

Université de Montréal

**Analyse du promoteur et caractérisation initiale de la
régulation transcriptionnelle du gène KCNE1**

par

Zenab Mustapha

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Pharmacologie

Avril 2006

© Zenab Mustapha, 2006



W
H
USB
2007
V.128

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Analyse du promoteur et caractérisation initiale de la régulation transcriptionnelle du gène
KCNE1

Présenté par :
Zenab Mustapha

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Lucie Parent
Président-rapporteur

Dr Stanley Nattel
Directeur de recherche

Dr Guy Rousseau
Membre du jury

Résumé

Introduction : Le gène *KCNE1* code pour une sous-unité β (minK) entrant dans la formation du canal potassique à rectification retardée (I_{Ks}). Des évidences suggèrent que la régulation transcriptionnelle de *KCNE1* pourrait être impliquée dans des maladies cardiaques de même que dans la différence d'expression de *KCNE1* chez différentes espèces. De fait, cette étude suggère l'hypothèse que les éléments de régulation dans la région 5' de *KCNE1* pourraient contribuer à cette régulation. **Méthodes et résultats :** Le site d'initiation de la transcription du gène humain *KCNE1* a été déterminé et trois isoformes ont été identifiées dont une qui constitue >80% de l'expression dans le cœur humain, ce dernier a été utilisé lors des études. Une région de 1625pb a été clonée et son activité promotrice a été analysée en utilisant le système du gène rapporteur de la luciférase. Une analyse par délétions a montré que la région centrale du promoteur (-311/+16; 327pb) contient plusieurs éléments riches en GC et confère une expression sélective aux myocytes de rats néonataux (NRM) comparée aux cellules CHO. Trois boîtes GATA ont été localisées dans la région centrale du promoteur : la mutagenèse dirigée des trois boîtes a diminué l'activité promotrice et le niveau de cardiospécificité. L'importance des boîtes GATA a été confirmée par la capacité des petits ARN inhibiteurs (siRNA) contre la séquence GATA à diminuer l'activité promotrice. *KCNE1* semble être important pour la spécificité d'expression de I_{Ks} chez les espèces, avec un bas niveau de minK chez la souris associé à une très faible expression d' I_{Ks} . Le clonage de la région 5' chez la souris a montré une homologie de ~50% à celle de l'humain, avec la présence d'une seule boîte GATA dans la région correspondante à la région centrale du promoteur humain. Cette région de la souris possède une plus faible activité promotrice et cardiospécificité comparée à la même région chez l'humain. **Conclusions :** Les éléments promoteurs en amont du gène *KCNE1* semblent importants dans la régulation de la transcription, la cardiospécificité et la variation de l'expression de *KCNE1* chez différentes espèces.

Mots-clés: Canaux ioniques ; Promoteur ; Expression de gène ; Arythmie

Abstract

Introduction: The *KCNE1* gene encodes the β -subunit (minK) that is essential for cardiac slow delayed rectifier potassium current (I_{Ks}) formation. There is evidence that the transcriptional regulation of *KCNE1* expression may be important in disease-related I_{Ks} remodeling and species-dependent expression. This study addressed the hypothesis that 5'-regulatory elements may contribute to this regulation. **Methods and results:** The transcription start site of the human *KCNE1* gene was determined and three isoforms were identified, the isoform constituting >80% expression in human heart was further used for analysed. A 1625 bp region 5' to the transcriptional start site was cloned and promoter activity analyzed by subcloning into luciferase reporter plasmid. Successive deletions showed that the core promoter (-311/+16; 327-bp) contains several GC-rich consensus elements and comparison of expression in NRM and CHO cells showed that cardiomyocyte-specific expression was conferred by the 327-bp. Three GATA boxes were found in the core promoter: site-directed mutageneses of all three reduced promoter activity and cardiac-specific expression. The importance of GATA boxes has been confirmed by siRNA GATA4 experiments which decreased the promoter activity. *KCNE1* appears to be important for species-specific I_{Ks} expression, with low minK levels in the mouse and rabbit associated with very small functional currents I_{Ks} . Cloning of the mouse *KCNE1* 5'-regulatory region showed it to be about 50% homologous to human, with only 1 GATA box in the region corresponding to human core promoter. This mouse region had less promoter activity compared to the human counterpart and had reduced cardiospecificity. **Conclusions:** Promoter elements 5' to the *KCNE1* TSS appear important in transcriptional regulation, cardiac-specificity and interspecies.

Keywords : Ion channels ; Promoter ; Gene expression ; Arrhythmias

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xv
Première Partie : Introduction	1
1. Le potentiel d'action et les canaux ioniques cardiaques	1
1.1 Le potentiel d'action des cellules cardiaques.....	1
1.1.1 Les canaux ioniques dans la cellule excitable.....	2
1.1.2 Les phases du potentiel d'action cardiaque.....	3
1.2 Les canaux ioniques du potentiel d'action cardiaque	5
1.2.1 Les canaux sodiques voltage dépendants.....	6
1.2.1.1 Rôle physiologique de Na_v	6
1.2.1.2 Structure et bases moléculaires de Na_v	6
1.2.1.3 Les gènes et régions régulatrices de Na_v	8
1.2.2 Les canaux calciques voltage dépendants.....	12
1.2.2.1 Rôle physiologique de Ca_v	12
1.2.2.2 Structure et bases moléculaires de Ca_v	14
1.2.2.3 Les gènes et régions régulatrices de Ca_v	16
1.2.3 Les canaux potassique voltage dépendants.....	19
1.2.3.1 Rôle physiologique de K_v	19
1.2.3.2 Structure et bases moléculaires de K_v	23

1.2.3.3 Les gènes et régions régulatrices de K _v	25
1.2.3.4 Les sous-unités accessoires.....	31
1.2.3.4.1 La sous-unité MinK.....	31
1.2.3.4.1.1 Historique et clonage du gène MinK.....	31
1.2.3.4.1.2 Rôle physiologique et pathophysiologique de MinK.....	32
1.2.3.4.1.3 Structure et régulation de la protéine MinK.....	35
1.2.3.4.1.4 Organisation du gène codant pour MinK (KCNE1).....	36
1.2.3.4.1.5 Distribution tissulaire de KCNE1.....	38
2. Mécanismes de base de l'arythmie cardiaque.....	39
2.1 L'activité déclenchée	39
2.2 L'automatisme anormale	41
2.3 La réentrée.....	41
3. Régulation de la transcription des gènes.....	43
3.1 La machinerie basale de la transcription.....	43
3.2 La structure du gène	45
3.3 Les facteurs de transcription	50
Deuxième Partie : But du projet de recherche.....	52
Troisième Partie : Article : Characterization of the cardiac KCNE1 gene promoter .	54
Summary.....	56
Introduction.....	57
Material and methods.....	59
-Mapping of human KCNE1 transcription start site.....	59
-Quantification of KCNE1 transcripts.....	59

-Construction of promoter-luciferase fusion plasmids.....	60
-Cell culture.....	61
-Transfection and promoter activity measurements.....	61
-Mutation analysis of GATA elements.....	61
-Silencing effects of GATA4 siRNA.....	62
-Western blot analysis.....	62
-Angiotensin II stimulation.....	64
Results.....	65
-Three KCNE1 isoforms were defined by 5'RACE.....	65
-Isoform 1&2 are the most abundant in heart tissues.....	65
-Human KCNE1 promoter shows characteristic of housekeeping promoters.....	66
-The core promoter contains cardiac-specific elements.....	67
-Three GATA boxes are involved in the cardiac-specific activity.....	68
-Angiotensin II increased the core promoter activity.....	69
-Comparison of the human and mouse KCNE1 core promoter.....	69
Discussion.....	70
References.....	73
Footnotes.....	75
Figure legends and Figures.....	76
Quatrième Partie : Discussion et Conclusion	88
1. Localisation du SIT principal et identification des isoformes de KCNE1	88
1.1 La technique du 5' <i>RACE</i>	88
1.2 Les limites de la technique du 5' <i>RACE</i>	91
1.3 Les résultats obtenus du 5' <i>RACE</i>	92
1.4 Comparaison des résultats du 5' <i>RACE</i> avec les résultats publiés.....	93

2. Caractérisation du promoteur proximal de KCNE1	94
2.1 Analyse fonctionnelle initiale du promoteur de KCNE1	94
2.2 Comparaison de l'analyse fonctionnelle avec les résultats publiés.....	96
2.3 Analyse des sites de régulation du promoteur de KCNE1.....	97
2.4 Comparaison du promoteur de KCNE1 entre l'humain et la souris.....	99
3. Directions futures	101
 Bibliographie.....	 104
 Annexe :	
-Accord des coauteurs	I
-Contribution des coauteurs.....	II
-CV académique.....	III

Liste des tableaux

PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION

Tableau 1.1 Classification et distribution tissulaire des sous-unités α des canaux Na_v11

Tableau 1.2 Classification et distribution tissulaire des sous-unités α des canaux Ca_v13

Tableau 1.3 Classification des sous-unités α des canaux K_v fonctionnels.....30

TROISIÈME PARTIE : ARTICLE

Tableau 1 Primer information.....87

Liste des figures

PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION

Figure 1.1 Le potentiel d'action cardiaque.....	5
Figure 1.2 Le canal sodique dépendant du voltage.....	7
Figure 1.3 Le canal calcique dépendant du voltage.....	15
Figure 1.4 Le canal potassique à six segments transmembranaires dépendant du voltage...25	
Figure 1.5 Schéma du peptide Mink.....	34
Figure 1.6 La machinerie basale de la transcription.....	45
Figure 1.7 Schéma illustrant la structure d'un gène.....	46

TROISIÈME PARTIE: ARTICLE

Figure 1. 5'RACE results and proposed gene structure.....	79
Figure 2. Human <i>KCNE1</i> isoform quantification by real-time RT-QPCR.....	80
Figure 3. A. Analysis of <i>HKCNE1</i> promoter activity in NRM and CHO cells B. Comparison of the <i>HKCNE1</i> promoter activity expressed in NRM and in CHO cells.....	81
Figure 4. GATA elements mutation analysis.....	82
Figure 5. Silencing effects of GATA4 siRNA. A. Co-transfection of GATA4 siRNA with the <i>HKCNE1</i> core promoter. B. Co-transfection of GATA4 siRNA with the 3-GATA mutated core promoter construct. C. Western blot analysis of GATA4 and GAPDH siRNA knock-down efficiency.....	83

Figure 6. Effect of angiotensin II on <i>HKCNE1</i> promoter activity.....	84
Figure 7. Sequence alignments of <i>KCNE1</i> human (H) and mouse (M) core promoter sequences.....	85
Figure 8. A. Comparison of the human and mouse core promoter activity. B. Ratio of the human and mouse core promoter activity expressed in NRM and in CHO cells.....	86
QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION	
Figure 4.1 Schéma illustrant la technique du 5' <i>RACE</i>	90

Liste des abréviations

5'RACE : « Rapid amplification of 5' cDNA ends »

ADN : Acide désoxyribonuléique

ADNc : Acide désoxyribonuléique copie

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANF: « Atrial natriuretic factor »

ARN: Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNsi: Acide ribonucléique « small interfering »

AT1: Récepteur de type 1 de l'angiotensine

BNP : « Brain natriuretic peptide »

Ca_v : Canal calcique dépendant du voltage

CHO: « Chinese Hamster Ovary cells »

CIP: « Calf intestinal phosphatase »

ERG: « Ether a-go-go related gene »

EMSA: « Electrophoretic mobility shift assay»

HERG: «Human Ether a-go-go related gene »

I_{Ca} : Courant calcique entrant

I_K : Courant potassique sortant

I_{K1} : Courant potassique entrant à rectification entrante

I_{K(ACh)} : Canal potassique sensible à l'acétylcholine

I_{K(ATP)} : Canal potassique sensible à l'adénosine triphosphate

I_{Kr} : Composante rapide du courant potassique sortant retardé à rectification

I_{Ks} : Composante lente du courant potassique sortant retardé à rectification

I_{Kur} : Courant sortant ultra rapide retardé à rectification

I_{Na} : Courant sodique entrant

I_{to} : Courant potassique transitoire sortant

Inr : « Initiator » ou Codon initiateur

K_v : Canal potassique dépendant du voltage

Kb : kilobase

KDa : KiloDaltons

MEF2: « Myocyte-specific enhancer factor 2 »

Na_v : Canal sodique dépendant du voltage

NRM : « Neonatal rats myocytes »

Pb : paire de base

PCR : « Polymerase chain reaction »

PKC : Protéine kinase C

SIT : Site d'initiation de la transcription

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

TAP: « Tobacco acid pyrophosphatase »

TEA: Tétréthylammonium

TFIIA: « Transcription initiation factor IIA »

TFIIB: « Transcription initiation factor IIB »

TFIID: « Transcription initiation factor IID »

TFIIF: « Transcription initiation factor IIF »

TFIIH: « Transcription initiation factor IIH »

TSS: « Transcription start site »

Remerciements

Tout d'abord, mes premiers remerciements iront à Dr Stanley Nattel, mon directeur de recherche, qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui m'a guidée tout au long de mon cheminement.

J'adresse ma reconnaissance à Li Pang, qui m'a fait bénéficier de ses compétences en biologie moléculaire avec beaucoup de patience, et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Je voudrais également remercier mes collègues de laboratoire ainsi que les techniciennes, Chantal Maltais, Chantal St-Cyr, Nathalie L'Heureux et Evelyn Landry, qui m'ont apporté leur soutien et leur aide à chaque moment où j'en avais besoin. Merci aussi pour l'environnement favorable qu'elles ont su construire dans le laboratoire de Dr Nattel.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à mes parents, Mona et Mehanna, qui, par leur appui moral indéfectible, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Et finalement, merci à mes sœurs, Jana, Fatima et Bassema de même qu'à mes frères Bassem et Mustapha qui, par leurs conseils et encouragements, m'ont motivée dans les temps nécessaire.

Première Partie : Introduction

1. Le potentiel d'action et les canaux ioniques cardiaques

1. 1 Le potentiel d'action des cellules cardiaques

Le cœur est un organe musculaire qui assure la circulation sanguine en pompant le sang vers les vaisseaux sanguins et les organes du corps afin d'en maintenir le bon fonctionnement. Le fonctionnement mécanique normal du cœur humain dépend du bon fonctionnement électrique [1]. Les impulsions électriques sont générées spontanément du nœud sino-auriculaire, transmis par le myocarde atrial au nœud auriculo-ventriculaire, et envoyé ensuite au myocarde ventriculaire. L'activité électrique du myocarde est attribuée à la génération de potentiels d'action dans les cellules cardiaques individuelles. Le fonctionnement électrique normal coordonné du cœur est facilement détectable par la lecture du potentiel d'action sur la surface d'un électrocardiogramme [2].

Le potentiel d'action constitue un événement complexe qui implique le mouvement d'une variété d'ions à travers la membrane cellulaire par l'action combinée de nombreux canaux ioniques et transporteurs. Depuis une vingtaine d'années, grâce à la mise en œuvre des techniques électrophysiologiques telles que le patch clamp couplées à l'essor récent de la biologie moléculaire, il a pu être montré que le développement du potentiel d'action repose sur le fonctionnement de canaux ioniques membranaires dotés de propriétés spécifiques de perméabilité sélective aux ions. C'est ainsi que la distinction entre les cellules excitables et non-excitables s'est estompée.

1.1.1 Les canaux ioniques dans la cellule excitable

La configuration et la durée du potentiel d'action cardiaque varient considérablement selon les espèces et les différentes régions du cœur (ventricule et oreillette) de même que dans les différentes surfaces constituant ces régions (épicaarde et endocarde).

Les canaux ioniques sont des protéines qui traversent la membrane cellulaire et qui contrôlent de façon sélective le passage des ions à travers celle-ci. Les canaux ioniques sont constitués par des protéines qui s'assemblent entre elles pour former un pore plus ou moins sélectif à une ou quelques espèces ioniques [3]. La sélectivité d'un canal lui est conférée par la présence d'un filtre sélectif situé dans le pore du canal. Ainsi, le passage des ions à travers les canaux ioniques semble être déterminé par deux paramètres : les forces électrostatiques à l'intérieur du filtre sélectif et le diamètre du pore de sorte que seul les ions de taille et de charge appropriées puissent passer à travers ce canal. La structure du filtre et sa composition en acides aminés varient d'un type de canal à l'autre. En fait, le filtre se définit comme étant un rétrécissement à l'intérieur du pore constitué par plusieurs sites de liaison de l'ion. Chaque site possède un niveau d'énergie qui lui est propre, un ion possédant suffisamment d'énergie pour se fixer au premier site sera ensuite déplacé par un nouvel ion. Cet ion délogé se fixe sur un second site, et ainsi l'ion traversera le pore du canal [3]. La cristallisation du canal KcsA en 1998 (un canal potassique retrouvé dans la bactérie *Streptomyces lividans*) a permis, pour la première fois, de visualiser la structure moléculaire d'un canal potassique. Il existe un total de sept sites de liaison pour les ions K^+ au niveau du pore. Lorsque l'ion K^+ atteint la cavité du pore, il est entouré de huit molécules d'eau afin d'assurer une coordination optimale de l'ion. L'ion K^+ traverse ensuite le filtre de sélectivité pour arriver dans le milieu extracellulaire [4]. Les canaux ioniques régulent le passage d'ions en s'ouvrant et se fermant en réponse à certains stimuli.

L'identification de la structure primaire qui compose les canaux ioniques, la mise en évidence de la diversité spatiale et temporelle des assemblages de leurs sous-unités permettent d'en mieux comprendre le fonctionnement [5]. L'apparition coordonnée de divers canaux au cours de la maturation confère à la cellule une activité électrique intrinsèque particulière, conditionnant le succès de son organisation anatomique et fonctionnelle future. Outre ces caractéristiques propres liées à l'expression de certains canaux ioniques, une cellule excitable ou un réseau de cellules excitables engendrent différentes activités selon les stimuli constituant son environnement [6].

1.1.2 Les phases du potentiel d'action cardiaque

Le potentiel d'action cardiaque consiste en 5 phases (voir Figure 1.1), la phase 0 ou la dépolarisation rapide de la membrane, la phase 1 reflétée par la repolarisation partielle, la phase 2 ou le plateau, la phase 3 est la repolarisation rapide et la phase 4 constituée par la phase de repos du potentiel cardiaque.

Phase 0 : Les canaux sodiques sont les premiers impliqués dans le déclenchement du potentiel d'action. Lorsque le potentiel transmembranaire augmente à la suite d'une stimulation externe et qu'il atteint une valeur au-delà du seuil d'excitabilité, les canaux sodiques s'ouvrent pour permettre l'influx du courant sodique (I_{Na}). La phase 0 est donc provoquée par une entrée massive de sodium à l'intérieur de la cellule dans toutes les régions du cœur exceptées les nœuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire.

Phase 1 : La dépolarisation amorcée par l'activation de I_{Na} induit l'activation d'un courant potassique transitoire sortant I_{to} qui, en parallèle avec l'inactivation des canaux sodiques rapides, cause la phase de repolarisation rapide du potentiel d'action. La phase 1 correspond donc à la repolarisation partielle due à une sortie transitoire d'ions potassium.

Phase 2 : La phase plateau du potentiel d'action est celle où la contraction des cellules survient. Cette contraction est initiée par l'entrée d'ions calcium dans le cytoplasme par les courants calciques de longue durée (I_{Ca-L}). Les ions Ca^{2+} peuvent alors se lier aux récepteurs à la ryanodine (RyR) et induire le relargage de calcium du réticulum

endoplasmique [6, 7]. La phase 2 implique plusieurs autres courants ioniques, dans un premier temps, la dépolarisation initiale provoque une activation des canaux calciques avec un courant I_{Ca} entrant soutenu durant le plateau ; parallèlement à l'entrée de calcium, le plateau est de plus soutenu par un faible courant lent I_{Na} entrant. Au début de la phase 2, le potentiel transmembranaire initie en même temps l'ouverture des canaux potassiques produisant un courant sortant (I_K). L'entrée de charges positives transportées par les courants I_{Ca-L} , I_{Ca-T} , I_{Na} et I_{NaCa} est donc contrebalancée par la sortie d'ions K^+ et il en résulte un équilibre entre l'influx et l'efflux de ces charges positives qui culminent en un aplanissement du potentiel d'action, qui forme le plateau [2, 8].

Phase 3 : La fin du plateau coïncide avec la fin de l'équilibre qui existait entre les courants dépolarisateurs et repolarisateurs. L'inactivation des canaux calciques et sodiques lents est associée à l'activation des courants potassiques repolarisateurs (I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1}) qui atteignent une amplitude importante permettant à l'efflux potassique massif de dominer durant la phase de repolarisation pour le retour de la cellule vers son potentiel de repos. L'activation du courant I_{K1} est induite durant la repolarisation rapide contribuant ainsi à la repolarisation terminale de la phase 3 [8].

Phase 4 : La phase 4 est nommée phase de repos du potentiel cardiaque puisqu'il n'y a pas de changement notable dans le potentiel transmembranaire. L'ion majeur qui détermine le potentiel de repos est le gradient d'ions de potassium. Le canal responsable de la perméabilité aux ions potassium est le courant potassique à rectification entrante I_{K1} [2]. Plusieurs autres courants sont impliqués dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos des cellules, dont les courants potassiques $I_{K(ACH)}$ et $I_{K(ATP)}$. Cependant, l'élément majeur menant au rétablissement des gradients électrochimiques est la pompe Na^+/K^+ ATPase. L'ATPase Na^+/K^+ pompe activement des ions Na^+ vers l'extérieur et des ions K^+ vers l'intérieur de la cellule contre leurs gradients électrochimiques. Pour chaque molécule d'ATP hydrolysée à l'intérieur de la cellule, trois ions Na^+ sont pompés vers l'extérieur et deux ions K^+ vers l'intérieur. Certains tissus cardiaques, comme le nœud sino-auriculaire, possèdent des propriétés intrinsèques de stimulation, où un courant activé par

l'hyperpolarisation (I_f) s'active durant la phase 4 et dépoliarise les cellules jusqu'au seuil de déclenchement d'un potentiel d'action.

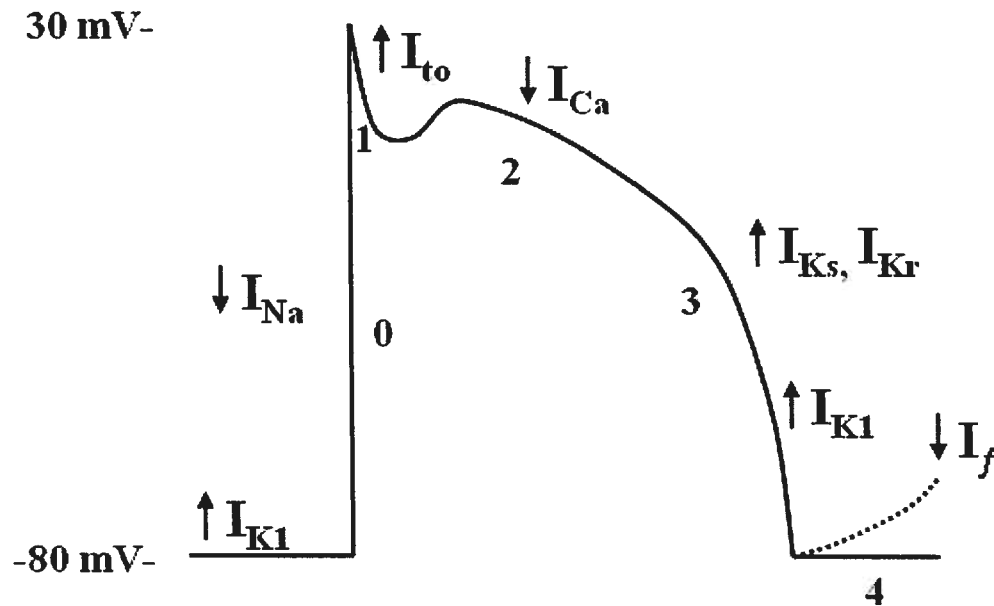


Figure 1.1 Le potentiel d'action cardiaque et les courants ioniques prédominants de chaque phase. Les flèches vers le bas représentent les courants entrants et celles vers le haut mettent en évidence les courants sortants de la cellule cardiaque.

1.2 Les canaux ioniques du potentiel d'action cardiaque

Le potentiel d'action du myocarde reflète une séquence d'activation et d'inactivation de courant entrant (sodique et calcique) et sortant (potassique) transporté par des canaux ioniques. Dans les différentes régions du cœur, la morphologie du potentiel d'action varie due à la différence d'expression des canaux sodiques, calciques et potassiques. Ces différences contribuent à la propagation normale et unidirectionnelle de l'activité et de la génération d'un rythme cardiaque normal.

1.2.1 Les canaux sodiques voltage dépendants

1.2.1.1 Rôle physiologique de Na_v

Les canaux sodiques voltage dépendant (Na_v) s'ouvrent rapidement lors de la dépolarisation membranaire et sont responsables de l'élévation rapide du potentiel d'action enregistré dans les myocytes ventriculaires et auriculaires ainsi que dans les cellules de Purkinje [9, 10]. L'expression du canal Na_v a aussi été observée dans des cellules des nœuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire [11-14]. Au cours de la dépolarisation membranaire, le canal Na_v cardiaque s'active et s'inactive rapidement [15, 16]. Le seuil d'activation du canal Na_v est négatif, il atteint approximativement -55mV et la cinétique d'activation dépend donc du voltage.

1.2.1.2 Structure et bases moléculaires de Na_v

En 1952, les premiers courants sodiques ont été enregistrés par Hodgkin et Huxley [17]. Leurs travaux classiques ont défini les trois caractéristiques clés des canaux Na^+ : l'activation voltage dépendante, l'inactivation rapide et la conductance sélective aux ions Na^+ . Depuis, plusieurs études structure-fonction ont révélé des particularités importantes impliquées dans la fonction des bases moléculaires du canal Na_v . Le canal sodique est constitué d'une sous-unité α (environ 260 kDa) encodant le cœur du canal et d'au moins une sous-unité auxiliaire β (30-40 kDa) qui modifie la fonction du canal [18]. Deux différentes sous-unités auxiliaires β ont été identifiées ($\beta 1$ et $\beta 2$). La sous-unité α possède 4 domaines homologues (I à IV), chacun formé par six segments transmembranaires (S1 à S6), ces domaines s'assemblent pour former le pore sélectif aux ions sodium (voir Figure 2.). Une boucle située entre les segments S5 et S6 se replie vers l'intérieur et contribue à former le pore ionique. Les propriétés fondamentales du canal sodique sont principalement

déterminées par la sous-unité α , cependant la sous-unité β joue un rôle modulateur important dans la fonction du canal en modifiant la cinétique et l'ouverture canal dépendant du voltage [19]. La courte boucle intracellulaire située entre les domaines III et IV joue un rôle important dans l'inactivation du canal Na_v par son pivotement vers le pore du canal [20] et un motif critique composé de trois acides aminés (isoleucine, phénylalanine, méthionine, (IFM)), situé à l'intérieur de cette boucle, a été identifié comme étant un composant moléculaire nécessaire pour l'inactivation du canal Na_v [21, 22, 23]. Ce concept est supporté par des études utilisant la mutagénèse dirigée et l'expression de canaux mutants dans des systèmes hétérologues d'expression. Le segment S4 de chaque domaine du canal possède la propriété de détecter le voltage par l'intermédiaire de résidus chargés positivement, séparé par des intervalles de trois résidus. Ce segment S4 serait donc sensible au changement de voltage et entraînerait un changement de conformation du canal pour permettre l'ouverture du pore. Ce motif S4 est conservé dans les canaux calciques, potassiques et sodiques, ce qui suggère qu'il existe un mécanisme commun d'activation des canaux ioniques dépendants du voltage.

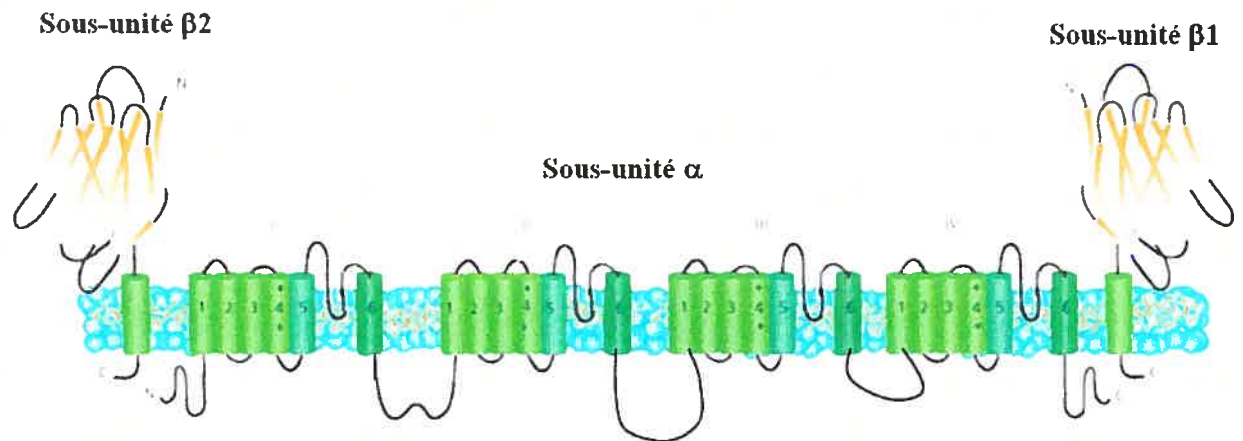


Figure 1.2 Structure de l'arrangement transmembranaire du canal sodique dépendant du voltage. Les quatre domaines de la sous-unité principale de même que les sous-unités auxiliaires sont illustrés.

1.2.1.3 Les gènes et régions régulatrices de Na_v

Les canaux sodiques ont été les premiers membres de la superfamille des canaux ioniques à être découvert ; la superfamille inclut aussi les canaux potassiques et calciques dépendants du voltage [6]. Le canal sodique voltage dépendant a été identifié chez une variété d'animaux de même que chez les mammifères et les vertébrés non mammifères. Il existe 9 isoformes du canal Na_v, partageant plus de 80% d'homologie au niveau des domaines transmembranaires et extracellulaires. Au moins 20 exons encodent chacune de ces neuf sous-unités α des canaux sodiques. Selon une analyse évolutionnaire, les canaux Na_v sont classés en 4 groupes selon le chromosome sur lequel ils sont encodés. Les gènes encodant les canaux sodiques Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 et Na_v1.7 sont localisés sur le chromosome 2 chez l'humain et la souris. Un second groupe incluant les canaux Na_v1.5, Na_v1.8 et Na_v1.9 sont encodés au niveau du chromosome 3 chez l'humain et la souris. Les deux isoformes Na_v1.4 et Na_v1.6 se retrouvent respectivement sur les chromosomes 17 et 12 chez l'humain, formant chacun un groupe individuel (voir Tableau 1.1) [24]. Bien que les différents isoformes partagent un niveau d'homologie élevé (75-85%), il reste que ces canaux sodiques diffèrent au niveau de certains résidus acides aminés qui confèrent un degré différent de résistance à la tétrodontoxine [24]. Dans le canal Na_v1.5, la seule mutation d'un seul acide aminé, la phénylalanine en cystéine, située dans la région du pore du domaine I est responsable d'une diminution significative de la sensibilité à la tétrodontoxine [25].

Le contrôle de l'excitabilité peut survenir au niveau génomique par la régulation transcriptionnelle des gènes des canaux ioniques. L'expression du canal sodique est régulée en fonction du stade de développement de l'organisme et de la région tissulaire. Les mécanismes qui contrôlent l'expression de ces gènes ne sont pas encore clairement élucidés [26]. Sheng *et al.* ont analysé la régulation transcriptionnelle du gène Na_v1.2 (rSkM2) par le clonage moléculaire et l'analyse fonctionnelle de son promoteur [27]. Une

région de 3.7 Kb du gène en question a été isolée, son analyse a permis de localiser les sites multiples d'initiation de la transcription ainsi que la région centrale du promoteur. La région centrale du promoteur comportait nécessairement des éléments de régulation ayant une grande influence sur la régulation transcriptionnelle. Ces études ont démontré que l'expression du gène *rSkM2* dépend de l'interaction de régulateurs positifs et négatifs de la transcription ainsi que d'éléments localisés dans le promoteur dont la fonction est spécifique au tissu et au stade de développement [27].

Les travaux entrepris par Sheng *et al.* ont inspiré d'autres chercheurs à rechercher la régulation transcriptionnelle des canaux sodiques voltage-dépendants. L'isoforme $\text{Na}_v1.5$ exprimé au niveau cardiaque est encodé par le gène *SCN5A*. Yang *et al.* ont localisé le site majeur d'initiation de la transcription (SIT) de *SCN5A*, ce qui leur a permis de cloner la région promotrice de ce gène [28]. Des éléments de régulation cardiaque ont été définis à proximité du SIT par une analyse de délétions et de mutations ainsi que par une technique qui permet de mettre en évidence l'interaction entre l'ADN et la protéine en question [28]. Par exemple, un site de liaison du facteur de transcription GATA a été prédit à 542pb en aval du SIT. La mutation de ce site GATA a confirmé son importance par une diminution significative de l'activité transcriptionnelle et un gel électrophorétique a permis de mettre en évidence l'interaction entre l'ADN constituant son site de liaison et la protéine GATA (*EMSA*). La région régulatrice en amont du SIT, hautement conservée à travers les gènes de Na_v , ne comportait aucune boîte TATA, par contre, elle était riche en GC et possédait trois boîtes GC qui servirait comme site de liaison pour le facteur de transcription Sp1. Comme c'est souvent le cas chez les gènes sans boîte TATA et riche en GC, de multiples sites d'initiation à la transcription ont été localisés dans une courte séquence de la région régulatrice de *SCN5A*. Les travaux de Yang *et al.*, ont été poursuivis par ceux de Shang et Dubley [29]. Ces derniers ont recherché les éléments régulateurs du gène *SCN5A* chez la souris. Ils ont identifié des sites multiples d'initiation de la transcription associés avec trois différents variant de la région 5' non codante due à l'épissage alternatif. De plus, deux

variants de la région 3' du gène ont aussi été identifiés. L'abondance de l'ARN messenger de ces variants est régulée en fonction du stade de développement de la souris. Des analyses de la région promotrice révèlent la localisation d'éléments régulateurs spécifiques au cœur. Chaque région promotrice était précédée par un élément répresseur de la transcription [29]. Ainsi, le gène est caractérisé par une régulation transcriptionnelle complexe induisant la possibilité de six variants d'ARN messenger ce qui implique nécessairement un contrôle d'expression important au niveau de la transcription.

L'expression du canal $Na_v1.5$ est surtout notée au niveau du muscle cardiaque, mais il a été aussi observé dans le muscle squelettique prénatal et le muscle lisse circulaire jéjunal [28, 29]. Le gène *SCN5A* a été cloné chez différentes espèces, notamment l'humain, le rat, la souris, la vache, le chien et le cobaye [29]. L'alignement de la séquence nucléotidique du gène *SCN5A* chez ces espèces montre un degré d'identité remarquablement élevé. Par exemple, le degré d'identité entre l'humain, le rat et la souris est de 99% et la structure génomique est maintenue dans toutes les espèces pour lesquels la séquence est connue.

Canal	Nom du Gène	Localisation sur le chromosome	Distribution prédominante
Na _v 1.1	<i>SCN1A</i>	2q24	SNC, SNP
Na _v 1.2	<i>SCN2A</i>	2q23-24	SNC
Na _v 1.3	<i>SCN3A</i>	2q24	SNC
Na _v 1.4	<i>SCN4A</i>	17q23-25	Muscle squelettique
Na _v 1.5	<i>SCN5A</i>	3p21	Muscle cardiaque
Na _v 1.6	<i>SCN8A</i>	12q13	SNC, SNP
Na _v 1.7	<i>SCN9A</i>	2q24	SNP
Na _v 1.8	<i>SCN10A</i>	3p22-24	SNP
Na _v 1.9	<i>SCN11A</i>	3p21-24	SNP

Tableau 1.1 Classification et distribution tissulaire des sous-unités α des canaux Na_v.
SNC : système nerveux central, SNP : système nerveux périphérique.

1.2.2 Les canaux calciques voltage dépendants

1.2.2.1 Rôle physiologique de Ca_v

Les canaux Ca^{2+} voltage dépendants sont l'une des voies d'entrée les plus importantes d'ions Ca^{2+} dans les cellules cardiaques, ce qui facilite la régulation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre [1, 31]. Contrairement au muscle squelettique, il est reconnu depuis longtemps que l'entrée de calcium du milieu extracellulaire est requise pour le couplage excitation-contraction du myocarde. Le calcium extracellulaire pénètre dans la cellule pendant la phase 2 ou plateau du potentiel d'action. Les canaux calciques voltage dépendants concourent à l'élévation de la concentration de calcium intracytoplasmique des fibres myocardiques. Cette augmentation provoque un renforcement de leur contraction. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire est donc à l'origine de la contraction musculaire [32].

Les canaux Ca_v sont fermés au potentiel de repos et s'ouvrent lors d'une dépolarisation de la cellule. Ils présentent au moins trois formes cinétiques, soit, l'état fermé, ouvert ou inactivé. On distingue les LVA (*Low voltage activated*) ou canaux à bas seuil, et les HVA (*High voltage activated*) ou canaux à haut seuil, qui s'activent respectivement à de faibles ou plus fortes dépolarisations. Les canaux LVA comprennent les canaux calciques de type T et les HVA incluent les types L, N, P/Q et R. Ces canaux se distinguent par leur voltage dépendance, leurs cinétiques d'activation, d'inactivation et de désactivation, leur conductance unitaire, leur sensibilité aux agents pharmacologiques et leur distribution [33]. Dans le muscle cardiaque de mammifère, au moins deux types de courant calciques peuvent être enregistrés : le courant de type L (I_{Ca-L}) et le courant de type T (I_{Ca-T}). Le courant de type L (pour *Long-lasting*) est un courant soutenu, à l'inverse, le courant de type T (pour *Transient*) est un courant transitoire dont la cinétique d'activation et d'inactivation est rapide [2]. Le courant de type L est exprimé partout dans le cœur de mammifère [34, 35]. L'entrée de calcium par les canaux I_{Ca-L} est fortement responsable de la formation du

plateau dans le potentiel d'action au niveau des cellules ventriculaire et de Purkinje. L'expression de ces derniers est aussi notée dans les nœuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire, où ils jouent un rôle dans la génération du potentiel d'action et dans la régulation de l'automatisme [11-13, 35-37]. L'expression des canaux I_{Ca-T} a été détectée dans les cellules de Purkinje et du nœud sino-auriculaire [2]. Cependant, jusqu'à ce jour, la présence des canaux I_{Ca-T} n'a pas été observée dans les cellules du myocarde [35, 38].

Canal	Courant	Isoforme	Nom du Gène	Localisation sur le chromosome	Distribution prédominante
Ca _v 1.1	L	α_{1S}	<i>CACNA1S</i>	1q31-32	Muscle squelettique
Ca _v 1.2	L	α_{1C}	<i>CACNA1C</i>	12p13.3	Cœur, Cerveau
Ca _v 1.3	L	α_{1D}	<i>CACNA1D</i>	3p14.3	Cerveau
Ca _v 1.4	L	α_{1F}	<i>CACNA1F</i>	Xp11.23	Rétine
Ca _v 2.1	P/Q	α_{1A}	<i>CACNA1A</i>	19p13.1-2	Cerveau, Cœur
Ca _v 2.2	N	α_{1B}	<i>CACNA1B</i>	9q34	Cerveau
Ca _v 2.3	R	α_{1E}	<i>CACNA1E</i>	1q25-31	Cerveau
Ca _v 3.1	T	α_{1G}	<i>CACNA1G</i>	17q22	Cerveau
Ca _v 3.2	T	α_{1H}	<i>CACNA1H</i>	16p13.3	Rein, Foie, Cœur
Ca _v 3.3	T	α_{1I}	<i>CACNA1I</i>	22q13	Cerveau

Tableau 1.2 Classification et distribution tissulaire des sous-unités α des canaux Ca_v.

1.2.2.2 Structure et bases moléculaires de Ca_v

Tout comme les canaux Na_v , les canaux calciques voltage dépendants sont membres de la superfamille génétique des canaux ioniques transmembranaires [33, 35, 38-40]. Les canaux calciques ont été identifiés en premier lieu par Fatt et Katz (1953) et des études subséquentes ont permis leur caractérisation biochimique [32]. Les canaux Ca_v constituent des complexes protéiques composés de 3 ou 4 sous-unités distinctes qui sont codées par de multiples gènes (voir Figure 1.3) [10]. La composante majeure est la sous-unité α_1 possédant un poids moléculaire entre 190 et 250 kDa. Cette sous-unité porte les fonctions de base du canal ; elle est responsable de la formation du pore sélectif aux ions Ca^{2+} , elle incorpore le détecteur de potentiel et est donc impliquée dans l'ouverture/fermeture du canal. Elle possède des sites connus de régulation par des seconds messagers, des agents pharmacologiques (agonistes et antagonistes) et des toxines. La sous-unité α_1 du canal Ca_v est organisée d'une façon semblable à la sous-unité α du canal Na_v , cette dernière est constituée de 4 domaines homologues (I-IV) reliés par des boucles intracellulaires et incluant chacun 6 segments transmembranaires (S1-S6) en hélice α . Par analogie avec les canaux sodiques, le segment S4 est considéré comme le détecteur de potentiel ; en réponse à une dépolarisation de la membrane, les résidus chargés positivement se déplacent, induisant ainsi un changement de conformation de la protéine et l'ouverture du canal. Le pore formé entre les segments S5 et S6 de chaque domaine détermine la sélectivité et la conductance des ions calciques. La sélectivité du canal pour le calcium repose sur la présence dans ce pore d'un anneau de quatre résidus glutamate chargés négativement et constituant des sites de liaison à haute affinité pour le calcium. Il est étonnant de constater que le changement de seulement trois acides aminés dans la région du pore des domaines I, III et IV convertit la sélectivité du canal sodique pour les ions calciques [41]. Une sous-unité β (60 kDa) intracellulaire de même qu'une sous-unité $\alpha_2\delta$ (170 kDa) sont des composantes accessoires de la majorité des canaux calciques. La sous-unité β se lie via

un motif hautement conservé de 18 résidus à la boucle située entre les domaines I et II de la sous-unité α_1 . De son côté, la sous-unité $\alpha_2\delta$ est reliée par un pont disulfure. Une sous-unité γ (30 kDa) supplémentaire a été observée dans le complexe protéique du canal calcique du muscle squelettique. Ces sous-unités auxiliaires ou régulatrices sont impliquées dans la modulation de la structure tertiaire et des propriétés du canal, cependant, il est important de noter que la diversité électrophysiologique et pharmacologique découlent principalement de l'existence de plusieurs sous-unités α_1 [42].

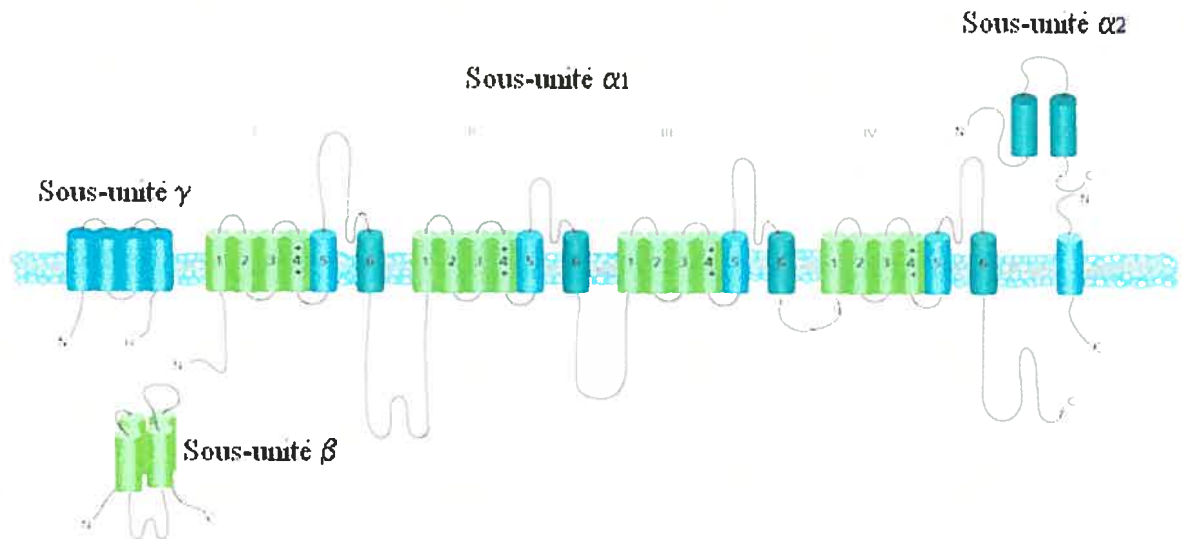


Figure 1.3 Illustration de la structure du canal calcique dépendant du voltage. Les quatre domaines de la sous-unité principale de même que les sous-unités auxiliaires sont illustrés.

1.2.2.3 Les gènes et régions régulatrices de Ca_v

La sous-unité α_1 du Ca_v de mammifères est encodé par au moins 10 gènes distincts [41]. Historiquement, une variété de nom a été attribuée aux produits des gènes correspondants aux canaux calciques, donnant lieu à une nomenclature parfois confuse. Ce n'est qu'en 2000 qu'une nomenclature rationnelle fut adoptée [43]. D'un point de vue structurel, les différents isoformes de la sous-unité α_1 peuvent être classées en 3 groupes (voir Tableau 2.). La sous-famille Ca_v1 ($Ca_v1.1$ à $Ca_v1.4$) inclue les canaux composés respectivement de α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} et α_{1F} formant le courant de type L. La sous-famille Ca_v2 ($Ca_v2.1$ à $Ca_v2.3$) inclut les canaux composés de α_{1A} , α_{1B} et α_{1E} formant de type P/Q, N et R respectivement. Enfin, la 3^e sous-famille Ca_v3 ($Ca_v3.1$ à $Ca_v3.3$) inclut les canaux composés de α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} formant le courant des canaux calciques voltages dépendants de type T [43]. Les séquences d'acides aminés complètes de ces sous-unités α partagent une homologie près de 70% à l'intérieur d'une même sous-famille et moins que 40% parmi les différentes sous-familles. Par conséquent, les différents gènes de la sous-unité α_1 sont largement dispersés dans le génome.

Les évidences moléculaires et biochimiques suggèrent que l'isoforme $Ca_v1.2$, qui encode la sous-unité α_{1C} , est le plus exprimé au niveau du myocarde de mammifère [1]. En effet, la fonction et l'abondance des canaux calciques de type L joue un rôle déterminant dans la performance contractile des myocytes [44, 45]. Cependant, il est connu que la sous-unité α_{1C} subit un épissage alternatif menant à la formation de trois isoformes distincts au point de vue fonctionnel et moléculaire : α_{1C-A} semble être l'isoforme prédominant au niveau cardiaque, α_{1C-B} au niveau du muscle lisse et α_{1C-C} au niveau du tissu neuronal [46, 47]. Il est intéressant de constater que même si les différents variants de α_{1C} sont identiques à plus de 95% dans leur contenu en acides aminés, ils sont exprimés dans différents tissus ou cellules. Les canaux calciques de type L sont nommés également récepteur des dihydropyridines (DHPR) en raison de leur sensibilité à ces agents pharmacologiques [48].

L'abondance de ces canaux peut être régulée à plusieurs points, certaines données suggèrent que la régulation de l'expression de l'ARNm au niveau transcriptionnel joue un rôle important.

La structure du gène de la sous-unité α_{1C} a été reportée par Soldatov (1994) et Yamada *et al.* (1995) [49, 50]. Le gène *CACNA1C* encodant la sous-unité α_{1C} couvre près de 150 kpb du génome humain, il est composé de 44 invariants et 6 exons alternatifs [1, 49]. Le premier exon comprend un codon d'initiateur (Inr) qui correspond normalement au site majeur d'initiation à la transcription et la région 5' non codante. Cette région 5' semble être sujette à l'épissage alternatif. Quoi qu'il en soit, la séquence nucléotidique des exons à proximité de la région 5' du gène codant pour la sous-unité α_{1C} chez l'humain est considérablement différente de la séquence d'ADNc de la sous-unité α_{1C} dans l'aorte du rat qui a été reporté par Koch *et al.* (1990) de même que dans le cœur de lapin décrit par Mikami *et al.* (1989) [46, 51]. En effet, le transcrit de α_{1C} identifié dans le cœur de lapin et l'aorte de rat possède un exon 1 différent des transcrits retrouvés dans le tissu vasculaire du poumon de lapin [52], le cœur de rat [53] et les fibroblastes humains [54]. Ainsi, ces observations suggèrent que l'expression de ces deux isoformes, c'est-à-dire l'isoforme au N-terminal long et l'isoforme au N-terminal court, est spécifique au tissu plutôt qu'à l'espèce [55]. À la différence de ces observations, le transcrit de la sous-unité α_{1C} (exon 1B) cloné du cœur humain par Schultz *et al.* (1993) ne possède pas d'exon composé d'un long N-terminal [56]. Ce n'est qu'en 2002 que Blumenstein *et al.* a montré l'existence d'un 2^e isoforme de $Ca_v1.2$ au niveau cardiaque, l'exon 1A, par la technique du RT-PCR. L'exon 1A de même que la région 5' non codante sont localisés dans le chromosome 12 chez l'humain [55]. L'exon 1A encode un isoforme composé d'un N-terminal plus long qui est impliqué dans la régulation du canal par la protéine kinase C [57]. En effet, le segment du N-terminal long contiendrait une séquence de 60 acides aminés cruciale pour la régulation par la PKC.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de contrôle de la transcription du gène codant la sous-unité α_{1C} cardiaque chez le rat, un large fragment de 2.3kb de la région 5' non codante a été cloné par Liu *et al.* (2000) pour en étudier les éléments de régulation [48]. Le site d'initiation de la transcription (SIT) a également été identifié. Les analyses de séquences régulatrices ont révélé la présence d'éléments de transcription à proximité du SIT qui semblent être essentiels pour l'expression spécifique du gène de la sous-unité α_{1C} au niveau des myocytes [48]. La séquence régulatrice est dépourvue de boîte TATA, cependant, des éléments de régulation importants ont été localisés. En effet, des processus par lesquels la transcription de la sous-unité α_{1C} serait modulée ont pu être postulés en utilisant des techniques propres à l'analyse promotrice, tels que des analyses de délétion de la séquence promotrice clonée dans un plasmide rapporteur de même que des transfections et expression transitoire dans les myocytes de rats néonataux. Selon leurs études, un site consensus AP1 localisé à 595 pb en amont du SIT serait responsable d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de la sous-unité en question, au niveau cardiaque. En effet, une délétion de ce site causerait une diminution significative de l'activité promotrice basale dans les myocytes. Les chercheurs ont montré que l'activation de la PKC dans les myocytes induit une diminution de l'abondance de l'ARNm de la sous-unité α_{1C} , tandis qu'une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} provoque une augmentation du niveau de messagers. La région promotrice analysée contient plusieurs sites consensus de liaison pour Nkx2.5 ; ce dernier facteur de transcription joue un rôle important dans les événements liés au développement du muscle cardiaque de même que dans l'expression spécifique de ce gène au niveau cardiaque. De plus, Nkx2.5 est un activateur de la transcription [58]. Une analyse de délétions des sites de liaison proximales de Nkx2.5 est associée à une diminution considérable de l'expression génétique de la sous-unité α_{1C} .

En 1995, Kamp *et al.* ont étudié la régulation transcriptionnelle de la sous-unité α_{1D} du canal calcique voltage dépendant exprimée au niveau des cellules neuronales [59]. La région régulatrice en amont du gène codant la sous-unité α_{1D} ne contient pas de sites de

liaisons pour le facteur Nkx2.5 ni pour AP1, cependant, cette région possède un site (ATG)₇ distinctif. Le site (ATG)₇ est une séquence trinuécléotidique répétitive qui fonctionne comme un régulateur positif de la transcription du gène [59].

Des études plus récentes (2003) sur la région régulatrice de la sous-unité α_{1C} du canal calcique de type L ont été effectuées par Pang *et al.* [60]. Deux isoformes du canal Ca_v1.2 humain ont été identifiées, une isoforme est exprimée sélectivement et fortement dans le tissu cardiaque alors que la seconde semble être exprimée ubiquitairement. Ces isoformes sont différents au niveau de la séquence en N-terminal, tel que rapporté précédemment. Le promoteur de l'isoforme cardiaque est actif dans les myocytes de rats néonataux mais pas dans les cellules H9C2, les cellules du muscle lisse ou les cellules HEK293, à l'opposé de l'isoforme ubiquitaire. Les résultats de leurs travaux indiquent une distribution spécifique de l'expression des deux isoformes sous le contrôle de deux régions régulatrices distinctes. En effet, le clonage et l'analyse des séquences promotrices a révélé une différence dans les éléments de régulation qui correspondent à l'expression spécifique aux tissus de chaque isoforme [60].

1.2.3 Les canaux potassiques voltage dépendants

1.2.3.1 Rôle physiologique de K_v

Les canaux potassiques constituent une famille de protéines membranaires ubiquitaires d'une grande diversité. Les membres de cette famille jouent plusieurs rôles critiques dans la signalisation cellulaire, le battement cardiaque, la sécrétion d'insuline, l'excitabilité neuronale, le transport épithélial d'électrolytes, la contraction du muscle lisse et dans la régulation du volume cellulaire [61]. Les canaux potassiques forment le groupe le plus diversifié des canaux ioniques et ils peuvent être divisés en trois grandes classes

structurales incluant deux, quatre ou six segments transmembranaires [62, 63]. Plus de 80 gènes humains reliés aux canaux potassiques ont été clonés jusqu'à ce jour [61, 63, 64]. Au point de vue cardiaque, les canaux potassiques dépendants du voltage sont les principaux déterminants de la repolarisation du potentiel d'action dans le myocarde de mammifère. En effet, les canaux repolarisateurs constituant le courant potassique I_K semblent jouer un rôle prépondérant dans la modulation de la durée du potentiel d'action comme le démontre leur implication dans le syndrome du QT long. Comparativement aux canaux cardiaques Na_v et Ca_v , il existe une diversité considérable au point de vue électrophysiologique et fonctionnel chez les canaux K_v cardiaques [65]. Dans les cellules cardiaques de mammifères, les canaux potassiques sont catégorisés en 2 groupes : les canaux dépendants du voltage (K_v) et les canaux dont l'ouverture dépend de la liaison d'un ligand [63, 66]. La première catégorie inclut le courant transitoire sortant I_{to} , le courant sortant ultrarapide retardé à rectification (I_{Kur}), la composante rapide du courant retardé à rectification (I_{Kr}), la composante lente du courant retardé à rectification (I_{Ks}) et le courant entrant à rectification entrante (I_{K1}). Quant à la 2^e catégorie, les canaux dont l'ouverture dépend du ligand, elle comprend les canaux activés par une diminution de la concentration intracellulaire d'ATP (K_{ATP}) et les canaux activés par l'acétylcholine (K_{ACh}) [63, 64].

I_{to} : Le courant I_{to} s'active et s'inactive rapidement en réponse à la dépolarisation du myocarde [67, 68]. Ce courant est responsable de la repolarisation initiale du potentiel d'action lors de la phase 1. De plus, il contribue à la détermination de la hauteur du plateau, influençant ainsi l'activation de d'autres courants qui contrôlent la repolarisation, principalement, le courant calcique de type L et le courant potassique retardé à rectification (I_K) [1]. Des différences régionales dans la morphologie du potentiel d'action sont en partie dues à l'hétérogénéité de I_{to} [69, 70, 71]. Une diminution de I_{to} contribue au prolongement de la durée du potentiel d'action durant la défaillance cardiaque [72, 73]. Certaines études ont démontré que le courant I_{to} résulte de la somme des courants I_{to1} et I_{to2} . Chez l'humain, la présence de I_{to2} n'a pas clairement été démontré au niveau des myocytes

ventriculaires et auriculaires [75]. Bien qu'à l'origine, le courant I_{to1} (ou I_{to}) a été identifié dans les fibres de Purkinje, il représente un courant important dans les myocytes ventriculaires de plusieurs espèces dont le chat, le chien, la souris, le rat de même que l'homme [75-79]. Au niveau des oreillettes, il a été identifié chez le chien, le rat, la souris et l'homme [80-83].

I_{Kur} : Jusqu'à ce jour, le courant I_{Kur} a été enregistré dans l'oreillette de l'humain mais il n'a pas été détecté dans le tissu ventriculaire ou les fibres de Purkinje. Il représente ainsi un courant potassique apportant une contribution importante à la repolarisation auriculaire chez l'humain [84, 85]. Le courant I_{Kur} a été caractérisé aussi dans les myocytes auriculaires du rat et du chien [81, 82, 86].

I_{Kr} et I_{Ks} : Dès la première description du courant de repolarisation par Noble et Tsien (1969) [87], les chercheurs ont postulé l'existence de plusieurs composantes impliquées à ce niveau du potentiel d'action. Ce n'est qu'en 1990, que Sanguinetti et Jurkiewicz sont parvenus à décomposer le courant I_K en ses principales composantes rapides (I_{Kr}) et lentes (I_{Ks}) [88]. Ces canaux peuvent être différenciés au niveau microscopique de même que par leur profil pharmacologique distinct [89]. Les propriétés uniques dépendantes du temps et du voltage de I_{Kr} et I_{Ks} suggèrent que ces courants jouent un rôle de grande importance au niveau de la repolarisation, particulièrement dans les myocytes ventriculaires et dans les fibres de Purkinje. Néanmoins, dans certaines cellules cardiaques, l'expression d'une seule composante (I_{Kr} ou I_{Ks}) apparaît présente. Par exemple, dans les cellules auriculaires de rat, dans le nœud sino-auriculaire de la souris et dans le nœud auriculo-ventriculaire de lapin, seulement la composante I_{Kr} semble être détectée [90-92]. Cependant, l'expression de ces courants potassiques a été rapportée dans les cellules des oreillettes et des ventricules chez l'humain [85, 93-95] de même que dans les cellules ventriculaires et de Purkinje chez le chien [71, 96-98] et dans les cellules ventriculaires du lapin [101]. À l'opposé, la densité

des canaux I_{Kr} et I_{Ks} est basse ou même indétectable au niveau du ventricule chez les rongeurs adultes [77, 100].

I_{K1} : Il y a près d'un demi siècle que Silvio Weidmann démontra l'existence de I_{K1} . Weidmann expliqua que la conductance de ce courant domine aux environs du potentiel de repos et décline une fois que la dépolarisation membranaire est déclenchée [101]. Ces canaux se ferment durant la dépolarisation et restent fermés au cours de la formation du plateau. Ensuite, pendant la phase de repolarisation, le potentiel diminue graduellement permettant ainsi la contribution des canaux I_{K1} à la repolarisation terminale de même qu'à la stabilisation du potentiel de repos (phase 4) [74, 101]. Ce courant entrant à rectification entrante est essentiel au maintien du potentiel de repos de même qu'au contrôle de l'excitabilité des cellules du myocarde due à sa conductance à des potentiels très négatifs. La densité du courant I_{K1} est plus grande dans les cellules du ventricule que dans les cellules auriculaires ou de Purkinje [102-104]. Cette haute densité de I_{K1} est associée à une repolarisation terminale plus rapide dans les myocytes ventriculaires, et inversement, une réduction de sa densité est reliée à une repolarisation plus lente dans les cellules de Purkinje [105].

K_{ATP} : Les canaux potassiques sensibles à l'ATP ont été découverts plus tardivement, soit en 1983 par Noma A. [106]. Dans les expérimentations effectuées par A. Noma, l'inhibition métabolique produite par le cyanure a permis le démasquage des canaux potassiques normalement inhibés par l'ATP à la surface intérieure de la membrane cellulaire [106]. Ainsi, ces canaux potassiques ont été nommés K_{ATP} . Dans les conditions normales du cœur, les canaux K_{ATP} sont masqués (inhibés ou fermés) par la forte concentration intracellulaire d'ATP, ce n'est que durant des conditions ischémiques, où la concentration est plus faible en ATP, que ces canaux s'ouvrent. De cette façon, les K_{ATP} servent à protéger les cellules du myocarde contre l'ischémie ou l'hypoxie. En effet, une augmentation du courant potassique sortant par l'ouverture des canaux K_{ATP} cause un

raccourcissement de la durée du potentiel d'action et de ce fait diminue l'influx calcique et la contraction afin de préserver l'ATP cellulaire [107]. Une conservation de l'ATP intracellulaire augmente ainsi le temps de survie de la cellule [109]. Ce canal semble être distribué uniformément à travers tout le ventricule [109].

K_{ACh} : Del Castillo et Katz de même que Hutter et Trautwein ont montré en 1955 que l'acétylcholine conduit à une hyperpolarisation du potentiel de membrane et une réduction de la fréquence du potentiel d'action [110, 111]. Trautwein et Dudel ont démontré plus tard (1958) que cette hyperpolarisation est due à une augmentation de l'efflux de potassium à travers la membrane cellulaire cardiaque [112]. C'est en 1983 que les premiers courants dûs au canal K_{ACh} ont été enregistrés par Sakmann *et al.* [113]. L'acétylcholine active ces canaux potassiques dans le nœud sino-auriculaire et les cellules auriculaires, permettant ainsi la régulation du débit cardiaque. La densité du courant $I_{K_{ACh}}$ est environ six fois plus grande dans les oreillettes que dans les ventricules [114]. Suite à la liaison de l'Ach aux récepteurs muscariniques M2, les sous-unités $G\beta\gamma$ de la protéine G activent le canal K_{ACh} en interagissant directement avec le N et c-terminal cytoplasmique du canal [74]. L'activation de K_{ACh} hyperpolarise le potentiel de membrane et conduit à un retardement de la conduction auriculo-ventriculaire [61, 63]. Bien que ces canaux soient exprimés dans le nœud auriculo-ventriculaire et sino-auriculaire, dans les oreillettes et les cellules de Purkinje, ils ne semblent pas contribuer de façon considérable à la repolarisation du potentiel d'action dans les conditions normales physiologiques.

1.2.3.2 Structure et bases moléculaires de K_v

Tout comme les sous-unités α des canaux Na_v et Ca_v , la sous-unité formant le pore du canal (α) potassique dépendant du voltage appartient à la superfamille « S4 » des canaux dépendants du voltage. Les canaux potassiques ont été classifiés en trois grandes familles

sur la base de la séquence en acides aminés de leur sous-unité α : les canaux potassiques dont la sous-unité α contient 2, 4 ou 6 segments transmembranaires [61, 63, 64]. Par opposition aux canaux Ca_v et Na_v , la sous-unité α de K_v est formée de six domaines transmembranaires et les canaux K_v fonctionnels sont constitués de quatre sous-unités α [115] (voir Figure 1.4). Un très grand nombre de sous-unités α ont été identifiés chez les canaux K_v et une terminologie systématique a été développée afin de les nommer [116]. En effet, l'expression hétérologue des sous-familles K_v1 - K_v4 révèle des canaux K_v fonctionnels possédant des propriétés distinctes au niveau de leur dépendance au temps et au voltage [117]. D'un autre côté, les sous-unités α des sous-familles K_v5 - K_v9 sont électriquement silencieuses [118-121]. Les rôles fonctionnels de ces canaux dans la génération de l'activité électrique du myocarde restent à être déterminés. Deux autres sous-familles ont aussi été identifiées, les canaux ERG (*ether-a-go-go-related*) et les KCNQ.

Donc les sous-unités α des canaux K_v possèdent six segments transmembranaires (S1-S6) avec deux domaines constituant le N- et le C-terminal cytoplasmique et un pore entre S5 et S6 impliqué dans la sélectivité aux ions potassiques par la séquence TxGYG [63, 64]. Le segment S4 contient des résidus chargés positivement (Lysine, Arginine) à approximativement chaque troisième position qui permettent la détection du voltage. La majorité des canaux K_v contiennent une séquence composée de Pro-X-Pro qui contrôle l'ouverture intracellulaire du pore dans les hélices S6 [122]. Les canaux K_v peuvent être formés par quatre sous-unités α identiques (homomultimère) ou par la combinaison de différentes sous-unités α de la même sous-famille (hétéromultimère). Dans la sous-famille de K_v1 , la tétramérisation semble être contrôlée par le domaine en N-terminal intracellulaire. D'autre part, chez les canaux des sous-familles HERG (I_{Kr}) et K_vLQT1 (I_{Ks}), le C-terminal est impliqué dans l'hétérotétramérisation [123].

Les canaux dépendants du voltage à rectification entrante (K_{ir}) sont composés de deux domaines transmembranaires connectés par un pore contenant la séquence G(Y/F)G de

même que le N- et C-terminal [1]. Cette architecture est typique des canaux I_{K1} , K_{ATP} et K_{Ach} . Les canaux Kir forment des homo- ou hétérotétramères.

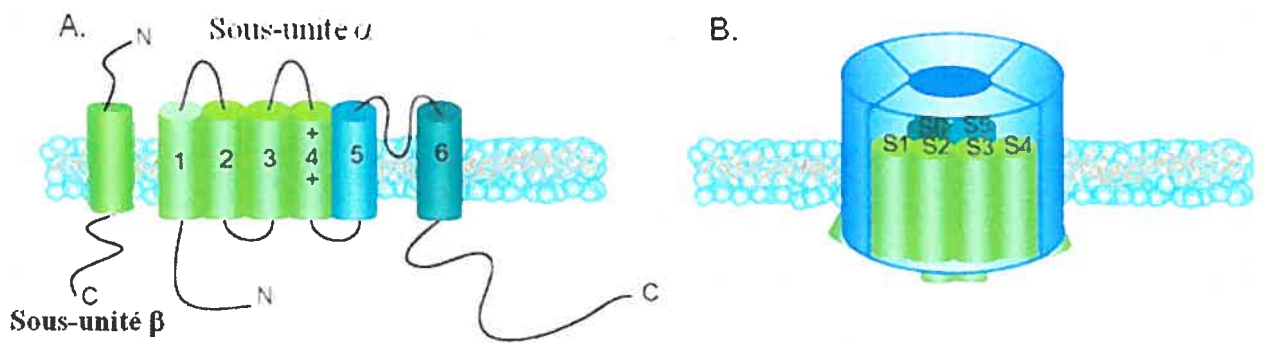


Figure 1.4 A. Représentation schématique de la structure du canal potassique à 6 segments transmembranaires. B. L'assemblage de 4 sous-unités α forme le pore du canal.

1.2.3.3 Les gènes et régions régulatrices de K_v

Les récents progrès dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis le clonage de plusieurs gènes des canaux potassiques dépendants du voltage chez les mammifères. Environ 20 gènes regroupés en 6 familles (K_v1 - K_v4 , ERG, KCNQ) encodent les canaux potassiques K_v fonctionnels (voir Tableau 1.3) [124]. Malgré l'absence d'intron dans le région codante de 1.5-2.0 kb, la famille des gènes K_v1 possède des transcrits de plus de 9.5 kb dû à la présence de vastes régions non codantes qui exposent un haut degré de conservation évolutive [125-127]. Cependant, le rôle de la plupart de ces séquences non codantes reste à être défini. Ce n'est qu'au début des années quatre-vingt-dix que les

chercheurs ont commencé à s'intéresser à l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes encodant les canaux K_v . Le gène $K_v1.4$ était un des premiers gènes à être caractérisé à ce niveau. La caractérisation initiale du gène $K_v1.4$ qui code pour le canal I_{to} chez la souris a été effectuée en 1993. La région codante de ce gène chez la souris partage une similarité de 91% comparé avec la même région chez l'humain [128]. La région codante est contenue dans un seul exon. Le gène codant pour le canal I_{to} chez la souris contient aussi des régions non codante. La région 3' non codante est constituée de plusieurs séquences répétitives de motifs ATTTA et ATTTG qui semblent contribuer à la déstabilisation de l'ARNm, ces motifs sont présents dans la séquence humaine aussi. La même région en 3' contient trois signals de polyadénylation impliqués dans la génération d'ARNm dont la stabilité diffère. Les régions 5' non codantes du gène $K_v1.4$ sont similaires à 85% chez la souris et l'homme ($K_v4.2$) et pourrait participer à la régulation de l'expression du canal [128]. Cette dernière contient huit sites consensus d'initiation de la traduction ((G,A)NNATG) qui servirait à diminuer l'efficacité de traduction et donc l'expression de la protéine.

Une étude plus détaillée du gène $K_v1.4$ a été reportée trois années après la première étude. Cette étude rapportait l'existence de deux transcrits différents chez la souris de 4.5 et 3.5 kb exprimés au niveau cardiaque. Ces deux isoformes sont similaires excepté pour la région 3' non codante. Même si la région codante reste la même dans les deux transcrits afin de générer une protéine identique, la région 3' non codante régule le niveau de canaux fonctionnels en régulant l'efficacité de la traduction de même que la stabilité de l'ARNm [124]. Ainsi, les régions conservées non codantes de $K_v1.4$ semblent jouer un rôle important dans la modulation de l'expression du gène $K_v1.4$. Le promoteur de ce gène contient trois sites de liaisons (CCGCCC) au facteur de transcription Sp1. Le contenu important en GC du promoteur pourrait réduire l'accessibilité à l'ARN polymérase [129].

De plus, des régulateurs transcriptionnels positifs et négatifs pourraient être responsables de l'expression spécifique du gène dans certains tissus en fonction du stade de développement de l'espèce.

La région régulatrice du canal I_{to} chez l'humain (gène codant pour $K_v4.3$), le rat et la souris (gène codant pour $K_v1.4$) a récemment été analysée. Au niveau du cœur, l'expression de l'ARNm de même que les protéines de $K_v4.2$ est diminuée dans le cœur hypertrophique ou défaillant. Jia et Takimoto ont cherché à savoir comment la transcription du gène $K_v4.2$ est régulée [130]. Afin d'élucider le mécanisme de contrôle de la transcription de ce gène, ces chercheurs ont isolé, cloné et caractérisé le promoteur du gène chez le rat. Contrairement à la majorité des autres gènes codant pour les canaux ioniques, il a été montré par la technique du 5' *RACE*, que $K_v4.2$ possède un seul site d'initiation de la transcription [130]. Cette analyse leur a permis d'arriver à trois principales déductions. En premier lieu, une analyse de délétion de la région promotrice du gène $K_v4.2$ a indiqué que l'activité promotrice est située principalement dans les 200 pb en amont du SIT. Cette séquence de 200 pb est essentielle afin de mener la transcription du gène $K_v4.2$ dans les cellules cardiaques et neuronales (cellules PC12). Ensuite, cette région est caractérisée par des sites de liaison aux facteurs de transcription GATA-4 et GATA-6 qui activent dramatiquement la transcription du canal dans les myocytes de même que les cellules neuronales, GATA-4 ayant un effet plus marqué. Cependant, cette activation induit un effet opposé dans les myocytes comparé aux cellules neuronales. Le corégulateur de GATA, le facteur FOG2, supprime fortement l'activation induite par GATA dans les myocytes, mais augmente cette activation dans les cellules neuronales. Des mutants du facteur GATA-4 se sont avérés incapables de former un complexe avec FOG2 et l'activation induite par GATA-4 était donc conservée dans ce cas. Ce fait indique que la formation du complexe GATA-FOG2 est requise pour la suppression médiée par FOG2 dans les myocytes contrairement aux cellules neuronales, où le complexe n'est pas essentiel pour l'augmentation via FOG2 [130]. Ces résultats indiquent que les facteurs de transcription GATA et FOG2 utilisent

des mécanismes différents afin de contrôler l'expression du gène $K_v4.2$ dans les cellules cardiaques et neuronales.

Le groupe de Bruneau et al. (2005) ont récemment montré que le facteur de transcription *Irx5* régule l'expression du courant I_{to} . Les chercheurs ont étudié des souris chez lesquelles le gène *Irx5* était invalidé (*Irx5*^{-/-}). Ils ont constaté que ces souris souffraient d'arythmies dû à un défaut au niveau de la repolarisation cardiaque. *Irx5* agit en diminuant l'expression de $K_v4.2$. En effet, *Irx5* interagit avec une protéine cardiaque (mBop) qui régule négativement l'activité transcriptionnelle de $K_v4.2$. Cette régulation assure une bonne coordination de la repolarisation cardiaque ce qui préviendrait des formes d'arythmies [71]. La région promotrice de $K_v4.2$ est conservée à plus de 50% chez le rat comparativement à la séquence chez l'humain. Cette séquence conservée pourrait contenir des éléments importants impliqués la régulation transcriptionnelle du gène $K_v4.2$. Quoi qu'il en soit, il est important de noter que l'expression de ce gène diffère significativement entre les deux espèces puisque l'ARNm du canal ionique est fortement et sélectivement exprimé dans la région du cœur chez le rat contrairement à l'humain [131]. Ces faits suggèrent la possibilité que les différences au niveau de la séquence promotrice entre les deux espèces pourraient être responsables du modèle d'expression distinct.

Mori *et al.* se sont intéressés à la régulation du gène $K_v1.5$ (codant pour I_{Kur}) [132]. Plus précisément, ces chercheurs ont caractérisé la région 5' non codante du gène $K_v1.5$ afin de vérifier si cette dernière serait impliquée dans la régulation du canal au niveau transcriptionnel. Deux différentes techniques ont été utilisées afin de localiser le SIT, soit l'extension d'amorce et le 5'RACE (*rapid amplification of cDNA ends*). Plusieurs sites de régulation ont été identifiés. Tout comme les régions régulatrices des gènes Ca_v et Na_v , l'analyse du promoteur a révélé l'absence de boîtes TATA. Cependant, même si ces gènes sont dépourvus d'une boîte TATA, leur expression (spécifique au tissu et à l'espèce) est strictement régulée [132, 133]. L'étude de la séquence régulatrice de $K_v1.5$ a permis l'identification d'un élément classique, le CRE, dans la région 5' non codante. Les

chercheurs ont fourni une évidence directe que l'AMPC régule l'expression du gène $K_v1.5$ au niveau transcriptionnel et que cette réponse est conférée par l'élément CRE localisé dans la région 5' non codante. L'AMPC semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des canaux potassiques et pourrait ainsi induire, à long terme, des effets sur l'activité électrique des cellules excitables [132].

Le gène $K_v1.7$ a été relié au diabète par son expression dans les cellules bêta pancréatiques chez la souris. La localisation du gène se situe sur le chromosome 19q13.3-q13.4 chez l'humain et cette région a été liée à la susceptibilité au diabète [133, 134]. Des chercheurs se sont attardés à l'analyse de la séquence de ce gène chez l'humain. Cette séquence est homologue à celle de la souris à plus de 85%. Comme chez la souris (et à l'opposé de la majorité des gènes des canaux K_v1), le gène est constitué de deux exons. L'analyse promotrice en amont du gène suggère l'identification d'éléments de régulation, en effet, des sites de liaisons pour les facteurs de transcription MEF-2 et Sp1 ont été localisés [136].

Jusqu'à ce jour, l'étude l'analyse du promoteur et des régions 5'/ 3' non codantes des gènes codants pour I_{Ks} et I_{Kr} n'a pas été rapportée. La régulation transcriptionnelle de ces gènes reste donc à être étudiée.

Canal	Nom du Gène	Localisation sur le chromosome	Distribution prédominante
K _v 1.1	<i>KCNA1</i>	12p13	Neurones, Cœur
K _v 1.2	<i>KCNA2</i>	1p11	Cerveau, Cœur
K _v 1.3	<i>KCNA3</i>	1p21	Lymphocytes
K _v 1.4	<i>KCNA4</i>	11p14	Cerveau, Cœur
K _v 1.5	<i>KCNA5</i>	12p13	Cerveau, Cœur
K _v 1.6	<i>KCNA6</i>	12p13	Cerveau
K _v 1.7	<i>KCNA7</i>	19q13	Cœur
K _v 2.1	<i>KCNB1</i>	20q13.1	Cerveau, Coeur
K _v 2.2		8q13	Rein, Rétine
K _v 3.1	<i>KCNC1</i>	11p15	Cerveau, muscle squelettique
K _v 3.2	<i>KCNC2</i>	12q21	Cerveau
K _v 3.3	<i>KCNC3</i>	19q13.4	Cerveau, Foie
K _v 3.4	<i>KCNC4</i>	1p11	Cerveau, muscle squelettique
K _v 4.1	<i>KCND1</i>	Xp11.2	
K _v 4.2	<i>KCND2</i>	7q32	Cerveau, Cœur
K _v 4.3	<i>KCND3</i>	1p11	
ERG	<i>KCNH1</i>	1q32	Cerveau
HERG	<i>KCNH2</i>	7q36	Cerveau, Coeur
ERG2	<i>KCNH3</i>		Cerveau
ERG3	<i>KCNH4</i>	17q21	Cerveau
K _v LQT1	<i>KCNQ1</i>	11p15	Cerveau, Cœur, Oreille interne
KCNQ2	<i>KCNQ2</i>	20p11.1	Système Nerveux
KCNQ3	<i>KCNQ3</i>	8q24.3	Système Nerveux

Tableau 1.3 Classification et distribution tissulaire des sous-unités α des canaux K_v fonctionnels.

1.2.3.4 Sous-unités accessoires

Plusieurs sous-unités accessoires (β) des canaux potassiques dépendants du voltage ont été identifiées. Il a été postulé que ces dernières contribuent à la génération de canaux K_v fonctionnels dans le myocarde. La majorité des sous-unités β coassemblent avec la sous-unité α des canaux K_v donnant lieu à un complexe $\alpha 4\beta 4$. Les sous-unités auxiliaires représentent un groupe moléculaire diversifié, incluant des protéines cytoplasmiques ($K_v\beta 1-3$, KChIP, KChAP) qui interagissent avec des domaines intracellulaires des canaux K_v ; des protéines à un segment transmembranaire, comme minK et les protéines reliées à minK (MiRPs) encodées par la famille des gènes de KCNE (KCNE1-KCNE5), et enfin les protéines reliées au transport ABC (*ATP-binding cassette*) comme par exemple les SUR (*sulfonylurea receptors*) pour les canaux Kir6.1-6.2 [7, 64, 66, 67, 137]. La coexpression des sous-unités β avec les sous-unités α régule l'expression des canaux potassiques à la surface cellulaire, la cinétique d'ouverture (et d'inactivation pour les SUR) de même que leur sensibilité aux différents composés pharmacologiques [138]. L'interaction entre les sous-unités α et β peut être dynamique et/ou modulée par d'autres protéines modulateurs, particulièrement pour les sous-unités accessoires cytosoliques.

1.2.3.4.1 La sous-unité minK

1.2.3.4.1.1 Historique et clonage du gène MinK

Il existe 5 membres de la famille des gènes humains KCNE. Le membre fondateur, minK (canal potassique minimum, aussi appelé IsK), est encodé par le gène *KCNE1*. Le gène *KCNE1* a été identifié et sa région codante a été clonée à partir d'un rein de rat en 1988 par Takumi *et al.* [139]. Son nom, minK, reflète ce que les chercheurs pensaient à cette époque, le fait que cette protéine était constituée de la grandeur minimale requise pour

former un canal potassique. Par la suite, minK a été cloné à partir de différents tissus dont l'utérus d'un rongeur [139], le cœur humain [141], le cœur du cochon d'Inde [139], le cœur de rats néonataux [140] et le cœur de souris néonatales [139]. Des clones génomiques encodant le gène de la protéine minK ont aussi été isolés à partir de bibliothèques d'ADN de l'humain [142], du rat [143], de la souris [144] et du cochon d'Inde [145].

1.2.3.4.1.2 Rôle physiologique et pathophysiologique de minK

L'expression fonctionnelle de minK dans le système d'expression d'ovocytes de *Xénopus* produit des courants similaires au courant entrant à rectification retardée, I_{Ks} . La majorité des chercheurs qui s'intéressaient au courant minK étaient incapables d'enregistrer des courants significatifs de ce dernier dans les cellules de mammifères, menant Blumenthal *et al.* à suggérer que minK formerait un canal potassique fonctionnel en s'associant avec un facteur endogène dans les ovocytes de *Xénope* [146]. C'est seulement en 1996 qu'il a été montré que KvLQT1 est la sous-unité α avec laquelle minK s'associe pour former I_{Ks} [147]. Quoi qu'il en soit, il a été rapporté que minK coassemble avec la protéine ERG1 dans des systèmes d'expression hétérologues suggérant ainsi un rôle pour minK dans la génération du canal I_{Kr} cardiaque. Cependant, il n'a pas encore été démontré que ces interactions puissent survenir dans les tissus intacts.

L'effet le plus apparent de l'association de minK avec KvLQT1 est le ralentissement des cinétiques d'activation par un facteur de dix lorsque le canal I_{Ks} est généré. La présence de minK modifie aussi les propriétés d'ouverture et de fermeture lors de l'inactivation et la déactivation du canal I_{Ks} . De plus, la conductance unitaire de minK/KvLQT1 est supérieure d'environ quatre fois par rapport à celle produite par le canal homomère KvLQT1 [148]. MinK modifie aussi la sélectivité pour les cations monovalents (K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Na^+ , Li^+) la sensibilité aux inhibiteurs des pores externes et internes, l'inhibition par les agents anti-arythmiques de classe III et l'activation par des petites molécules régulatrices [149].

Des études biochimiques se sont attardées à clarifier le rôle de minK dans le fonctionnement des canaux cardiaques I_{Ks} et I_{Kr} . Bien que des précisions reliées au fonctionnement de minK restent incomprises, il est important de souligner la signification physiologique de cette sous-unité dans la génération de courants membranaires cardiaques. Des mutations du gène *KCNE1* causent le syndrome du QT long 5 (LQT5) [150]. En effet, des mutations héréditaires dans *KCNE1* menant au remplacement de la sérine en position 74 par la leucine (S74L), ou le remplacement de l'aspartate en position 76 par l'asparagine (D76N) ont été associées avec le syndrome du QT long héréditaire (voir Figure 1.5) [148, 151, 152]. Des mutations dans *KCNE1* réduisent le flux d'ions potassium en produisant un changement au niveau de l'activation qui se traduit par la génération d'un courant plus faible pendant la dépolarisation ; et une désactivation accélérée [148]. Des mutations dans *KCNE1* peuvent aussi prédisposer certains agents pharmacologiques à induire le syndrome du long QT [153]. Les individus porteurs de deux allèles mutées de *KCNE1* peuvent souffrir d'un intervalle QT prolongé de même que de surdité (Syndrome Jervell et Lange-Nielsen, JLNS). Ainsi, une mutation dans *KCNE1* entraîne des conséquences pathologiques dans plusieurs tissus, ce qui indique la complexité et les rôles multiples de minK dans le canal I_{Ks} . En effet, l'expression de minK n'est pas limitée au cœur, *KvLQT1* de même que minK sont exprimés dans d'autres tissus ou organes comme le rein et l'oreille interne [154]. Ainsi, l'association de *KvLQT1*/minK forme un canal potassique ayant un rôle électrogénique important dans la repolarisation cardiaque et un rôle clé dans le contrôle de l'homéostasie de l'endolymphe associée avec une ouïe normale. MinK semble jouer un rôle physiologique au niveau du côlon de même qu'au niveau des lymphocytes T et de l'utérus ; cependant, les détails de son implication dans ces tissus ne sont pas encore connus [155].

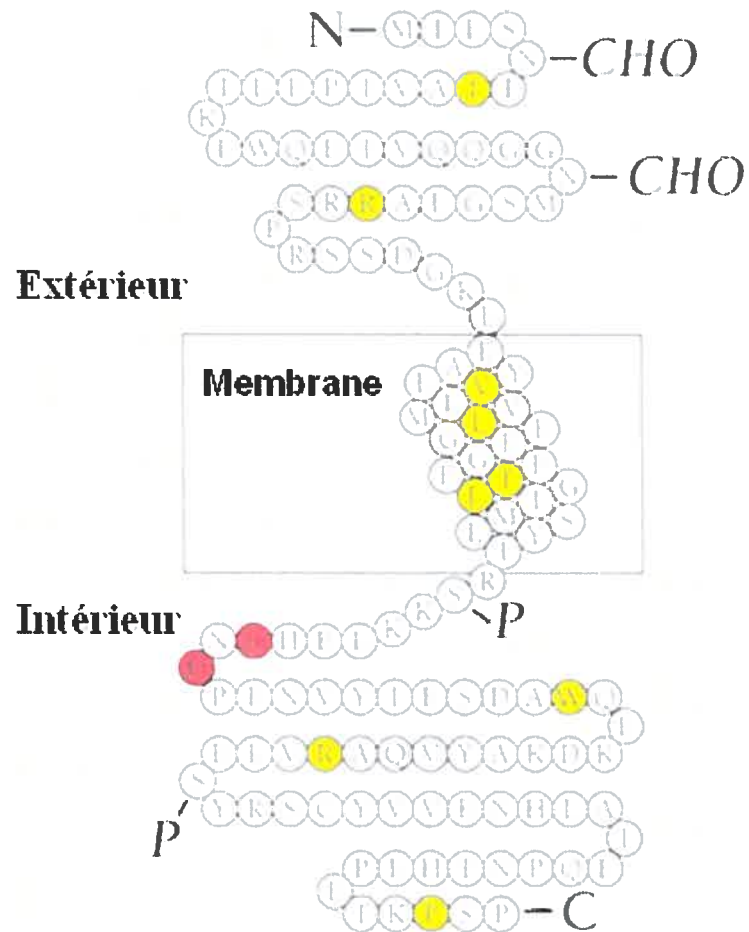


Figure 1.5 Schéma du peptide MinK. Les acides aminés en rouge représentent les résidus qui, lorsque mutés, sont associés au Syndrome du long QT. Les résidus en jaune représentent des mutations retrouvées chez des individus atteints d'arythmie cardiaque. P=site potentiel de phosphorylation; CHO=site potentiel de N-glycosylation (Schéma adapté de [151])

1.2.3.4.1.3 Structure et régulation de la protéine MinK

KCNE1 est un des premiers gènes codant pour un canal potassique qui a été cloné [156]. Ce gène encode une protéine de 129-130 acides aminés possédant un poids moléculaire d'environ 15 kDa [156]. Cette protéine possède un segment hydrophobe unique de 23 acides aminés formant une hélice α qui traverse la membrane (voir Figure 1.5) [157]. Le domaine N-terminal est N-glycosylé et localisé au niveau extracellulaire, tandis que le domaine C-terminal contient un site de phosphorylation par la PKC sur la sérine en position 102 au niveau intracellulaire de la protéine. Le domaine transmembranaire est hautement conservé à travers les espèces. De plus, une étude a suggéré que le segment transmembranaire est impliqué dans la liaison dépendante du voltage du tétraéthylammonium (TEA), un inhibiteur classique des canaux potassiques [158].

Le domaine C-terminal de minK joue un rôle crucial dans la formation du canal I_{Ks} . En effet, une mutation de la sérine en thréonine en position 68 réduit la densité du courant de KvLQT1/minK [147]. Des mutations dans le segment transmembranaire de même que dans des résidus cytoplasmiques ou extracellulaires produisent des changements significatifs dans l'ouverture et la fermeture ainsi que dans la perméabilité du canal. Le remplacement de la leucine en isoleucine ou alanine en position 52 modifie la cinétique du canal [159]. Ensuite, la mutation de la phénylalanine en cystéine dans les positions 53 et 58 induisent des changements opposés dans l'activation dépendante du voltage. Il a aussi été rapporté que la mutation de la phénylalanine en thréonine ou alanine en position 55 modifie la sélectivité aux ions potassiques [160].

Des études biochimiques et électrophysiologiques ont été effectuées afin de proposer un modèle qui pourrait aider à comprendre la façon dont minK et KvLQT1 interagissent ensemble. Cependant, il reste que les connaissances sont limitées à ce niveau. Kurokawa *et al.* ont pu montrer par mutagenèse dirigée que la réponse de sensibilité du TEA et Cd^{2+} de minK ne réside pas dans la région du pore du canal assemblé [161]. Ce travail défie des

études précédentes qui suggèraient que la région transmembranaire de minK participe à la formation du pore de même qu'à l'ouverture et la fermeture du canal. En effet, en utilisant le système de la levure à deux hybrides et la chromatographie par affinité, une étude a suggérée que le domaine C-terminal de minK interagit avec la région du pore de KvLQT1. Ainsi, le domaine C-terminal de minK interagit avec KvLQT1 et module ses propriétés d'ouverture et de fermeture, mais le segment transmembranaire de minK est aussi nécessaire pour la modulation de KvLQT1 par minK [162].

Le courant minK est hautement régulé par plusieurs messagers seconds. L'oxyde nitrique, une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire de même que la protéine kinase A mènent à une augmentation de la vitesse d'activation [162, 163]. Au contraire, le peroxyde (H_2O_2) produit en situation pathophysiologique et l'activation de la protéine kinase C cause une diminution du courant minK par le changement direct de conformation de la protéine [164]. La base moléculaire sous-jacente ces mécanismes de régulation est peu connue.

1.2.3.4.1.4 Organisation du gène codant pour MinK (KCNE1)

En 1991, McPherson *et al.* ont localisé le gène KCNE1 au niveau du chromosome 21 en utilisant une sonde humaine spécifique à KCNE1 dans l'étude d'hybrides de cellules somatiques. Plus tard, Chevillard *et al.* ont confirmé ces observations par des expériences d'hybridation isotopique *in situ* et ont assigné la localisation de KCNE1 à 21q22.1-q22.2 [165]. Ensuite, par l'analyse de PCR, Malo *et al.* ont aussi localisé le gène KCNE1 humain au chromosome 21 avec 100% de concordance [166]. En utilisant des techniques d'analyse de séquences génomiques, Splawski *et al.* ont déterminé que le gène *KCNE1* est constitué de trois exons et de deux introns qui sont localisés dans la région 5' non codante [167]. Le gène minK possède une organisation structurelle intéressante qui suggère la production de différentes espèces d'ARNm. Tous ces différents transcrits encodent la

même protéine minK, cependant, la longueur de même que la nature des régions 5' et 3' non codantes diffèrent d'un transcrit à l'autre [168]. Chez le rat, des clones d'ADNc ont montré l'existence d'au moins deux isoformes de l'ARNm qui font 800 nucléotides chacune. En effet, il a été rapporté que la transcription du gène KCNE1 chez le rat peut être initiée à deux différents exons (exon 1A et exon 1B). Ces exons sont localisés à proximité l'un de l'autre dans l'ADN génomique, par contre, ils se situent à une plus grande distance de l'exon 2 (>9 kb) qui encode la séquence protéique complète de minK chez le rat. L'épissage alternatif de l'ARN génère des ARNm qui sont constitués de l'exon 2 précédé soit de l'exon 1A ou de l'exon 1B [169]. L'organisation génomique du gène minK chez la souris a aussi été déterminée ; il semble avoir une grande similarité avec ce qu'il a été rapporté chez le rat. Comme chez le rat, la protéine minK est encodée par un seul gène dans le génome de la souris. L'ARNm est constitué d'un premier exon résultant de la transcription soit du premier ou du deuxième exon qui contient seulement la séquence 5' non codante. Ces deux derniers exons sont séparés de l'exon 2 par environ 10 kb (qui contient la séquence codante entière). Il existe aussi de multiples SIT de même que différents sites de polyadénylation qui contribuent à l'hétérogénéité des ARNm. La signification de ces différentes formes d'ARNm qui encodent la même protéine minK n'a pas été élucidée à ce jour.

La séquence nucléotidique du gène de minK est relativement conservée à travers les espèces. En effet, il existe une homologie de plus de 92% entre la séquence de minK du rat et celle de la souris et une identité proche de 76% pour les séquences du rat et l'humain [167, 168]. Les régions les plus conservées sont situées au niveau du domaine transmembranaire et au niveau de la séquence qui suit immédiatement ce domaine. À l'opposé, les domaines N- et C-terminal semblent être plus variables. Il a été rapporté que certaines différences dans la séquence nucléotidique de minK entre les espèces animales peuvent produire des différences qualitatives reliées aux propriétés de minK, par exemple, la séquence de minK chez le cochon d'Inde contient une asparagine à la position

correspondante au substrat de la PKC (en position 103) tandis que chez le rat on retrouve une sérine en cette position. Par conséquent, le canal I_{Ks} chez le cochon d'Inde répond à l'activation du canal par la PKC par une augmentation de l'ouverture alors qu'elle se traduit par une inhibition du canal chez le rat [171].

1.2.3.4.1.5 Distribution tissulaire de KCNE1

La protéine minK de même que son ARNm sont exprimés au niveau du tissu cardiaque chez l'humain, le rat et la souris [168]. La protéine minK a aussi été détectée dans le cœur du cochon d'Inde et du cheval, plus précisément dans l'oreillette et le ventricule. Ramakers *et al.* (2003) ont rapporté une diminution de l'expression de minK et KvLQT1 chez les chiens souffrant d'hypertrophie cardiaque [172]. MinK est largement exprimé dans les muscles lisses et le tissu épithélial chez l'humain et les rongeurs. En effet, minK a été constamment détecté dans le rein, l'oreille interne et l'utérus du rat, la souris et l'humain. Chez l'humain, minK a été observée aussi dans les poumons, dans les leucocytes [168]. Cependant, en contraste avec les rongeurs, la présence de minK n'a pas été rapportée dans l'estomac chez l'humain. De plus, l'ARNm de minK n'a pas été détecté dans le cerveau humain [173]. L'expression du gène KCNE1 varie durant le développement du cœur de la souris. Tôt lors de la gestation, l'expression de l'ARNm de minK est similaire dans l'oreillette et le ventricule. Plus tard dans le développement, l'expression de minK se limite au ventricule, alors que son expression n'est pas observée dans le noeud auriculo-ventriculaire ou l'oreillette [174]. L'expression de l'ARNm de minK diminue durant le développement jusqu'à atteindre un très bas niveau d'expression dans le cœur de la souris [175].

2. Mécanismes de base de l'arythmie cardiaque

L'excitation normale cardiaque de même que la relaxation implique une délicate balance des interactions dynamiques entre les courants ioniques passant à travers une variété de canaux membranaires et l'environnement cellulaire. Des défauts génétiques, des polymorphismes, des interventions thérapeutiques ou des anomalies structurales de ces canaux ioniques peuvent perturber cette balance et induire des phénotypes arythmogéniques [176, 177]. Une arythmie se définit comme étant un trouble du rythme cardiaque. Plusieurs types d'arythmies ont été identifiés. On divise habituellement les mécanismes responsables des arythmies cardiaques en deux catégories, ces dernières peuvent être causées par soit par une anomalie de la génération du potentiel d'action (activités déclenchées et automaticité anormale), soit par sa conduction à travers le cœur (phénomène de réentrée) [178].

2.1 L'activité déclenchée

Les activités déclenchées sont des post-dépolarisations provoquées par un potentiel d'action antérieur, pouvant survenir durant la phase du plateau ou celle de la repolarisation. Ces activités sont dites précoces (*early after depolarization*) lorsqu'elles surviennent à partir d'un niveau réduit du potentiel de membrane pendant les phases 2 et 3 du potentiel d'action cardiaque [179]. Il reste que ceux de la phase 2 semblent plus importants alors que ceux de la phase 3 sont plus rares et plus difficile à générer. Les post-dépolarisations précoces prennent place lorsque le potentiel d'action est prolongé, reflétant un déséquilibre dans les courants impliqués dans la formation du plateau, favorisant ainsi la dépolarisation. En effet, ce déséquilibre est induit par la diminution des courants sortants, notamment, I_K ,

I_{to} et I_{K1} [180-183]. La prolongation de la durée du potentiel d'action dans le cadre de cette diminution des courants sortants permet aux courants I_{CaL} , I_{Na} et NCX de déclencher une post-dépolarisation précoce en phase 2 et 3 respectivement [184, 185]. Les courants dépolarisants peuvent donc être réactivés et ils sont responsables, à l'échelon cellulaire, d'une activité rythmique répétitive c'est-à-dire d'une activité déclenchée (*early after depolarization*). De plus, les post-dépolarisations précoces sont impliquées dans les arythmies des patients ayant un segment QT prolongé (syndrome du long QT, LQTS). L'intervalle QT de l'électrocardiogramme reflète la repolarisation des cellules cardiaques. Son allongement correspond donc à un retard de la repolarisation du potentiel d'action cardiaque qui peut être dû à des courants entrants persistants ou des courants sortants déficients (essentiellement potassiques). Ces anomalies révèlent donc un fonctionnement anormal de plusieurs protéines, notamment des canaux potassiques (KvLQT1 (LQT1), HERG (LQT2), KCNE1 (LQT5) KCNE2, (LQT6)), le canal sodique $Na_v1.5$ (LQT3), le canal calcique $Ca_v1.2$ (LQT8) et la protéine d'encrage ankyrine-B (LQT4) [186].

Lorsque les post-dépolarisations surviennent après la terminaison de la repolarisation (phase 4), elles sont appelées post-dépolarisations tardives. Inversement, les post-dépolarisations tardives (*delayed after depolarizations*) sont induites plus facilement si le rythme cardiaque est élevé. Elles sont dues à une surcharge de calcium intracellulaire provoquant une libération rythmique de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique menant à une contraction. La relâche spontanée de Ca^{2+} prime l'activité de l'échangeur NCX, qui échange un ion Ca^{2+} sortant pour trois ions Na^+ entrant, causant ainsi un flux net entrant positif et provoquant une dépolarisation. Les deux types de post-dépolarisations ne sont pas en mesure d'atteindre le potentiel seuil mais elles peuvent déclencher une autre post-dépolarisation et le phénomène peut ainsi s'auto-entretenir.

2.2 L'automatisme anormal

L'automatisme anormal peut s'expliquer par l'exacerbation des propriétés automatiques de cellules qui en sont physiologiquement douées, c'est-à-dire les cellules du tissu nodal ; ou de l'apparition de propriétés automatiques au niveau de cellules qui en sont normalement dénuées. L'automatisme très rapide ou anormal dans les régions du cœur autre que le tissu nodal (noeud sinusal) peut induire des tachycardies ectopiques. Les fibres de Purkinje sont particulièrement sujettes à l'automatisme anormal [187].

2.3 La réentrée

La réentrée est liée à une altération de la conduction dans le cœur qui engage la formation d'une impulsion désordonnée. L'impulsion engagée réexcite une portion du myocarde ayant déjà été excitée. Ce phénomène est responsable de plusieurs arythmies. Il faut des conditions précises pour qu'une réentrée ait lieu. Il doit y avoir au moins deux voies possibles de conduction jointes, la présence d'un bloc unidirectionnel dans l'une des deux voies et une condition normale dans la 2^e voie impliquée, ces deux voies doivent posséder des périodes réfractaires différentes et un équilibre approprié doit exister entre la période réfractaire et la conduction pour que la réentrée reste soutenue suite à son initiation. Cette initiation se produit quand un battement précoce excite une voie durant la période réfractaire d'une autre [187, 188].

Le mécanisme de la réentrée est responsable de plusieurs types d'arythmies, dont la fibrillation cardiaque qui est une des formes les plus complexes. On parle de fibrillation lorsque les cellules cardiaques se contractent de manière totalement asynchrone, c'est-à-dire que les contractions sont rapides et complètement désordonnées. Ce phénomène est

généralement dû à une réentrée aléatoire. La fibrillation est caractérisée par une désynchronisation totale entre les cellules, que ce soit au niveau auriculaire ou ventriculaire. La perte du synchronisme induit la perte de l'activité mécanique [189].

3. Régulation de la transcription des gènes

Pendant ces dernières années, des scientifiques se sont attardés à terminer le séquençage du génome humain [190]. Une fois que la séquence complète d'un gène est connue, le défi consiste ensuite à comprendre le fonctionnement de ce gène en question, c'est-à-dire de déterminer la fonction et le patron d'expression de ce dernier, plus précisément d'étudier les mécanismes de régulation de son expression. L'expression d'une protéine est régulée tout d'abord au niveau génomique, lors de la transcription du gène en ARN primaire et en ARNm (voir Figure 1.6). La régulation de la transcription est le mécanisme principal dans la cellule dirigeant quand et comment les gènes sont exprimés en protéines.

La majorité des premiers travaux de biologie moléculaire reliés aux canaux ioniques se sont attardés à identifier les composantes moléculaires de ces canaux [191]. Grâce aux efforts d'un grand nombre de chercheurs dans ce domaine, de nombreux outils sont maintenant disponibles pour étudier la régulation des canaux ioniques cardiaques au niveau moléculaire.

3.1 La machinerie basale de la transcription

L'expression de tous les gènes cellulaires chez les eucaryotes débute avec la transcription. La transcription des gènes en ARNm est assurée par l'ARN polymérase II. Afin de commencer la transcription, l'ARN polymérase doit reconnaître des séquences d'ADN bien particulières, les promoteurs, qui se trouvent en amont de chaque gène et qui possèdent les sites d'initiation de la transcription. Suite à la liaison de l'ARN polymérase II, il y a ouverture immédiate d'un fragment d'ADN pour en exposer les nucléotides. L'un

des deux brins de l'ADN exposé sert de matrice à l'appariement complémentaire avec les nouveaux ribonucléotides. L'élongation de la chaîne se poursuit alors jusqu'à ce que l'enzyme rencontre un second signal dans l'ADN, le signal de terminaison, où la polymérase s'arrête et libère à la fois la matrice d'ADN et la chaîne d'ARN nouvellement synthétisée [192].

L'initiation de la transcription nécessite la présence, dans la région promotrice, d'un complexe multiprotéique. Ce complexe est, notamment, formé de facteurs transcriptionnels (TF). Les facteurs généraux de la transcription sont des complexes protéiques dont une des fonctions est d'assurer la stabilité du complexe d'initiation de la transcription. La mise en place des complexes TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIF, TFIIIE et TFIIH est nécessaire pour permettre l'activation d'un gène (voir Figure 6.). Ces facteurs sont très conservés, leur ordre d'assemblage est très précis et chaque complexe joue un rôle essentiel. Parmi ces protéines, seule TFIID (ou TBP) se fixe sur la boîte TATA. TFIIA stabiliserait le complexe alors que TBP-ADN, TFIIB et TFIIIE assureraient la liaison avec l'ARN polymérase II. Enfin TFIIF aurait une activité hélicase permettant de dénaturer la double hélice de l'ADN au niveau du site d'initiation de la transcription. Ce groupe de facteurs généraux ainsi que l'ARN polymérase II constituent donc le complexe d'initiation, ce complexe est aussi appelé l'holoenzyme. La transcription démarre quelques nucléotides en aval de la boîte TATA au site d'initiation de la transcription (+1). La boîte TATA permet une initiation précise de la transcription [192].

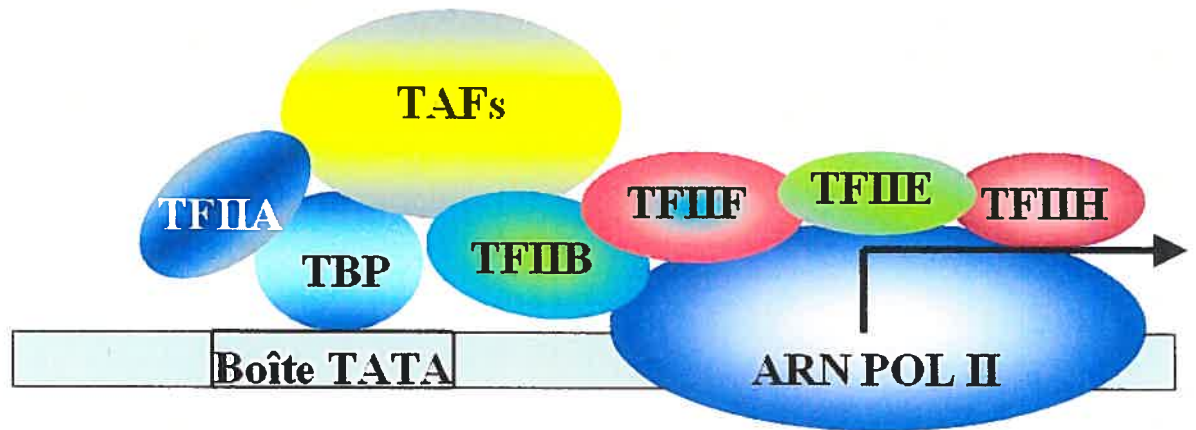


Figure 1.6 Représentation des principales composantes de la machinerie basale de la transcription.

3.2 La structure du gène

Les gènes codant pour les ARNm sont constitués de deux séquences d'ADN distinctes, la séquence transcrite et la séquence régulatrice. Normalement, les régions en amont et en aval de la séquence qui code pour la protéine sont responsables de la régulation des activités du gène. Souvent, chacune de ces séquences est responsable de l'activation du gène dans des circonstances différentes. Par exemple, certains gènes ne doivent être activés qu'à un stade précis du développement d'un organisme, ou bien seulement dans certains types de cellules, ou bien encore en réponse à des conditions extérieures données. La structure interne du gène n'est pas moins complexe. Souvent, un gène eucaryote est interrompu par une ou plusieurs séquences qui ne codent aucune partie du produit protéique final. Ces régions sont dites introns, tandis que les séquences codantes sont nommées exons. Les introns font partie intégrante des segments d'ADN transcrits par l'ARN

polymérase II, mais ils sont ensuite éliminés pendant le processus de synthèse de l'ARNm (épissage), qui sera transporté du noyau au cytoplasme, puis traduit par les ribosomes (voir Figure 1.7). Chaque exon correspond souvent au domaine fonctionnel de la protéine finale, c'est-à-dire à une partie de la protéine ayant une fonction particulière. La biologie moléculaire ne connaît pas encore la fonction précise des introns, même si de nombreuses explications ont été proposées. En effet, il a été montré que certaines séquences introniques de gènes participeraient à la régulation de la transcription [193, 194].

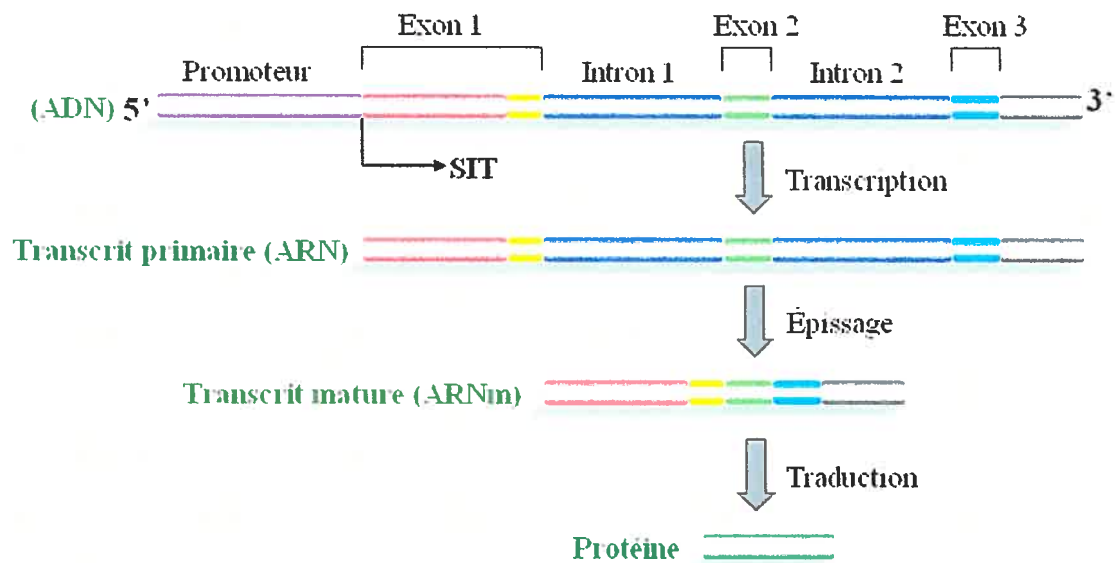


Figure 1.7 Schéma illustrant la structure d'un gène. La séquence d'ADN en amont du gène (violet) représente la région du promoteur. Le gène en question peut être divisé en 4 parties: la région 5' non codante (rouge), les exons (jaune, vert, turquoise), les introns (bleu) et la région 3' non codante (noir). Les régions non codantes sont souvent impliquées dans la régulation du gène.

3.2.1 Structure de la région promotrice du gène

L'organisation du promoteur n'est pas aussi régulière que celle des séquences codantes. Les promoteurs sont caractérisés par une absence de l'équivalent du code génétique ou tout autre trait caractéristique qui fournirait des relations cohérentes aux fonctions. Le promoteur total peut parfois s'étendre sur des milliers de pb d'ADN. Ce dernier peut être divisé en trois parties distinctes : la région promotrice basale, la région régulatrice proximale et la région stimulatrice/modératrice (*enhancer/silencer*) [192].

La première région, le promoteur basal s'étend sur une région d'environ 100pb couvrant la séquence en amont et en aval du SIT. Cette courte région est essentielle au positionnement du complexe de l'holoenzyme de l'ARN polymérase II. En effet, cette machinerie transcriptionnelle s'assemble sur le promoteur basal dont les fonctions sont de fournir un site de maintien au complexe de l'holoenzyme et de positionner l'initiation de la transcription relative aux séquences codantes [195, 196]. La composition du promoteur basal diffère entre les gènes. Pour plusieurs gènes dont l'expression est limitée à certains tissus, les sites de liaison contenus dans la boîte TATA sont d'une importance capitale. En effet, ce motif lie la TBP et cette dernière recrute par la suite l'ARN polymérase II et ses diverses composantes à proximité du SIT. Cette boîte TATA est normalement localisée à environ 25-30 pb du SIT. Certains gènes sont caractérisés par l'absence du motif TATA (TATA(A/T)A(A/T)), dans ce cas, le positionnement du complexe de l'holoenzyme se fait plutôt via la séquence initiatrice (Inr) positionnée entre les nucléotides -4 et +3 [197, 198]. Généralement, les gènes dont l'expression n'est pas limitée à un tissu, les gènes constitutifs (*housekeeping genes*), ne contiennent ni la boîte TATA ni la séquence initiatrice [199]. Ces gènes possèdent plutôt de multiples SIT ainsi que des promoteurs riches en nucléotides GC qui comportent souvent des motifs reconnus par le facteur de transcription Sp1 [200]. Les conséquences fonctionnelles de ces différences dans la structure du promoteur basal ne sont pas bien comprises.

La deuxième région du promoteur, la région proximale, est nécessaire pour initier efficacement la transcription. Cette région est située directement en amont du promoteur basal. Cette séquence est constituée de la majorité des motifs ou sites de liaisons reconnus par des facteurs de transcriptions [201]. La composition et l'organisation de ces sites de liaison des facteurs de transcription varient énormément entre les gènes. Les séquences nucléotidiques de ces sites de liaison déterminent sélectivement la nature des facteurs de transcriptions qui sont capables de s'associer avec le promoteur d'un gène donné. Il reste que ces facteurs de transcription doivent actuellement être présents dans le noyau, sous forme actives et, dans plusieurs cas, la présence de cofacteurs est aussi nécessaire [202]. La présence de ces facteurs de transcription actifs dans le noyau de la cellule diffère au cours du développement, dans la réponse aux conditions environnementales, à travers les régions de l'organisme de même que les types cellulaires [203]. La composition et la configuration des sites de liaisons des facteurs de transcription à proximité d'un gène sont les déterminants majeurs du profil d'expression de ce gène. En conséquent, ils constituent une classe importante de séquences qui représentent des cibles potentielles de la sélection naturelle de l'expression du gène [196].

Outre le promoteur proximal évoqué dans le paragraphe précédent, il existe d'autres séquences régulatrices constituant les séquences distales du promoteur. Ces éléments sont généralement constitués de quelques nucléotides et peuvent être éloignés (en amont ou même en aval) du SIT. C'est sur ces séquences que viennent se fixer les facteurs transrégulateurs. Parmi ces séquences, on note les activateurs (*enhancers*) ainsi que les séquences extinctrices (*silencers*). Leurs particularités sont d'être souvent localisées à de très grandes distances (1 à 30 kb) et d'être capables d'agir indépendamment de leur position (qu'ils soient en amont ou en aval). La dernière région constitue donc la région promotrice la plus éloignée du SIT. Cette dernière participe également à la régulation de la transcription du gène, tout comme les deux premières régions. Cependant, son implication est surtout de manière ponctuelle et spécifique à certaines conditions et à un nombre

restreint de tissus [204, 205]. Les mécanismes d'action des séquences régulatrices aussi éloignées du SIT demeurent encore vagues [206].

3.2.2 L'importance de l'analyse promotrice

Il existe divers mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes incluant la condensation de la chromatine, la méthylation de l'ADN, l'initiation de la transcription, l'épissage alternatif de l'ARN, la stabilité de l'ARNm, le contrôle de la traduction, plusieurs formes de modifications post-traductionnelles, la circulation intracellulaire et la dégradation de protéine [207]. Cependant, le point de contrôle le plus commun et important pour la régulation de l'expression génétique est l'initiation de la transcription, d'où l'importance accordée à l'analyse des régions régulatrices ou promotrices des gènes [192, 203, 208].

De plus, l'analyse de la région promotrice contribue à la compréhension du mécanisme par lequel la transcription se passe chez les eucaryotes. Ces connaissances font partie de la base de la compréhension moléculaire de la biologie. Aussi, les événements qui précèdent l'activation de la transcription doivent éventuellement mener à la machinerie basale de la transcription au niveau du promoteur. De cette façon, le promoteur (basal et proximal) est la cible ultime de l'action de tous les facteurs qui sont impliqués dans la régulation de la transcription.

3.3 Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines qui interagissent avec les promoteurs des gènes afin de modifier le niveau de la transcription. En effet, si la transcription se fait grâce à l'holoenzyme de l'ARN polymérase II, il reste que les facteurs de transcription jouent un rôle capital dans la régulation de l'expression des gènes. Ces facteurs forment une classe de protéines nucléaires qui se lient à des séquences d'ADN spécifiques (*cis-elements*) et de ce fait, stimulent ou inhibent la transcription [209].

La plupart des facteurs de transcription possèdent une structure diversifiée. Ils sont constitués de domaines protéiques séparés, chaque domaine étant responsable d'une fonction particulière comme la liaison à l'ADN, la dimérisation avec d'autres cofacteurs ou encore un domaine qui sert à l'activation de la transcription afin de promouvoir un haut niveau de transcription [210]. Une fois que les facteurs se lient à l'ADN, ces derniers interagissent ensuite avec d'autres protéines liées qui vont permettre d'augmenter le niveau de synthèse d'ARNm. Par exemple, le cofacteur « myocardin » interagit avec le facteur de réponse au sérum (SRF) qui se lie au promoteur de plusieurs gènes exprimés dans le cœur, et interagit avec une série de facteurs dont Nkx2.5 et GATA-4 afin de réguler l'expression des gènes en question [210].

De nombreux gènes partagent les mêmes sites de liaison aux facteurs de transcription, deux des éléments les plus communs à travers les gènes retrouvés dans la région proximale du promoteur sont les boîtes GC et CCAAT. La boîte GC contient le motif GGGCGG et constitue le site de liaison pour Sp1. Cette boîte se trouve dans la zone promotrice proximale de certains gènes à un emplacement variable, environ -110 à -40 pb par rapport au SIT. Il semble que les gènes constitutifs possèdent le plus souvent des boîtes GC comparativement aux gènes possédant une boîte TATA. Sp1 est un facteur de transcription

général exprimé dans tous les types cellulaires de l'organisme et il est impliqué dans la transcription d'une multitude de gènes. Contrairement à la boîte GC, la boîte CCAAT lie différentes protéines, certaines sont présentes dans tous les types cellulaires et d'autres étant spécifiques à certaines cellules [211].

Deuxième Partie : But du projet de recherche

L'étude de la régulation transcriptionnelle des canaux ioniques peut indiquer la spécificité de l'expression de ces canaux. Le recrutement d'une variété de combinaisons de facteurs de transcription peut induire une régulation indépendante de plusieurs gènes codant pour des canaux ioniques distincts [212]. La régulation précise du niveau de l'expression du canal serait très importante pour certains canaux comme ceux activés durant le potentiel d'action, où un changement mineur dans le niveau de courant peut résulter soit en une repolarisation prématurée ou encore une prolongation significative de la durée du potentiel d'action [96, 213, 214]. Bien que les études concernant la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le potentiel d'action soient encore peu avancés, il reste que cette dernière peut produire des niveaux précis de l'expression des gènes [215].

Tel qu'évoqué précédemment, des études ont démontré que des mutations génétiques au niveau du gène KCNE1 causeraient le Syndrome du long QT. L'expression de KCNE1 est modifiée par des maladies cardiaques, ce qui semble contribuer de façon importante au risque des arythmies et morts subites. En effet, des altérations fonctionnelles des courants ioniques ont été associées avec des changements au niveau de l'expression de l'ARNm et la protéine correspondante. Nathalie Gaborit et ses nombreux collaborateurs ont évalué le profil d'expression des gènes codant pour les canaux ioniques cardiaques chez des patients souffrant de fibrillation auriculaire et chez des patients normaux [216]. Leurs résultats ont démontré un changement significatif au niveau de l'expression de l'ARNm de douze canaux ioniques chez les patients malades comparé aux patients sains. Le gène codant pour minK était plus fortement exprimé chez les patients atteints de fibrillation auriculaire comparé aux patients non atteints.

Dans tous les cas, il est clair qu'une remodelisation de l'expression de minK par les maladies cardiaques implique une modification au niveau de la durée du potentiel d'action cardiaque, ce qui pourrait contribuer aux arythmies cardiaques. De plus amples connaissances à propos des éléments de régulation de KCNE1 contribueraient à la compréhension des mécanismes moléculaires sous jacents aux arythmies cardiaques.

De plus, le gène KCNE1 semble être important pour l'expression d' I_{Ks} de façon spécifique chez différentes espèces. Par exemple, la faible expression de KCNE1 est corrélée par l'expression plus faible du courant potassique I_{Ks} chez le lapin [218] et la souris [219].

Nous avons émis l'hypothèse que les éléments de régulation au niveau 5' de KCNE1 pourraient contribuer à cette régulation transcriptionnelle. Les objectifs du projet de recherche sont : 1) de cloner le promoteur de KCNE1; et 2) d'identifier les éléments de régulation impliqués dans la régulation de la transcription de KCNE1. Ensuite, 3) l'activité promotrice de KCNE1 sera testée chez la souris dans le but de vérifier si le promoteur serait responsable de la faible expression de KCNE1 dans le tissu cardiaque de cette espèce.

Ce projet de recherche nous a permis de caractériser le promoteur proximal du gène KCNE1 dans le tissu cardiaque chez l'humain et la souris et d'identifier les séquences moléculaires qui contrôlent l'expression du gène KCNE1 au niveau de la transcription. L'article qui suit décrit l'ensemble des résultats obtenus et a été soumis le 12 juin 2006 à la revue *Journal of Biological Chemistry*.

Troisième Partie : Article

CHARACTERIZATION OF THE CARDIAC KCNE1 GENE PROMOTER

Zenab Mustapha^{§†1}, Li Pang^{§1,3}, and Stanley Nattel^{§†2}

From the Research Center and Department of Medicine, Montreal Heart Institute and University of Montreal[§]; Department of Pharmacology, University of Montreal[‡], Montreal, Quebec, Canada.

Running Title: KCNE1 gene promoter

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Dr Stanley Nattel, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St. E., Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8. Tel. 514-376-3330;

Fax. 514-376-1355; E-mail [REDACTED]

³ Present address: Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Science, Little Rock, Arkansas, 72205

Summary

KCNE1 encodes an essential cardiac slow delayed-rectifier potassium current (I_{Ks}) β -subunit (minK). Varying *KCNE1*-expression is important in disease-related remodeling and species-dependent expression. To address potential underlying *KCNE1* 5'-regulatory elements, the transcriptional start site (TSS) of human *KCNE1* (*HKCNE1*) was determined with 5'-RACE. Of four isoforms, the putative promoter driving the isoforms constituting >80% expression in human hearts was further analyzed. A 1625-bp region 5' to the TSS was subcloned into luciferase-reporter plasmid (PGL3-Basic). The full promoter sequence (-1609/+16) drove luciferase-expression 31-fold in neonatal rat cardiomyocytes (NRMs). The 327-bp core promoter (-311/+16) maintained activity 21-29 fold. Comparison of NRM and Chinese Hamster Ovary cell (CHO) expression showed that this 326-bp sequence conferred cardiomyocyte-preferential expression, with NRM/CHO expression-ratio=4.9 vs ~2.0 for (-1609/+16). Site-directed mutagenesis of all three GATA-elements in (-311/+16) reduced promoter-activity by >50% and reduced cardiomyocyte-preferential expression from NRM/CHO=4.6 to 2.3. Mutagenesis of the second GATA-element alone decreased promoter activity by ~50% and NRM/CHO to 3.0. GATA4 siRNA inhibited ~40% of (-311/+16) promoter-activity in NRMs. Angiotensin-II increased *HKCNE1* promoter activity, consistent with a role in disease-related remodeling. Low *KCNE1* protein-expression may be responsible for low-level I_{Ks} expression in mouse and rabbit. Cloning of mouse *KCNE1* (*MKCNE1*) 5'-regulatory region showed ~50%

sequence-identity to human, but *MKCNE1* had only 1 GATA-element in the region corresponding to human (-311/+16), had less promoter-activity (14.6 vs 29.0 fold PGL3-Basic) than human and less cardiomyocyte-specificity (NRM/CHO=3.0). Conclusion: Promoter elements in the *KCNE1* 5'-end may be important in tissue and species-related transcriptional regulation.

K⁺-channels play an important role in the regulation of resting membrane potential, heart rate and action potential configuration (1,2). To date, over 80 human K⁺-channel related genes have been cloned and characterized (1). K⁺-channels contain pore-forming α -subunits, which co-assemble with accessory β -subunits that stabilize the channel structure, promote membrane insertion and regulate gating and conductance properties (1,3,4). The *KCNE* gene-family encodes single transmembrane-spanning β -subunit proteins composed of 103 to 177 residues (3). To date, the *KCNE* family has five known members. The first-discovered *KCNE*-encoded protein, minK, corresponding to *KCNE1*, was discovered in 1988 by functional expression of fractionated rat kidney RNA (5). *KCNE1* was later found to be expressed in various tissues including heart, ear, colon, uterus and lymphocytes (6,7).

KCNE1 encodes a 129-130 amino-acid protein with a single putative transmembrane domain that associates with the α -subunit KvLQT1 to form the slow delayed-rectifier current I_{Ks} (3). I_{Ks} plays a key role in the control of cardiac action potential repolarization, particularly under conditions of repolarization stress (8,9). Mutations in the human *KCNE1*

gene (*HKCNE1*) cause the autosomal dominant Romano-Ward (RW) and the rarer autosomal recessive Jervell and Lange-Nielsen (JLN) forms of long QT syndromes (6,7,10,11). Recently, I_{Ks} /minK remodeling has been found to occur in various cardiac disease models (12-15), with changes in mRNA concentration pointing to possible underlying transcriptional regulation.

HKCNE1 was shown to map to chromosome 21 (21q22.1-q22.2) and to contain three exons and two introns (16). The first two exons encode 5' untranslated regions (5'UTRs), whereas the third exon encodes the whole coding region and the 3'UTR (16). The *KCNE1* coding region is relatively conserved among different species: there is 92% amino-acid sequence identity between mouse and rat and about 76% between mouse and human. Although the *KCNE1* product plays an important role in human cardiac physiology and pathophysiology (17,18), minK expression is very weak in mouse (19) and rabbit (20) hearts, corresponding to very small I_{Ks} density in these species (21,22).

In the early 1990s, mouse and rat *KCNE1* gene organization was characterized and putative promoter sequences identified but not analyzed (23,24). Here, we describe the results of experiments designed to clone and characterize the *HKCNE1* promoter, in order to define regions important in controlling cardiac- and species-selective expression.

MATERIALS AND METHODS

RNA and genomic DNA isolation - Total RNA was extracted from normal human and mouse heart with Trizol (Invitrogen). A human genomic clone (RPCI-11 Human BAC Clones) was obtained from Roswell Park Cancer Institute. Mouse genomic DNA was extracted from mouse heart. Human tissues were obtained from the Réseau de tissus pour études biologiques (RETEB) tissue bank under procedures approved by the Human Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute.

Mapping of the HKCNE1 transcription start sites by 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) - 5' RACE was used to locate the transcription start site of human cardiac *KCNE1* transcripts with Ambion's RNA ligase-mediated 5'-rapid amplification of cDNA ends (RLM-5'-RACE), which reacts only with 5'-capped-mRNA. Outer and Inner *HKCNE1*-specific primers were based on the *HKCNE1* sequence published by Splawski *et al.* (16), as shown in Table 1.

Quantification of HKCNE1 transcripts - To determine the abundance of various *HKCNE1* transcripts, two-step real-time reverse transcription (RT)- quantitative polymerase chain reaction (QPCR GeneAmp 5700, PE Biosystems) was performed with SYBR green I (PCR Master Mix, Applied Biosystems). The initial RT step was performed with random primers and MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). For isoform quantification in various human

tissues, cDNAs were synthesized with RNA from normal human tissues (Human Total RNA Master Panel II, Clontech). Primers for RT-QPCR were designed to cross inter-exon junctions to avoid genomic DNA contamination (Table 1). Absolute quantification was obtained by constructing a plasmid which contains exon 1-2, exon 0.5-1A, exon 2B-3 sequences. Plasmid DNA was serially diluted and used as a standard for real-time quantitative RT-PCR. Human GAPDH was used as an internal control. All PCR products were verified based on the dissociation curve and gel electrophoresis.

Construction of promoter-luciferase fusion plasmids - Variable lengths of the human and mouse *KCNE1* promoter region were amplified by PCR. PCR primers were designed based on human GenBank sequence NT_011512 and mouse NT-082371 (Table 1). *HKCNE1* 5'-upstream regions were amplified with the use of RPCI-11 human BAC clones and mouse (*MKCNE1*) 5'-upstream regions were amplified with the use of mouse genomic DNA. PCR products were cloned into pCRII vector (Invitrogen) and then subcloned into the polylinker region of PGL3-Basic (Promega) with the appropriate restriction enzymes.

DNA sequencing and analysis - The promoter region sequences obtained by PCR were verified by DNA sequencing and the orientations of all constructs were confirmed by restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. Sequencing results were analysed with BLAST. Potential transcription factor binding sites were analysed with MatInspector V4.1 and alignment was performed with Clone manager V6.0.

Cell culture - Neonatal rat cardiomyocytes were isolated and cultured as described previously (25). Briefly, one to two-day-old rats were decapitated and their hearts were aseptically removed. Their ventricles were dissected, minced and trypsinized overnight at 4°C. The next day, cells were dissociated with collagenase and pre-plated twice for 60 min at 37°C. The non-adherent cardiomyocytes were removed and plated in 24-well plates in DMEM/F-12 medium (Invitrogen) containing 10% FBS and 0.1 mM bromodeoxyuridine (Sigma). After 24 h, the medium was changed. CHO cells were cultured in DMEM/F-12 (Invitrogen) plus 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. 1×10^5 cells/well were seeded in 24 well plate for transfection.

Transfection and promoter activity measurements - The KCNE1 promoter-luciferase fusion plasmids (1 µg) and 100 ng of PRL-TK plasmid (Renilla luciferase expression vector, an internal control for transfection efficiency) were co-transfected into neonatal rat cardiomyocytes and CHO cells with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Following transfection (48 h), the cells were washed with PBS and lysed with 150 µl passive lysis buffer (Promega). Luciferase activity was measured with the dual luciferase assay kit (Promega) on a Lumat LB9507 luminometer.

Mutation analysis of GATA elements - Three potential GATA4 binding sites (-294, -269 and -54) in PGL3-HKCNE1(-311/+16) were mutated by 3 rounds of PCR with 4 primers per mutation. Two primers complementary to the desired mutation and another two PCR primers flanking unique restriction enzyme sites enclosing the region of interest were designed for each mutation. Two parallel PCR reactions, each with a flanking primer and a primer containing the desired mutation, generated two DNA fragments with overlapping ends. After gel purification, both fragments were annealed in a third PCR using the two restriction-site flanking primers, resulting in a fragment containing the desired mutation. The final PCR product was digested with the flanking restriction enzymes, gel-purified, and cloned into PGL3-HKCNE1 (-311/+16) vector, which was also digested with the same flanking restriction enzymes and gel purified. The primers used in mutagenesis are listed in Table 1. GATA-F1, R1, F2 and R2 were used to mutate GATA-294 to *TGCA*; GATA-F1, R3, F3 and R2 were used to mutate GATA-269 to *GTAG*; GATA-F4, R4, F5 and R5 were used to mutate GATA-54 to *AGCT*. All primers were designed to avoid producing new transcription factor binding sites.

Silencing effects of GATA4 siRNA - GATA4 siRNA (50 nM, Santa Cruz biotechnology) and PGL3-HKCNE1 (-311/+16) with and without GATA mutations were co-transfected into neonatal rat cardiomyocytes with Lipofectamine 2000. GAPDH siRNA (Ambion) was used as a control.

Western blot - Neonatal rat cardiomyocytes (NRM) were transfected with 100 nM GATA4/GAPDH siRNA with Lipofectamine 2000. Forty-eight hours post-transfection, the cells transfected with siRNA GAPDH were lysed with RIPA buffer (solution dissolved in PBS containing 1.0% IGEPAL (Sigma), 0.5% Na⁺-deoxycholate, 0.1% SDS, 0.07% β -mercaptoethanol, pH adjusted to pH 7.3 with HCl) at 4°C for 30 min. Following centrifugation (13,000 g, 30 min, 4°C), the protein content of the supernatants was quantified. Nuclear extract from NRM transfected with siRNA GATA4 was prepared by the following method. Buffer A (10mM HEPES, pH 7.9, 10mM KCL, 0.1mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 10% IGEPAL) was directly added to the plate and incubated for 15 minutes at 4°C. The cells were collected with a scraper. The pellet was collected by centrifugation at 6000 rpm for 4 min and resuspended in Buffer B (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM DTT and 1mM PMSF). The tube was shaken at 4°C for 2 hours and then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatant containing the nuclear extract was collected. Whole-cell or nuclear extracts were fractionated on 12% SDS-PAGE and transferred electrophoretically to Immobilon-P polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore) in 25 mM Tris-base, 192 mM glycine and 5% methanol at 0.4 mA for 2 h. After blocking with 5% non-fat dry milk (Bio-Rad) in TTBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM; pH 7.5, 0.05% Tween-20) overnight, membranes were incubated with primary antibody against GATA4 (Santa Cruz), GAPDH (Ambion), or actin (Santa Cruz) at room temperature for 18 h. Membranes were then washed 3 times with TTBS and incubated with

secondary antibody (goat anti-mouse IgG or donkey anti-goat IgG conjugated to horseradish peroxidase, Santa Cruz) for 40 min. Blots were subsequently washed 3 times in TTBS and developed with Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences). Protein loading was controlled by probing all Western blots with anti-actin antibody.

Angiotensin II stimulation – 100 nM and 1 μ M human synthetic angiotensin II (Sigma) were used to stimulate NRM and CHO cells transfected with PGL3-HKCNE1(-311/+16) and with PGL3-HKCNE1 (-311/+16, GATA 2 mutated). Angiotensin II was included in serum-free medium beginning 24 h after transfection.

Statistics - All experiments were performed at least three independent times. Results are mean \pm SEM. Statistical analysis was with Student's *t*-test (single comparisons only) and one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison post-test. Controls were performed concurrently for each set of experiments shown in each figure to control for time-and technique-dependent variations.

RESULTS

Three human KCNE1 isoforms were defined by 5'RACE

We identified three different *HKCNE1* isoforms (1, 2 and 3) by 5'RACE (Fig. 1). Isoform 1 is similar to that reported by Splawski *et al.* in 1998 (16), but contains an additional 38 bp in the 5' region. Isoform 2 is similar to isoform 1, except that the 5' region of exon 2 in isoform 2 is 28 bp shorter than exon 2 in isoform 1. Isoform 3 has different nucleotide sequences upstream to exon 3, which we designate exon 2B. All 5'RACE product sequences match the sequence reported in human chromosome 22 working draft sequence segment NT_011512 (containing the *KCNE1* gene). By performing a Blast search in GenBank, we found a fourth isoform, (BC046224), which we designate Isoform 4. This isoform consists of 4 exons: besides exon 2 and 3 as in NT_011512, the other 2 exons are located upstream of exon 1, and we designated them exon 0.5 and exon 1A. The existence of this fourth isoform in human heart cDNA was demonstrated by quantitative RT-PCR and confirmed by DNA sequencing of the RT-PCR product. The sequences at all the exon-intron boundaries are consistent with the consensus sequence of the splice junction.

Isoform 1&2 are the most abundant of human KCNE1 transcripts in heart tissues

The four isoforms illustrated in Fig. 1 have identical coding regions. The existence of different 5'-UTRs and alternative transcription start sites suggests the presence of multiple promoters. Since isoform 1 and 2 share the same exon-1 and differ only to a minor extent in

exon-2, they are likely to be driven by the same promoter. Our primary purpose was to clone the promoter responsible for the most abundant cardiac isoforms, so we quantified the human cardiac expression of isoform 1 and 2 together and compared this to the expression of isoforms 3 and 4, which have quite different 5'-upstream regions. Absolute quantification of *HKCNE1* transcripts by real-time RT-QPCR (Fig. 2) showed that isoforms 1 and 2 are strongly expressed in human hearts, contributing ~80% of *HKCNE1* transcripts in right ventricle, 85% in left ventricle and 72% in atrium. The isoform 3 expression level is 10 times smaller in right and left ventricles and 5 times smaller in atrium compared to isoforms 1 and 2. Isoform 4 is least-expressed in human heart. To assess the expression of various isoforms across a range of tissues, we repeated RT-QPCR with commercial human tissue-bank samples. Figure 2 B shows the resulting *HKCNE1* isoform quantification across 14 tissues. Isoforms 1&2 are strongly expressed in heart, kidney and testis, with 4.5-fold greater concentration in heart versus isoform 3 and 9-fold greater versus isoform 4. Isoform 4 is particularly expressed in lung and trachea.

Human KCNE1 promoter shows characteristic of housekeeping promoters

Based on these data indicating consistent isoform 1&2 dominance in the heart, we concentrated on characterizing the isoform 1&2 promoter. Putative cis-acting regulatory elements in the sequences immediately upstream of *HKCNE1* exon 1 were analysed. The putative *HKCNE1* promoter has no apparent TATA box, but contains two putative CCAAT boxes and is GC-rich. MatInspector predicts 4 GC-boxes that could serve as binding sites

for Sp1 transcription factors. The high content of consensus GC elements, lack of consensus TATA boxes and multiple TSSs are characteristic of housekeeping promoters.

The core promoter contains cardiac-specific elements

Varying lengths of the putative isoform 1&2 promoter were transfected into NRM and CHO cells (Fig. 3). The promoter activity of the longest construct, PGL3-*HKCNE1* (-1609/+16) was 31-fold that of PGL3-Basic in NRM, and 16-fold in CHO cells. The second highest promoter activity in NRM was associated with the shortest construct studied, the core promoter PGL3-*HKCNE1* (-311/+16), 21-29 fold PGL3-Basic (Fig. 3A). Element(s) responsible for cardiomyocyte-selective activity of the *HKCNE1* promoter appear to be located in the core promoter, because PGL3-*HKCNE1* (-311/+16) has a NRM/CHO expression ratio (NRM/CHO) of ~4.9 vs ~2.0 for PGL3-*HKCNE1* (-1609/+16) (Fig. 3B). In order to assess the basis for the cardiac predominance of isoform 3, we cloned its potential 5'-promoter elements and studied their activity. The full-length putative promoter region (-1620/+21) produced reporter activity ~5-fold PGL3-Basic in NRM, 6 times weaker than the corresponding Isoform 1&2 promoter construct (-1609/+16, Figure 3C). The Isoform-3 full-length promoter region showed a NRM/CHO expression ratio of ~1.0, vs ~2.0 for the corresponding Isoform 1&2 construct.

Three GATA boxes are involved in the cardiac-specific core promoter activity

To investigate potential mechanism(s) of the cardiomyocyte-selective activity of PGL3-*HKCNE1* (-311/+16), MatInspector was used to screen potential cardio-selective expression elements. Three GATA-boxes were found: GATA (-294), GATA (-269) and GATA (-54), which were studied by site-directed mutagenesis (Fig. 4). Mutation of the first (-294) or third (-54) GATA element decreased promoter activity by ~36% in NRM (18.2±0.9 and 18.9±1.1-fold PGL3-Basic, vs 29.0±1.9-fold PGL3-Basic for the construct without mutation). Mutation of the second (-269) GATA element decreased promoter activity 55% (to 12.9±0.9-fold PGL3-Basic) and reduced cardio-selective activity from NRM/CHO ~4.6 to 2.5. Mutation of all three GATA elements decreased promoter activity by 58% (12.2±0.6 vs 29.0±1.9), no further decrease than the 2nd GATA-element mutation alone. None of the GATA mutations significantly affected promoter activity in CHO cells and all reduced cardiomyocyte-selectivity (e.g. the 3-GATA and GATA-2 mutations reduced the NRM/CHO ratio from 4.6 to ~2.3).

To confirm the functional importance of those GATA elements in the *HKCNE1* core promoter, siRNA silencing experiments were performed. As shown in Fig. 5A, co-transfection of PGL3-*HKCNE1* (-311/+16) with 50 nM GATA4 siRNA decreased promoter activity by 43% (28.2±0.7 vs 16.2±0.5-fold, P<0.001), but co-transfection of GATA4 siRNA with 3 GATA-mutated PGL3-*HKCNE1* (-311/+16) caused no significant change in promoter activity (Fig. 5B). GAPDH siRNA was used as a control to confirm gene-specific silencing effects. There was no significant decrease in promoter activity when 50 nM

GAPDH siRNA was co-transfected with PGL3-*HKCNE1*. Western blots (Fig. 5C) effective knockdown by siRNA, with ~75% protein-expression reduction for GAPDH siRNA and ~70% for GATA4 siRNA.

Angiotensin II increased the core promoter activity

GATA4 is important in inducible gene expression evoked by a variety of hypertrophic stimuli (26). We therefore tested the effect of angiotensin-II on *HKCNE1* promoter activity. Both 100 nM and 1 μ M angiotensin II significantly increased luciferase activity of the *HKCNE1* core promoter in transfected NRM and CHO cells (Fig. 6). Angiotensin II failed to increase GATA-2 mutated core promoter activity.

Comparison of the human and mouse *KCNE1* core promoter

KCNE1 appears important for species-specific I_{Ks} expression, with low minK levels in mouse and rabbit associated with very small I_{Ks} (17,18,20,21). Alignment of human and mouse *KCNE1* 5'-regulatory regions revealed ~50% sequence identity, with none of the 3 GATA elements in the *HKCNE1* core promoter conserved in the corresponding region of *MKCNE1*, although *MKCNE1* has one GATA element not found in *HKCNE1* (Fig. 7). Fig. 8 shows that the mouse core promoter has less activity in NRMs compared to its human counterpart (11.7 ± 0.7 vs 29.0 ± 1.9 fold PGL3-Basic, $P < 0.001$) and less cardiomyocyte-selectivity (NRM/CHO=3.0).

DISCUSSION

In this study, we identified several *HKCNE1* isoforms and studied the 5'-regulatory elements determining the expression of the most strongly-expressed cardiac isoforms. We found that the core promoter significantly drives transcriptional activity and cardiomyocyte-selective expression, with a single GATA element of particular importance, and obtained evidence suggesting that core-promoter sequence differences contribute to species variations in *KCNE1* expression.

The regulation of cardiac ion-channel subunit expression is an important area in rapid development, although presently-available information is limited (27). Cardiac K⁺-channel promoters typically lack TATA boxes, are GC-rich and contain multiple Sp-1 binding sites (28,29), features observed for the putative *HKCNE1* promoter in the present study. Factors that have been identified as important in the control of cardiac K⁺-channel expression include cyclic AMP (cAMP) interactions with a cAMP response element in Kv1.5 (28) and GATA interacting with FOG2 for Kv4.2, despite the absence of consensus GATA binding sites in the Kv4.2 core promoter (30). In the present study, GATA appeared to play a significant role in regulating *HKCNE1* expression via interactions requiring consensus GATA binding sequences in the core promoter.

The *KCNE1* gene product minK is required for optimal function of the important cardiac repolarizing current I_{Ks} (6,7,10,11) and alterations in minK expression can be a

significant component of disease-induced remodeling of cardiac electrical function (12-15). Here, we studied the cardiac mRNA expression of various *HKCNE1* isoforms and cloned and characterized the putative promoter of the most commonly-expressed isoforms. Our isoform 1 corresponds to the isoform first described by Splawski *et al.* in 1998 (16). Lundquist *et al.* reported the expression of 2 isoforms that they designated 1a and 1b (15,31), corresponding to our isoforms 2 and 3 respectively. We also identified the expression of a 4th isoform in human hearts, corresponding to a previously uncharacterized sequence in GenBank. We found that our isoforms 1 and 2, with the same DNA sequence 5' to the TSS, are much more strongly expressed in the heart than isoforms 3 and 4, and that this cardiac predominance is related to strong promoter activity in cardiomyocytes.

We found an important role for consensus GATA-binding sequences in the *HKCNE1* core promoter. GATA-4 (and/or GATA-6) binds to such elements in heart and thereby regulate DNA transcription. GATA-4 can be activated by important stimuli like mechanical stretch or cardiac hypertrophy. Stretch induces release of norepinephrine, angiotensin-II, and endothelin-1 from cardiomyocytes and is associated with increased GATA-4 binding to DNA; over-expression of GATA-4 promotes cardiac hypertrophy (32). GATA-4 regulates the expression of numerous genes involved in cardiac hypertrophy, such as those encoding myosin heavy chains, various natriuretic proteins (ANP, BNP), the sodium/calcium exchanger, troponin-I, type-1 angiotensin receptors, M2 muscarinic receptors and A1-adenosine receptors (26,32). Human *KCNE1* expression has been

reported to be increased in cardiomyopathic tissue (33). This may be related to the enhancing effect of angiotensin-II on *HKCNE1* promoter activity that we observed. This effect of angiotensin-II was abolished by the GATA 2 mutation and therefore requires this intact GATA transcription factor binding site.

The functional expression of I_{Ks} varies widely among species (21,22,34), and there is evidence that differences in *KCNE1* expression may be important in determining species-dependent I_{Ks} expression differences (20). I_{Ks} density is known to be very small in the mouse (21), paralleling low-level *KCNE1* expression (19). We found differences in core-promoter sequences and activities between mouse and human *KCNE1* that may contribute to lower-level expression in the mouse heart.

In summary, we have identified 4 *HKCNE1* isoforms expressed in human hearts and characterized the promoter driving expression of the predominant isoforms. We found core-promoter GATA elements that are important for promoter activity, cardiomyocyte-selective, and species-selective expression. Our results may have important implications for understanding the transcriptional regulation of *KCNE1*/ I_{Ks} in normal conditions and in the presence of cardiac disease.

REFERENCES

1. Tamargo, J., Caballero, R., Gomez, R., Valenzuela, C., and Delpon, E. (2004) *Cardiovasc Res* 62(1), 9-33
2. Xiao, J. F., Fischer, C., and Steinlein, O. K. (2001) *Neuroreport* 12(17), 3733-3739
3. Abbott, G. W., and Goldstein, S. A. (2001) *Mol Interv* 1(2), 95-107
4. Kashuba, V. I., Kvasha, S. M., Protopopov, A. I., Gizatullin, R. Z., Rynditch, A. V., Wahlestedt, C., Wasserman, W. W., and Zabarovsky, E. R. (2001) *Gene* 268(1-2), 115-122
5. Takumi, T., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1988) *Science* 242(4881), 1042-1045
6. Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1997) *Embo J* 16(17), 5472-5479
7. Kass, R. S., and Moss, A. J. (2003) *J Clin Invest* 112(6), 810-815
8. Han, W., Wang, Z., and Nattel, S. (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(3), H1075-1080
9. Jost, N., Virag, L., Bitay, M., Takacs, J., Lengyel, C., Biliczki, P., Nagy, Z., Bogats, G., Lathrop, D. A., Papp, J. G., and Varro, A. (2005) *Circulation* 112(10), 1392-1399
10. Krumerman, A., Gao, X., Bian, J. S., Melman, Y. F., Kagan, A., and McDonald, T. V. (2004) *Am J Physiol Cell Physiol* 286(6), C1453-1463
11. Abriel, H., Schlapfer, J., Keller, D. I., Gavillet, B., Buclin, T., Biollaz, J., Stoller, R., and Kappenberger, L. (2004) *Swiss Med Wkly* 134(47-48), 685-694
12. Gaborit, N., Steenman, M., Lamirault, G., Le Meur, N., Le Bouter, S., Lande, G., Leger, J., Charpentier, F., Christ, T., Dobrev, D., Escande, D., Nattel, S., and Demolombe, S. (2005) *Circulation* 112(4), 471-481
13. Brundel, B. J., Van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tieleman, R. G., Tuinenburg, A. E., Wietes, M., Grandjean, J. G., Van Gilst, W. H., and Crijns, H. J. (2001) *Circulation* 103(5), 684-690

14. Tsuji, Y., Zicha, S., Qi, X., Kodama, I., and Nattel, S. *Circulation*. 2006 Jan 24;113(3):345-55.
15. Lundquist, A. L., Manderfield, L. J., Vanoye, C. G., Rogers, C. S., Donahue, B. S., Chang, P. A., Drinkwater, D. C., Murray, K. T., and George, A. L., Jr. (2005) *J Mol Cell Cardiol* 38(2), 277-287
16. Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Lehmann, M. H., and Keating, M. T. (1998) *Genomics* 51(1), 86-97
17. Li, G. R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M., and Nattel, S. (1996) *Circ Res* 78(4), 689-696
18. Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (2001) *Cell* 104(4), 569-580
19. Marionneau, C., Couette, B., Liu, J., Li, H., Mangoni, M. E., Nargeot, J., Lei, M., Escande, D., and Demolombe, S. (2005) *J Physiol* 562(Pt 1), 223-234
20. Zicha, S., Moss, I., Allen, B., Varro, A., Papp, J., Dumaine, R., Antzelevich, C., and Nattel, S. (2003) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(4), H1641-1649
21. Temple, J., Frias, P., Rottman, J., Yang, T., Wu, Y., Verheijck, E. E., Zhang, W., Siprachanh, C., Kanki, H., Atkinson, J. B., King, P., Anderson, M. E., Kupersmidt, S., and Roden, D. M. (2005) *Circ Res* 97(1), 62-69
22. Lu, Z., Kamiya, K., Opthof, T., Yasui, K., and Kodama, I. (2001) *Circulation* 104(8), 951-956
23. Lesage, F., Attali, B., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (1992) *FEBS Lett* 301(2), 168-172
24. Iwai, M., Masu, M., Tsuchida, K., Mori, T., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1990) *J Biochem (Tokyo)* 108(2), 200-206
25. Pang, L., Koren, G., Wang, Z., and Nattel, S. (2003) *FEBS Lett* 546(2-3), 349-354
26. Akazawa, H., and Komuro, I. (2003) *Circ Res* 92(10), 1079-1088
27. Rosati B, McKinnon D. *Circ Res*. 2004 Apr 16;94(7):874-83.
29. Mori Y, Matsubara H, Folco E, Siegel A, Koren G. *J Biol Chem*. 1993 Dec 15;268(35):26482-93.

28. Wymore RS, Negulescu D, Kinoshita K, Kalman K, Aiyar J, Gutman GA, Chandy KG. *J Biol Chem*. 1996 Jun 28;271(26):15629-34.
30. Jia Y, Takimoto K. *Cardiovasc Res*. 2003 Nov 1;60(2):278-87.
31. Lundquist, A. L., Turner, C. L., Ballester, L. Y., and George, A. L., Jr. (2006) *Genomics* 87(1), 119-128
32. Dobrev, D. (2003) *Cardiovasc Res* 60(2), 226-227
33. Borlak, J., and Thum, T. (2003) *Faseb J* 17(12), 1592-1608
34. Varro A, Lathrop DA, Hester SB, Nanasi PP, Papp JG. *Basic Res Cardiol*. 1993 Mar-Apr;88(2):93-102.

FOOTNOTES

The authors thank Chantal Maltais and Chantal St-Cyr for technical support. The authors thank France Thériault for secretarial help with the manuscript. This work was supported by an award from the Canadian Institutes of Health Research.

The abbreviations used are: CHO, Chinese hamster ovary; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium; FBS, Fetal bovine serum; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcriptase; NRM, neonatal rat myocytes; TSS, transcription start site; UTR, untranslated region; HKCNE1, human KCNE1 gene; MKCNE1, mouse KCNE1 gene; RACE, rapid amplification of cDNA ends.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. 5'RACE results and proposed gene structure. Three 5'RACE products (Isoform 1, 2, 3) were identified. Isoform 4 was identified in GenBank as BC046224. The location and sizes of exons and introns are according to GenBank: NT_011512. Two major TSSs determined by 5'RACE are indicated by arrows.

Fig. 2. Human *KCNE1* Isoform quantification by real-time RT-QPCR. A. Absolute quantification of *HKCNE1* isoform 1 & 2, 3 and 4 expressions in different heart tissues (n=3 per data point). Isoforms 1 and 2 were most abundant in all heart tissues. (***P<0.001 vs isoforms 1& 2, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test) B. Absolute quantification of *HKCNE1* isoform 1 & 2, 3 and 4 expression in various human tissues (n=3 per data point). Human GAPDH was used as an internal control.

Fig. 3. A. Analysis of *HKCNE1* Isoform 1&2 promoter activity in NRM and CHO cells (n=6 for each cell-type). A schematic representation of the 5' deletion constructs of the *HKCNE1* promoter region is shown on the left. Nucleotides of fusion plasmids are numbered with respect to the TSS (+1) identified by 5'RACE. Firefly luciferase expression levels were divided by co-expressed Renilla luciferase activity and expressed as -fold activity divided by the promoter-less construct (PGL3-Basic). B. Comparison of *HKCNE1* promoter activity expressed in NRM and in CHO cells. The promoter activity in NRM is divided by promoter activity in CHO cells. Core promoter (-311/+16) activity in NRM was

4.9 times activity in CHO cells, which suggests that it contains cardiomyocyte-selective transcription factor binding sites. C. Analysis of *HKCNE1* isoform 3 promoter activity in NRM and CHO cells (n=3 for each cell type) and comparison of *HKCNE1* isoform 3 promoter activity in NRM versus CHO cells.

Fig. 4. GATA element mutation analysis. The GATA elements (GATA 1: GATC(-294), GATA 2: GATC(-254), GATA 3: CATC(-54)) in PGL3-*HKCNE1* (-311/+16) were mutated to TGCA, GTAG, AGCT respectively and the effects of these mutations on core promoter activity were measured by luciferase assay (**P<0.01 vs non-mutated core promoter; n=6 for each data point, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test).

Fig. 5. Effects of GATA4 siRNA on promoter activity and cardiomyocyte-selective expression. A. Co-transfection of GATA4 siRNA (50 nM) with the *HKCNE1* core promoter resulted in a significant decrease in promoter activity. B. Co-transfection of GATA4 siRNA with the 3-GATA mutated core promoter construct did not affect promoter activity. Co-transfection with 50 nM GAPDH siRNA was used as a control (***P<0.001 vs result without siRNA, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test). C. GATA4 and GAPDH siRNA knock-down efficiency analyzed by Western blot in the absence (control) or presence of siRNA (+ siRNA). Actin served as a loading control (**P<0.01, ***P<0.001 vs result without siRNA co-transfection; n=5 for each data point).

Fig. 6. Effect of angiotensin II on *HKCNE1* promoter activity. NRM and CHO cells transfected with PGL3-*HKCNE1* (-311/+16) and PGL3-*HKCNE1* (-311/+16, GATA 2 mutated) were incubated with 100 nM and 1 μ M angiotensin II (*P<0.05, **P<0.01 vs core promoter in absence of angiotensin II; n=5 for each data point, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test).

Fig. 7. Sequence alignments of *KCNE1* human (H) and mouse (M) core promoter sequences. Conserved regions are underlined. GATA-boxes are identified as boxes with solid lines and GC-boxes with dotted lines. The TSS in *HKCNE1* is indicated by arrows.

Fig. 8. Comparison of human and mouse core promoter activity. A. Human and mouse core promoter activities were measured in NRMs and CHO cells by luciferase assay (***P<0.001 for human vs mouse; n=5 for each data point). B. Human and mouse *KCNE1* promoter activity in NRMs was divided by activity in CHO cells. Cardio-selectivity was lower for the mouse promoter.

Figure 1

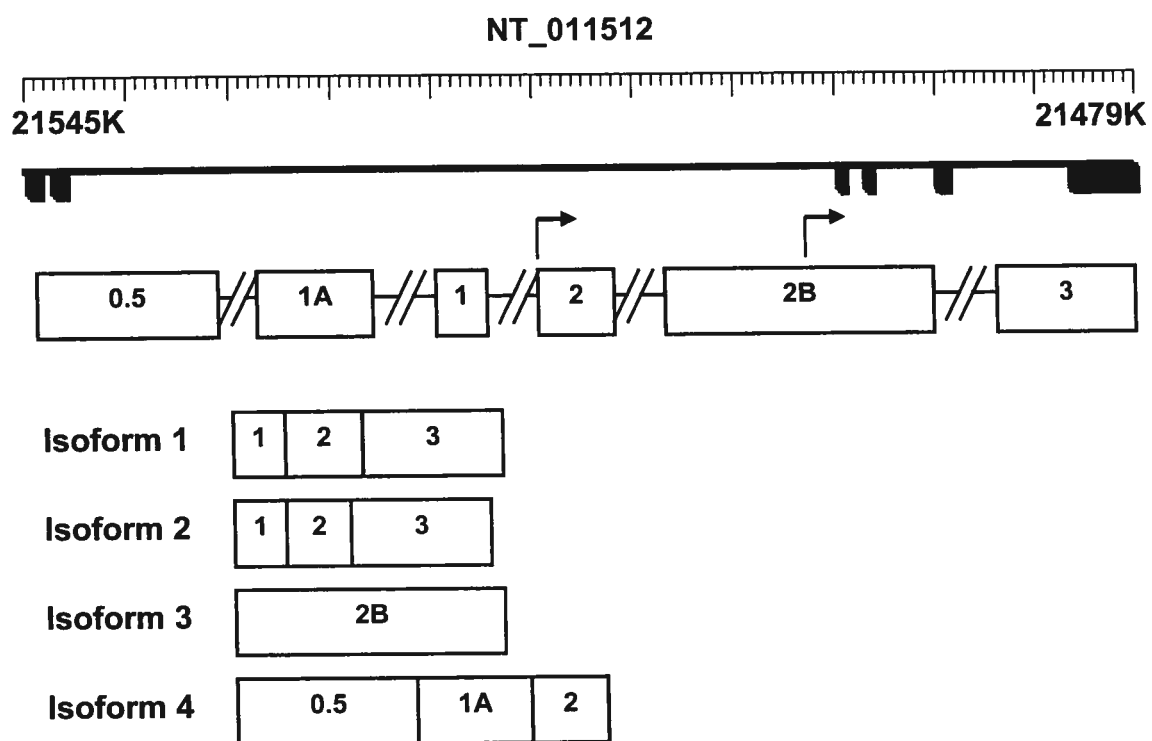
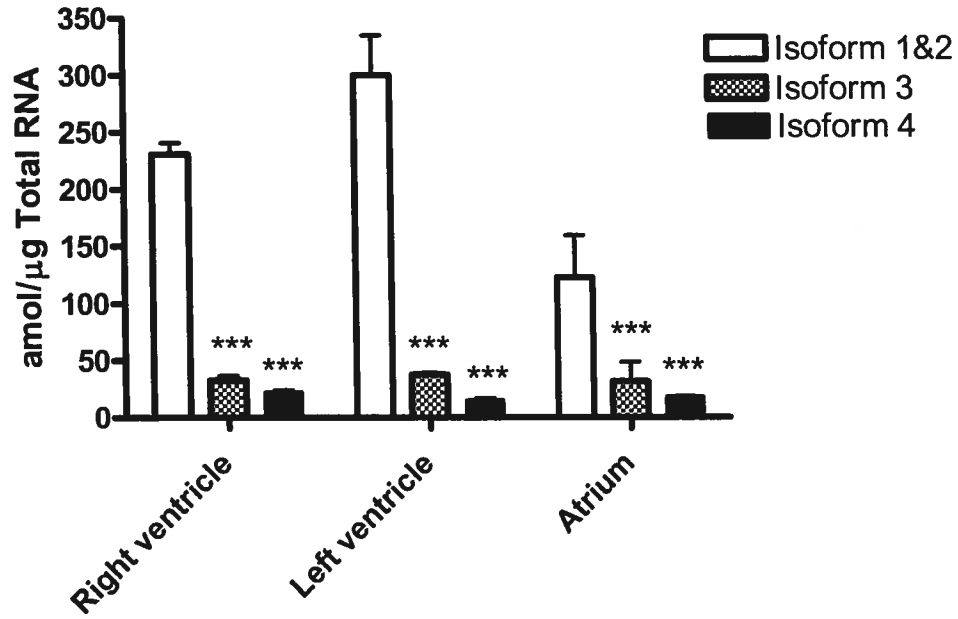


Figure 2

A



B

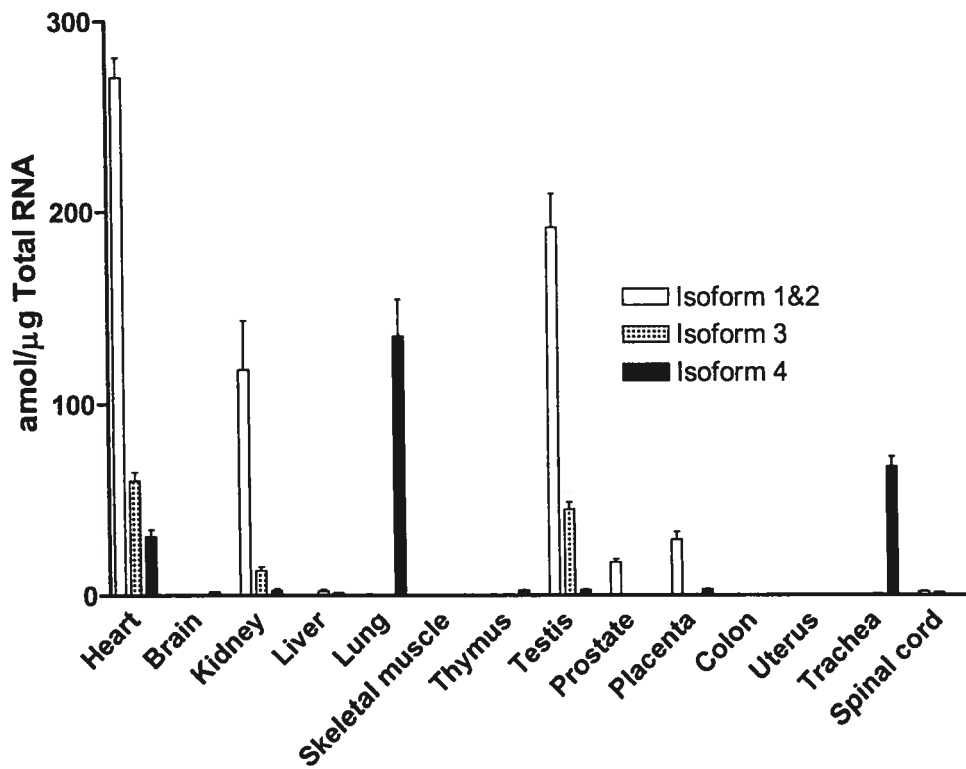


Figure 3

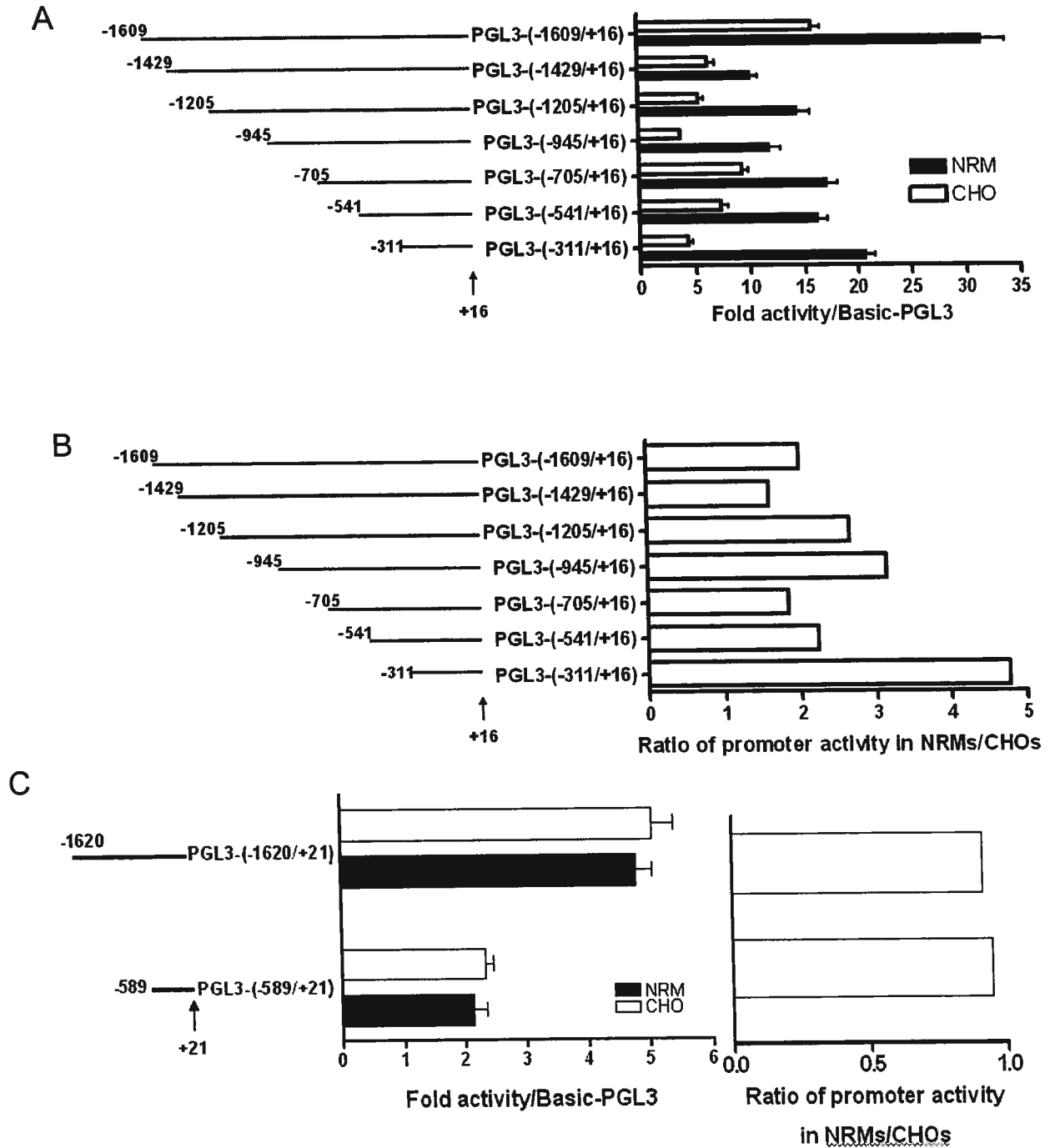


Figure 4

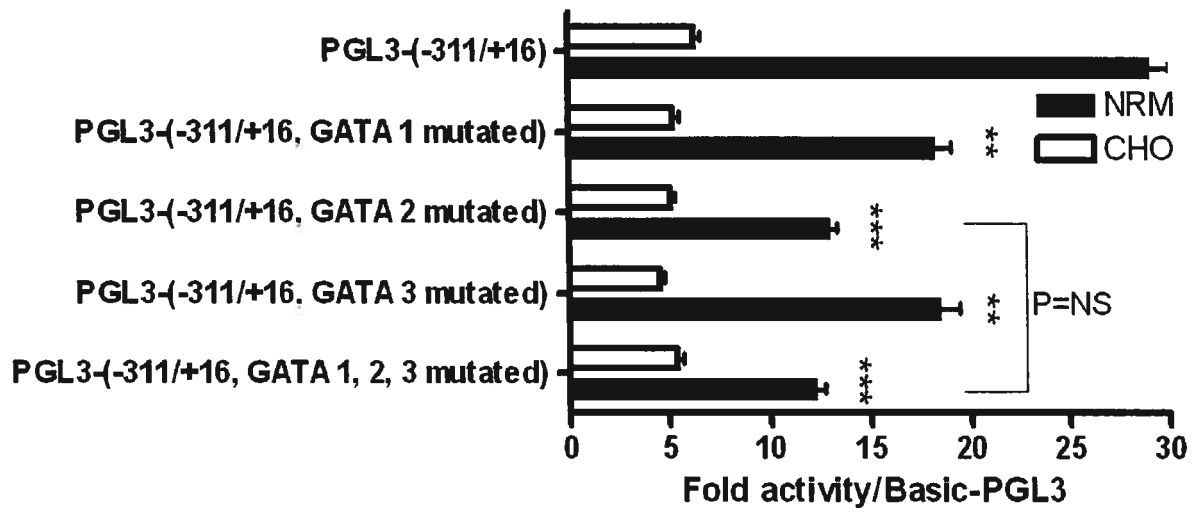


Figure 5

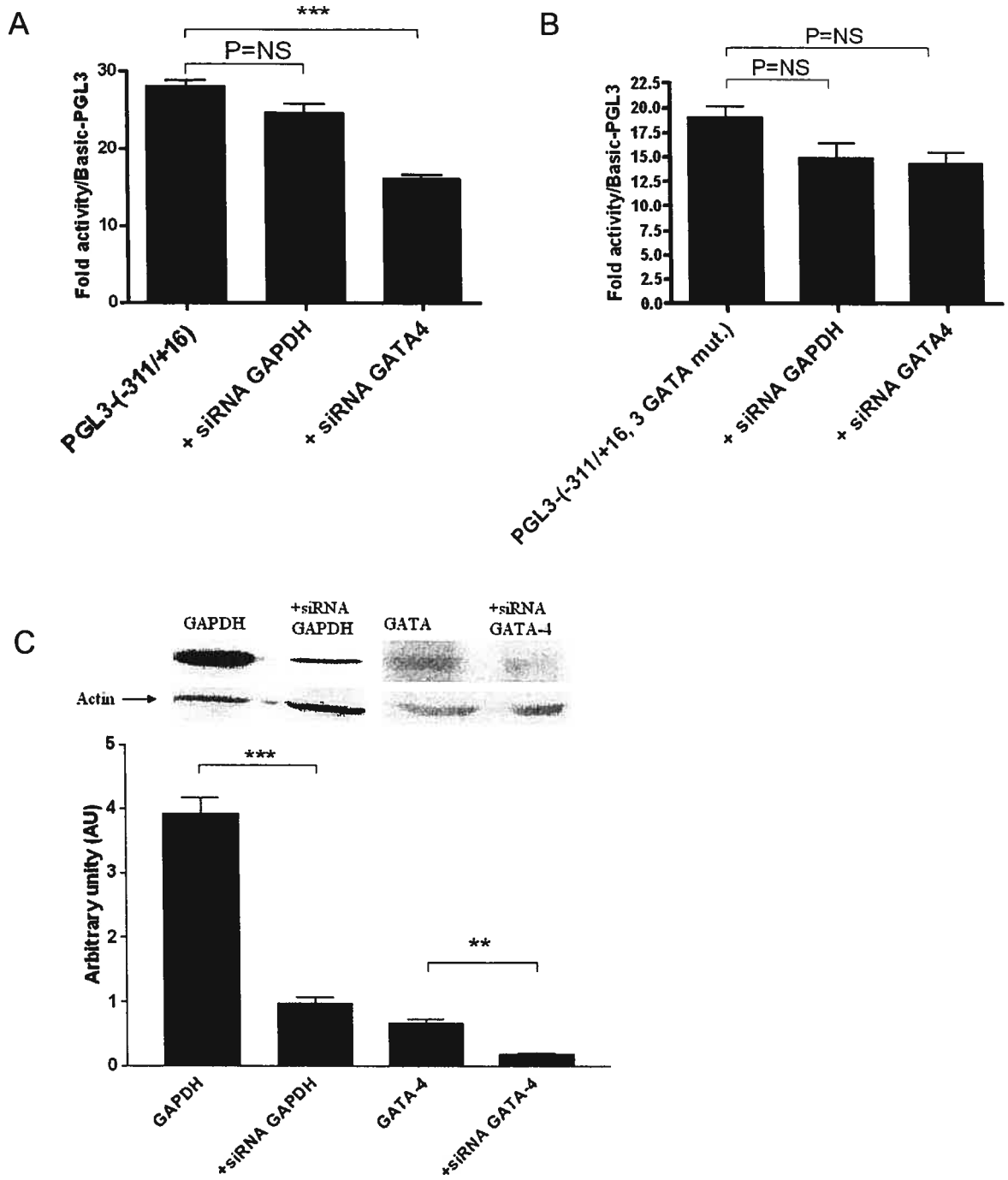


Figure 6

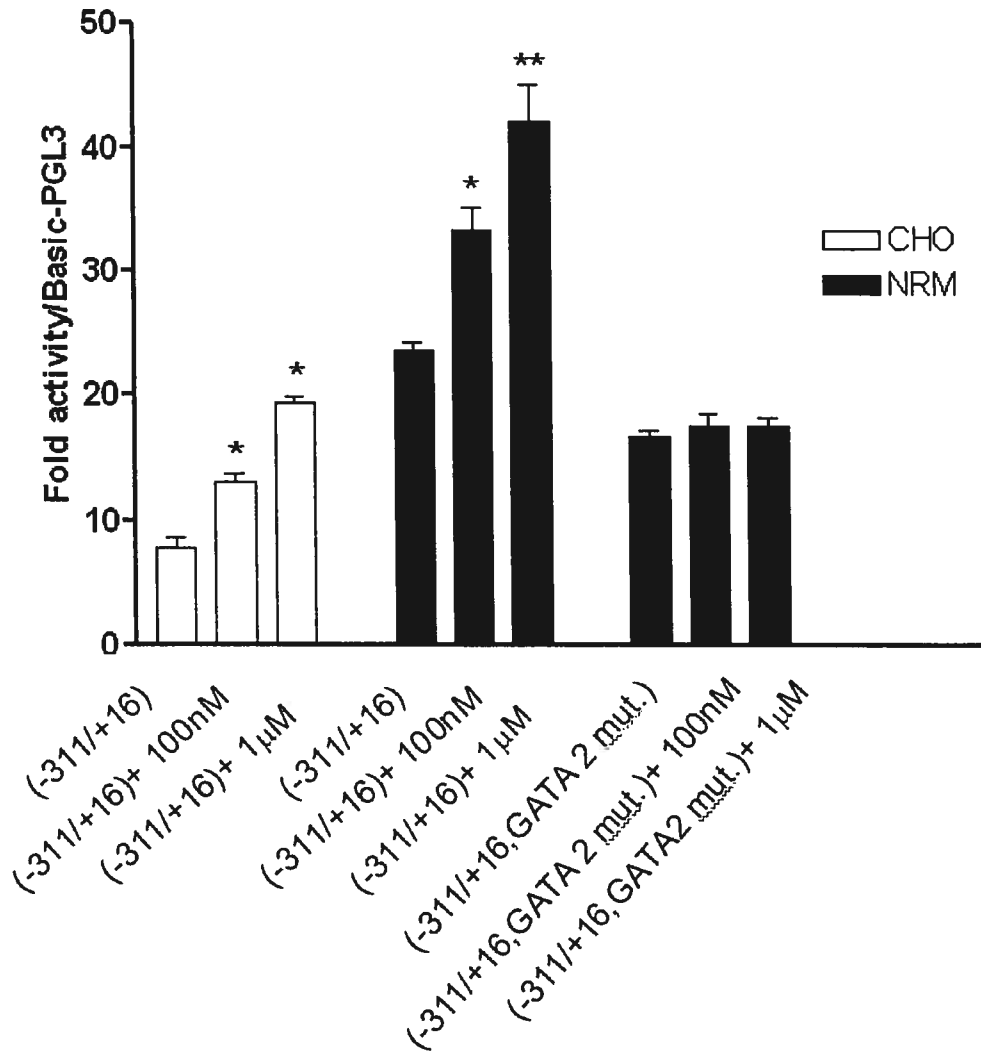


Figure 7

H CCGCAGGAAGGTAGGTA⁻²⁹⁴GATCTGTCGGTTGGTCGGCTTTCTC⁻²⁶⁹GATCCTAATGCAAACCT
 M CCACAG-----ACTGC

H CTGCCGGCCTTGAGCCTCTCCGACAGGATCTAAAACGCTTCCCTACGCGCGTTGGTGTG
 M CTGCCAGCCCTAAGCC--CACCTGCTGGAGTCAAAGTGTITCC-----GGCCCTTGGGGCT-

H GTCTGGGGTGCAGAGTGTGGAGGACCCGGGGGGCCGGGGCTGGTCTGGGGTGGTCCCGG
 M -----GAGTGCAGCGTGCAGGGTGC-----AGGGTGCAGGG---TGGGCTGGGTAACTTC-----

H GGAACCCTGGGCTGGGCCGTGCGTGTGGGCGGAGTGGGGCGGGACGCCTGGCGGCTCTGG
 M AGAGACCTAGGCTGG-----CAGATAGCGAGC--CAACCTGGCTGGAAGCCCCAGGGCTCTGT

H GAGGC⁻⁵⁴CCGCCCCCCCATCCCTGTGCAGCGCTCAGGCCCTTAGAAGGTGCCGCCCGG
 M GAGGCCCGCCCACCAAAGC-----AACATCGCT-----TGAG-----TGCCTCTG

H GGCGGGGCTGT  CTGTGGCCTCAGCGCT
 M GGCTTGTTCGGT CCTAGACCCCGGCTCA

Figure 8

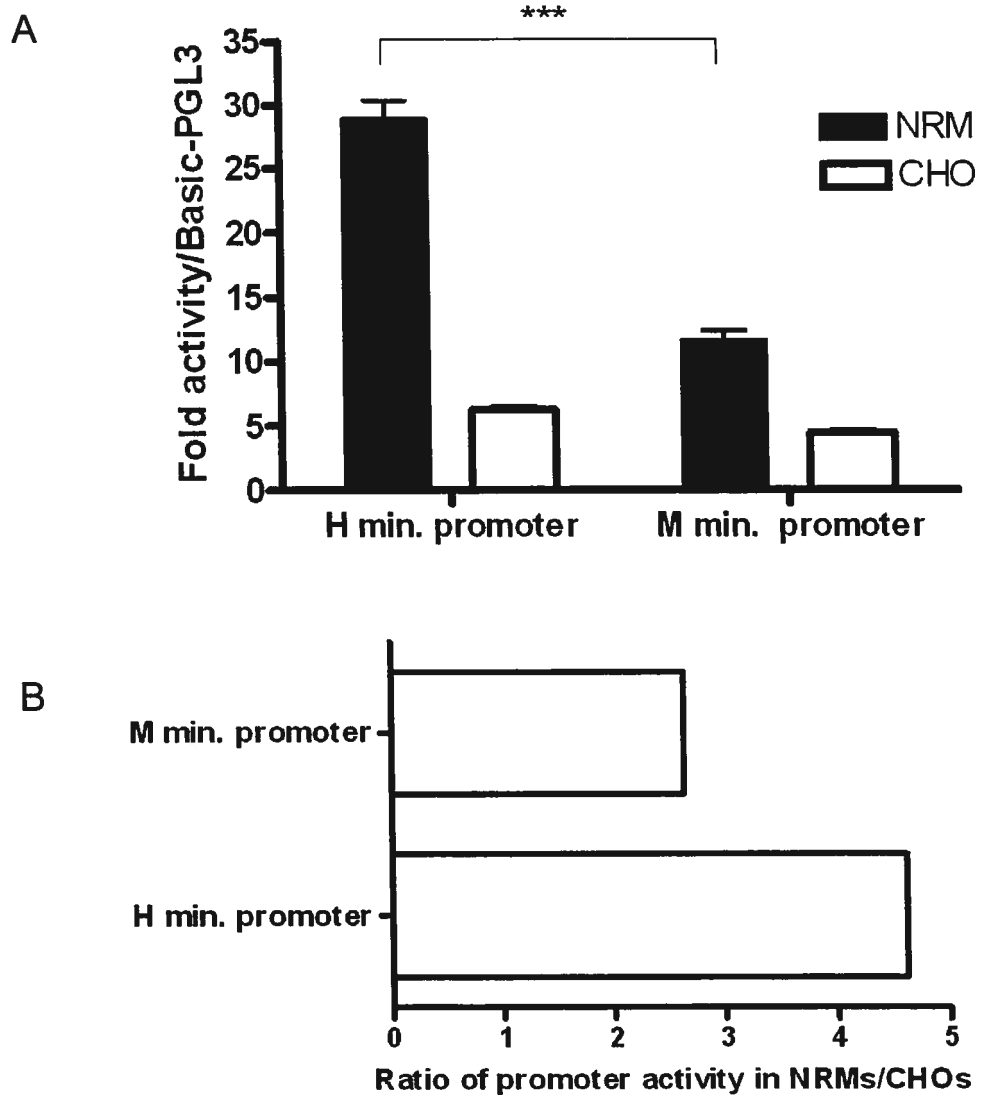


Table 1. Primer information

Primers	Genbank #	Sequences	Location	Application
InnerGSP	NM_000219	ATGAGGACGTAGAGGGCCTCC	Exon 3	5'RACE
OuterGSP	NM_000219	GGAAGGTGTGTGTTGGGTTGT	Exon 3	5'RACE
Iso4-F	BC046224	CGCAGTGTGCTTGAGGAGACT	Exon 0.5	Real-time PCR
Iso4-R	BC046224	GCCAGAGAAAGCAGAGGGATT	Exon 1A	Real-time PCR
Iso1/2-F	AY789479	GGCTCTCTCGGCATCTCAGA	Exon 1	Real-time PCR
Iso1/2-R	AY789479	TACAGATAATGCCTTCCTCCAATG	Exon 2	Real-time PCR
Iso3-F	AY789480	CTGCCTCCACCATCCCTTAC	Exon 2B	Real-time PCR
Iso3-R	AY789480	CTCCCAGGCACACCTCTAAAT	Exon 3	Real-time PCR
HKCNE1F1	NT_011512	GGACTCCACATAATATTCTACTA	HKCNE1 Pro (-1609/-1587)	HPro. amplification
HKCNE1F2	NT_011512	GTCTGGGCACGCTGACTACA	HKCNE1 Pro (-1429/-1409)	HPro. Amplification
HKCNE1F3	NT_011512	CAGTGAGCCGAGATCGTGCCATT	HKCNE1 Pro (-1205/-1183)	HPro. Amplification
HKCNE1F4	NT_011512	CATGAGAACACCGAGGTGGAAG	HKCNE1 Pro (-945/-924)	HPro. Amplification
HKCNE1F5	NT_011512	GGAAGTCACCTGCATCATTG	HKCNE1 Pro (-705/-686)	HPro. Amplification
HKCNE1F6	NT_011512	AGGGCTGCACACCCAGTAAGT	HKCNE1 Pro (-541/-521)	HPro. Amplification
HKCNE1F7	NT_011512	CCGCAGGAAGGTAGGTAGA	HKCNE1 Pro (-311/-293)	HPro. Amplification
HKCNE1R1	NT_011512	AGCGCTGAGGCCACAGACA	HKCNE1 Pro (-3/+16)	HPro. Amplification
GATAF1		TGCCAGAACATTTCTCTATC	PGL3	Mutate GATA-294 / -269
GATAR1		CCAACGGACA TGC ATACCTACCTCCT	(-307/-281)	Mutate GATA-294
GATAF2		TAGGTA TGC ATGTCCGTGGTCGGCTT	(-296/-274)	Mutate GATA-294
GATAR2		ATCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCT	PGL3	Mutate GATA-294/ -269
GATAF3		TCGGCTTTCG TAG TCCCTAATGCAAACCTTCT	(-280/-250)	Mutate GATA-269
GATAR3		GCATTAGGACT ACG AAAGCCGACCAACG	(-276/-259)	Mutate GATA-269
GATAF4		ACGACTGCAGAAATTCGCCCTTCCGCAGGAAGGT	PGL3	Mutate GATA-54
GATAR4		GCACAGGAGCTGGGGCGGGCGGGCCTCCAGA	(-76/-43)	Mutate GATA-54
GATAF5		CCCAGCTCCTGTGCAGCGCTCAGGCCCTT	(-57/-29)	Mutate GATA-54
GATAR5		GATCCACTAGTAACGGCCGCCA	PGL3	Mutate GATA-54
MKCNE1-F	NT_082371	ACTGCCTGCCAGCCCTAAGC	MKCNE1 promoter	MPro. Amplification
MKCNE1-R	NT_082371	GCAGCGGGAGCCTTGATGTG	MKCNE1 promoter	MPro. Amplification

F: forward primer, R: reverse primer

Quatrième Partie : Discussion et Conclusion

Les éléments de régulation situés en région 5' du gène KCNE1 semblent être importants dans la régulation transcriptionnelle de ce gène. Les résultats permettent l'identification des séquences moléculaires qui contrôlent la régulation transcriptionnelle du gène KCNE1 dans les myocytes. En particulier, les résultats démontrent la localisation de trois sites GATA spécifiques au cœur et impliqués dans la régulation transcriptionnelle positive de KCNE1.

La région promotrice de KCNE1 diffère considérablement chez les différentes espèces. Le clonage de la région 5' chez la souris a montré une homologie de ~50% à celle de l'humain, avec la présence d'une seule boîte GATA dans la région correspondante à la région centrale du promoteur humain. Cette région de la souris possède une plus faible activité promotrice comparée à la même région chez l'humain et elle serait responsable de la faible expression de ce gène dans le tissu cardiaque de la souris.

1. Localisation du SIT principal et identification des isoformes de KCNE1

1.1 La technique du 5' *RACE*

La région promotrice d'un gène est localisée directement en amont du site d'initiation de la transcription (SIT). Le SIT d'un gène est déterminé par l'identification de la région 5' non codante de son ARNm. La technique 5' *RACE* est une méthode relativement simple et sensible pour déterminer l'extrémité 5' non codante d'un ARNm et donc de localiser son SIT. Cette dernière consiste en l'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de l'ARNm pleine longueur du gène en question. Seul l'ARNm pleine

longueur ayant subi la réaction de décoiffage à la TAP (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*) a pu être soumis à la ligation d'un adaptateur pour ensuite être amplifié par PCR (voir Figure 4.1). L'adaptateur peut se lier qu'à l'extrémité 5' de l'ARNm pleine longueur dont la structure de coiffage a été enlevée ; il est important de noter que seuls les ARNm intacts (non dégradés) possède cette structure de coiffage (CAP). L'ARNm ayant lié l'adaptateur est amplifié par PCR, cette étape permet l'amplification de l'ARNm complet du gène KCNE1 en utilisant des amorces spécifiques à l'adaptateur ainsi qu'au gène en question. L'amplification est effectuée en deux rondes dans le but d'augmenter la spécificité et le rendement. Cette technique est donc valide même pour les gènes exprimés à un niveau très bas. Cette méthode semble être la plus utilisée pour la localisation du SIT et de la région 5' d'un gène. Par la comparaison des résultats du 5'*RACE* obtenus avec les séquences d'ADN génomique humain, il est possible de localiser la région promotrice située en amont du gène. Cette technique permet aussi de déterminer, en partie, la structure de la région 5' d'un gène ; c'est-à-dire qu'elle permet la caractérisation initiale des différentes isoformes en 5' du gène en question, s'il y a lieu.

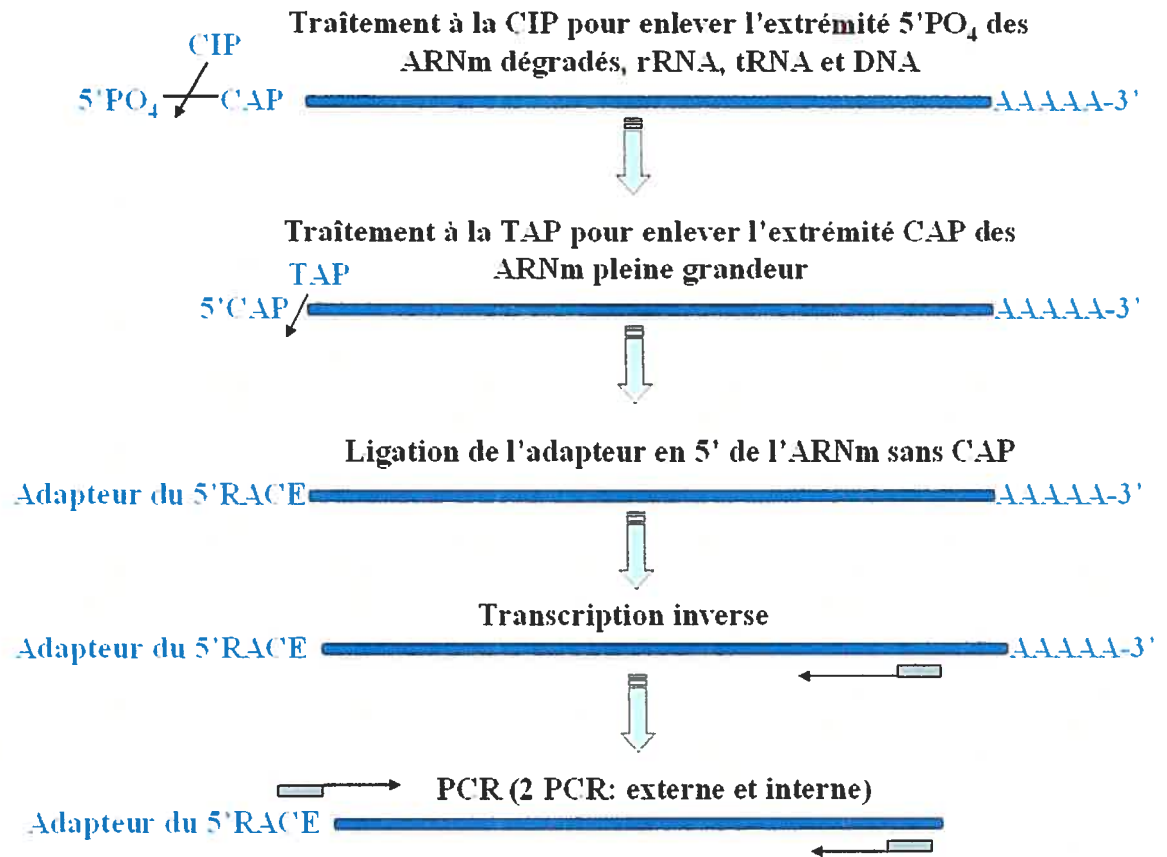


Figure 4.1 Schéma illustrant la technique du 5' RACE. Le premier traitement à la CIP est nécessaire afin d'enlever l'extrémité 5'PO₄ des ARN autres que l'ARNm pleine grandeur. La structure de coiffage (CAP) des ARNm complets n'est pas affectée par la CIP. Les ARNm complets peuvent ensuite être soumis à la TAP, la ligation à l'adaptateur et l'amplification par PCR en deux étapes.

1.2 Les limites de la technique du 5' RACE

Il est commun de s'apercevoir que différents groupes de chercheurs qui clonent le même gène publient différents SIT qu'ils auraient obtenus en utilisant la même technique. La raison la plus évidente pourrait être que ce gène possède de multiples sites d'initiation de la transcription, ce qui arrive très souvent chez les gènes codant pour les canaux ioniques. Une autre raison s'explique par le simple fait que l'extrémité réelle du transcrit n'a pas été amplifiée. Même si des techniques supplémentaires sont utilisées afin de vérifier la localisation du SIT, comme l'extension d'amorce ou encore la *RNase protection*, chez les types de gènes dont le promoteur est dépourvu de boîte TATA, ces différentes méthodes suggèrent quand même des résultats différents. De plus, un important désavantage de la technique 5' RACE est le fait que la réaction du PCR peut amplifier de façon préférentielle des produits qui ne représentent pas l'extrémité 5' authentique du transcrit. En effet, il est connu que les produits plus courts sont préférentiellement amplifiés par PCR, faisant croire qu'ils représentent le SIT majeur même si ces derniers ne sont que des SIT mineurs. Ceci est souvent un inconvénient dans le cas où le gène possède de multiples SIT. Le fait que différents groupes de chercheurs viennent à obtenir une variété de SIT ne devrait pas poser de problème puisque les résultats restent similaires. De plus, les résultats exprimés par nos constructions de plasmides constitués des séquences promotrices et du gène rapporteur de la luciférase expriment des données d'activité promotrice solides, ce qui laisse croire que notre identification du SIT est juste.

1.3 Les résultats obtenus du 5' RACE

En premier lieu, de multiples SIT ont été identifiés dans une courte région du gène KCNE1 par la technique du 5' RACE. Nos expériences ont permis l'identification d'un SIT localisé 38 pb en amont du SIT rapporté par Splawski *et al.*, ce SIT a été déterminé (+1) dans la séquence nucléotidique du gène KCNE1. Ce site plus en amont est donc associé au SIT principal. La séquence du gène et de la région promotrice de KCNE1 a donc été énumérée d'après ce dernier SIT dont la localisation est plus en amont par rapport aux autres SIT identifiés dans nos résultats (de même que ceux rapportés) du 5' RACE. À proximité de cette région, la séquence promotrice basale de KCNE1 est dépourvue de boîte TATA et de boîte CAAT, cependant, cette séquence est riche en nucléotides GC qui peuvent constituer des sites de liaison au facteur de transcription Sp1. Ces dernières caractéristiques sont souvent en corrélation avec la présence de multiples SIT. De plus, ces caractéristiques sont typiques d'un gène de type constitutif (*housekeeping gene*) qui est normalement exprimé ubiquitairement, cependant, comme c'est le cas de KCNE1, un nombre croissant de gènes dont l'expression est spécifique à un ou plusieurs tissus semblent posséder ce type de promoteur. MinK est exprimé dans différents tissus humains mais il reste que son expression n'est pas ubiquitaire. Il en est de même pour les canaux potassiques K_v1.3, K_v1.4 (clonés chez la souris) et KCNQ2 (cloné chez l'humain), c'est-à-dire que leurs promoteurs ne contiennent pas de boîte TATA, sont riches en nucléotides GC mais l'expression de ces canaux potassiques est limitée à certains tissus [124, 221, 222]. Cette spécificité est attribuée à la présence d'éléments de régulation responsables d'induire une expression spécifique du gène à un certain tissu. Des études plus approfondies des éléments de régulation constituant le promoteur pourraient permettre l'identification des sites impliqués dans l'induction de la spécificité de l'expression du gène. Par exemple, Gan *et al.* se sont attardés à l'identification de ces éléments de régulation au niveau du promoteur du gène K_v3.1 [223]. L'expression du canal potassique K_v3.1 est restreinte dans

le cerveau. Les résultats de leur étude suggèrent que cette restriction est contrôlée par un élément de régulation situé dans la région 5' non codante du gène. Plus précisément, ils ont démontré que cette expression restrictive de K_v3.1 semble utiliser un mécanisme qui implique un élément silencieux spécifique aux neurones dans la région 5' non codante et un faible élément stimulateur spécifique aux neurones situé dans la région du promoteur proximal de K_v3.1.

1.4 Comparaison des résultats du 5' *RACE* avec les résultats publiés

En utilisant cette même technique de 5' *RACE*, un groupe de chercheurs a récemment rapporté des résultats similaires aux nôtres. En effet, Lundquist *et al.* (2005) ont identifié deux différentes isoformes de KCNE1 au niveau du cœur humain. Ils ont rapporté une isoforme 1a (Genbank : AY789479) homologue à notre isoforme 2, cette isoforme a aussi été rapporté sous BCO36452. Leur 2^e isoforme, l'isoforme 1b (Genbank : AY789480) correspond à notre isoforme 3. La seule différence entre ce dernier isoforme est le fait que la séquence de notre isoforme 3 est un peu plus longue que leur isoforme 1b. Lundquist *et al.* n'ont pas identifié le transcrite de KCNE1 reporté par Splawski *et al.* en 1998, cependant, nous l'avons cloné et désigné isoforme 1 [167, 220].

Les groupes de Lunquist *et al.* et Splawski *et al.* n'ont pas rapporté l'existence de la quatrième isoforme que nous avons identifiée par la technique du 5' *RACE*. La présence de cette dernière a été confirmée dans le tissu cardiaque de l'humain par RT-PCR et séquençage. Afin d'identifier l'isoforme le plus exprimé au niveau du cœur humain, une quantification absolue des transcrits a été effectué. Tout d'abord, la constitution des isoformes 1 et 2 ne diffère que par la longueur de l'exon 2, ce qui indique que ces deux isoformes sont contrôlées par le même promoteur. En se basant sur leurs séquences nucléotidiques communes, une seule paire d'amorces a été construite et utilisée pour leur

quantification par PCR en temps réel. Deux autres paires d'amorces ont été construites selon les séquences des isoformes 3 et 4. Les données obtenues par la quantification indiquent que l'expression des isoformes 1 et 2 est prédominante dans le tissu cardiaque humain (70-80% des transcrits humain de KCNE1). Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Lundquist *et al.*, bien que ces derniers ont trouvé seulement une expression ~2 fois plus grande de l'isoforme 1a par rapport à l'isoforme 1b. D'après nos résultats de quantification, l'expression de l'isoforme correspondant à leur isoforme 1a (isoforme 1 et 2) est ~6 fois plus grande que celle de l'isoforme correspondant à leur isoforme 1b (correspondant à notre isoforme 3).

2. Caractérisation du promoteur proximal de KCNE1

2.1 Analyse fonctionnelle initiale du promoteur de KCNE1

Pour être en mesure d'identifier des éléments de contrôle dans la séquence promotrice proximale du gène, il est nécessaire de développer une méthode d'analyse fonctionnelle du promoteur. Dans notre cas, une analyse de délétion de la séquence promotrice de KCNE1 de l'isoforme prédominant dans le tissu cardiaque humain a été effectuée afin de mesurer l'activité des différentes régions promotrices. Les différentes séquences promotrices délétées ont été introduites dans un plasmide en amont du gène rapporteur de la luciférase conduisant ainsi l'expression de la luciférase. Une plus grande expression de la luciférase traduit donc une plus grande activité de la séquence promotrice clonée dans le plasmide rapporteur et implique nécessairement la présence d'éléments de régulation positifs dans cette région précise du promoteur. L'activité promotrice de chaque séquence délétée et clonée a été mesurée dans les myocytes de rats néonataux de même que dans les cellules CHO (cellules non cardiaques) afin de pouvoir détecter les éléments de régulation spécifiques au cœur. En effet, en utilisant deux types de cellules de

nature différente, il est possible de détecter des effets reliés aux séquences régulatrices spécifiques à un tissu.

Les résultats de l'analyse fonctionnelle du promoteur du gène KCNE1 humain, conduisant à l'expression des isoformes 1 et 2, indiquent que la séquence localisée entre les nucléotides -311 et +16 par rapport au SIT (+1) est la région promotrice minimale, c'est-à-dire que cette séquence contiendrait des sites nucléotidiques importants responsables de l'activité promotrice proximale. En effet, cette séquence de 327 nucléotides exprime la 2^e plus grande activité promotrice dans les myocytes (~29 fois l'activité basale) après la séquence promotrice complète de KCNE1 (-1609/+16). De plus, cette grande activité induite par la séquence (-311/+16) semble spécifique à la région promotrice minimale puisque l'augmentation de l'activité promotrice n'est pas observée dans les cellules non cardiaque (cellules CHO). L'activité promotrice de l'isoforme 3 du gène KCNE1 est jusqu'à 6 fois plus basse que celle de l'isoforme 1&2. Ceci pourrait expliquer la faible expression de cette isoforme au niveau du tissu cardiaque humain.

La figure 3 de l'article montrant les résultats des expériences conduites avec des plasmides construits (promoteur-rapporteur) impliquant la série de séquences promotrices délétées, ont permis l'identification de la région critique du promoteur. Cette figure nous suggère aussi la localisation approximative d'éléments de régulation importants. En observant les variations de l'activité promotrice (augmentation ou diminution de l'activité), il est possible de déduire si l'élément de régulation est stimulateur ou répresseur. L'exemple le plus remarquable est la différence d'activité observée entre la séquence promotrice complète (-1609/+16) et la séquence délétée (-1429/+16) suivant immédiatement la séquence complète ($31,64 \pm 6$ et $10,14 \pm 2$). Cette diminution drastique serait vraisemblablement causée par la présence d'un élément régulateur positif localisé entre -1429 et -1609 puisqu'en délétant cet élément stimulateur (séquence délétée (-1429/+16)), il y a diminution de plus de 67% de l'activité promotrice de la séquence complète. Dans le même ordre d'idées, un faible

élément répresseur semble être localisé entre -705 et -945. La délétion de cet élément causerait une augmentation de l'activité promotrice de plus de 30%.

2.2 Comparaison de l'analyse fonctionnelle avec les résultats publiés

Très récemment, Lundquist *et al.* (2006) ont analysé les promoteurs des transcrits KCNE1a et KCNE1b et ils ont rapporté la distribution tissulaire de ces deux isoformes [229]. Leurs études d'activité promotrice dans les myocytes de même que leur localisation de la région minimale du promoteur ont révélés des résultats similaires aux nôtres. Cependant, ces chercheurs ont identifié un SIT majeur différent de celui reporté dans nos études ainsi que celui publié par Splawski et ses collaborateurs. Un élément *Inr* (*initiator*) a été identifié au niveau de leur séquence promotrice basale. La présence de cet élément peut s'expliquer par le fait que pour les gènes dont l'expression est limitée à certains tissus et qui n'ont pas de motif TATA, le positionnement de l'ARN polymérase II au SIT peut se faire via la séquence *Inr* et celle de l'élément qui suit la région promotrice proximale (*downstream core promoter element*, DPE) [198]. Ainsi, Lundquist et ses collaborateurs ont postulé que cet élément pourrait précisément diriger l'initiation de la transcription. Cependant, nos constructions de plasmides (promoteur-rapporteur) induisent des activités promotrices solides même si cette séquence de régulation (*Inr*) n'est pas contenue dans nos constructions. De plus, les activités dans les myocytes et les cellules CHO que nous avons rapporté, se traduisent par nos résultats d'expression spécifique au cœur (ratio de l'activité du promoteur dans NRM/CHO), concordent parfaitement avec le niveau d'expression d'ARNm qu'ils ont rapporté dans le cœur et l'ovaire.

2.3 Analyse des sites de régulation du promoteur de KCNE1

La séquence promotrice qui constitue la région minimale du promoteur a été analysée par le logiciel *MatInspector*. Ce logiciel informatique permet de prédire les séquences d'ADN correspondantes aux sites de liaison des facteurs de transcription contenues dans une séquence promotrice [224]. Selon les prédictions de *MatInspector*, la région minimale du promoteur contiendrait trois sites potentiels correspondants au motif GATA. La mutagenèse dirigée de ces trois motifs GATA (-294 : GATC→TGCA, -264 : GATC→GTAG, -54 : CATC→AGCT) a été effectuée et leurs effets sur l'activité transcriptionnelle du gène KCNE1 ont été mesurés. Une diminution de l'activité promotrice de 36% a été observée lors de la mutation du premier et troisième site GATA (-294 et -54), une diminution plus importante de 55% a été mesurée suite à la mutation du deuxième site GATA (en -264). Ces sites GATA semblent jouer un rôle important dans l'activité promotrice de base et pourraient être responsables de l'activité promotrice élevée dans les cardiomyocytes. Quoi qu'il en soit, la mutation simultanée des trois éléments GATA n'a pas démontré d'une activité synergique comme nous nous attendions. Nos résultats indiquent plutôt que le second site GATA (-264) est l'élément clé puisque la perte de l'activité transcriptionnelle induite par la mutation des trois sites GATA correspondait à la même diminution de l'activité causée par la mutation du site GATA en -264.

Des expériences de ARNsi (*siRNA : small interfering RNA*) ont été effectuées afin de confirmer les résultats de mutagenèse dirigée des motifs GATA. L'ARNsi est utilisé dans ce cas afin d'éteindre l'expression du gène GATA-4 et de le rendre « silencieux ». La mesure du taux de transcription en présence de l'ARNsi GATA-4 permet donc d'observer le niveau de l'activité promotrice de KCNE1 en l'absence (en grande partie) du gène GATA-4. Selon la figure 5 de l'article, la cotransfection du plasmide rapporteur incluant la séquence promotrice (-311/+16) avec l'ARNsi de GATA-4 a induit une diminution de

43% de l'activité promotrice. Ces résultats confirment que le facteur de transcription GATA joue un rôle important dans l'activité du promoteur de KCNE1 puisqu'en inhibant l'expression de ce dernier, il y a une diminution significative de l'activité promotrice. Nous avons aussi cotransfecté l'ARNsi de GATA-4 avec le plasmide incluant la séquence promotrice dans laquelle les trois motifs GATA ont été délétés afin d'observer l'effet de l'ARNsi de GATA-4 sur le promoteur sans site GATA. Comme prévu, aucun changement significatif de l'activité promotrice de ce plasmide, avec ou sans ARNsi, a été observé.

Le motif GATA représente le site de liaison pour les protéines de la famille GATA. Dans le cœur, GATA-4 (et/ou GATA-6) se lie sur ce motif. GATA-4 peut être activé par des contraintes mécaniques liées à l'étirement ou encore par l'hypertrophie cardiaque. Les contraintes mécaniques liées à l'étirement induisent la relâche de norépinéphrine, d'angiotensine II et d'endothéline 1 par les cardiomyocytes et ce mécanisme est associé à une augmentation du niveau de liaison de GATA-4 à la séquence d'ADN correspondante dans la région promotrice.

Dans le même ordre d'idées, une surexpression de la protéine GATA-4 favorise le développement de l'hypertrophie cardiaque [225]. En effet, il a été rapporté que GATA-4 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'hypertrophie comme la chaîne lourde de la myosine- α , l'ANF (*atrial natriuretic factor*), le BNP (*brain natriuretic peptide*), l'échangeur sodium/calcium (NCX), la troponine 1 cardiaque, le récepteur de l'angiotensine AT1, le récepteur muscarinique M2 et le récepteur de l'adénosine A1. Il a aussi été rapporté que le niveau d'expression de KvLQT1 et KCNE1 est significativement élevé dans les tissus cardiomyopathiques de cœurs défailants comparativement aux tissus normaux [216, 217]. En se basant sur ces deux derniers faits, nous avons supposé que ceci pourrait être causé par une augmentation de l'activité de GATA-4 au cours d'une hypertrophie ou défaillance cardiaque, ce qui pourrait activer la transcription du gène KCNE1 chez l'humain. En effet, nos résultats appuient cette idée puisqu'à l'ajout de l'angiotensine II, on observe une augmentation significative de l'activité promotrice de

KCNE1, ce qui confirme l'importance de la régulation de la transcription de KCNE1 dans les maladies cardiaques. Cette augmentation de l'activité promotrice de KCNE1 par l'angiotensine II est annulée par la mutation du second site GATA. La stimulation de l'activité transcriptionnelle de KCNE1 se fait donc via le site de liaison du facteur de transcription GATA en -264 par rapport au SIT. Ces résultats viennent appuyer le fait que ce motif GATA est important pour la bonne régulation de la transcription du gène KCNE1 dans les cellules cardiaques.

Autres que ces sites GATA, la région promotrice en amont de la région proximale du promoteur de KCNE1 contient plusieurs sites de liaison aux facteurs de transcription qui pourraient être en mesure d'augmenter la complexité de la régulation transcriptionnelle. Ces sites pourraient impliquer des rôles fonctionnels importants à d'autres facteurs de transcription reliés à l'expression du gène KCNE1. Ces sites incluent notamment ceux du facteur Sp-1 (boîte GC), MEF2 (*Myocyte-specific enhancer factor 2*), Nkx2.5 et MyoD. Il est bien connu que GATA-4 interagit directement avec le facteur de transcription cardiaque Nkx2.5 pour réguler plusieurs types promoteurs de gènes cardiaques, comme par exemple l'ANP (peptide atrial natriurétique) [226]. GATA-4 interagit aussi avec MEF2 afin de réguler l'expression de gènes cardiaques [227].

2.4 Comparaison du promoteur de KCNE1 entre l'humain et la souris

Il a été noté que l'expression variable de KCNE1 chez différentes espèces pourrait être contrôlée au niveau de la transcription. Le gène KCNE1 semble être important pour l'expression d' I_{Ks} de façon spécifique chez différentes espèces, avec un faible niveau d'expression de la protéine KCNE1 chez la souris et le lapin qui est associée à une faible expression du courant potassique I_{Ks} . Chez la souris, il a été rapporté que l'expression de KCNE1 diminue au cours du développement pour atteindre un niveau très bas chez la

souris adulte. Nous avons comparé la séquence promotrice du gène KCNE1 de la souris avec la séquence humaine de 1.6 kb utilisée dans nos travaux. Ces alignements montraient une similarité de 45% entre les deux séquences promotrices, bien que l'alignement entre le gène humain KCNE1 démontrait des identités de 61% et 57% (respectivement pour les exons 1a et 1) avec la séquence du gène rapportée chez la souris. Le niveau d'identité de la région promotrice restait stable, même pour la région à proximité du SIT. De façon intéressante, les trois motifs GATA dont la présence semble critique pour l'activité promotrice chez l'humain de même que pour la spécificité cardiaque à travers ces éléments de régulation ne sont pas conservés dans la région proximale du promoteur de KCNE1 chez la souris. En effet, comme montré dans la figure 8 de l'article, la région minimale du promoteur de KCNE1 chez la souris exprime une activité promotrice plus faible et un niveau de spécificité cardiaque beaucoup plus bas comparativement aux résultats obtenus chez l'humain pour la région promotrice correspondante (-311/+16). Ces résultats confirment le fait que la régulation de la transcription induite par le promoteur pourrait être responsable du faible niveau d'expression de KCNE1 chez la souris adulte.

De plus, contrairement au gène chez l'humain, le facteur de transcription cardiaque GATA-4/GATA-6 ne semble pas jouer un rôle direct dans la régulation de la transcription de KCNE1 chez la souris. Quoi qu'il en soit, plusieurs exemples démontrent l'importance de l'élément GATA pour une régulation précise de la transcription au niveau du tissu cardiaque, tel est le cas pour le gène du canal potassique $K_v4.2$ chez le rat [130]. Jia *et al.* ont rapporté que l'activation du promoteur de $K_v4.2$ induite par le facteur GATA pourrait contribuer significativement à l'augmentation de l'expression des canaux transitoires sortants au cours du développement [130]. En effet, la forme et la durée du potentiel d'action cardiaque changent dramatiquement durant le développement. Par exemple, les myocytes ventriculaires de rat expriment une diminution prononcée du potentiel d'action tôt durant le développement [228]. Ce changement dans la durée du potentiel d'action est un phénomène dont l'apparition est corrélée avec celle du courant potassique transitoire

sortant. Puisque le niveau de GATA-4/GATA-6 augmente dramatiquement tôt durant le développement, ces facteurs pourraient expliquer, en partie, l'induction de l'expression des canaux potassiques $K_v4.2$.

3. Directions futures

En résumé, nous avons identifié 4 isoformes du gène humain KCNE1 dans le tissu cardiaque et le promoteur conduisant l'isoforme la plus exprimée a été cloné. La région minimale du promoteur a été caractérisée, ce dernier contient trois éléments GATA importants pour l'activité promotrice proximale de même que pour l'activité préférentielle au niveau des cellules cardiaques.

Une caractérisation plus poussée de ces trois éléments GATA pourrait probablement démontrer leur contribution à la régulation de la transcription de KCNE1 dans les maladies cardiaques de même qu'aux différences d'expression de KCNE1 chez différentes espèces. Nos résultats pourraient avoir d'importantes implications dans la compréhension de la fonction de minK/I_{Ks} dans des conditions cardiaques normales ou pathologiques et dans les différences d'expression chez les espèces.

Selon les résultats des activités promotrices de KCNE1 chez l'humain, il existerait plusieurs éléments de régulation localisés dans la région promotrice clonée; certains éléments semblent plus éloignés du SIT que d'autres. Ainsi, cette caractérisation initiale du promoteur proximal pourrait être suivie par une étude du promoteur distal de KCNE1, c'est-à-dire que l'identification de sites de liaison de facteurs de transcription plus éloignés du SIT compléterait l'étude promotrice minimale de KCNE1. Aussi, la mutation du site GATA en -264 a causé une diminution de plus de 50% de l'activité promotrice proximale

du gène KCNE1. La portion de l'activité promotrice restante suite à cette mutation pourrait être analysée au cours d'études futures. Certains éléments sont à considérer dans ce cas, comme par exemple, les boîtes GC (site de liaison du facteur de transcription Sp1). En effet, les boîtes GC à proximité du SIT sont souvent responsables de l'activité promotrice basale d'un gène qui est dépourvu de boîte TATA.

Différentes isoformes du gène KCNE1 humain ont été identifiées. Il serait fructueux d'étudier et de comprendre la signification de l'expression de différentes isoformes de KCNE1 dans le cœur, et ce, dans différentes conditions (pathologiques et normales).

L'expression du gène KCNE1 est modifiée par les maladies cardiaques, dont les arythmies. Certains chercheurs ont reporté une baisse de l'expression de KCNE1 et d'autres, à l'opposé, ont démontré une hausse de son expression dans des conditions pathologiques. Quoi qu'il en soit, il est noté que ce changement d'expression contribue aux arythmies cardiaques. Par quelle(s) voie(s) ou pour quelle(s) raison(s) ce changement d'expression de KCNE1 est-il déclenché lors d'une arythmie cardiaque? La réponse à cette question reste très vague et ce sujet pourrait faire l'objet d'une importante étude.

Le laboratoire de recherche où ce projet de maîtrise a été effectué a précédemment rapporté que la différence du niveau d'expression entre les protéines et l'ARNm codant pour KCNE1 pourrait expliquer la différence de l'expression de I_{Ks} à travers l'humain, le lapin et le cochon d'inde [218]. Le clonage de la région 5' non codante du gène KCNE1 chez le lapin et le cochon d'inde par la technique du 5' *RACE* a montré qu'il existe une seule isoforme exprimée chez chaque espèce, dont la séquence est identique de ~71% et ~60% respectivement à celle de l'humain (exon1) [218]. De ce fait, il serait intéressant de savoir si cette différence à travers les espèces pourrait être expliquée par la différence au niveau de la constitution de leurs régions promotrices.

Une autre direction future de ce projet pourrait être l'étude approfondie du promoteur de KCNE1 chez la souris. D'une part, il faudrait caractériser de manière plus précise la région promotrice proximale et ses composantes du gène KCNE1 chez la souris. Ensuite, il serait intéressant de déterminer les éléments du promoteur responsables de la basse expression de KCNE1 chez la souris adulte comparée à la souris néonatale au niveau du tissu cardiaque. Même si le promoteur proximal ne semble pas être composé de motif GATA chez la souris comme pour le cas de l'humain, il reste qu'il est possible que les facteurs de transcriptions cardiaques GATA jouent un rôle indirect en passant par d'autres voies que celle de la liaison au site d'ADN de la séquence promotrice.

Bibliographie

- [1] Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85:1205-53.
- [2] Shih HT. Anatomy of the action potential in the heart. *Tex Heart Inst J* 1994;21:30-41.
- [3] Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998;280:69-77.
- [4] Parent L, Sauvé R, Bernèche S, Roux B. A bas les barrières d'énergie dans les canaux potassiques! *Medecine Sciences* 2002;18:605-609.
- [5] Breitwieser GE. Mechanisms of K⁺ channel regulation. *J Membr Biol* 1996;152:1-11.
- [6] Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, MA : Sinauer Ass, Inc, 2001;01375.
- [7] Anyukhovskiy EP, Sosunov EA, Rosen MR. Regional differences in electrophysiological properties of epicardium, midmyocardium, and endocardium. In vitro and in vivo correlations. *Circulation* 1996;94:1981-8.
- [8] Pourrier M, Schram G, Nattel S. Properties, expression and potential roles of cardiac K⁺ channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol* 2003;194:141-52.
- [9] Nerbonne J, Kass R. Physiology and molecular biology of ion channels contributing to ventricular repolarization. *Contemporary Cardiology: Cardiac Repolarization: Bridging Basic and Clinical Science*, edited by I Gussak and C Antzelevitch Totowa, NJ: Humana 2003:25-62.
- [10] Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;26:13-25.
- [11] Kodama I, Nikmaram MR, Boyett MR, Suzuki R, Honjo H, Owen JM. Regional differences in the role of the Ca²⁺ and Na⁺ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *Am J Physiol* 1997;272:H2793-806.

- [12] Munk AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebriel A, Shrier A. Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol* 1996;493 (Pt 3):801-18.
- [13] Yuill KH, Hancox JC. Characteristics of single cells isolated from the atrioventricular node of the adult guinea-pig heart. *Pflugers Arch* 2002;445:311-20.
- [14] Zhang H, Holden AV, Boyett MR. Sustained inward current and pacemaker activity of mammalian sinoatrial node. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2002;13:809-12.
- [15] Fozzard HA. Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc Res* 2002;55:1-8.
- [16] Fozzard HA, Hanck DA. Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol Rev* 1996;76:887-926.
- [17] Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952;117:500-44.
- [18] Isomoto S, Fukatani M, Konoe A, Tanigawa M, Centurion OA, Seto S, et al. The influence of advancing age on the electrophysiological changes of the atrial muscle induced by programmed atrial stimulation. *Jpn Circ J* 1992;56:776-82.
- [19] Ogata N, Ohishi Y. Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* 2002;88:365-77.
- [20] Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL. Amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10905-9.
- [21] Vassilev P, Scheuer T, Catterall WA. Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:8147-51.
- [22] West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, Catterall WA. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10910-4.

- [23] Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 1988;241:1658-61.
- [24] Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003;4:207.
- [25] Satin J, Kyle JW, Chen M, Rogart RB, Fozzard HA. The cloned cardiac Na channel alpha-subunit expressed in *Xenopus* oocytes show gating and blocking properties of native channels. *J Membr Biol* 1992;130:11-22.
- [26] Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 1998;508 (Pt 3):647-57.
- [27] Sheng ZH, Zhang H, Barchi RL, Kallen RG. Molecular cloning and functional analysis of the promoter of rat skeletal muscle voltage-sensitive sodium channel subtype 2 (rSkM2): evidence for muscle-specific nuclear protein binding to the core promoter. *DNA Cell Biol* 1994;13:9-23.
- [28] Yang P, Kupersmidt S, Roden DM. Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovasc Res* 2004;61:56-65.
- [29] Shang LL, Dudley SC, Jr. Tandem promoters and developmentally regulated 5'- and 3'-mRNA untranslated regions of the mouse *Scn5a* cardiac sodium channel. *J Biol Chem* 2005;280:933-40.
- [30] Ambrosius WT, Bloem LJ, Zhou L, Rebhun JF, Snyder PM, Wagner MA, et al. Genetic variants in the epithelial sodium channel in relation to aldosterone and potassium excretion and risk for hypertension. *Hypertension* 1999;34:631-7.
- [31] Yamakage M, Namiki A. Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth* 2002;49:151-64.
- [32] Dolphin AC. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2003;55:607-27.
- [33] Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 1995;64:493-531.

- [34] Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 1985;86:1-30.
- [35] Benitah JP, Gomez AM, Fauconnier J, Kerfant BG, Perrier E, Vassort G, et al. Voltage-gated Ca²⁺ currents in the human pathophysiologic heart: a review. *Basic Res Cardiol* 2002;97 Suppl 1:I11-8.
- [36] Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 2000;47:658-87.
- [37] McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1994;74:365-507.
- [38] Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;83:117-61.
- [39] Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:411-25.
- [40] Perez-Reyes E, Schneider T. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int* 1995;48:1111-24.
- [41] Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* 2003;55:579-81.
- [42] Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:399-418.
- [43] Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000;25:533-5.
- [44] Davidoff AJ, Maki TM, Ellingsen O, Marsh JD. Expression of calcium channels in adult cardiac myocytes is regulated by calcium. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1791-803.

- [45] Ogawa S, Barnett JV, Sen L, Galper JB, Smith TW, Marsh JD. Direct contact between sympathetic neurons and rat cardiac myocytes in vitro increases expression of functional calcium channels. *J Clin Invest* 1992;89:1085-93.
- [46] Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, et al. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989;340:230-3.
- [47] Soldatov NM, Oz M, O'Brien KA, Abernethy DR, Morad M. Molecular determinants of L-type Ca^{2+} channel inactivation. Segment exchange analysis of the carboxyl-terminal cytoplasmic motif encoded by exons 40-42 of the human $\alpha_1\text{C}$ subunit gene. *J Biol Chem* 1998;273:957-63.
- [48] Liu L, Fan QI, El-Zaru MR, Vanderpool K, Hines RN, Marsh JD. Regulation of DHP receptor expression by elements in the 5'-flanking sequence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1153-62.
- [49] Soldatov NM. Genomic structure of human L-type Ca^{2+} channel. *Genomics* 1994;22:77-87.
- [50] Yamada Y, Masuda K, Li Q, Ihara Y, Kubota A, Miura T, et al. The structures of the human calcium channel alpha 1 subunit (CACNL1A2) and beta subunit (CACNLB3) genes. *Genomics* 1995;27:312-9.
- [51] Koch WJ, Ellinor PT, Schwartz A. cDNA cloning of a dihydropyridine-sensitive calcium channel from rat aorta. Evidence for the existence of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 1990;265:17786-91.
- [52] Biel M, Ruth P, Bosse E, Hullin R, Stuhmer W, Flockerzi V, et al. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* 1990;269:409-12.
- [53] Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP, Gilbert MM. Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* 1991;7:45-57.

- [54] Sun W, McPherson JD, Hoang DQ, Wasmuth JJ, Evans GA, Montal M. Mapping of a human brain voltage-gated calcium channel to human chromosome 12p13-pter. *Genomics* 1992;14:1092-4.
- [55] Abernethy DR, Soldatov NM. Structure-functional diversity of human L-type Ca²⁺ channel: perspectives for new pharmacological targets. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:724-8.
- [56] Schultz D, Mikala G, Yatani A, Engle DB, Iles DE, Segers B, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6228-32.
- [57] Blumenstein Y, Kanevsky N, Sahar G, Barzilai R, Ivanina T, Dascal N. A novel long N-terminal isoform of human L-type Ca²⁺ channel is up-regulated by protein kinase C. *J Biol Chem* 2002;277:3419-23.
- [58] Chen CY, Schwartz RJ. Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J Biol Chem* 1995;270:15628-33.
- [59] Kamp TJ, Mitas M, Fields KL, Asoh S, Chin H, Marban E, et al. Transcriptional regulation of the neuronal L-type calcium channel alpha 1D subunit gene. *Cell Mol Neurobiol* 1995;15:307-26.
- [60] Pang L, Koren G, Wang Z, Nattel S. Tissue-specific expression of two human Ca(v)1.2 isoforms under the control of distinct 5' flanking regulatory elements. *FEBS Lett* 2003;546:349-54.
- [61] Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000;52:557-94.
- [62] Warth R, Barhanin J. The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R639-48.

- [63] Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;42:377-90.
- [64] Roden DM, Balsler JR, George AL, Jr., Anderson ME. Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* 2002;64:431-75.
- [65] Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM. Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ Res* 1998;83:560-7.
- [66] An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000;403:553-6.
- [67] Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;525 Pt 2:285-98.
- [68] Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:851-72.
- [69] Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, et al. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res* 1991;69:1427-49.
- [70] Liu DW, Gintant GA, Antzelevitch C. Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res* 1993;72:671-87.
- [71] Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, Kim KH, Zhu Y, Zhu W, Lebel M, Cheng CW, Park CY, Pierce SA, Guerchicoff A, Pollevick GD, Chan TY, Kabir MG, Cheng SH, Husain M, Antzelevitch C, Srivastava D, Gross GJ, Hui CC, Backx PH, Bruneau BG. The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* 2005; 123(2):347-58.
- [72] Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, et al. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 1996;78:262-73.

- [73] Nabauer M, Kaab S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:324-34.
- [74] Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;62:9-33.
- [75] Furukawa T, Myerburg RJ, Furukawa N, Bassett AL, Kimura S. Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. *Circ Res* 1990;67:1287-91.
- [76] Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988;62:116-26.
- [77] Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1999;113:661-78.
- [78] Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991;97:973-1011.
- [79] Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;491 (Pt 1):31-50.
- [80] Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am J Physiol* 1996;270:H2157-68.
- [81] Boyle WA, Nerbonne JM. A novel type of depolarization-activated K⁺ current in isolated adult rat atrial myocytes. *Am J Physiol* 1991;260:H1236-47.
- [82] Boyle WA, Nerbonne JM. Two functionally distinct 4-aminopyridine-sensitive outward K⁺ currents in rat atrial myocytes. *J Gen Physiol* 1992;100:1041-67.
- [83] Bou-Abboud E, Li H, Nerbonne JM. Molecular diversity of the repolarizing voltage-gated K⁺ currents in mouse atrial cells. *J Physiol* 2000;529 Pt 2:345-58.

- [84] Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999;9:217-26.
- [85] Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;73:1061-76.
- [86] Yue L, Feng J, Li GR, Nattel S. Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *J Physiol* 1996;496 (Pt 3):647-62.
- [87] Noble D, Tsien RW. Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1969;200:205-31.
- [88] Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;96:195-215.
- [89] Balsler JR, Bennett PB, Roden DM. Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Gating kinetics of the delayed rectifier. *J Gen Physiol* 1990;96:835-63.
- [90] Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, et al. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I(Kr) channels. *J Biol Chem* 2000;275:5997-6006.
- [91] Clark RB, Mangoni ME, Lueger A, Couette B, Nargeot J, Giles WR. A rapidly activating delayed rectifier K⁺ current regulates pacemaker activity in adult mouse sinoatrial node cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1757-66.
- [92] Ito H, Ono K. A rapidly activating delayed rectifier K⁺ channel in rabbit sinoatrial node cells. *Am J Physiol* 1995;269:H443-52.
- [93] Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996;78:689-96.

- [94] Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand* 1993;149:133-42.
- [95] Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;28:1540-6.
- [96] Liu DW, Antzelevitch C. Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res* 1995;76:351-65.
- [97] Varro A, Balati B, Iost N, Takacs J, Virag L, Lathrop DA, et al. The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J Physiol* 2000;523 Pt 1:67-81.
- [98] Volders PG, Sipido KR, Carmeliet E, Spatjens RL, Wellens HJ, Vos MA. Repolarizing K⁺ currents ITO1 and IKs are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation* 1999;99:206-10.
- [99] Salata JJ, Jurkiewicz NK, Jow B, Folander K, Guinasso PJ, Jr., Raynor B, et al. IK of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for IKs. *Am J Physiol* 1996;271:H2477-89.
- [100] Clancy CE, Rudy Y. Na⁽⁺⁾ channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation* 2002;105:1208-13.
- [101] Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:625-38.
- [102] Giles WR, Imaizumi Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988;405:123-45.
- [103] Cordeiro JM, Spitzer KW, Giles WR. Repolarizing K⁺ currents in rabbit heart Purkinje cells. *J Physiol* 1998;508 (Pt 3):811-23.
- [104] Koumi S, Backer CL, Arentzen CE. Characterization of inwardly rectifying K⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes

- isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1995;92:164-74.
- [105] Pinto JM, Boyden PA. Reduced inward rectifying and increased E-4031-sensitive K⁺ current density in arrhythmogenic subendocardial purkinje myocytes from the infarcted heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:299-311.
- [106] Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983;305:147-8.
- [107] Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;274:C25-37.
- [108] Grover GJ, Garlid KD. ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:677-95.
- [109] Shaw RM, Rudy Y. Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ Res* 1997;81:727-41.
- [110] Mark MD, Herlitz S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem* 2000;267:5830-6.
- [111] Hutter OF, Trautwein W. Vagal effects on the sinus venosus of the frog's heart. *J Physiol* 1955;129:48P.
- [112] Trautwein W, Dudel J. [Mechanism of membrane effect of acetylcholine on myocardial fibers.]. *Pflugers Arch* 1958;266:324-34.
- [113] Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature* 1983;303:250-3.
- [114] Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002;90:939-50.
- [115] Pongs O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev* 1992;72:S69-88.

- [116] Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, et al. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 2003;55:583-6.
- [117] Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* 1991;7:763-73.
- [118] Castellano A, Chiara MD, Mellstrom B, Molina A, Monje F, Naranjo JR, et al. Identification and functional characterization of a K⁺ channel alpha-subunit with regulatory properties specific to brain. *J Neurosci* 1997;17:4652-61.
- [119] Drewe JA, Verma S, Frech G, Joho RH. Distinct spatial and temporal expression patterns of K⁺ channel mRNAs from different subfamilies. *J Neurosci* 1992;12:538-48.
- [120] Hugnot JP, Salinas M, Lesage F, Guillemare E, de Weille J, Heurteaux C, et al. Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *Embo J* 1996;15:3322-31.
- [121] Salinas M, Duprat F, Heurteaux C, Hugnot JP, Lazdunski M. New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K⁺ channels. *J Biol Chem* 1997;272:24371-9.
- [122] Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002;419:35-42.
- [123] Wickenden A. K(+) channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther* 2002;94:157-82.
- [124] Wymore RS, Negulescu D, Kinoshita K, Kalman K, Aiyar J, Gutman GA, et al. Characterization of the transcription unit of mouse Kv1.4, a voltage-gated potassium channel gene. *J Biol Chem* 1996;271:15629-34.
- [125] Abbott GW, Goldstein SA. A superfamily of small potassium channel subunits: form and function of the MinK-related peptides (MiRPs). *Q Rev Biophys* 1998;31:357-98.
- [126] Abbott GW, Goldstein SA, Sesti F. Do all voltage-gated potassium channels use MiRPs? *Circ Res* 2001;88:981-3.

- [127] Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;97:175-87.
- [128] Wymore RS, Korenberg JR, Kinoshita KD, Aiyar J, Coyne C, Chen XN, et al. Genomic organization, nucleotide sequence, biophysical properties, and localization of the voltage-gated K⁺ channel gene KCNA4/Kv1.4 to mouse chromosome 2/human 11p14 and mapping of KCNC1/Kv3.1 to mouse 7/human 11p14.3-p15.2 and KCNA1/Kv1.1 to human 12p13. *Genomics* 1994;20:191-202.
- [129] Blake MC, Jambou RC, Swick AG, Kahn JW, Azizkhan JC. Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol* 1990;10:6632-41.
- [130] Jia Y, Takimoto K. GATA and FOG2 transcription factors differentially regulate the promoter for Kv4.2 K(+) channel gene in cardiac myocytes and PC12 cells. *Cardiovasc Res* 2003;60:278-87.
- [131] Dixon JE, McKinnon D. Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res* 1994;75:252-60.
- [132] Mori Y, Matsubara H, Folco E, Siegel A, Koren G. The transcription of a mammalian voltage-gated potassium channel is regulated by cAMP in a cell-specific manner. *J Biol Chem* 1993;268:26482-93.
- [133] Matsubara H, Liman ER, Hess P, Koren G. Pretranslational mechanisms determine the type of potassium channels expressed in the rat skeletal and cardiac muscles. *J Biol Chem* 1991;266:13324-8.
- [134] Elbein SC, Hoffman M, Ridinger D, Otterud B, Leppert M. Description of a second microsatellite marker and linkage analysis of the muscle glycogen synthase locus in familial NIDDM. *Diabetes* 1994;43:1061-5.
- [135] Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GC, Timms AE, Goy JV, et al. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nat Genet* 1998;19:297-300.

- [136] Kashuba VI, Kvasha SM, Protopopov AI, Gizatullin RZ, Rynditch AV, Wahlestedt C, et al. Initial isolation and analysis of the human Kv1.7 (KCNA7) gene, a member of the voltage-gated potassium channel gene family. *Gene* 2001;268:115-22.
- [137] Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999;868:233-85.
- [138] Hanlon MR, Wallace BA. Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry* 2002;41:2886-94.
- [139] Kaczmarek LK, Blumenthal EM. Properties and regulation of the minK potassium channel protein. *Physiol Rev* 1997;77:627-41.
- [140] Folander K, Smith JS, Antanavage J, Bennett C, Stein RB, Swanson R. Cloning and expression of the delayed-rectifier IsK channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2975-9.
- [141] Swanson R, Marshall J, Smith JS, Williams JB, Boyle MB, Folander K, et al. Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron* 1990;4:929-39.
- [142] Lai LP, Deng CL, Moss AJ, Kass RS, Liang CS. Polymorphism of the gene encoding a human minimal potassium ion channel (minK). *Gene* 1994;151:339-40.
- [143] Iwai M, Masu M, Tsuchida K, Mori T, Ohkubo H, Nakanishi S. Characterization of gene organization and generation of heterogeneous mRNA species of rat ISK protein. *J Biochem (Tokyo)* 1990;108:200-6.
- [144] Lesage F, Attali B, Lakey J, Honore E, Romey G, Faurobert E, et al. Are *Xenopus* oocytes unique in displaying functional IsK channel heterologous expression? *Receptors Channels* 1993;1:143-52.
- [145] Zhang ZJ, Jurkiewicz NK, Folander K, Lazarides E, Salata JJ, Swanson R. K⁺ currents expressed from the guinea pig cardiac IsK protein are enhanced by activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1766-70.

- [146] Blumenthal EM, Kaczmarek LK. The minK potassium channel exists in functional and nonfunctional forms when expressed in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 1994;14:3097-105.
- [147] Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 1996;384:78-80.
- [148] Sesti F, Goldstein SA. Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol* 1998;112:651-63.
- [149] Busch AE, Busch GL, Ford E, Suessbrich H, Lang HJ, Greger R, et al. The role of the IsK protein in the specific pharmacological properties of the IKs channel complex. *Br J Pharmacol* 1997;122:187-9.
- [150] Bianchi L, Shen Z, Dennis AT, Priori SG, Napolitano C, Ronchetti E, et al. Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 1999;8:1499-507.
- [151] Abbott GW, Goldstein SA. Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs). *Mol Interv* 2001;1:95-107.
- [152] Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nat Genet* 1997;17:338-40.
- [153] Napolitano C, Schwartz PJ, Brown AM, Ronchetti E, Bianchi L, Pinnavaia A, et al. Evidence for a cardiac ion channel mutation underlying drug-induced QT prolongation and life-threatening arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;11:691-6.
- [154] Romey G, Attali B, Chouabe C, Abitbol I, Guillemare E, Barhanin J, et al. Molecular mechanism and functional significance of the MinK control of the KvLQT1 channel activity. *J Biol Chem* 1997;272:16713-6.

- [155] Busch AE, Suessbrich H. Role of the ISK protein in the IminK channel complex. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:26-9.
- [156] Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988;242:1042-5.
- [157] Blumenthal EM, Kaczmarek LK. Structure and regulation of the MinK potassium channel. *Neurochem Res* 1992;17:869-76.
- [158] Wang KW, Tai KK, Goldstein SA. MinK residues line a potassium channel pore. *Neuron* 1996;16:571-7.
- [159] Oiki S, Takumi T, Okada Y, Nakanishi S. Alterations of gating parameters by neutral substitutions of transmembrane Leu52 of slow potassium channel. *Ann N Y Acad Sci* 1993;707:402-6.
- [160] Goldstein SA, Miller C. Site-specific mutations in a minimal voltage-dependent K⁺ channel alter ion selectivity and open-channel block. *Neuron* 1991;7:403-8.
- [161] Kurokawa J, Motoike HK, Kass RS. TEA(+)-sensitive KCNQ1 constructs reveal pore-independent access to KCNE1 in assembled I(Ks) channels. *J Gen Physiol* 2001;117:43-52.
- [162] Tapper AR, George AL, Jr. MinK subdomains that mediate modulation of and association with KvLQT1. *J Gen Physiol* 2000;116:379-90.
- [163] Honore E, Attali B, Romey G, Lesage F, Barhanin J, Lazdunski M. Different types of K⁺ channel current are generated by different levels of a single mRNA. *Embo J* 1992;11:2465-71.
- [164] Busch AE, Waldegger S, Herzer T, Raber G, Gulbins E, Takumi T, et al. Molecular basis of IsK protein regulation by oxidation or chelation. *J Biol Chem* 1995;270:3638-41.
- [165] Chevillard C, Attali B, Lesage F, Fontes M, Barhanin J, Lazdunski M, et al. Localization of a potassium channel gene (KCNE1) to 21q22.1-q22.2 by in situ hybridization and somatic cell hybridization. *Genomics* 1993;15:243-5.

- [166] Malo MS, Srivastava K, Ingram VM. Gene assignment by polymerase chain reaction: localization of the human potassium channel IsK gene to the Down's syndrome region of chromosome 21q22.1-q22.2. *Gene* 1995;159:273-5.
- [167] Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT. Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics* 1998;51:86-97.
- [168] McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004;47:787-821.
- [169] Honore E, Attali B, Romey G, Heurteaux C, Ricard P, Lesage F, et al. Cloning, expression, pharmacology and regulation of a delayed rectifier K⁺ channel in mouse heart. *Embo J* 1991;10:2805-11.
- [170] Murai T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:176-81.
- [171] Varnum MD, Busch AE, Bond CT, Maylie J, Adelman JP. The min K channel underlies the cardiac potassium current I_{Ks} and mediates species-specific responses to protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11528-32.
- [172] Ramakers C, Vos MA, Doevendans PA, Schoenmakers M, Wu YS, Scicchitano S, et al. Coordinated down-regulation of KCNQ1 and KCNE1 expression contributes to reduction of I(K_s) in canine hypertrophied hearts. *Cardiovasc Res* 2003;57:486-96.
- [173] Sugimoto T, Tanabe Y, Shigemoto R, Iwai M, Takumi T, Ohkubo H, et al. Immunohistochemical study of a rat membrane protein which induces a selective potassium permeation: its localization in the apical membrane portion of epithelial cells. *J Membr Biol* 1990;113:39-47.

- [174] Franco D, Demolombe S, Kupersmidt S, Dumaine R, Dominguez JN, Roden D, et al. Divergent expression of delayed rectifier K(+) channel subunits during mouse heart development. *Cardiovasc Res* 2001;52:65-75.
- [175] Felipe A, Knittle TJ, Doyle KL, Tamkun MM. Primary structure and differential expression during development and pregnancy of a novel voltage-gated sodium channel in the mouse. *J Biol Chem* 1994;269:30125-31.
- [176] Clancy CE, Kass RS. Defective cardiac ion channels: from mutations to clinical syndromes. *J Clin Invest* 2002;110:1075-7.
- [177] Anantharam A, Markowitz SM, Abbott GW. Pharmacogenetic considerations in diseases of cardiac ion channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:831-8.
- [178] Rosen MR. Mechanisms for arrhythmias. *Am J Cardiol* 1988;61:2A-8A.
- [179] Akhtar M, Tchou PJ, Jazayeri M. Mechanisms of clinical tachycardias. *Am J Cardiol* 1988;61:9A-19A.
- [180] Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;73:379-85.
- [181] Han W, Chartier D, Li D, Nattel S. Ionic remodeling of cardiac Purkinje cells by congestive heart failure. *Circulation* 2001;104:2095-100.
- [182] Kleiman RB, Houser SR. Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989;256:H1450-61.
- [183] Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, et al. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2000;101:2631-8.
- [184] De Ferrari GM, Viola MC, D'Amato E, Antolini R, Forti S. Distinct patterns of calcium transients during early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in ventricular myocytes. *Circulation* 1995;91:2510-5.
- [185] January CT, Riddle JM. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current. *Circ Res* 1989;64:977-90.

- [186] Antzelevitch C. Molecular genetics of arrhythmias and cardiovascular conditions associated with arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;14:1259-72.
- [187] Janse MJ, D'Alnoncourt CN. Reflections on reentry and focal activity. *Am J Cardiol* 1987;60:21F-6F.
- [188] Hoffman BF, Dangman KH. Mechanisms for cardiac arrhythmias. *Experientia* 1987;43:1049-56.
- [189] Veenhuyzen GD, Simpson CS, Abdollah H. Atrial fibrillation. *Cmaj* 2004;171:755-60.
- [190] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
- [191] Rosati B, McKinnon D. Regulation of ion channel expression. *Circ Res* 2004;94:874-83.
- [192] Carey M, Smale ST. Transcription regulation in eukaryotes: concepts, strategies, and techniques. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2000.
- [193] Smith AN, Barth ML, McDowell TL, Moulin DS, Nuthall HN, Hollingsworth MA, et al. A regulatory element in intron 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 1996;271:9947-54.
- [194] Suen TC, Goss PE. Identification of a novel transcriptional repressor element located in the first intron of the human BRCA1 gene. *Oncogene* 2001;20:440-50.
- [195] Reinberg D, Orphanides G, Ebright R, Akoulitchev S, Carcamo J, Cho H, et al. The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1998;63:83-103.
- [196] Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M, Rockman MV, et al. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 2003;20:1377-419.
- [197] Burke TW, Kadonaga JT. Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* 1996;10:711-24.

- [198] Kaufmann J, Smale ST. Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev* 1994;8:821-9.
- [199] Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 1996;21:327-35.
- [200] Bouwman P, Philipsen S. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 2002;195:27-38.
- [201] Roeder RG. The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci* 1991;16:402-8.
- [202] Locker J. *Transcription factors*. Academic Press, San Diego, Calif 2001.
- [203] Latchman DS. *Eukaryotic transcription factors*. Academic Press, San Diego, Calif 1998.
- [204] Ogbourne S, Antalis TM. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 1998;331 (Pt 1):1-14.
- [205] Dorsett D. Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:505-14.
- [206] Blackwood EM, Kadonaga JT. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 1998;281:60-3.
- [207] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. *The molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York 2002.
- [208] Lemon B, Tjian R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 2000;14:2551-69.
- [209] Doevendans PA, van Bilsen M. Transcription factors and the cardiac gene programme. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:387-403.
- [210] Brand NJ, Barton PJ. *Myocardial molecular biology: an introduction*. *Heart* 2002;87:284-93.
- [211] Macfarlane WM. Demystified.... Transcription. *Mol Pathol* 2000;53:1-7.
- [212] Ptashne M, Gann A. *Genes and Signals*. Cold Spring Harb, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002.

- [213] Hoppe UC, Marban E, Johns DC. Molecular dissection of cardiac repolarization by in vivo Kv4.3 gene transfer. *J Clin Invest* 2000;105:1077-84.
- [214] Antzelevitch C. The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12:268-72.
- [215] Biggar SR, Crabtree GR. Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses. *Embo J* 2001;20:3167-76.
- [216] Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005;112:471-81.
- [217] Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, Tieleman RG, Tuinenburg AE, Wietses M, et al. Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2001;103:684-90.
- [218] Zicha S, Moss I, Allen B, Varro A, Papp J, Dumaine R, et al. Molecular basis of species-specific expression of repolarizing K⁺ currents in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1641-9.
- [219] Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, et al. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 2005;562:223-34.
- [220] Lundquist AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, et al. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I(Ks). *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:277-87.
- [221] Ashfield R, Ashcroft SJ. Cloning of the promoters for the beta-cell ATP-sensitive K-channel subunits Kir6.2 and SUR1. *Diabetes* 1998;47:1274-80.
- [222] Xiao JF, Fischer C, Steinlein OK. Cloning and mutation analysis of the human potassium channel KCNQ2 gene promoter. *Neuroreport* 2001;12:3733-9.

- [223] Gan L, Hahn SJ, Kaczmarek LK. Cell type-specific expression of the Kv3.1 gene is mediated by a negative element in the 5' untranslated region of the Kv3.1 promoter. *J Neurochem* 1999;73:1350-62.
- [224] Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005;21:2933-42.
- [225] Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2003;92:1079-88.
- [226] Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *Embo J* 1997;16:5687-96.
- [227] Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *Embo J* 2000;19:2046-55.
- [228] Fedida D, Shimoni Y, Giles WR. Alpha-adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. *J Physiol* 1990;423:257-77.
- [229] Lundquist AL, Turner CL, Ballester LY, George AL, Jr. Expression and transcriptional control of human KCNE genes. *Genomics* 2006;87:119-28.

Annexe : Accord des coauteurs

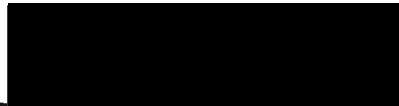
Zenab Mustapha,
M.Sc Pharmacologie (N° de programme : 2-520-1-0), Département de Pharmacologie.

Mustapha, Z., Pang, L., Nattel, S. Characterization of the cardiac KCNE1 gene promoter.
(À venir)

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Zenab Mustapha inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Analyse du promoteur et caractérisation initiale de la régulation transcriptionnelle du gène KCNE1».

Li Pang

Coauteur



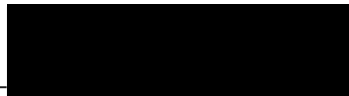
Signature

03/01/2006

Date

Stanley Nattel

Coauteur



Signature

le 3 avr /06

Date

Contribution des coauteurs

Au cours de ce projet scientifique, j'ai réalisé toutes les procédures expérimentales sous la supervision de Li Pang et de Dr Stanley Nattel. Li Pang m'a enseigné les différentes techniques de biologie moléculaire (clonage moléculaire, construction de plasmide, transfection, culture cellulaire...) de même qu'elle m'a orienté tout au long de mon cheminement.

Pour ce qui est de l'article scientifique, j'ai rédigé l'introduction, la partie décrivant les matériels et méthodes, les résultats et la bibliographie. J'ai construit tous les schémas et graphiques. Li Pang a rédigé la discussion. Dr Nattel a révisé et corrigé l'article.

CV académique

Zenab Mustapha

Institut de Cardiologie de Montréal (ICM), Département de Pharmacologie, Université de Montréal.

Projet de recherche : Analyse du promoteur et caractérisation initiale de la régulation transcriptionnelle du gène KCNE1.

Résumé de Présentations :

- ❖ *Role of the Cardiac KCNE1 Gene Promoter in Tissue and Species Selective Expression, Applications of gene regulation*, Boston, Octobre 2005.
- ❖ Clonage moléculaire et analyse de la régulation du promoteur du gène KCNE1, Journée de la recherche de l'ICM, Montréal, Juin 2005.
- ❖ Clonage moléculaire et analyse de la régulation du promoteur du gène KCNE1, Journée Gabriel L. Plaa, Montréal, Mai 2005.
- ❖ Caractérisation initiale du promoteur du gène cardiaque KCNE1, Journée de la recherche de l'ICM, Montréal, Juin 2006.
- ❖ *The Cardiac KCNE1 Gene Promoter and Transcriptional Regulation of I_{Ks} Expression*, American Heart Association, scientific sessions, Chicago, Novembre 2006.

Bourses et Prix:

- ❖ 2005, Bourse de la Faculté des Études Supérieures (2000\$)
- ❖ 2006, Bourse de la Faculté des Études Supérieures (1950\$)
- ❖ 2006, Bourse de Fin d'Étude (500\$)
- ❖ 2006, Prix de Présentation Orale à la Journée de recherche de l'ICM (500\$)

