. (2001). Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. Gene *280*, 37-48.

Cohen, R., Elferink, L. A., and Atlas, D. (2003). The C2A domain of synaptotagmin alters the kinetics of voltage-gated Ca2+ channels Ca(v)1.2 (Lc-type) and Ca(v)2.3 (R-type). J Biol Chem *278*, 9258-9266.

Cohen, R. M., Foell, J. D., Balijepalli, R. C., Shah, V., Hell, J. W., and Kamp, T. J. (2005). Unique modulation of L-type Ca2+ channels by short auxiliary beta1d subunit present in cardiac muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol *288*, H2363-2374.

Colecraft, H. M., Alseikhan, B., Takahashi, S. X., Chaudhuri, D., Mittman, S., Yegnasubramanian, V., Alvania, R. S., Johns, D. C., Marban, E., and Yue, D. T. (2002). Novel functional properties of Ca(2+) channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. J Physiol *541*, 435-452.

Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., and Perez-Reyes, E. (1998). Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca2+ channel gene family. Circ Res *83*, 103-109.

Currie, K. P., and Fox, A. P. (1997). Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. J Neurosci *17*, 4570-4579.

Curtis, B. M., and Catterall, W. A. (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. Biochemistry *23*, 2113-2118.

Day, N. C., Volsen, S. G., McCormack, A. L., Craig, P. J., Smith, W., Beattie, R. E., Shaw, P. J., Ellis, S. B., Harpold, M. M., and Ince, P. G. (1998). The expression of voltage-dependent calcium channel beta subunits in human hippocampus. Brain Res Mol Brain Res *60*, 259-269.

De Jongh, K. S., Merrick, D. K., and Catterall, W. A. (1989). Subunits of purified calcium channels: a 212-kDa form of alpha 1 and partial amino acid sequence of a phosphorylation site of an independent beta subunit. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 8585-8589.

De Jongh, K. S., Warner, C., and Catterall, W. A. (1990). Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. J Biol Chem *265*, 14738-14741.

De Waard, M., and Campbell, K. P. (1995). Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca2+ channel expressed in Xenopus oocytes. J Physiol *485 (Pt 3)*, 619-634.

De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V. E., Gurnett, C. A., and Campbell, K. P. (1997). Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. Nature *385*, 446-450.

De Waard, M., Pragnell, M., and Campbell, K. P. (1994). Ca2+ channel regulation by a conserved beta subunit domain. Neuron *13*, 495-503.

De Waard, M., Scott, V. E., Pragnell, M., and Campbell, K. P. (1996). Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca2+ channels. FEBS Lett *380*, 272-276.

Denier, C., Ducros, A., Durr, A., Eymard, B., Chassande, B., and Tournier-Lasserve, E. (2001). Missense CACNA1A mutation causing episodic ataxia type 2. Arch Neurol *58*, 292-295.

Dolphin, A. C. (1995). The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. Exp Physiol *80*, 1-36.

Dolphin, A. C. (2003). Beta subunits of voltage-gated calcium channels. J Bioenerg Biomembr *35*, 599-620.

Dubel, S. J., Starr, T. V., Hell, J., Ahlijanian, M. K., Enyeart, J. J., Catterall, W. A., and Snutch, T. P. (1992). Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 5058-5062.

Dubreuil, C. I., Marklund, N., Deschamps, K., McIntosh, T. K., and McKerracher, L. (2006). Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. Exp Neurol *198*, 361-369.

Dustan, H. P. (1996). Hypertension treatment. Its past and (perhaps) its future. Arch Intern Med *156*, 1913-1914.

Ellis, S. B., Williams, M. E., Ways, N. R., Brenner, R., Sharp, A. H., Leung, A. T., Campbell, K. P., McKenna, E., Koch, W. J., Hui, A., and et al. (1988). Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. Science *241*, 1661-1664.

Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., *et al.* (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. Neuron *25*, 533-535.

Escayg, A., De Waard, M., Lee, D. D., Bichet, D., Wolf, P., Mayer, T., Johnston, J., Baloh, R., Sander, T., and Meisler, M. H. (2000). Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. Am J Hum Genet *66*, 1531-1539.

Fatt, P., and Katz, B. (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. J Physiol *120*, 171-204.

Felix, R., Gurnett, C. A., De Waard, M., and Campbell, K. P. (1997). Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca2+ channel alpha2delta subunit. J Neurosci *17*, 6884-6891.

Feng, Z. P., Arnot, M. I., Doering, C. J., and Zamponi, G. W. (2001). Calcium channel beta subunits differentially regulate the inhibition of N-type channels by individual Gbeta isoforms. J Biol Chem *276*, 45051-45058.

Finlin, B. S., and Andres, D. A. (1997). Rem is a new member of the Rad- and Gem/Kir Ras-related GTP-binding protein family repressed by lipopolysaccharide stimulation. J Biol Chem *272*, 21982-21988.

Finlin, B. S., Correll, R. N., Pang, C., Crump, S. M., Satin, J., and Andres, D. A. (2006). Analysis of the complex between Ca2+ channelbeta -subunit and the rem GTPase. J Biol Chem.

Fitzgerald, E. M. (2000). Regulation of voltage-dependent calcium channels in rat sensory neurones involves a Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. J Physiol *527 Pt 3*, 433-444.

Fitzgerald, E. M. (2002). The presence of Ca2+ channel beta subunit is required for mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent modulation of alpha1B Ca2+ channels in COS-7 cells. J Physiol *543*, 425-437.

Fletcher, C. F., and Frankel, W. N. (1999). Ataxic mouse mutants and molecular mechanisms of absence epilepsy. Hum Mol Genet *8*, 1907-1912.

Flockerzi, V., Oeken, H. J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalie, A., and Trautwein, W. (1986). Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. Nature *323*, 66-68.

Foell, J. D., Balijepalli, R. C., Delisle, B. P., Yunker, A. M., Robia, S. L., Walker, J. W., McEnery, M. W., January, C. T., and Kamp, T. J. (2004). Molecular heterogeneity of calcium channel beta-subunits in canine and human heart: evidence for differential subcellular localization. Physiol Genomics *17*, 183-200.

Fox, A. P., Nowycky, M. C., and Tsien, R. W. (1987a). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. J Physiol *394*, 149-172.

Fox, A. P., Nowycky, M. C., and Tsien, R. W. (1987b). Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. J Physiol *394*, 173-200.

Freedman, S. B., Dawson, G., Villereal, M. L., and Miller, R. J. (1984). Identification and characterization of voltage-sensitive calcium channels in neuronal clonal cell lines. J Neurosci *4*, 1453-1467.

Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A., Saad, M., Forgacs, E., Latif, F., Wei, M. H., Lerman, M., Lee, J. H., Perez-Reyes, E., *et al.* (2000). Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). J Biol Chem *275*, 12237-12242.

Godreau, D., Neyroud, N., Vranckx, R., and Hatem, S. (2004). [MAGUKs: beyond ionic channel anchoring]. Med Sci (Paris) *20*, 84-88.

Grabner, M., Dirksen, R. T., Suda, N., and Beam, K. G. (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 *274*, 21913-21919.

Gregg, R. G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J. A., Coronado, R., and Powers, P. A. (1996). Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 13961-13966.

Grueter, C. E., Abiria, S. A., Dzhura, I., Wu, Y., Ham, A. J., Mohler, P. J., Anderson, M. E., and Colbran, R. J. (2006). L-type Ca2+ channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. Mol Cell *23*, 641-650.

Gurnett, C. A., De Waard, M., and Campbell, K. P. (1996). Dual function of the voltage-dependent Ca2+ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. Neuron *16*, 431-440.

Gurnett, C. A., Felix, R., and Campbell, K. P. (1997). Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca2+ channel alpha2delta and alpha1 subunits. J Biol Chem *272*, 18508-18512.

Guy, H. R., and Conti, F. (1990). Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. Trends Neurosci *13*, 201-206.

Haase, H., Karczewski, P., Beckert, R., and Krause, E. G. (1993). Phosphorylation of the L-type calcium channel beta subunit is involved in beta-adrenergic signal transduction in canine myocardium. FEBS Lett *335*, 217-222.

Hagiwara, S. (1975). Ca-dependent action potential. Membranes *3*, 359-381.

Hagiwara, S., Ozawa, S., and Sand, O. (1975). Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. J Gen Physiol *65*, 617-644.

Hanlon, M. R., and Wallace, B. A. (2002). Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. Biochemistry *41*, 2886-2894.

Harry, J. B., Kobrinsky, E., Abernethy, D. R., and Soldatov, N. M. (2004). New short splice variants of the human cardiac Cavbeta2 subunit: redefining the major functional motifs implemented in modulation of the Cav1.2 channel. J Biol Chem *279*, 46367-46372.

Heinemann, S. H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K., and Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. Nature *356*, 441-443.

Helton, T. D., and Horne, W. A. (2002). Alternative splicing of the beta 4 subunit has alpha1 subunit subtype-specific effects on Ca2+ channel gating. J Neurosci *22*, 1573-1582.

Helton, T. D., Kojetin, D. J., Cavanagh, J., and Horne, W. A. (2002). Alternative splicing of a beta4 subunit proline-rich motif regulates voltage-dependent gating and toxin block of Cav2.1 Ca2+ channels. J Neurosci *22*, 9331-9339.

Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Rousset, M., Charnet, P., Hudspeth, A. J., and Lesage, F. (2003). Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca2+-channel beta 4 subunit. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 307-312.

Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Vologodskaia, M., Hudspeth, A. J., and Lesage, F. (2002). RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels. Neuron *34*, 411-423.

Hidalgo, P., Gonzalez-Gutierrez, G., Garcia-Olivares, J., and Neely, A. (2006). The alpha 1-beta subunit interaction that modulates calcium channel activity is reversible and requires a competent alpha -interaction domain. J Biol Chem.

Hille, B. (1994). Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. Trends Neurosci *17*, 531-536.

Hillyard, D. R., Monje, V. D., Mintz, I. M., Bean, B. P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., and et al. (1992). A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca2+ channels. Neuron *9*, 69-77.

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952a). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J Physiol *116*, 473-496.

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J Physiol *116*, 449-472.

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J Physiol *116*, 497-506.

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952d). Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. Proc R Soc Lond B Biol Sci *140*, 177-183.

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952e). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J Physiol *117*, 500-544.

Hofmann, F., Biel, M., and Flockerzi, V. (1994). Molecular basis for Ca2+ channel diversity. Annu Rev Neurosci *17*, 399-418.

Hosford, D. A., Clark, S., Cao, Z., Wilson, W. A., Jr., Lin, F. H., Morrisett, R. A., and Huin, A. (1992). The role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice. Science *257*, 398-401.

Hosford, D. A., Lin, F. H., Kraemer, D. L., Cao, Z., Wang, Y., and Wilson, J. T., Jr. (1995). Neural network of structures in which GABAB receptors regulate absence seizures in the lethargic (lh/lh) mouse model. J Neurosci *15*, 7367-7376.

Hosford, D. A., Lin, F. H., Wang, Y., Caddick, S. J., Rees, M., Parkinson, N. J., Barclay, J., Cox, R. D., Gardiner, R. M., Hosford, D. A., *et al.* (1999). Studies of the lethargic (lh/lh) mouse model of absence seizures: regulatory mechanisms and identification of the lh gene. Adv Neurol *79*, 239-252.

Hughes, S. W., Lorincz, M., Cope, D. W., Blethyn, K. L., Kekesi, K. A., Parri, H. R., Juhasz, G., and Crunelli, V. (2004). Synchronized oscillations at alpha and theta frequencies in the lateral geniculate nucleus. Neuron *42*, 253-268.

Huguenard, J. R. (1996). Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. Annu Rev Physiol *58*, 329-348.

Hullin, R., Asmus, F., Ludwig, A., Hersel, J., and Boekstegers, P. (1999). Subunit expression of the cardiac L-type calcium channel is differentially regulated in diastolic heart failure of the cardiac allograft. Circulation *100*, 155-163.

Hullin, R., Khan, I. F., Wirtz, S., Mohacsi, P., Varadi, G., Schwartz, A., and Herzig, S. (2003). Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. J Biol Chem *278*, 21623-21630.

Hullin, R., Matthes, J., von Vietinghoff, S., Bodi, I., Rubio, M., D'Souza, K., Friedrich Khan, I., Rottlander, D., Hoppe, U. C., Mohacsi, P., *et al.* (2007). Increased Expression of the Auxiliary beta(2)-subunit of Ventricular L-type Ca Channels Leads to Single-Channel Activity Characteristic of Heart Failure. PLoS ONE *2*, e292.

Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F., and Flockerzi, V. (1992). Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. Embo J *11*, 885-890.

Ikemoto, N., Ronjat, M., and Meszaros, L. G. (1989). Kinetic analysis of excitation-contraction coupling. J Bioenerg Biomembr *21*, 247-266.

Imbrici, P., Eunson, L. H., Graves, T. D., Bhatia, K. P., Wadia, N. H., Kullmann, D. M., and Hanna, M. G. (2005). Late-onset episodic ataxia type 2 due to an in-frame insertion in CACNA1A. Neurology *65*, 944-946.

Imbrici, P., Jaffe, S. L., Eunson, L. H., Davies, N. P., Herd, C., Robertson, R., Kullmann, D. M., and Hanna, M. G. (2004). Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia. Brain *127*, 2682-2692.

Jay, S. D., Ellis, S. B., McCue, A. F., Williams, M. E., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., and Campbell, K. P. (1990). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. Science *248*, 490-492.

Jeng, C. J., Chen, Y. T., Chen, Y. W., and Tang, C. Y. (2006). Dominant-negative effects of human P/Q-type Ca2+ channel mutations associated with episodic ataxia type 2. Am J Physiol Cell Physiol *290*, C1209-1220.

Kang, M. G., Chen, C. C., Felix, R., Letts, V. A., Frankel, W. N., Mori, Y., and Campbell, K. P. (2001). Biochemical and biophysical evidence for gamma 2

subunit association with neuronal voltage-activated Ca2+ channels. J Biol Chem *276*, 32917-32924.

Kerr, L. M., and Yoshikami, D. (1984). A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. Nature *308*, 282-284.

Khan, Z., and Jinnah, H. A. (2002). Paroxysmal dyskinesias in the lethargic mouse mutant. J Neurosci *22*, 8193-8200.

Kim, D. K., and Catterall, W. A. (1997). Ca2+-dependent and -independent interactions of the isoforms of the alpha1A subunit of brain Ca2+ channels with presynaptic SNARE proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 14782-14786.

Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., and Hofmann, F. (1999). Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. J Neurosci *19*, 684-691.

Kohn, A. B., Anderson, P. A., Roberts-Misterly, J. M., and Greenberg, R. M. (2001). Schistosome calcium channel beta subunits. Unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. J Biol Chem *276*, 36873-36876.

Lacinova, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. Gen Physiol Biophys *24 Suppl 1*, 1-78.

Lee, A., Wong, S. T., Gallagher, D., Li, B., Storm, D. R., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1999a). Ca2+/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. Nature *399*, 155-159.

Lee, J. H., Daud, A. N., Cribbs, L. L., Lacerda, A. E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T., and Perez-Reyes, E. (1999b). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. J Neurosci *19*, 1912-1921.

Letts, V. A., Felix, R., Biddlecome, G. H., Arikkath, J., Mahaffey, C. L., Valenzuela, A., Bartlett, F. S., 2nd, Mori, Y., Campbell, K. P., and Frankel, W. N. (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca2+-channel gamma subunit. Nat Genet *19*, 340-347.

Leung, A. T., Imagawa, T., and Campbell, K. P. (1987). Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca2+ channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. J Biol Chem *262*, 7943-7946.

Lie, A. A., Blumcke, I., Volsen, S. G., Wiestler, O. D., Elger, C. E., and Beck, H. (1999). Distribution of voltage-dependent calcium channel beta subunits in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. Neuroscience *93*, 449-456.

Lin, F., Barun, S., Lutz, C. M., Wang, Y., and Hosford, D. A. (1999). Decreased (45)Ca(2)(+) uptake in P/Q-type calcium channels in homozygous lethargic (Cacnb4lh) mice is associated with increased beta3 and decreased beta4 calcium channel subunit mRNA expression. Brain Res Mol Brain Res *71*, 1-10.

Llinas, R., Sugimori, M., Lin, J. W., and Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 1689-1693.

Llinas, R., and Yarom, Y. (1981). Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. J Physiol *315*, 549-567.

Llinas, R. R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. Science *242*, 1654-1664.

Lory, P., and Nargeot, J. (1992). Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac Ca channels expressed in Xenopus laevis oocytes. Biochem Biophys Res Commun *182*, 1059-1065.

Ludwig, A., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1997). Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. J Neurosci *17*, 1339-1349.

Magga, J. M., Jarvis, S. E., Arnot, M. I., Zamponi, G. W., and Braun, J. E. (2000). Cysteine string protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels. Neuron *28*, 195-204.

McCright, B., Rivers, A. M., Audlin, S., and Virshup, D. M. (1996). The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. J Biol Chem *271*, 22081-22089.

McEnery, M. W., Copeland, T. D., and Vance, C. L. (1998a). Altered expression and assembly of N-type calcium channel alpha1B and beta subunits in epileptic lethargic (lh/lh) mouse. J Biol Chem *273*, 21435-21438.

McEnery, M. W., Vance, C. L., Begg, C. M., Lee, W. L., Choi, Y., and Dubel, S. J. (1998b). Differential expression and association of calcium channel subunits in development and disease. J Bioenerg Biomembr *30*, 409-418.

McGee, A. W., and Bredt, D. S. (1999). Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. J Biol Chem *274*, 17431-17436.

McGee, A. W., Dakoji, S. R., Olsen, O., Bredt, D. S., Lim, W. A., and Prehoda, K. E. (2001). Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a

mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. Mol Cell *8*, 1291-1301.

McGee, A. W., Nunziato, D. A., Maltez, J. M., Prehoda, K. E., Pitt, G. S., and Bredt, D. S. (2004). Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits. Neuron *42*, 89-99.

Meir, A., Bell, D. C., Stephens, G. J., Page, K. M., and Dolphin, A. C. (2000). Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of alpha 1 B by G beta gamma. Biophys J *79*, 731-746.

Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., and Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. Nature *340*, 230-233.

Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M. S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., and et al. (1991). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. Nature *350*, 398-402.

Moss, F. J., Viard, P., Davies, A., Bertaso, F., Page, K. M., Graham, A., Canti, C., Plumpton, M., Plumpton, C., Clare, J. J., and Dolphin, A. C. (2002). The novel product of a five-exon stargazin-related gene abolishes Ca(V)2.2 calcium channel expression. Embo J *21*, 1514-1523.

Murakami, M., Yamamura, H., Suzuki, T., Kang, M. G., Ohya, S., Murakami, A., Miyoshi, I., Sasano, H., Muraki, K., Hano, T., *et al.* (2003). Modified cardiovascular L-type channels in mice lacking the voltage-dependent Ca2+ channel beta3 subunit. J Biol Chem *278*, 43261-43267.

Nakai, J., Dirksen, R. T., Nguyen, H. T., Pessah, I. N., Beam, K. G., and Allen, P. D. (1996). Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. Nature *380*, 72-75.

Namkung, Y., Smith, S. M., Lee, S. B., Skrypnyk, N. V., Kim, H. L., Chin, H., Scheller, R. H., Tsien, R. W., and Shin, H. S. (1998). Targeted disruption of the Ca2+ channel beta3 subunit reduces N- and L-type Ca2+ channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca2+ channels in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 12010-12015.

Niidome, T., Kim, M. S., Friedrich, T., and Mori, Y. (1992). Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. FEBS Lett *308*, 7-13.

Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., and et al. (1984). Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. Nature *312*, 121-127.

Noronha-Blob, L., Richard, C., and U'Prichard, D. C. (1988). Voltage-sensitive calcium channels in differentiated neuroblastoma X glioma hybrid (NG108-15) cells: characterization by quin 2 fluorescence. J Neurochem *50*, 1381-1390.

Nowycky, M. C., Fox, A. P., and Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. Nature *316*, 440-443.

Opatowsky, Y., Chen, C. C., Campbell, K. P., and Hirsch, J. A. (2004). Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. Neuron *42*, 387-399.

Opatowsky, Y., Chomsky-Hecht, O., Kang, M. G., Campbell, K. P., and Hirsch, J. A. (2003). The voltage-dependent calcium channel beta subunit contains two stable interacting domains. J Biol Chem *278*, 52323-52332.

Ophoff, R. A., Terwindt, G. M., Vergouwe, M. N., van Eijk, R., Oefner, P. J., Hoffman, S. M., Lamerdin, J. E., Mohrenweiser, H. W., Bulman, D. E., Ferrari, M., *et al.* (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca2+ channel gene CACNL1A4. Cell *87*, 543-552.

Paarmann, I., Spangenberg, O., Lavie, A., and Konrad, M. (2002). Formation of complexes between Ca2+.calmodulin and the synapse-associated protein SAP97 requires the SH3 domain-guanylate kinase domain-connecting HOOK region. J Biol Chem *277*, 40832-40838.

Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., and Lee, J. H. (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. Nature *391*, 896-900.

Petersen, O. H., Michalak, M., and Verkhratsky, A. (2005). Calcium signalling: past, present and future. Cell Calcium *38*, 161-169.

Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., and Yue, D. T. (1999). Calmodulin is the Ca2+ sensor for Ca2+ -dependent inactivation of L-type calcium channels. Neuron *22*, 549-558.

Pinkstaff, J. K., Detterich, J., Lynch, G., and Gall, C. (1999). Integrin subunit gene expression is regionally differentiated in adult brain. J Neurosci *19*, 1541-1556.

Powers, P. A., Liu, S., Hogan, K., and Gregg, R. G. (1992). Skeletal muscle and brain isoforms of a beta-subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. J Biol Chem *267*, 22967-22972.

Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., and Campbell, K. P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. Nature *368*, 67-70.

Puri, T. S., Gerhardstein, B. L., Zhao, X. L., Ladner, M. B., and Hosey, M. M. (1997). Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels. Biochemistry *36*, 9605-9615.

Qiao, X., Hefti, F., Knusel, B., and Noebels, J. L. (1996). Selective failure of brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the cerebellum of stargazer, a mutant mouse with ataxia. J Neurosci *16*, 640-648.

Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997). Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca2+ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 8866-8871.

Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M. L., Codd, E. E., and D'Andrea, M. R. (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. Mol Pharmacol *62*, 485-496.

Raike, R. S., Kordasiewicz, H. B., Thompson, R. M., and Gomez, C. M. (2007). Dominant-negative suppression of Ca(v)2.1 currents by alpha(1)2.1 truncations requires the conserved interaction domain for beta subunits. Mol Cell Neurosci *34*, 168-177.

Randall, A., and Tsien, R. W. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca2+ channel currents in rat cerebellar granule neurons. J Neurosci *15*, 2995-3012.

Raymond, C., Walker, D., Bichet, D., Iborra, C., Martin-Moutot, N., Seagar, M., and De Waard, M. (1999). Antibodies against the beta subunit of voltage-dependent calcium channels in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Neuroscience *90*, 269-277.

Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci *21*, 267-271.

Regehr, W. G., and Mintz, I. M. (1994). Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses. Neuron *12*, 605-613.

Represa, A., Tremblay, E., and Ben-Ari, Y. (1990). Sprouting of mossy fibers in the hippocampus of epileptic human and rat. Adv Exp Med Biol *268*, 419-424.

Restituito, S., Cens, T., Barrere, C., Geib, S., Galas, S., De Waard, M., and Charnet, P. (2000a). The [beta]2a subunit is a molecular groom for the Ca2+ channel inactivation gate. J Neurosci *20*, 9046-9052.

Restituito, S., Cens, T., Rousset, M., and Charnet, P. (2001). Ca(2+) channel inactivation heterogeneity reveals physiological unbinding of auxiliary beta subunits. Biophys J *81*, 89-96.

Restituito, S., Thompson, R. M., Eliet, J., Raike, R. S., Riedl, M., Charnet, P., and Gomez, C. M. (2000b). The polyglutamine expansion in spinocerebellar ataxia type 6 causes a beta subunit-specific enhanced activation of P/Q-type calcium channels in Xenopus oocytes. J Neurosci *20*, 6394-6403.

Rohrkasten, A., Meyer, H. E., Nastainczyk, W., Sieber, M., and Hofmann, F. (1988). cAMP-dependent protein kinase rapidly phosphorylates serine- 687 of the skeletal muscle receptor for calcium channel blockers. J Biol Chem *263*, 15325-15329.

Rousset, M., Cens, T., Restituito, S., Barrere, C., Black, J. L., 3rd, McEnery, M. W., and Charnet, P. (2001). Functional roles of gamma2, gamma3 and gamma4, three new Ca2+ channel subunits, in P/Q-type Ca2+ channel expressed in Xenopus oocytes. J Physiol *532*, 583-593.

Sandoval, A., Andrade, A., Beedle, A. M., Campbell, K. P., and Felix, R. (2007). Inhibition of recombinant N-type Ca(V) channels by the gamma 2 subunit involves unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent mechanisms. J Neurosci *27*, 3317-3327.

Sandoval, A., Oviedo, N., Tadmouri, A., Avila, T., De Waard, M., and Felix, R. (2006). Two PEST-like motifs regulate Ca2+/calpain-mediated cleavage of the CaVbeta3 subunit and provide important determinants for neuronal Ca2+ channel activity. Eur J Neurosci *23*, 2311-2320.

Sandoz, G., Lopez-Gonzalez, I., Grunwald, D., Bichet, D., Altafaj, X., Weiss, N., Ronjat, M., Dupuis, A., and De Waard, M. (2004). Cavbeta-subunit displacement is a key step to induce the reluctant state of P/Q calcium channels by direct G protein regulation. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 6267-6272.

Schramm, M., Thomas, G., Towart, R., and Franckowiak, G. (1983). Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca2+ channels. Nature *303*, 535-537.

Scoggan, K. A., Friedman, J. H., and Bulman, D. E. (2006). CACNA1A mutation in a EA-2 patient responsive to acetazolamide and valproic acid. Can J Neurol Sci *33*, 68-72.

Sculptoreanu, A., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1993). Voltage-dependent potentiation of L-type Ca2+ channels due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. Nature *364*, 240-243.

Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J. H., and Bell, G. I. (1992). Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 584-588.

Sharp, A. H., Black, J. L., 3rd, Dubel, S. J., Sundarraj, S., Shen, J. P., Yunker, A. M., Copeland, T. D., and McEnery, M. W. (2001). Biochemical and anatomical evidence for specialized voltage-dependent calcium channel gamma isoform

expression in the epileptic and ataxic mouse, stargazer. Neuroscience *105*, 599-617.

Sheng, Z. H., Rettig, J., Takahashi, M., and Catterall, W. A. (1994). Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. Neuron *13*, 1303-1313.

Sheng, Z. H., Yokoyama, C. T., and Catterall, W. A. (1997). Interaction of the synprint site of N-type Ca2+ channels with the C2B domain of synaptotagmin I. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 5405-5410.

Sher, E., Biancardi, E., Pollo, A., Carbone, E., Li, G., Wollheim, C. B., and Clementi, F. (1992). omega-Conotoxin-sensitive, voltage-operated Ca2+ channels in insulin-secreting cells. Eur J Pharmacol *216*, 407-414.

Snutch, T. P., Leonard, J. P., Gilbert, M. M., Lester, H. A., and Davidson, N. (1990). Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. Proc Natl Acad Sci U S A *87*, 3391-3395.

Sonkusare, S., Palade, P. T., Marsh, J. D., Telemaque, S., Pesic, A., and Rusch, N. J. (2006). Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. Vascul Pharmacol *44*, 131-142.

Soong, T. W., Stea, A., Hodson, C. D., Dubel, S. J., Vincent, S. R., and Snutch, T. P. (1993). Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. Science *260*, 1133-1136.

Spafford, J. D., Van Minnen, J., Larsen, P., Smit, A. B., Syed, N. I., and Zamponi, G. W. (2004). Uncoupling of calcium channel alpha1 and beta subunits in developing neurons. J Biol Chem *279*, 41157-41167.

Starr, T. V., Prystay, W., and Snutch, T. P. (1991). Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 5621-5625.

Stea, A., Dubel, S. J., Pragnell, M., Leonard, J. P., Campbell, K. P., and Snutch, T. P. (1993). A beta-subunit normalizes the electrophysiological properties of a cloned N-type Ca2+ channel alpha 1-subunit. Neuropharmacology *32*, 1103-1116.

Stea, A., Soong, T. W., and Snutch, T. P. (1995). Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. Neuron *15*, 929-940.

Stephens, G. J., Page, K. M., Bogdanov, Y., and Dolphin, A. C. (2000). The alpha1B Ca2+ channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. J Physiol *525 Pt 2*, 377-390.

Strom, T. M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B. H., Wutz, K., Gutwillinger, N., Ruther, K., Drescher, B., *et al.* (1998). An L-type

calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. Nat Genet *19*, 260-263.

Swartz, K. J., Merritt, A., Bean, B. P., and Lovinger, D. M. (1993). Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca2+ channels and synaptic transmission. Nature *361*, 165-168.

Tae, W. S., Hong, S. B., Joo, E. Y., Han, S. J., Cho, J. W., Seo, D. W., Lee, J. M., Kim, I. Y., Byun, H. S., and Kim, S. I. (2006). Structural brain abnormalities in juvenile myoclonic epilepsy patients: volumetry and voxel-based morphometry. Korean J Radiol *7*, 162-172.

Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F., and Catterall, W. A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 5478-5482.

Takahashi, S. X., Miriyala, J., and Colecraft, H. M. (2004). Membrane-associated guanylate kinase-like properties of beta-subunits required for modulation of voltage-dependent Ca2+ channels. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 7193-7198.

Takahashi, S. X., Miriyala, J., Tay, L. H., Yue, D. T., and Colecraft, H. M. (2005). A CaVbeta SH3/guanylate kinase domain interaction regulates multiple properties of voltage-gated Ca2+ channels. J Gen Physiol *126*, 365-377.

Takahashi, T., and Momiyama, A. (1993). Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. Nature *366*, 156-158.

Takamori, M., Komai, K., and Iwasa, K. (2000). Antibodies to calcium channel and synaptotagmin in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Am J Med Sci *319*, 204-208.

Takeuchi, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M., and Takai, Y. (1997). SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. J Biol Chem *272*, 11943-11951.

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. Nature *328*, 313-318.

Tanaka, O., Sakagami, H., and Kondo, H. (1995). Localization of mRNAs of voltage-dependent Ca(2+)-channels: four subtypes of alpha 1- and beta-subunits in developing and mature rat brain. Brain Res Mol Brain Res *30*, 1-16.

Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997). A Xenopus oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 1703-1708.

Tauck, D. L., and Nadler, J. V. (1985). Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. J Neurosci *5*, 1016-1022.

Tonelli, A., D'Angelo, M. G., Salati, R., Villa, L., Germinasi, C., Frattini, T., Meola, G., Turconi, A. C., Bresolin, N., and Bassi, M. T. (2006). Early onset, non fluctuating spinocerebellar ataxia and a novel missense mutation in CACNA1A gene. J Neurol Sci *241*, 13-17.

Tottene, A., Moretti, A., and Pietrobon, D. (1996). Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. J Neurosci *16*, 6353-6363.

Tsien, R. W., Ellinor, P. T., and Horne, W. A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca2+ channels. Trends Pharmacol Sci *12*, 349-354.

Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R., and Fox, A. P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. Trends Neurosci *11*, 431-438.

Turner, T. J., Adams, M. E., and Dunlap, K. (1992). Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA. Science *258*, 310-313.

Uchitel, O. D., Protti, D. A., Sanchez, V., Cherksey, B. D., Sugimori, M., and Llinas, R. (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 3330-3333.

Ursu, D., Sebille, S., Dietze, B., Freise, D., Flockerzi, V., and Melzer, W. (2001). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit gamma1. J Physiol *533*, 367-377.

Uruno, K., O'Connor, M. J., and Masukawa, L. M. (1995). Effects of bicuculline and baclofen on paired-pulse depression in the dentate gyrus of epileptic patients. Brain Res *695*, 163-172.

van den Maagdenberg, A. M., Kors, E. E., Brunt, E. R., van Paesschen, W., Pascual, J., Ravine, D., Keeling, S., Vanmolkot, K. R., Vermeulen, F. L., Terwindt, G. M., *et al.* (2002). Episodic ataxia type 2. Three novel truncating mutations and one novel missense mutation in the CACNA1A gene. J Neurol *249*, 1515-1519.

Van Petegem, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., and Minor, D. L., Jr. (2004). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. Nature *429*, 671-675.

Varadi, G., Lory, P., Schultz, D., Varadi, M., and Schwartz, A. (1991). Acceleration of activation and inactivation by the beta subunit of the skeletal muscle calcium channel. Nature *352*, 159-162.

Vendel, A. C., Rithner, C. D., Lyons, B. A., and Horne, W. A. (2006a). Solution structure of the N-terminal A domain of the human voltage-gated Ca2+channel beta4a subunit. Protein Sci *15*, 378-383.

Vendel, A. C., Terry, M. D., Striegel, A. R., Iverson, N. M., Leuranguer, V., Rithner, C. D., Lyons, B. A., Pickard, G. E., Tobet, S. A., and Horne, W. A. (2006b). Alternative splicing of the voltage-gated Ca2+ channel beta4 subunit creates a uniquely folded N-terminal protein binding domain with cell-specific expression in the cerebellar cortex. J Neurosci *26*, 2635-2644.

Waeber, B. (2002). [The treatment of arterial hypertension: is it a simple routine?]. Arch Mal Coeur Vaiss *95 Spec No 6*, 3-6.

Wakamori, M., Niidome, T., Furutama, D., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Fujita, Y., Tanaka, I., Katayama, K., Yatani, A., Schwartz, A., and et al. (1994). Distinctive functional properties of the neuronal BII (class E) calcium channel. Receptors Channels *2*, 303-314.

Walker, D., Bichet, D., Campbell, K. P., and De Waard, M. (1998). A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca2+ channel alpha 1A subunit. J Biol Chem *273*, 2361-2367.

Walker, D., Bichet, D., Geib, S., Mori, E., Cornet, V., Snutch, T. P., Mori, Y., and De Waard, M. (1999). A new beta subtype-specific interaction in alpha1A subunit controls P/Q-type Ca2+ channel activation. J Biol Chem *274*, 12383-12390.

Wan, J., Khanna, R., Sandusky, M., Papazian, D. M., Jen, J. C., and Baloh, R. W. (2005). CACNA1A mutations causing episodic and progressive ataxia alter channel trafficking and kinetics. Neurology *64*, 2090-2097.

Watabe-Uchida, M., Govek, E. E., and Van Aelst, L. (2006). Regulators of Rho GTPases in neuronal development. J Neurosci *26*, 10633-10635.

Welling, A., Lacinova, L., Donatin, K., Ludwig, A., Bosse, E., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1995). Expression of the L-type calcium channel with two different beta subunits and its modulation by Ro 40-5967. Pflugers Arch *429*, 400-411.

Westenbroek, R. E., Hell, J. W., Warner, C., Dubel, S. J., Snutch, T. P., and Catterall, W. A. (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. Neuron *9*, 1099-1115.

Wheeler, D. B., Randall, A., and Tsien, R. W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca2+ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. Science *264*, 107-111.

Williams, M. E., Brust, P. F., Feldman, D. H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A. F., Velicelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (1992a). Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. Science *257*, 389-395.

Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (1992b). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. Neuron *8*, 71-84.

Williams, S. R., Toth, T. I., Turner, J. P., Hughes, S. W., and Crunelli, V. (1997). The 'window' component of the low threshold Ca2+ current produces input signal amplification and bistability in cat and rat thalamocortical neurones. J Physiol *505 (Pt 3)*, 689-705.

Wiser, O., Bennett, M. K., and Atlas, D. (1996). Functional interaction of syntaxin and SNAP-25 with voltage-sensitive L- and N-type Ca2+ channels. Embo J *15*, 4100-4110.

Wiser, O., Tobi, D., Trus, M., and Atlas, D. (1997). Synaptotagmin restores kinetic properties of a syntaxin-associated N-type voltage sensitive calcium channel. FEBS Lett *404*, 203-207.

Witcher, D. R., De Waard, M., Kahl, S. D., and Campbell, K. P. (1994). Purification and reconstitution of N-type calcium channel complex from rabbit brain. Methods Enzymol *238*, 335-348.

Woermann, F. G., Sisodiya, S. M., Free, S. L., and Duncan, J. S. (1998). Quantitative MRI in patients with idiopathic generalized epilepsy. Evidence of widespread cerebral structural changes. Brain *121 (Pt 9)*, 1661-1667.

Wu, L. G., and Saggau, P. (1995). Block of multiple presynaptic calcium channel types by omega-conotoxin-MVIIC at hippocampal CA3 to CA1 synapses. J Neurophysiol *73*, 1965-1972.

Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J. W., Strack, S., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2006). Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. Cell *127*, 1239-1251.

Yang, J., and Tsien, R. W. (1993). Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. Neuron *10*, 127-136.

Yue, Q., Jen, J. C., Thwe, M. M., Nelson, S. F., and Baloh, R. W. (1998). De novo mutation in CACNA1A caused acetazolamide-responsive episodic ataxia. Am J Med Genet *77*, 298-301.

Zamponi, G. W. (2003). Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. J Pharmacol Sci *92*, 79-83.

Zamponi, G. W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J., and Snutch, T. P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. Nature *385*, 442-446.

Zhong, H., Yokoyama, C. T., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1999). Reciprocal regulation of P/Q-type Ca2+ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. Nat Neurosci *2*, 939-941.