

Université de Montréal

Le locus EED de la partie amino-terminale de l'hélice AID confère des cinétiques d'inactivation lentes au canal calcique  $Ca_v1.2$

Par  
Omar Dafi

Département de physiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
En physiologie

Décembre 2004

© Omar Dafi





## **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 :

Le locus EED de la partie amino-terminale de l'hélice AID confère des  
cinétiques d'inactivation lentes au canal calcique  $Ca_v1.2$

Présenté par :  
Omar Dafi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr. Pierre Haddad**  
président-rapporteur

**Dr. Lucie Parent**  
directrice de recherche

**Dr. Jean-Louis Schwartz**  
membre du jury

## RÉSUMÉ

La mutation E462R à la 5<sup>ème</sup> position de la région AID de la boucle I-II accélère significativement les cinétiques d'inactivation du canal  $Ca_v1.2$  du type L, ce qui suggère que la région AID pourrait participer à un mécanisme d'inactivation du type « hinged-lid ». La cristallisation récente de la région AID- $Ca_v\beta$  dans les canaux  $Ca_v1.1$  et  $Ca_v1.2$  ont montré qu'en plus de E462, les positions occupées par les résidus Q458, Q459, E461, K465, L468, D469 et T472 dans le canal calcique  $Ca_v1.2$  du lapin pourraient aussi contribuer au mécanisme du type « hinged-lid ». Une étude mutationnelle effectuée dans notre laboratoire a montré que les mutations Q458A, Q459A, K465N, L468R, D469A et T472D n'affectent pas significativement la dépendance en voltage de l'inactivation (VDI). Par contre, la mutation de certains résidus chargés négativement E461, E462 et D463 en résidus neutres ou positifs accélère la VDI, ce qui suggère que le locus des résidus chargés négativement au niveau N-terminal de l'hélice AID pourrait être impliqué dans les cinétiques d'inactivation lente du canal  $Ca_v1.2$ . L'analyse des mutations effectuées à la position 462 (R, K, A, G, D, N, Q) confirment qu'à +10 mV, E462R produit des cinétiques d'inactivation plus rapides comparativement aux autres mutations avec E462R >> E462K  $\approx$  E462A > E462N > wt  $\approx$  E462Q  $\approx$  E462G > E462D (du plus rapide au plus lent). E462R accélère aussi les cinétiques d'inactivation de la chimère CEEE qui comprend le domaine I avec la boucle I-II du canal  $Ca_v1.2$ , inséré dans le canal  $Ca_v2.3$ . Les cinétiques d'inactivation rapide des mutants  $Ca_v1.2 + E462R$  et de CEEE + E462R sont abolies en présence de la sous-unité  $Ca_v\beta2a$ , mais sont rétablies avec la forme non palmitoylée de  $Ca_v\beta2a$ , soit  $Ca_v\beta2a$  C3S + C4S ( $Ca_v\beta2a$  CS). Ces résultats confirment que  $Ca_v\beta2a$  et E462R modulent la VDI via une même voie mais avec des effets opposés. L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle particulier de E461, E462 et E463 de la boucle I-II dans la VDI des canaux  $Ca_v1.2$ .

**Mots clés:** Alpha-1C, type-L, sous-unité bêta, modulation, cinétiques, palmitoylation, AID, boucle cytoplasmique, « hinged-lid »

## ABSTRACT

The E462R mutation in the 5<sup>th</sup> position of the AID region in the I-II linker is known to accelerate significantly VDI kinetics of the L-type Ca<sub>v</sub>1.2 channel suggesting that the AID region could participate to a hinged-lid type inactivation mechanism in these channels. The recently solved crystal structures of the AID-Ca<sub>v</sub>β regions in L-type Ca<sub>v</sub>1.1 and Ca<sub>v</sub>1.2 channels show that in addition to E462, positions occupied by Q458, Q459, E461, K465, L468, D469, and T472 in the rabbit Ca<sub>v</sub>1.2 channel could also potentially contribute to a hinged-lid type mechanism. A mutational analysis of these residues shows that Q458A, Q459A, K465N, L468R, D469A, and T472D did not significantly alter VDI gating. In contrast, mutations of the negatively charged E461, E462, and D463 to neutral or positively charged residues increased VDI gating suggesting that the cluster of negatively charged residues in the N-terminal end of the AID helix could account for the slower VDI kinetics of Ca<sub>v</sub>1.2. A mutational analysis at position 462 (R, K, A, G, D, N, Q) further confirmed that E462R yielded faster VDI kinetics at +10 mV than any other residue with E462R >> E462K ≈ E462A > E462N > wt ≈ E462Q ≈ E462G > E462D (from the fastest to the slowest). E462R was also found to increase the VDI gating of the slow CEEE chimera that includes the I-II linker from Ca<sub>v</sub>1.2 into a Ca<sub>v</sub>2.3 background. The fast VDI kinetics of the Ca<sub>v</sub>1.2 E462R and the CEEE + E462R mutants were abolished by Ca<sub>v</sub>β2a subunit and reinstated when using the non-palmitoylated form of Ca<sub>v</sub>β2a C3S + C4S (Ca<sub>v</sub>β2a CS), confirming that Ca<sub>v</sub>β2a and E462R modulate VDI through a common pathway albeit in opposite directions. Altogether these results highlight the unique role of E461, E462, and D463 in the I-II linker in the VDI gating of HVA Ca<sub>v</sub>1.2 channels.

**Key words:** Alpha-1C, L-type, beta subunit, regulation, kinetics, gating, palmitoylation, alpha interaction domain, cytoplasmic linker, hinged-lid mechanism

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS. ....	ix

<b>I Introduction</b> .....	1
I.1 Les canaux calciques dépendant du potentiel membranaire. ....	3
I.2 Structure des canaux calciques dépendant du potentiel membranaire .....	6
I.2.1 La sous-unité $Ca_v\alpha 1$ .....	7
I.2.1.1 Diversité moléculaire.....	10
I.2.1.2 Distribution tissulaire.....	10
I.2.2 La sous-unité $Ca_v\beta$ .....	12
I.2.3 La sous-unité $Ca_v\alpha 2$ .....	14
I.2.4 La sous-unité $Ca_v\gamma$ .....	15
I.3 Implications pathologiques : canalopathies .....	17
I.4 Propriétés structurales déterminant la conduction ionique.....	19
I.5 Mécanisme moléculaire d'activation des canaux calciques .....	20
I.6 Mécanismes moléculaires d'inactivation des canaux calciques.....	21
I.6.1 Mécanisme moléculaire de l'inactivation dépendant du potentiel membranaire.....	24
I.6.2 Mécanisme moléculaire de l'inactivation dépendant du calcium .....	25
I.7 Objectifs et description du projet.....	27
<b>II Matériels et méthodes</b> .....	29
II.1 Techniques d'ADN recombinant.....	30
II.2 Mutagenèse dirigée.....	30
II.3 Expression fonctionnelle dans les ovocytes de xénope.....	33
II.4 Enregistrements électrophysiologiques .....	34
II.5 Préparation des figures de la structure cristalline.....	36
<b>III Article</b> .....	37
<b>IV Discussion</b> .....	84
IV.1 Le locus EED constitue le déterminant moléculaire de l'inactivation du canal $Ca_v1.2$ .....	85
IV.2 Le résidu arginine à la 5 <sup>ème</sup> position de la région AID accélère les cinétiques d'inactivation du canal $Ca_v1.2$ et de la chimère CEEE .....	90
IV.3 E462R module aussi la dépendance en voltage de l'inactivation de la chimère CEEE .....	91
IV.4 $Ca_v\beta 2a$ et E462R modulent les cinétiques d'inactivation via le même mécanisme .....	93
IV.5 Structures déterminant l'inactivation dépendant du potentiel membranaire.....	94
<b>V Liste des références</b> .....	98
<b>VI Annexes</b> .....	108



**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I</b>	Classification des différents canaux calciques dépendant du potentiel membranaire suivant leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques	5
<b>Tableau II</b>	Caractéristiques moléculaires et distribution tissulaire des différentes sous-unités de canaux VDCC.....	11
<b>Tableau III</b>	Localisation chromosomique, chez l'homme, des gènes codants pour les sous-unités des canaux calciques et maladies génétiques liées à des canalopathies calciques.....	18
<b>Tableau IV</b>	Alignement des sous-unités $\alpha 1 G$ , $\alpha 1 C$ et $\alpha 1 E$ au niveau de la région du pore des canaux calciques.....	19
<b>Tableau V</b>	Accessibilité des résidus de la boucle AID dans le complexe AID-Ca $\nu$ $\beta 2a$ .....	89

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Modèle d'interaction entre les différentes sous-unités du canal calcique voltage-dépendant $Ca_v1.1$ .....	6
<b>Figure 2</b>	Topologie transmembranaire prédite de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ .....	9
<b>Figure 3</b>	Structure cristalline de la sous-unité $Ca_v\beta2a$ .....	13
<b>Figure 4</b>	Modèle d'interaction entre la sous-unité $Ca_v\beta$ et la boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ .....	13
<b>Figure 5</b>	Structure prédite de la sous-unité $Ca_v\gamma2$ .....	16
<b>Figure 6</b>	Modèle d'inactivation des canaux calciques dépendant du potentiel membranaire. ....	22
<b>Figure 7</b>	Mécanisme d'inactivation « hinged lid » des canaux sodiques .....	23
<b>Figure 8</b>	Mécanisme d'inactivation des canaux potassiques de type Shaker. ....	23
<b>Figure 9</b>	Cinétiques d'inactivation de la chimère CEEE .....	25
<b>Figure 10</b>	Modèle montrant le mécanisme d'inactivation du canal calcique $Ca_v1.2$ .....	26
<b>Figure 11</b>	Construction de la chimère CEEE .....	32
<b>Figure 12</b>	Technique de mutagenèse dirigée.....	32
<b>Figure 13</b>	Modèle d'inactivation de type « hinged-lid » des canaux calciques dépendant du potentiel membranaire. ....	97

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>A</b>	alanine
<b>Å</b>	Angström
<b>ABP</b>	«alpha-binding pocket»
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADN<sub>c</sub></b>	ADN complémentaire
<b>AID</b>	« alpha interaction domain »
<b>Ala</b>	alanine
<b>AMPA</b>	« $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic »
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>Asn</b>	asparagine
<b>Asp</b>	aspartate
<b>Ba<sup>2+</sup></b>	ion barium
<b>BID</b>	« beta interaction domain »
<b>Boucle I-II</b>	boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II
<b>BTZ</b>	benzothiazépine
<b>C</b>	cystéine
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	ion calcium
<b>CaM</b>	calmoduline
<b>Ca<sub>v</sub></b>	canaux calciques dépendant du potentiel membranaire
<b>Ca<sub>v</sub>1.2 + E462R</b>	mutation E462R dans le canal Ca <sub>v</sub> 1.2
<b>Ca<sub>v</sub><math>\beta</math>2a C3S+C4S</b>	mutations C3S et C4S dans la sous-unité Ca <sub>v</sub> $\beta$ 2a
<b>CDI</b>	« Calcium-dependent inactivation »
<b>CEEE</b>	canal chimère formé de Ca <sub>v</sub> 1.2 et Ca <sub>v</sub> 2.3
<b>CEEE + E462R</b>	mutation E462R dans le canal CEEE
<b>C-terminal</b>	carboxyle terminal
<b>D</b>	aspartate
<b>Da</b>	dalton = $1,66 \times 10^{-27}$ kg
<b>DHP</b>	dihydropyridine
<b>Dpn1</b>	enzyme de restriction (« <i>Diplococcus pneumoniae G41</i> »)
<b>E</b>	glutamate

<b>E<sub>0.5</sub></b>	potentiel de mi-inactivation
<b>EGTA</b>	acide éthylène glycol tétraacétique
<b>F</b>	phénylalanine
<b>G</b>	glycine
<b>g</b>	gramme
<b>Gln</b>	glutamine
<b>Glu</b>	glutamate
<b>H<sub>2</sub>O</b>	eau
<b>HEPES</b>	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique
<b>HUGO</b>	«Human Genome Organisation»
<b>HVA</b>	« high voltage activated »
<b>Hz</b>	Hertz
<b>I</b>	isoleucine
<b>IC<sub>50</sub></b>	concentration qui engendre 50% d'inhibition
<b>IFM</b>	boucle cytoplasmique reliant les domaines III et IV
<b>K</b>	lysine
<b>K<sup>+</sup></b>	ion potassium
<b>kDa</b>	kilodaltons
<b>kHz</b>	kiloHertz
<b>L</b>	leucine
<b>L-type</b>	courant calcique de type L
<b>LVA</b>	«low voltage activated»
<b>Lys</b>	lysine
<b>M</b>	molaire
<b>MeS</b>	acide méthanesulfonique
<b>min</b>	minute
<b>mM</b>	millimolaire
<b>mmol</b>	millimole
<b>ms</b>	milliseconde
<b>mV</b>	millivolt
<b>N</b>	asparagine
<b>Na<sup>+</sup></b>	ion sodium

<b>nM</b>	nanomolaire
<b>N-terminal</b>	amino-terminal
<b>N-type</b>	courant calcique de type N
<b>PAA</b>	phénylalkylamines
<b>PCR</b>	« polymerase chain reaction »
<b>pH</b>	$-\log [H^+]$
<b>PKA</b>	protéine kinase A
<b>PKC</b>	protéine kinase C
<b>Q</b>	glutamine
<b>Q-type</b>	courant calcique de type Q
<b>R</b>	arginine
<b>R-type</b>	courant calcique de type R
<b>r300</b>	fraction du courant restant à la fin d'un pulse de 300 ms
<b>S</b>	sérine
<b>S4</b>	segment transmembranaire IV
<b>S5</b>	segment transmembranaire V
<b>S6</b>	segment transmembranaire VI
<b>se</b>	écart-type
<b>Ser</b>	serine
<b>SH3</b>	« Src homology 3 » : domaine d'interaction de la sous-unité $Ca_v\beta$
<b>T</b>	thréonine
<b>T-type</b>	courant calcique de type T
<b>V</b>	valine
<b>VDCC</b>	« voltage dependant calcium channel »
<b>VDI</b>	« voltage dependant inactivation »
<b>W</b>	tryptophane
<b>wt</b>	« wild type »
<b>Y</b>	tyrosine
<b><math>\mu A</math></b>	microampère
<b><math>\mu M</math></b>	micromolaire
<b><math>\tau_{inact}</math></b>	constante de temps d'inactivation

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de recherche Dr. Lucie Parent qui a su me donner une excellente formation tant académique que technique. Ses conseils prodigieux et son dévouement à la recherche m'ont permis de mener à bien mon projet de recherche.

Je remercie Laurent Berrou pour ses conseils et son soutien technique en électrophysiologie et en biologie moléculaire.

Un grand merci à Yolaine Dodier de m'avoir aidé à développer mes habiletés et mes connaissances en techniques de biologie moléculaire. Merci pour sa grande contribution à la réalisation de l'article.

Merci à Özlem Topalak pour son soutien et ses conseils.

Merci à tous les membres du GÉPROM.

Merci au personnel du département de physiologie et merci surtout à Joanne Payette.

À mes chers parents qui ont toujours cru à ma réussite

À toi ma femme

À toi Massine

À toute *tamurt inou*, à tous les "*Hommes libres*"

Gloire à vous tous!

## **I. INTRODUCTION**



L'influx d'ions calciques dans les cellules déclenche plusieurs réactions importantes et intervient dans de nombreux processus physiologiques fondamentaux, notamment le couplage excitation-contraction, l'expression des gènes, l'activité rythmique cardiaque, la signalisation cellulaire, la sécrétion hormonale, la libération de neurotransmetteurs, l'activation d'enzymes et le développement. La concentration extracellulaire du calcium libre peut atteindre 1.8 mM; alors que dans le cytoplasme elle est relativement très faible, environ 0.1 $\mu$ M. De ce fait le calcium tend à diffuser vers l'intérieur de la cellule à travers des protéines dites « canaux ioniques » par un mécanisme de diffusion facilitée. L'une des familles de protéines de transport qui permettent au calcium de s'introduire dans la cellule est une famille de canaux ioniques dont l'activité dépend du potentiel membranaire, ce sont les canaux calciques qui s'activent avec la dépolarisation (VDCC). Une altération du fonctionnement physiologique normal de ces canaux provoque ce qu'on appelle une « canalopathie », ce qui entraîne un déséquilibre de l'homéostasie calcique qui peut engendrer la mort cellulaire suite à un déséquilibre de la concentration de calcium intracellulaire. Ainsi une compréhension de la structure et de la régulation des VDCC est indispensable à la compréhension de ces phénomènes physiopathologiques.

## I.1 Les canaux calciques dépendant du potentiel membranaire

L'essor du « patch-clamp », qui consiste à étudier l'activité électrique unitaire des protéines-canaux, a permis d'identifier l'existence d'une multitude de canaux aux propriétés biophysiques distinctes, qui parfois coexistent chez un même type cellulaire. Vers la fin des années 80, grâce aux premières caractérisations moléculaires ainsi qu'à une meilleure définition de la pharmacologie de ces canaux, il est clairement apparu que les canaux calciques dépendant du potentiel membranaire constituaient des complexes de protéines hétéromultimériques qui se forment grâce à la combinaison de plusieurs sous-unités (Hofmann et al., 1994; Catterall, 1995). Dans la majorité des cas le canal VDCC se compose de la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  formant le pore de conduction des ions, et des sous-unités auxiliaires  $Ca_v\beta$  et  $Ca_v\alpha_2\delta$  qui modulent les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques de la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$ .

Suivant leur sensibilité au potentiel membranaire, les canaux calciques sont principalement subdivisés en fonction de leur seuil d'activation en HVA (« High Voltage Activated ») et LVA (« Low Voltage Activated »). Les premiers sont des canaux activés par de fortes dépolarisations ( $\Delta V > 30 - 40$  mV). Les canaux de type L, N, P/Q et R font partie de ce groupe. Leurs cinétiques d'activation et d'inactivation sont plus lentes par rapport aux canaux de types LVA. Les canaux à bas seuil (LVA) sont activés par de faibles dépolarisations. Ils comprennent les canaux de type T qui ont la capacité de s'ouvrir sous l'effet de faibles dépolarisations membranaires ( $\Delta V > 10 - 20$  mV). Ils produisent des courants à cinétique rapide. Les courants de type T peuvent être enregistrés sur de

nombreux types cellulaires: cardiaques, neuronaux et endocrines.

Ces différents types de canaux natifs ont été identifiés en se basant sur leurs caractéristiques pharmacologiques et biophysiques (Tableau I).

Du point de vue pharmacologique, les canaux de type N sont inhibés par la  $\omega$ -conotoxine MVIIC (Hirning et al., 1988), alors que ceux de type P/Q sont spécifiquement inhibés par la toxine  $\omega$ -AgaIVA ( $IC_{50} \sim 1nM$  pour le type P et  $\sim 0.1nM$  pour le type Q) et par la  $\omega$ -conotoxine GIVA (Mintz et al., 1992) (voir Tableau I). Les canaux de type T sont sensibles à l'amiloride. Le mibéfradil est aussi un inhibiteur de ces canaux ( $IC_{50} = 2\mu M$ ) (Ertel et al., 1997), quoiqu'à des concentrations de l'ordre du micromolaire il inhibe aussi les canaux HVA (Jiminez et al., 2000; Bernatchez et al., 2001a).

Les canaux de type L sont très sensibles aux dihydropyridines (DHP) (exemple : nifédipine), aux phénylalkylamines (exemple : vérapamil) et aux benzothiazépines (exemple : diltiazem). Ils sont largement distribués dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, le muscle lisse, le système endocrinien et la rétine. Il existe également des canaux calciques à haut seuil, insensibles aux dihydropyridines et présents exclusivement dans le système nerveux. Ces canaux sont responsables des courants calciques de type R qui présentent une sensibilité au SNX-482 qui est une toxine isolée de mollusques et d'araignées (Tableau I).

Type de canal	Sous-unité	Classification phylogénique	Activation	Cinétique d'inactivation	Sensibilité pharmacologique	Sensibilité à des toxines
L	$\alpha 1C$	$Ca_v1.2$	<b>HVA</b>	Lente	Dihydropyridine, Benzothiazepines, Phénylalkylamines	Calcicludine Calciseptine
L	$\alpha 1D$	$Ca_v1.3$				
L	$\alpha 1F$	$Ca_v1.4$				
L	$\alpha 1S$	$Ca_v1.1$				
P/Q	$\alpha 1A$	$Ca_v2.1$	<b>HVA</b>	Lente		<i>w</i> -agatoxine-IVA ++ <i>w</i> -conotoxine-MVIIC +
N	$\alpha 1B$	$Ca_v2.2$	<b>HVA</b>	Lente		<i>w</i> -conotoxine-GVIA ++
R	$\alpha 1E$	$Ca_v2.3$	<b>HVA</b>	Rapide		SNX-482
T	$\alpha 1G$	$Ca_v3.1$	<b>LVA</b>	Rapide	Mibefradil, Amiloride, Dihydropyridine (+/-)	Kurtoxine
T	$\alpha 1H$	$Ca_v3.2$				
T	$\alpha 1I$	$Ca_v3.3$				

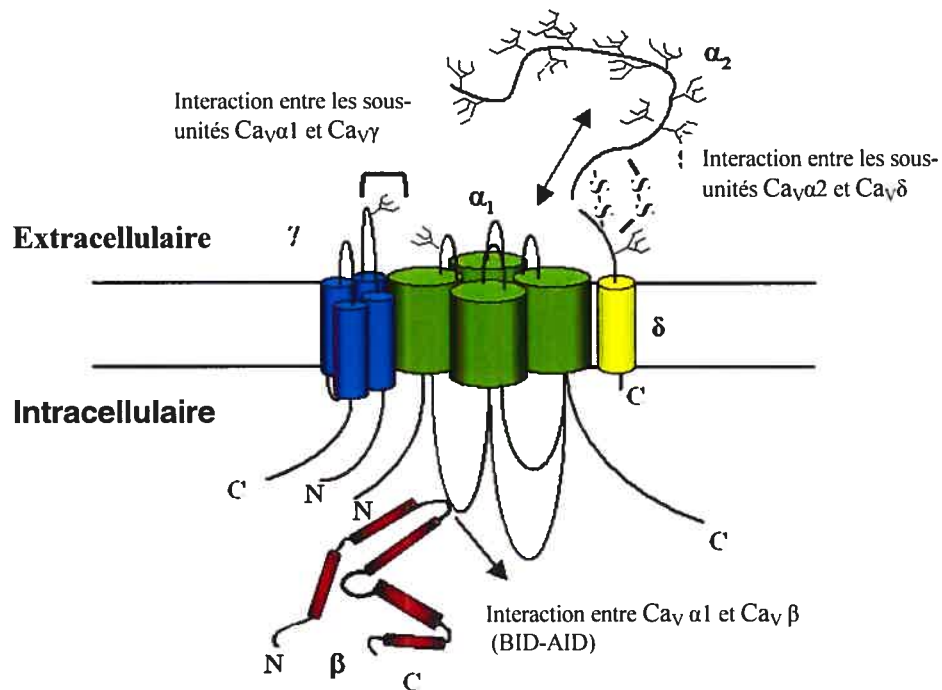
**Tableau I:** Classification des différents canaux calciques dépendant du potentiel membranaire suivant leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques.

Tandis que les courants de type T s'activent à de faibles dépolarisations et s'inactivent rapidement, les canaux de type L exigent une forte dépolarisation et leurs cinétiques d'inactivation sont très lentes. Les canaux calciques de type N, P, Q et R ont aussi besoin de fortes dépolarisations mais leurs cinétiques d'inactivation sont intermédiaires entre celles des canaux de type-T et celles des canaux de type-L.

## I.2 Structure des canaux calciques dépendant du potentiel membranaire

Sur le plan structural, les canaux calciques sont des protéines hétéromultimériques qui contiennent tous une sous-unité principale  $Ca_v\alpha_1$  qui forme le pore, des sous-unités auxiliaires modulatrices  $Ca_v\beta$  et  $Ca_v\alpha_2\delta$ , et parfois une cinquième sous-unité  $Ca_v\gamma$  associée aux canaux de type L du muscle squelettique (Figure 1).

Les canaux calciques de type L du muscle squelettique ( $Ca_v1.1$ ) sont activés par des protéines kinase A par l'intermédiaire de protéines AKAP («*A kinase anchoring proteins*») (Catterall, 2000). Dans les canaux de type N et P la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  peut être inhibée par la protéine G suite à une interaction directe entre le complexe  $G\beta\gamma$  et  $Ca_v\alpha_1$ . Cette interaction se produit au niveau de la région AID («*Alpha Interaction Domain*») reliant les domaines I et II (De Waard et al. 1997).



**Figure 1** : Modèle d'interaction entre les différentes sous-unités du canal calcique voltage-dépendant  $Ca_v1.1$  (Arikkath et al., 2003).

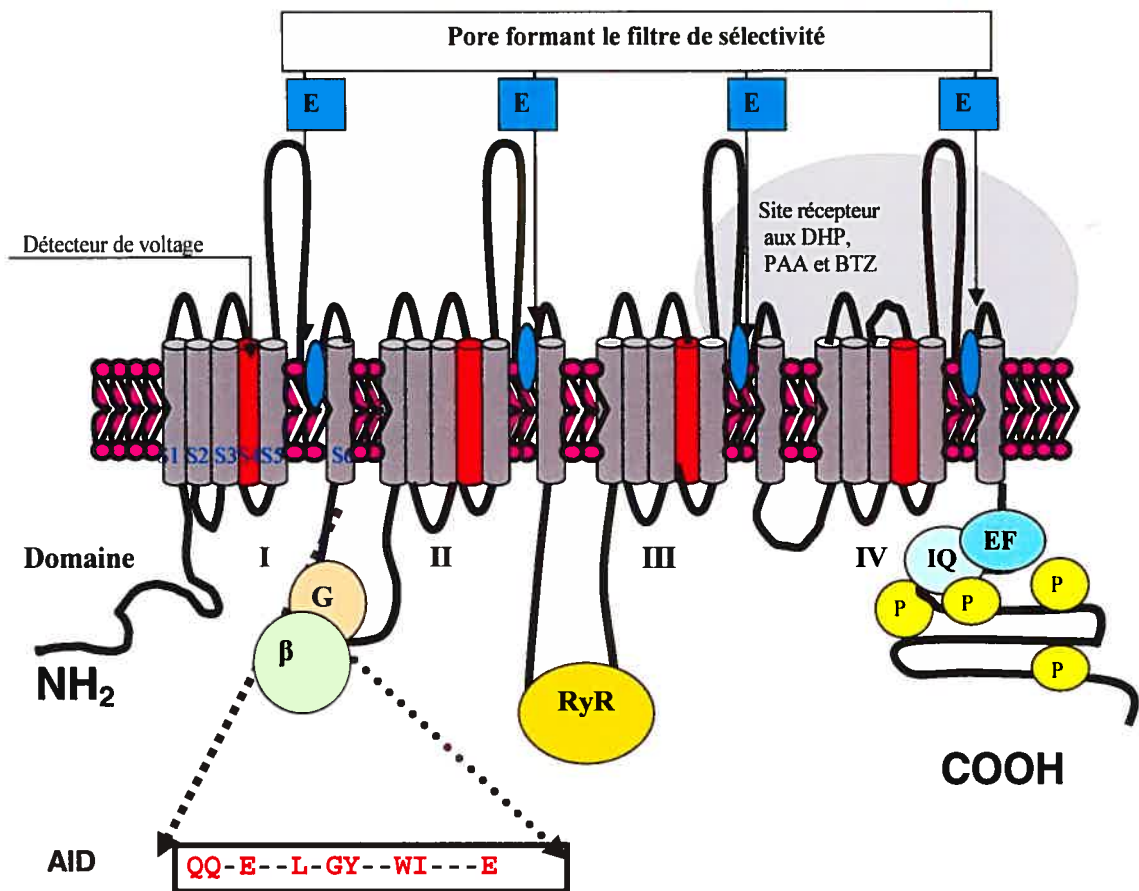
### I.2.1 La sous-unité $Ca_v\alpha 1$

La sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  est la sous-unité principale. Elle est constituée de 24 segments transmembranaires agencés en 4 domaines homologues (Figure 2). Elle a un poids moléculaire de 170 à 240 kDa. Les études structure-fonction ont permis d'identifier les régions de la protéine auxquelles sont associées les activités essentielles des canaux. L'expression fonctionnelle dans des systèmes hétérologues tels que les ovocytes de xénope, a démontré que l'activité électrique est portée par la sous-unité  $Ca_v\alpha 1$ . Les caractéristiques biophysiques telles que la cinétique, le seuil d'activation et la sensibilité pharmacologique sont déterminées par cette sous-unité. Le quatrième segment transmembranaire de chaque domaine (S4) porte des résidus chargés positivement. Il est sensible aux variations de potentiel et constitue donc un détecteur de voltage. La boucle peptidique qui relie les segments 5 et 6 dans chaque domaine est impliquée dans la formation du pore et la sélectivité du canal.

Dix gènes distincts codent pour la sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  et de nombreuses isoformes sont générés par épissage différentiel (Tableau II). Les études d'expression fonctionnelle ont indiqué que quatre de ces gènes ( $\alpha 1C$ ,  $\alpha 1D$ ,  $\alpha 1F$  et  $\alpha 1S$ ) codent des canaux de type L sensibles aux dihydropyridines. Chaque sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  présente des propriétés fonctionnelles distinctes et une expression tissulaire définie (Perez-Reyes et al., 1995) (Tableau II). La sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  est associée aux sous-unités  $Ca_v\beta$  et  $Ca_v\alpha 2\delta$  qui modulent sa mise en place et son fonctionnement (Ludwig et al., 1997). L'interaction avec la sous-unité  $Ca_v\beta$  se fait par l'intermédiaire du site AID (« Alpha Interaction Domain »)

situé sur la boucle intracellulaire entre les domaines I et II. Cette interaction avec la sous-unité  $Ca_v\beta$  conduit à des régulations de type allostérique (dépendance au voltage, cinétiques d'activation et d'inactivation) et d'adressage à la membrane plasmique.

Les sites de liaison des dihydropyridines, des benzothiazepines (BTZ), des phénylalkylamines (PAA) et de certaines toxines ont été identifiés au niveau du pore dans les domaines III et IV des canaux de type L. Des sites potentiels de phosphorylation par la PKA sont localisés sur la partie carboxyterminale et sur la boucle qui relie les domaines II et III selon le type de sous-unité  $Ca_v\alpha_1$ . Des sites consensus de phosphorylation pour d'autres kinases (PKC, calmoduline kinase, caséine kinase) sont aussi répartis sur toute la structure.



**Figure 2** : - Topologie transmembranaire prédite de la sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  : 4 domaines composés de 6 segments transmembranaires.

- Cartographie des régions importantes de la protéine  $Ca_v\alpha 1$  montrant le segment (S4) de chaque domaine qui participe à la détection du voltage (senseur), et qui est composé d'acides aminés chargés positivement (arginine et lysine); les sites d'interaction avec la sous-unité  $Ca_v\beta$  et la protéine G, le récepteur à la ryanodine (RyR) et les sites de liaisons aux dihydropyridines (DHP), phénylalkylamines (PAA) et benzothiazépines (BTZ). Le pore correspond à un feuillet  $\beta$  s'intercalant entre les segments 5 et 6 dans chaque domaine et l'on retrouve sur la région carboxy-terminale de la sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  des sites de phosphorylation (P), un motif (IQ) de liaison de la calmoduline et un motif (EF) de liaison du calcium. (Adapté de Lory et al., 1998).



### **I.2.1.1 Diversité moléculaire**

Contrairement aux canaux sodiques qui ont environ 90% d'homologie au niveau de leur structure primaire, Les canaux calciques dépendant du potentiel membranaire présentent peu d'homologie au niveau de leur séquence déduite en acides aminés. À ce jour, les techniques de clonage moléculaire ont permis d'identifier la structure primaire de dix canaux VDCC classés en trois familles  $Ca_v1$ ,  $Ca_v2$  et  $Ca_v3$  qui possèdent entre eux une grande homologie au niveau de leurs séquences primaires. Ces trois familles présentent des différences pharmacologiques et fonctionnelles importantes, notamment entre les canaux de types HVA et LVA tel que décrit précédemment.

Il existe quatre canaux calciques recombinants ayant les caractéristiques biophysiques des canaux de type L :  $Ca_v\alpha1S$  ( $Ca_v1.1$ )  $Ca_v\alpha1C$  ( $Ca_v1.2$ ),  $Ca_v\alpha1D$  ( $Ca_v1.3$ ) et  $Ca_v\alpha1F$  ( $Ca_v1.4$ ). Les canaux de type T ont 30% d'homologie avec les canaux HVA. L'ADN complémentaire codant pour une première sous-unité  $Ca_v\alpha1$  de type T ( $\alpha1G$ ) a été isolé en 1998 par le groupe de Perez-Reyes (Perez-Reyes et al., 1998). Le même groupe a par la suite identifié deux autres gènes codant pour des sous-unités  $Ca_v\alpha1$  homologues ( $\alpha1H$  et  $\alpha1I$ ) (Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999).

### **I.2.1.2 Distribution tissulaire**

Les canaux de type L et T se retrouvent dans la plupart des cellules excitables. Le type L joue un rôle majeur dans le couplage excitation-contraction et excitation-sécrétion.

Les canaux de type N sont distribués sur un grand nombre de neurones centraux ou périphériques, notamment au niveau présynaptique (Westenbroek et al., 1992). Ceux de type P ou Q sont localisés essentiellement dans la plupart des neurones centraux et notamment dans les cellules de Purkinje du cervelet. Leur concentration au niveau des terminaisons présynaptiques leur permet de jouer un rôle important dans la neurotransmission au niveau de plusieurs synapses centrales (Westenbroek et al., 1995). Le type R est largement distribué au niveau du cerveau (Yokoyama et al., 1995) (Tableau II).

Isoforme	Nomenclature génique HUGO/GDB	Localisation tissulaire	Poids moléculaire	Nombre d'acides aminés	
				Humain	rat
$\alpha 1A$	CACNA1A	Cerveau/ cervelet, rein	250 kDa	2510	2212
$\alpha 1B$	CACNA1B	Cerveau	260 kDa	2339	2336
$\alpha 1C$	CACNA1C	Cœur, muscle lisse, cerveau	240 kDa	2221	2169
$\alpha 1D$	CACNA1D	Cerveau, pancréas, rein, ovaire	245 kDa	2161	1646
$\alpha 1E$	CACNA1E	Cerveau	252 kDa	2251	2222
$\alpha 1F$	CACNA1F	Rétine		1966	1981
$\alpha 1G$	CACNA1G	Cerveau, ovaire, muscle lisse	249 kDa	2171	2254
$\alpha 1H$	CACNA1H	Cerveau, rein, cœur	243 kDa	2353	2359
$\alpha 1I$	CACNA1I	Cerveau	220 kDa	2251	1835
$\alpha 1S$	CACNA1S	Muscle squelettique	212 kDa	1873	1146
$\beta 1$	CACNB1	Muscle squelettique, cerveau, cœur	65 kDa	598	597
$\beta 2$	CACNB2	Cerveau, cœur	73 kDa	660	655
$\beta 3$	CACNB3	Plusieurs tissus	54 kDa	484	484
$\beta 4$	CACNB4	Cerveau, rein	58 kDa	520	486
$\alpha 2/\delta-1$	CACNA2D1	Muscle squelettique, cœur, cerveau	123 kDa	1091	1103
$\alpha 2/\delta-2$	CACNA2D2	Poumons	130 kDa	1143	1151
$\alpha 2/\delta-3$	CACNA2D3	Rate	122 kDa	997	1051
$\gamma 1$	CACNG1	Muscle squelettique, neurone	25 kDa	222	223
$\gamma 2$	CACNG2	Cerveau	35 kDa	323	323
$\gamma 3$	CACNG3	Cerveau	35 kDa	315	315
$\gamma 4$	CACNG4	Cerveau	36 kDa	327	327
$\gamma 5$	CACNG5	Cerveau	30 kDa	275	275

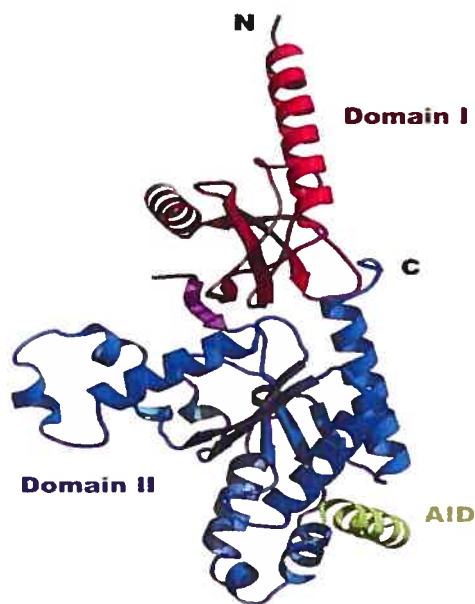
**Tableau II :** Caractéristiques moléculaires et distribution tissulaire des différentes sous-unités  $Ca_v\alpha 1$  de canaux VDCC (adapté de Lory et al., 1997; Lehmann-Horn et Jurkat-Rott, 1999).

(HUGO: *Human Genome Organisation*)

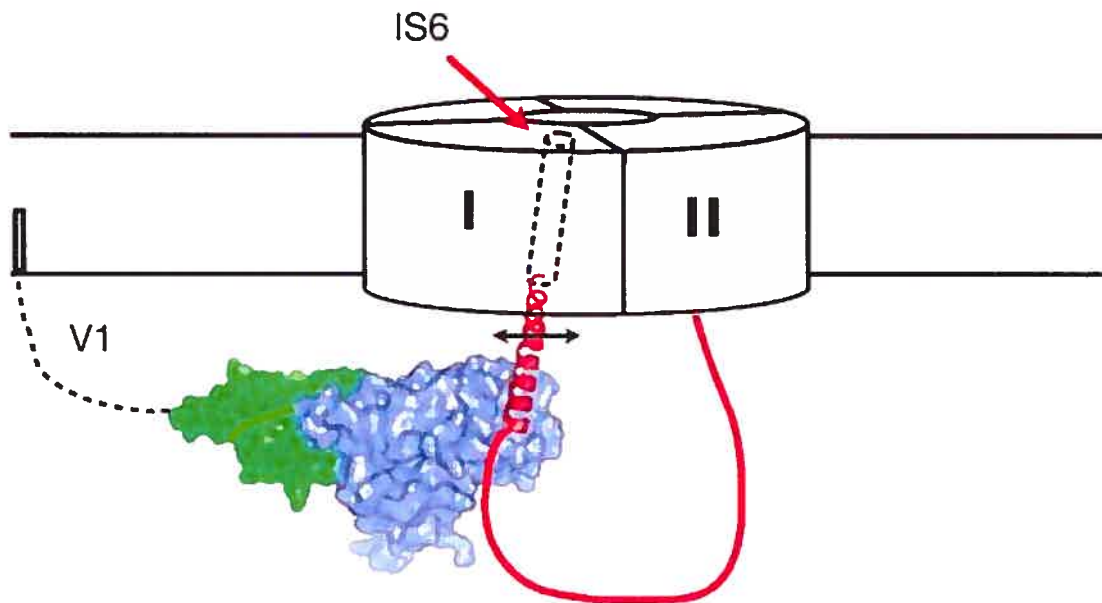
## I.2.2 La sous-unité $\text{Ca}_v\beta$

La sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$  est cytoplasmique et elle a un poids moléculaire de 54 à 73 kDa. Elle est codée par quatre gènes distincts ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 4$ ) qui ont des effets différents sur la modulation du canal. La cristallisation récente des sous-unités  $\text{Ca}_v\beta 3$ ,  $\text{Ca}_v\beta 4$  et  $\text{Ca}_v\beta 2a$  (Chen et al., 2004; Van Petegem et al., 2004; Opatowsky et al., 2004) montre une structure à deux domaines d'interaction conservés (68-92% d'identité) : un domaine SH3 et un domaine de guanylate kinase, entourés de trois régions variables (Figure 3) et qui interagit avec le site de liaison AID sur la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$  (Figure 4).

Cette sous-unité auxiliaire joue un rôle de chaperon. Elle participe au ciblage à la membrane et à la régulation des propriétés fonctionnelles de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$ . Elle augmente donc le nombre de canaux à la membrane ainsi que l'amplitude des courants (Brice et al., 1997). La co-expression de sous-unités  $\text{Ca}_v\beta$  avec des sous-unités  $\text{Ca}_v\alpha 1$  dans les ovocytes de xénope augmente l'amplitude des courants calciques (Wei et al., 1991), et module l'activité du canal en accélérant ses cinétiques d'activation et d'inactivation (Walker et De Waard, 1998). Les cinétiques d'inactivation sont plus rapides avec la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta 3$  et plus lentes avec  $\text{Ca}_v\beta 2a$  ( $\beta 3 > \beta 1 > \beta 4 \gg \beta 2a$ ) (Hullin et al., 1992; Sather et al., 1993; Parent et al., 1997). Contrairement aux autres sous-unités  $\text{Ca}_v\beta$ , l'isoforme  $\beta 2a$  est ancrée à la membrane plasmique suite à une palmitoylation au niveau amino-terminal grâce à la formation d'un pont thioester entre deux cystéines C3 et C4 qui provoque le ralentissement des cinétiques d'inactivation (Chien et al., 1996).



**Figure 3** : Structure cristalline de la sous-unité Ca<sub>v</sub>β2a formant un complexe avec le AID de la sous-unité Ca<sub>v</sub>α1 de Ca<sub>v</sub>1.1. (Opatowsky et al., 2004)



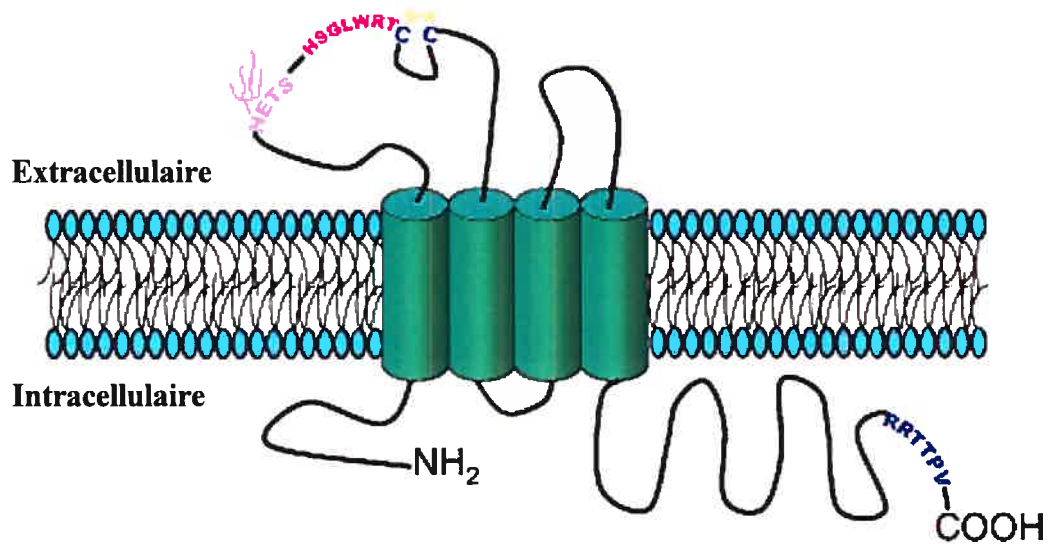
**Figure 4** : Modèle d'interaction entre la sous-unité Ca<sub>v</sub>β et la boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité Ca<sub>v</sub>α1. Chez l'isoforme β2a la région N-terminale (V1) est ancrée à la membrane. La boucle I-II de Ca<sub>v</sub>α1 forme une hélice α entre le N-terminal de AID et le segment IS6. Les domaines SH3 et guanylate kinase sont respectivement en vert et en bleu (Van Petegem et al., 2004)

### I.2.3 La sous-unité $Ca_v\alpha 2$

La sous-unité  $Ca_v\alpha 2$  a un poids moléculaire de 122 à 130 kDa et elle est liée par des ponts disulfures à une sous-unité  $\delta$  (30 kDa). Les deux protéines sont encodées par un gène unique. La sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta$  forme un complexe dont la plupart des acides aminés sont extracellulaires à l'exception de dix à quinze résidus qui forment un segment transmembranaire et cinq résidus au niveau carboxy-terminal. La partie extracellulaire de la protéine possède de nombreux sites de glycosylation. Trois sous-unités ont été identifiées jusqu'à présent. La comparaison de la structure primaire révèle que  $Ca_v\alpha 2\delta 2$  et  $Ca_v\alpha 2\delta 3$  partage une homologie respective de 55.6 et 30.3% avec la sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  (Klugbauer et al., 1999a). Sa co-expression avec la sous-unité principale  $Ca_v\alpha 1G$  dans des cellules COS-7 et dans les ovocytes de xénope permet d'obtenir des courants macroscopiques plus importants (Dolphin et al., 1999). En plus d'augmenter le taux d'expression de  $Ca_v\alpha 1$  et de la densité des courants,  $Ca_v\alpha 2\delta$  pourrait avoir des effets sur les caractéristiques macroscopiques de  $Ca_v\alpha 1$  tels que l'accélération des cinétiques et la dépendance en voltage de l'activation et de l'inactivation (Singer et al., 1991; Walker et De Waard, 1998; Wakamori et al., 1999). Toutefois, les effets de  $Ca_v\alpha 2\delta$  sont beaucoup moins clairs que ceux de  $Ca_v\beta$  sur l'activité de la sous-unité  $Ca_v\alpha 1$ .

### I.2.4 La sous-unité $Ca_v\gamma$

La sous-unité  $Ca_v\gamma$  est une sous-unité d'un poids moléculaire de 25 à 36 kDa qui possède quatre segments transmembranaires (Figure 5). C'est la moins bien caractérisée de toutes les sous-unités des canaux calciques dépendant du potentiel membranaire. Elle a d'abord été identifiée au niveau du muscle squelettique. Plus récemment, des isoformes de la sous-unité  $Ca_v\gamma$  ont été identifiées dans les cellules du système nerveux central de la souris souffrant d'épilepsie; il s'agit des protéines dites « stargazer » (Letts et al., 1998; Moss et al., 2003). En plus de leur rôle comme sous-unités des canaux calciques voltage-dépendants, ces isoformes forment un complexe avec les récepteurs synaptiques de l'AMPA («  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic ») (Chen et al., 2000). La co-expression de  $Ca_v\gamma 2$  ou  $Ca_v\gamma 4$  avec le complexe  $Ca_v 2.1/ Ca_v\beta 4$  en absence ou en présence de la sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta$  n'affecte ni l'amplitude des courants ni les propriétés d'activation et d'inactivation (Moss et al., 2003). Cette observation suggère que l'association de  $Ca_v\gamma$  avec les canaux VDCC ne module pas leurs propriétés d'activation et d'inactivation.  $Ca_v\gamma 2$ ,  $Ca_v\gamma 3$  et  $Ca_v\gamma 4$  ne sont pas des sous-unités proprement dites des VDCC mais elles pourraient moduler la fonction de ces canaux. Elles pourraient par exemple interagir avec les VDCC et moduler leurs propriétés biophysiques dans le cas où ces courants requièrent des protéines d'interaction qui ne sont pas présentes dans les ovocytes de xénope de manière endogène (Moss et al., 2003).



**Figure 5** : Structure prédite de la sous-unité  $Ca_v\gamma 2$  avec ses 4 domaines transmembranaires. Un site de glycosylation est situé sur la première boucle extracellulaire. Une région hautement conservée est représentée par des acides aminés en rouge. Au niveau du C-terminal se trouve un domaine de liaison de PDZ représenté par des acides aminés en bleu. La première boucle extracellulaire ainsi que le domaine PDZ pourraient être impliqués dans l'association avec les autres sous-unités du canal calcique ou d'autres protéines (Kang et *al.*, 2003)

### I.3 Implications pathologiques : canalopathies

Les pathologies liées à des altérations de la structure primaire des canaux ioniques sont appelées canalopathies (Lory et al., 1998). L'implication des canaux calciques voltage-dépendants dans certaines maladies génétiques est de plus en plus évidente. Des mutations dans les gènes codant pour la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  sont responsables de plusieurs maladies génétiques, en particulier la paralysie périodique hypokaliémique ( $Ca_v1.1$ , gène CACNA1S) (Fontaine et al., 1994), certaines formes d'ataxie et de migraine hémiplegique ( $Ca_v2.1$ , CACNA1A) (Ophoff et al., 1996), ainsi que des formes de rétinite pigmentaire ( $Ca_v1.4$ , CACNA1F).

Ophoff et coll. (1996) ont montré que des mutations au niveau de la sous-unité  $\alpha_1A$  ( $Ca_v2.1$ ) sont liées à deux maladies rares, la migraine hémiplegique familiale (MHF) et l'ataxie épisodique de type 2 (AE2). La MHF est une maladie autosomique dominante qui associe une migraine avec aura à un certain degré d'hémiplegie sporadique. Les symptômes qu'on observe dans le cas de l'ataxie épisodique sont de type migraineux avec de longues périodes d'ataxie induite par le stress. Le gène lié à ces deux maladies est situé sur le chromosome 19 qui code pour la sous-unité  $\alpha_1A$  chez l'homme (Joutel et al., 1993) (Tableau III).



Isoforme	Localisation chromosomique	Pathologie(s) associée(s)	Phénotype(s) murin(s) correspondant
$\alpha 1A$	19p13.1-2	-Ataxie cérébro-spinale (SCA6) <sup>4</sup> -Ataxie épisodique (EA-2) <sup>1,3</sup> -Migraine hémiplégique (FHM) <sup>2,3,5</sup> -Syndrome myasthénique de Lambert-Eaton <sup>6</sup> (antigène)	Tottering (tg) Leaner (tgla)
$\alpha 1B$	9q34	n.d.	n.d.
$\alpha 1C$	12p13.3	n.d.	n.d.
$\alpha 1D$	3p14.3	n.d.	n.d.
$\alpha 1E$	1q25-q31	n.d.	n.d.
$\alpha 1F$	Xp11	-Rétinine pigmentaire 2 (CSNB2) <sup>7</sup>	n.d.
$\alpha 1G$	17q22	n.d.	<i>Teetering (tn)</i>
$\alpha 1H$	16p13.3	n.d.	n.d.
$\alpha 1I$	22q13	n.d.	n.d.
$\alpha 1S$	1q31-q32	-Paralysie périodique hypokaliémique (HypoPP) <sup>8</sup> , -Hyperthermie maligne (MHS5) <sup>9</sup>	<i>Muscular dysgenesis (mdg)</i>
$\beta 1$	17q11.2-q22	n.d.	n.d.
$\beta 2$	10p12	-Syndrome myasthénique de Lambert-Eaton <sup>8</sup>	n.d.
$\beta 3$	12q13	n.d.	n.d.
$\beta 4$	2q22-q23	n.d.	n.d.
$\alpha 2/\delta-1$	7q21-q22	-Hyperthermie maligne (MHS3)	n.d.
$\alpha 2/\delta-2$	3p21.3	-Cancer de poumon à petites cellules (SCLC) <sup>10</sup>	n.d.
$\alpha 2/\delta-3$	3p21.1	n.d.	n.d.
$\gamma 1$	17q24	n.d.	n.d.
$\gamma 2$	22q12	n.d.	<i>Stargazer (stg)</i>
$\gamma 3$	16p12-p13	n.d.	n.d.
$\gamma 4$	17q22	n.d.	n.d.
$\gamma 5$	17q11-q22	n.d.	n.d.

**Tableau III** : Localisation chromosomique, chez l'homme, des gènes codants pour les sous-unités des canaux calciques et les maladies génétiques connues qui y sont associées (Lory et al., 1998).

**Abréviations:**

FHM : Familial hemiplegic migraine  
CSNB : Congenital stationary night blindness  
MHS : Malignant hyperthermia susceptibility  
SCLC : small cell lung cancer  
n.d. : non déterminé(e)

**Références :**

1 Vahedi et al., 1995  
2 Joutel et al., 1993  
3 Jen J et al., 1999  
4 Klockgether T et al., 2000  
5 Ophoff et al., 1996  
6 Lory et Monteil, 1998  
7 Bech-Hansen et al., 1998  
8 Kim SH et al., 2001; Bulman DE et al., 1999  
9 Monnier et al., 1997  
10 Van den Berg et Buys, 1997

## I.4 Propriétés structurales déterminant la conduction ionique

Les canaux calciques VDCC sont sélectifs aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette sélectivité est conférée par un groupe conservé de quatre résidus Glutamate qui projettent leurs groupements carboxyles dans la lumière du pore et forment ainsi un anneau chargé négativement (EEEE) (Wu et al., 2000). Ce locus EEEE constitue un site de liaison à haute affinité pour le calcium dans chacun des quatre domaines (Yang et al., 1993; Parent et al., 1995). Pour la famille des canaux de type  $\text{Ca}_v3.1$  ( $\alpha 1G$ ), les glutamates sont remplacés par des aspartates dans les deux derniers domaines (EEDD) (Tableau IV).

<b>Domaine I</b>																									
<b>Ca<sub>v</sub>3.1</b>	F	D	N	I	G	Y	A	W	I	A	I	F	Q	V	I	T	L	E	G	W	V	D	I	M	Y
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	F	D	N	F	A	F	A	M	L	T	V	F	Q	C	I	T	M	E	G	W	T	D	V	L	Y
<b>Ca<sub>v</sub>2.3</b>	F	D	N	I	L	F	A	V	L	T	V	F	Q	C	I	T	M	E	G	W	T	T	V	L	Y
<b>Domaine II</b>																									
<b>Ca<sub>v</sub>3.1</b>	F	D	S	L	L	W	A	I	V	T	V	F	Q	I	L	T	Q	E	D	W	N	K	V	L	Y
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	F	D	N	F	P	Q	S	L	L	T	V	F	Q	I	L	T	G	E	D	W	N	S	V	M	Y
<b>Ca<sub>v</sub>2.3</b>	F	D	T	F	P	A	A	I	M	T	V	F	Q	I	L	T	G	E	D	W	N	E	V	M	Y
<b>Domaine III</b>																									
<b>Ca<sub>v</sub>3.1</b>	F	D	N	L	G	Q	A	L	M	S	L	F	V	L	A	S	K	D	G	W	V	D	I	M	Y
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	F	D	N	V	L	A	A	M	M	A	L	F	T	V	S	T	F	E	G	W	P	E	L	L	Y
<b>Ca<sub>v</sub>2.3</b>	Y	D	N	I	I	W	A	L	L	T	L	F	T	V	S	T	G	E	G	W	P	Q	V	L	Q
<b>Domaine IV</b>																									
<b>Ca<sub>v</sub>3.1</b>	F	R	N	F	G	M	A	F	L	T	L	F	R	V	S	T	G	D	N	W	N	G	I	M	K
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	F	Q	T	F	P	Q	A	V	L	L	L	F	R	C	A	T	G	E	A	W	Q	D	I	M	L
<b>Ca<sub>v</sub>2.3</b>	F	R	S	F	F	G	S	L	M	L	L	F	R	S	A	T	G	E	A	W	Q	E	I	M	L

**Tableau IV** : Alignement des sous-unités  $\text{Ca}_v3.1$  ( $\alpha 1G$ ),  $\text{Ca}_v1.2$  ( $\alpha 1C$ ) et  $\text{Ca}_v2.3$  ( $\alpha 1E$ ) au niveau de la région du pore des canaux calciques. En rouge, les résidus constituant les sites de liaison aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  (adapté de Perez-Reyes et al., 1998)

## **I.5 Mécanisme moléculaire d'activation des canaux calciques**

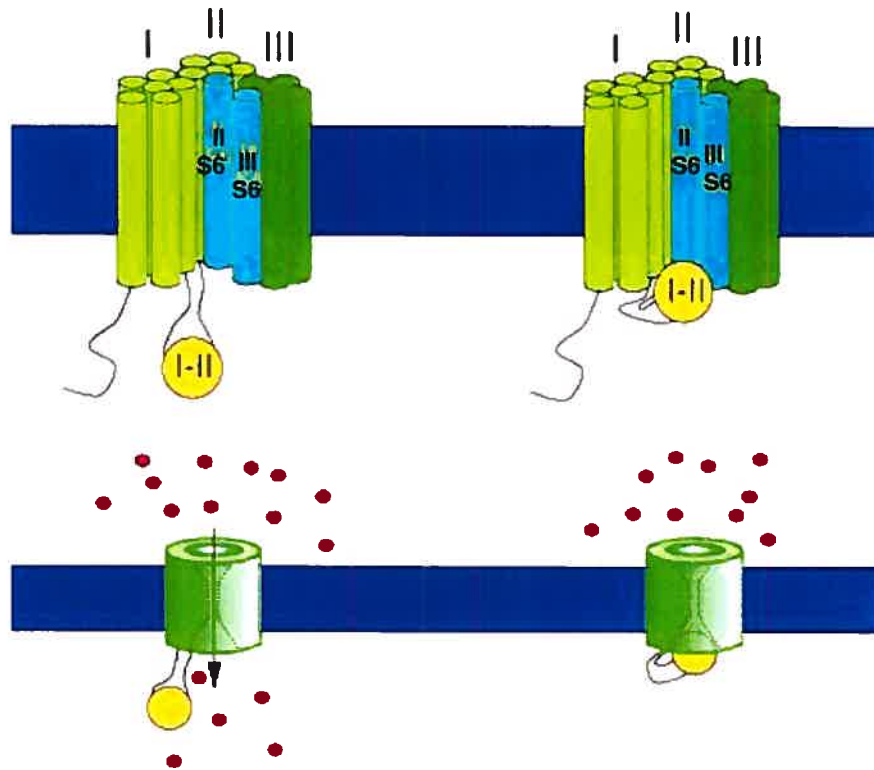
L'activation des canaux VDCC se produit suite à un réarrangement structural dû à la dépolarisation qui provoque le mouvement vers l'extérieur du segment S4 qui comprend une série périodique hautement conservée d'acides aminés chargés positivement (arginine, lysine). Ce mouvement de S4 mène à l'ouverture du canal qui permet donc le passage des ions tel que démontré à l'origine pour les canaux sodiques (Stühmer et al., 1989). Cependant, et contrairement aux canaux potassiques et sodiques, peu d'études ont porté sur les mécanismes moléculaires d'activation et la dépendance au voltage des canaux calciques. En effet, au niveau moléculaire, les mécanismes qui font que certains canaux s'activent à de fortes dépolarisations alors que d'autres s'activent à des bas seuils ne sont pas encore clairs. Pour déterminer les bases moléculaires responsables des différences entre les canaux HVA et LVA, Dennis Wray et coll. ont construit des chimères entre le canal  $Ca_v3.1$  de type LVA et le canal  $Ca_v1.2$  de type HVA. Ils ont constaté que les domaines I, III et IV étaient d'une grande importance pour l'ouverture du canal et pourraient contribuer, par conséquent, à la différence dans la dépendance au potentiel de l'activation entre les canaux  $Ca_v3.1$  et  $Ca_v1.2$  (Li et al., 2004).

## I.6 Mécanismes moléculaires d'inactivation des canaux calciques

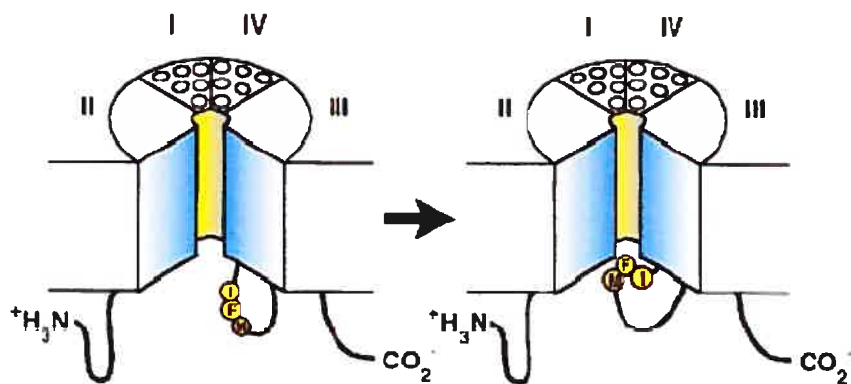
L'inactivation des canaux calciques voltage-dépendant VDCC est un état où le canal demeure ouvert sans toutefois être en mesure de conduire des ions. C'est un mécanisme qui permet le maintien des concentrations en calcium à des niveaux physiologiques. Les cinétiques d'inactivation des canaux calciques sont déterminées par les propriétés intrinsèques de la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  formant le pore et par des interactions avec les autres sous-unités du canal. Ces cinétiques d'inactivation peuvent être rapides ou lentes. L'inactivation rapide décrit une baisse rapide et complète des courants observée en réponse à de très brèves dépolarisations de l'ordre de quelques millisecondes ( $\tau_{inact} < 50$  ms). Quant à l'inactivation lente, elle se produit suite à de longues dépolarisations ( $> 500$  ms).

Le mécanisme d'inactivation des canaux calciques VDCC, quoiqu'il ne soit pas encore parfaitement élucidé semble s'apparenter à celui des canaux sodiques et potassiques. Il s'agit d'un mécanisme modifié de celui de « la-balle-et-la-chaîne », communément appelé en anglais « hinged-lid », puisque dans ce cas les deux extrémités de la boucle d'inactivation sont reliées au canal (Figure 6). C'est un mécanisme que l'on retrouve dans les canaux sodiques lors de l'inactivation rapide pendant laquelle une boucle cytoplasmique IFM reliant les domaines III et IV provoque l'occlusion du pore, tandis que l'inactivation lente impliquerait un réarrangement du pore (Goldin, 2003) (Figure 7). Quant aux canaux potassiques de type Shaker, l'inactivation se produit par le mécanisme de « ball and chain » par lequel le N-terminal constituant la particule d'inactivation se déplace du

cytoplasme jusqu'au canal où il en obstrue le pore (Hoshi et al., 1990) (Figure 8).

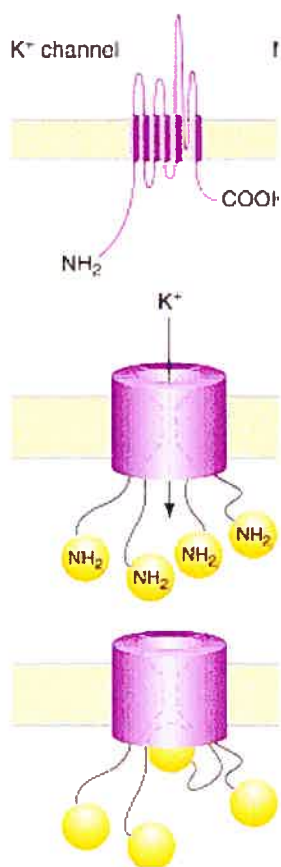


**Figure 6** : Modèle d'inactivation des canaux calciques dépendant du potentiel membranaire impliquant la boucle I-II et les segments S6 des domaines II et III. La boucle I-II formerait une structure de « hinged-lid » qui pourrait obstruer physiquement le vestibule interne du canal en se projetant sur les segments S6 des domaines I et II (Stotz et al., 2000)



**Figure 7 :**

Mécanisme d'inactivation « hinged-lid » des canaux sodiques : La boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV contient une résidu F1489 responsable de l'occlusion du pore. (Catterall, 2000)



**Figure 8 :**

Mécanisme d'inactivation des canaux potassiques de type Shaker suite à l'occlusion du pore par la région du N-terminal. (Stotz et Zamponi, 2001)

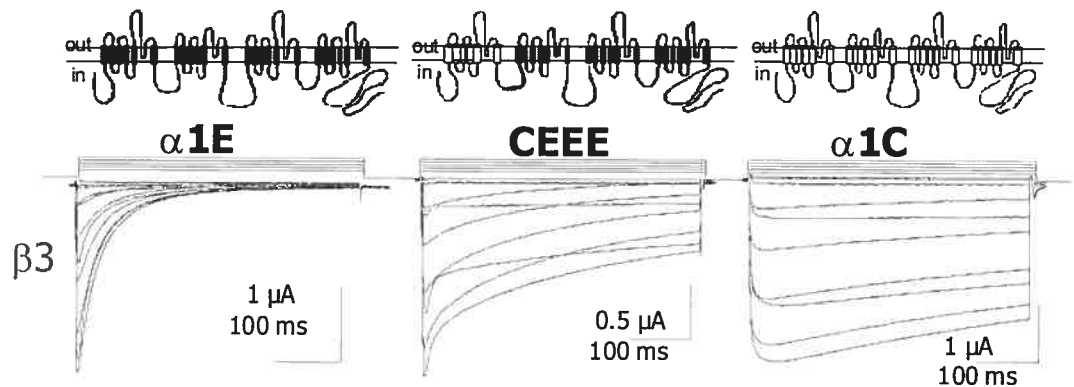
### **I.6.1 Mécanisme moléculaire de l'inactivation dépendant du potentiel membranaire**

Des études menées dans notre groupe ont montré que la construction d'une chimère CEEE (Figure 9), soit le premier domaine et une partie de la boucle I-II du canal  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) à cinétique d'inactivation lente et les trois autres domaines du canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) à cinétique d'inactivation rapide, produit des courants aux propriétés d'inactivation similaires au canal  $Ca_v1.2$ , quoique CEEE présente plus de 90% d'homologie avec le canal  $Ca_v2.3$ . Par ailleurs, la chimère EC(AID)EEE, contenant le domaine d'interaction entre les sous-unités  $Ca_v\alpha1$  et  $Ca_v\beta$  (AID) du canal  $\alpha1C$ , se comporte plutôt comme ce dernier en terme de cinétiques d'inactivation et de dépendance au potentiel.

Ces études montrent que la boucle cytoplasmique qui relie IS6 à IIS1 contient des structures moléculaires qui jouent un rôle essentiel dans l'inactivation du canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) (Bernatchez et al., 2001a; Berrou et al., 2001).

D'autres études utilisant également la méthode de chimère entre des canaux à différents taux d'inactivation ont montré que le segment IS6 incluant la boucle I-II joue un rôle essentiel dans l'inactivation dépendante du potentiel dans les canaux calciques de type P/Q et R (Zhang et al., 1994). De même, les régions S6 des domaines II, III, et IV sont aussi impliquées dans les cinétiques d'inactivation des canaux de type-L. C'est ainsi que le groupe de G. Zamponi a montré que le transfert du segment S6 du domaine II du canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) à cinétiques rapides d'inactivation au canal  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) qui s'inactive

lentement confère à ce dernier une inactivation rapide (Stotz et al., 2000).



**Figure 9** : La chimère CEEE produit des courants dont les cinétiques d'inactivation sont intermédiaires entre celles de  $Ca_v1.2$  ( $\alpha 1C$ ) et de  $Ca_v2.3$  ( $\alpha 1E$ ) malgré le fait que CEEE soit à 90% semblable à  $\alpha 1E$  (reproduit de Bernatchez et al., 2001a).

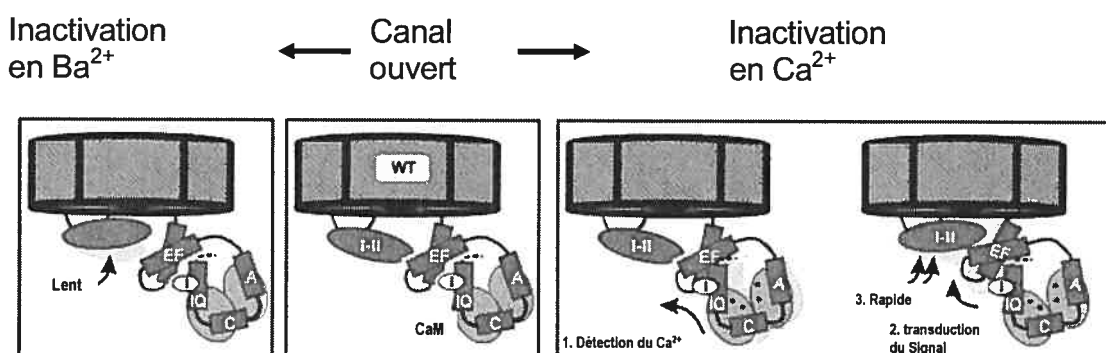
### 1.6.2 Mécanisme moléculaire de l'inactivation dépendant du calcium

Le déterminant majeur des cinétiques d'inactivation des canaux calciques de type-L  $Ca_v1.2$  durant la dépolarisation membranaire est un mécanisme qui dépend de l'augmentation du calcium intracellulaire. Il s'agit d'un mécanisme de rétroaction négative. Le processus de contrôle de l'entrée de calcium dans la cellule dépend de la calmoduline (CaM) qui est liée de façon endogène au canal et qui constitue le véritable senseur du calcium. L'inactivation se produit d'une part via une interaction entre la calmoduline liée et un motif IQ situé au niveau carboxy-terminal du canal; et d'autre part



à cause de la liaison du calcium sur un motif « main EF » situé approximativement à 100 acides aminés en amont du C-terminal (Peterson et al., 1999, 2000). La liaison du calcium induit un changement conformationnel qui provoque l'obstruction du pore et induit par conséquent l'inactivation du canal (Figure 10).

La calmoduline module également l'activité de certains canaux cationiques; elle permet l'inactivation des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ,  $I_{\text{CNG}}$ ,  $I_{\text{NMDA}}$ ), ainsi que l'activation de certains canaux de type K(Ca).



**Figure 10** : Modèle montrant le mécanisme d'inactivation du canal calcique  $\text{Ca}_v1.2$ .

À gauche, le potentiel induit un lent changement conformationnel qui permet à la boucle I-II d'interagir avec le pore. À droite, l'influx de calcium conduit à la formation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM qui irait se fixer sur un motif IQ au niveau C-terminal de la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$  (Kim J. et al., 2004).

## I.7 Objectifs et description du projet

Le canal calcique  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) fait partie de la famille des canaux de type L dont les cinétiques d'inactivation sont nettement plus lentes que celles du canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) qui appartient à la famille des canaux de type R. Les deux canaux sont identiques à ~ 35% au niveau de leur séquence primaire. Notre groupe a mis en évidence le rôle de la boucle cytoplasmique I-II dans l'inactivation dépendante du potentiel membranaire du canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) (Bernatchez et al., 2001a, Berrou et al., 2001). Par ailleurs, nous avons déjà montré que la mutation E462R accélère les cinétiques d'inactivation du canal  $Ca_v1.2$  (Berrou et al., 2001). Ces effets suggèrent que la boucle AID constitue une région importante dans le mécanisme d'inactivation dépendante du potentiel membranaire des canaux calciques HVA  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . Ce mécanisme s'apparente à un changement de conformation de type « hinged-lid » où la boucle cytoplasmique I-II se déplacerait physiquement pour obstruer le vestibule interne du canal en se projetant sur les segments S6 des domaines I et II.

Suite à la cristallisation récente des régions AID- $Ca_v\beta$  des canaux  $Ca_v1.1$  et  $Ca_v1.2$  de type L (Van Petegem et al., 2004; Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004), leur analyse structurale par diffraction aux rayons X a montré que, en plus de E462, les acides aminés Q458, Q459, K465, L468 et T472 du canal  $Ca_v1.2$  occupent des positions qui leur permettraient d'interagir avec d'autres protéines ou régions du canal et pourraient par conséquent contribuer au mécanisme d'inactivation de type « hinged-lid ».

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires à la base de ce mécanisme d'inactivation, nous avons procédé à des mutations ponctuelles des résidus indiqués ci-haut, au niveau de la région AID située dans la boucle cytoplasmique reliant les domaines I-II du canal  $Ca_v1.2$ . Ces mutations permettront de déterminer le rôle des résidus susceptibles d'interagir avec d'autres parties du canal.

## **II. Matériel et méthodes**

## II.1 Techniques d'ADN recombinant

Les ADNc codant pour le canal du lapin  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) de type sauvage (« GenBank X15539 »), ainsi que les ADNc de la sous-unité  $Ca_v\beta3$  (« GenBank M88751 ») et de la sous-unité  $Ca_v\beta2a$  (« GenBank M80545 ») ont été généreusement fournis par le docteur E. Perez-Reyes. La sous-unité  $Ca_v\alpha2b\delta$  (plus de 90% de similitude avec « GenBank NM\_000722 ») a été offerte par le docteur T. P. Snutch.

## II.2 Mutagenèse dirigée

Un site *XhoI* (c/tcgag) a été introduit par la technique du PCR (*polymerase chain reaction*) dans le canal  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) à la position 1530 (nt) dans la boucle cytoplasmique reliant les domaine I et II. Il s'agit d'une mutation non silencieuse qui permet de remplacer une glycine par une arginine. Le canal ainsi obtenu appelé  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) ou  $\alpha1C$  (*XhoI*) produit des cinétiques d'activation et d'inactivation similaires au canal  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) de type sauvage (Berrou et al., 2001; Bernatchez et al., 2001a). La chimère CEEE a été obtenue en remplaçant le domaine I du canal  $Ca_v2.3$  ( $\alpha1E$ ) par le domaine correspondant du canal  $Ca_v1.2$  situé entre les sites *Clal* et *XhoI* (Figure 11) (Bernatchez et al., 2001a).

Les mutations ponctuelles et doubles effectuées sur le canal  $Ca_v1.2$ , sur la chimère CEEE et sur la sous-unité  $Ca_v\beta2a$  ont été réalisées avec la trousse de mutagenèse « Quick-

Change XL » (Stratagene, LaJolla, CA) en utilisant deux oligonucléotides (amorces) de 39 paires de bases en suivant les instructions du manufacturier (Figure 12). Toutes les mutations ont été réalisées sur un fragment de la sous-unité  $\alpha 1C$  sous-cloné dans le vecteur pBluscript entre les positions 956 et 1530 (Stratagene, LaJolla, CA) en utilisant les sites natifs *SacI/XhoI*. La ligation des fragments portant la mutation désirée aux sites *SacI/XhoI* du canal  $Ca_v1.2$  de type sauvage ou de la chimère CEEE a été effectuée en présence de T4 « DNA ligase » (NEB, Mississauga, Ontario). Les constructions d'ADN ont été vérifiées par digestion enzymatique et par séquençage automatisé (Bio S&T, Lachine, Québec).

Les matrices d'ADN utilisées pour la transcription in vitro des sous-unités  $\alpha 1C$  et CEEE de type sauvage et muté ont été linéarisées à leur extrémité 3' par l'enzyme de digestion *Hind III*, alors que les sous-unités  $Ca_v\beta 3$  et  $Ca_v\beta 2a$  de cerveau de rat étaient linéarisées par l'enzyme *Not I*. L'ADN est ensuite purifié à l'aide d'une solution de phénol chloroforme. La transcription in vitro est réalisée à l'aide de la polymérase T7 de la trousse commerciale mMessage mMachine<sup>®</sup> (Ambion, Austin, TX). L'ARN est à son tour purifié par la solution de phénol chloroforme et resuspendu dans de l'eau sans ARNase. La vérification du poids moléculaire se fait par migration des ARN sur un gel (dénaturant) d'agarose révélé au bromure d'éthidium, en comparaison avec l'échelle de poids moléculaire (« RNA ladder »).

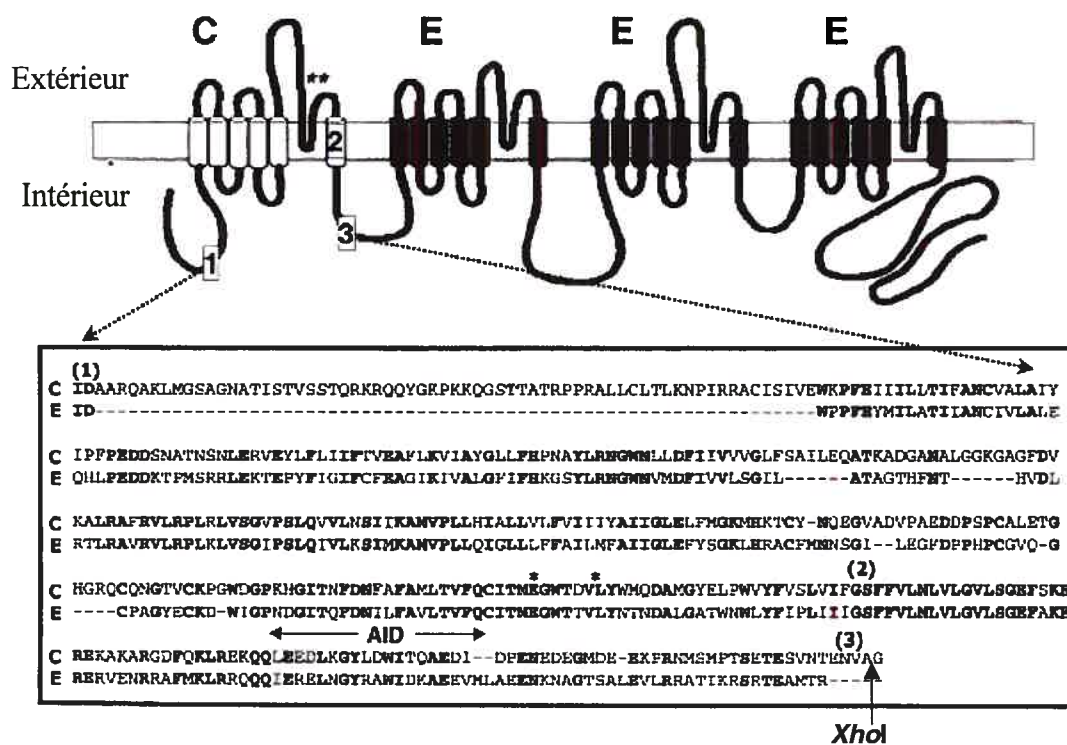


Figure 11 : La chimère CEEE a été obtenue en échangeant la région 1-3 entre les canaux Cav2.3 et Cav1.2. (Bertachez et al., 2001a)

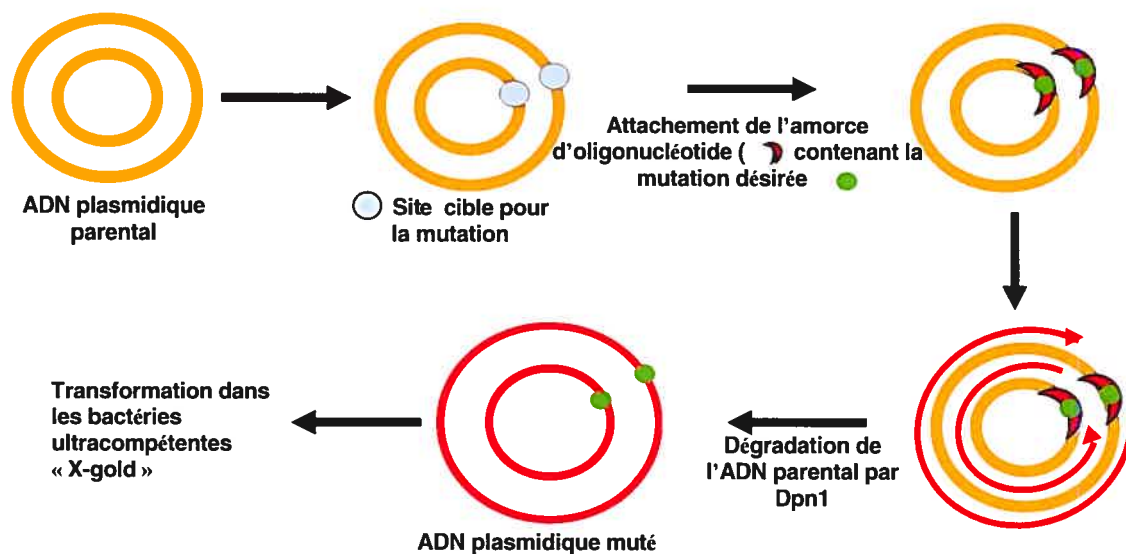


Figure 12 : Technique de mutagenèse dirigée (Stratagene, LaJolla, CA).

### II.3 Expression fonctionnelle dans les ovocytes de xénope

L'expression fonctionnelle se fait dans les œufs de xénope, *Xenopus laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI). Les œufs obtenus au stade V et VI sont incubés pendant 30 à 40 minutes dans une solution sans calcium composée (en mM) : 82.5 NaCl; 2.5 KCl; 1 MgCl<sub>2</sub>; 5 HEPES, ainsi que 2 mg/ml de collagénase (Gibco, Burlington, Ontario) qui permet d'enlever la membrane folliculaire entourant les ovocytes. Seize heures après, 46 nl d'une solution contenant entre 35 et 50 ng d'ARNc codant pour les sous-unités Ca<sub>v</sub>α1 de type sauvage ou mutés sont injectés dans les ovocytes de xénope en utilisant un micro-injecteur (WPI, Sarasota, FL). Les ARNc codants pour les sous-unités Ca<sub>v</sub>α2bδ et Ca<sub>v</sub>β3 sont co-injectés avec la sous-unité Ca<sub>v</sub>α1 dans une proportion de poids de 3 : 1 : 2 (α1 : α2bδ : β3). Dans certains cas, la sous-unité Ca<sub>v</sub>β3 a été remplacée par la sous-unité Ca<sub>v</sub>β2a de type sauvage ou la sous-unité mutée Ca<sub>v</sub>β2a C3S + C4S. L'ARNc codant pour le canal Ca<sub>v</sub>1.2 de type sauvage était souvent injecté et son expression mesurée dans les mêmes conditions expérimentales que les différents mutants pour s'assurer que les propriétés d'inactivation des canaux soient enregistrées avec le même niveau de la sous-unité endogène Ca<sub>v</sub>β3 (Lacerda et al., 1994; Tareilus et al., 1997). Finalement, les ovocytes sont incubés 3 - 4 jours à 19°C dans une solution de Barth contenant (en mM) : 100 NaCl; 2 KCl; 1.8 CaCl<sub>2</sub>; 1MgCl<sub>2</sub>; 5 HEPES; 2.5 d'acide pyruvique; 100 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de gentamicine (pH 7.6).



## II.4 Enregistrements électrophysiologiques

Les courants macroscopiques des canaux sauvages et mutés ont été enregistrés à la température ambiante (18 - 22°C) 4 à 6 jours après l'injection des ARN par la technique électrophysiologique à deux électrodes en utilisant un amplificateur à voltage imposé (OC-725, Warner Instruments, Hamden, CT). Les deux électrodes d'une résistance de 0.5 à 1.5 M $\Omega$  ont été remplies par une solution de 3M KCl, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES titrée au pH 7.4. L'une des électrodes sert à maintenir le potentiel de l'œuf à une valeur donnée, l'autre permet de mesurer les courants requis pour maintenir le potentiel constant. Les ovocytes ont été d'abord empalés dans une solution de Ringer modifiée contenant: 96 mM NaOH, 2 mM KOH, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES titrée au pH 7.4 avec l'acide méthanesulfonique (MeS). Le bain était ensuite perfusé par une solution de 10 mM Ba<sup>2+</sup> contenant (en mM) : 10 Ba(OH)<sub>2</sub>, 110 NaOH, 1 KOH, 20 HEPES titrée au pH 7.3 avec le MeS. Avant le début des expériences, les ovocytes ont été préalablement injectés avec 18.4 nl d'EGTA 50 mM (Sigma, St-Louis, MO) pour minimiser l'activation par le Ca<sup>2+</sup> des courants Cl<sup>-</sup> endogènes qui pourraient avoir des effets contaminants sur les cinétiques des courants calciques. Les ovocytes ont été perfusés par gravité à un débit de 2 ml/min.

L'acquisition et l'analyse des enregistrements recueillis ont été effectuées à l'aide du logiciel pClamp 6.02 (Axon Instrument, Foster City, CA). Les données ont été collectées à 10 kHz et filtrées à 5 kHz en utilisant le filtre intégré à l'amplificateur. Les courbes courant-voltage instantanées ont été enregistrées en utilisant des séries de signaux rectangulaires de 450 ms appliqués à partir d'un potentiel de -80 mV et à une fréquence de

0.2 Hz. Le premier voltage est imposé à -40 mV suivi par des créneaux qui augmentent à chaque fois de 10mV pour atteindre le voltage imposé de +60 mV.

La dépendance en voltage de l'inactivation a été mesurée à un potentiel test de 0 ou 10 mV après une série de prépotentiels rectangulaires de 5 s appliqués à partir d'un potentiel de -100 mV. Ces données ont été lissées à l'équation 1 de Boltzman en utilisant le logiciel Origin 6.1 (Microcal Software, Northampton, MA).

$$\frac{i}{i_{\max}} = 1 - \frac{1 - Y_0}{1 + \left\{ \exp - \frac{zF}{RT} (V_m - E_{0.5}) \right\}} \quad (1)$$

$E_{0.5}$ , potentiel de la mi-inactivation;  $z$ , pente;  $Y_0$ , fraction de courant non inactivé;  $V_m$ , prépotentiel;  $RT/F = 25$  mV;  $z$  étant la charge de l'ion (2 pour  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Les paramètres d'activation ont été estimés à partir des courbes courant-voltage moyennes. Les mesures ont été normalisées par rapport à l'amplitude maximale et ont été lissées à l'équation 2 de Boltzman.

$$\frac{i}{i_{\max}} = G_{\text{rel}} \frac{V_m - V_{\text{rev}}}{1 + \left\{ \exp - \frac{zF}{RT} (V_m - E_{0.5, \text{act}}) \right\}} \quad (2)$$

$E_{0.5}$ , potentiel de mi-activation;  $G_{\text{rel}}$ , conductance normalisée;  $z$ , pente;  $V_m$ , potentiel de test.

Les cinétiques d'inactivation ont été mesurées en utilisant les valeurs de r300 qui représentent la fraction des courants résiduels après un pulse de 300 ms.

## II.5 Préparation des figures de la structure cristalline

La structure tridimensionnelle de l'hélice AID du canal calcique  $Ca_v1.2$  du lapin a été obtenue avec le logiciel « InsightII » (version 2000, Accelrys) en utilisant comme matrice la structure cristalline du canal  $Ca_v1.2$  humain co-cristallisé avec  $Ca_v\beta2a$  (Van Petegem et al., 2004). La séquence en acides aminés est identique pour le lapin et l'humain. Les coordonnées de départ ont été prises à partir du fichier PDB 1T0B.pdb ( $Ca_v\beta2a$  + AID de  $Ca_v1.2$ ) (Van Petegem et al., 2004).

**III. ARTICLE**

Biophys J BioFAST, published on August 31, 2004

as doi:10.1529/biophysj.104.045559

**NEGATIVELY CHARGED RESIDUES  
IN THE N-TERMINAL OF THE AID HELIX CONFER  
SLOW VOLTAGE DEPENDENT INACTIVATION GATING TO Ca<sub>v</sub>1.2**

Running title: Role of the EED locus in VDI

Omar Dafi, Laurent Berrou, Yolaine Dodier,  
Alexandra Raybaud, Rémy Sauvé, Lucie Parent\*.

Département de Physiologie  
Membrane Protein Research Group  
Université de Montréal  
P.O. Box 6128, Downtown Station  
Montréal, Qué, H3C 3J7  
Canada

\* Corresponding author.

Phone: (514) 343-6673

Fax: (514) 343-7146

**Key words: Alpha-1C, L-type, Beta subunit, Regulation, Kinetics,  
Gating, Palmitoylation, Alpha interaction domain,  
Cytoplasmic linker, Hinged-lid mechanism**

**ABSTRACT**

The E462R mutation in the 5<sup>th</sup> position of the AID region in the I-II linker is known to significantly accelerate VDI kinetics of the L-type Ca<sub>v</sub>1.2 channel suggesting that the AID region could participate to a hinged-lid type inactivation mechanism in these channels. The recently solved crystal structures of the AID-Ca<sub>v</sub>β regions in L-type Ca<sub>v</sub>1.1 and Ca<sub>v</sub>1.2 channels have shown that in addition to E462, positions occupied by Q458, Q459, E461, K465, L468, D469, and T472 in the rabbit Ca<sub>v</sub>1.2 channel could also potentially contribute to a hinged-lid type mechanism. A mutational analysis of these residues show that Q458A, Q459A, K465N, L468R, D469A, and T472D did not significantly alter VDI gating. In contrast, mutations of the negatively charged E461, E462, and D463 to neutral or positively charged residues increased VDI gating suggesting that the cluster of negatively charged residues in the N-terminal end of the AID helix could account for the slower VDI kinetics of Ca<sub>v</sub>1.2. A mutational analysis at position 462 (R, K, A, G, D, N, Q) further confirmed that E462R yielded faster VDI kinetics at +10 mV than any other residue with E462R >> E462K ≈ E462A > E462N > wt ≈ E462Q ≈ E462G > E462D (from the fastest to the slowest). E462R was also found to increase the VDI gating of the slow CEEE chimera that includes the I-II linker from Ca<sub>v</sub>1.2 into a Ca<sub>v</sub>2.3 background. The fast VDI kinetics of the Ca<sub>v</sub>1.2 E462R and the CEEE + E462R mutants were abolished by Ca<sub>v</sub>β2a subunit and reinstated when using the non-palmitoylated form of Ca<sub>v</sub>β2a C3S + C4S (Ca<sub>v</sub>β2a CS) confirming that Ca<sub>v</sub>β2a and E462R modulate VDI through a common pathway albeit in opposite directions. Altogether these results highlight the unique role of E461, E462, and D463 in the I-II linker in the VDI gating of HVA Ca<sub>v</sub>1.2 channels.

## INTRODUCTION

The influx of calcium through voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels regulates a wide range of cellular processes, including contraction, activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzymes, and gene regulation. To this date, molecular cloning has identified the gene encoding for three distinct families of calcium channel  $\alpha_1$  subunits. The  $\text{Ca}_v1$  family encode the high-voltage activated (HVA) L-type channels; the  $\text{Ca}_v2$  family produces the HVA P/Q-, N-, and R-type channels whereas  $\text{Ca}_v3$  channels form the low-voltage activated T-type channels (Ertel et al., 2000; Lee et al., 1999a; Monteil et al., 2000; Piedras-Renteria and Tsien, 1998). Whereas all voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunits activate and inactivate in response to membrane depolarisation, the HVA  $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$   $\alpha_1$  subunits operate at markedly more positive membrane potentials than LVA  $\text{Ca}_v3$  channel  $\alpha_1$  subunits.

Inactivation is a distinctive feature of all voltage-gated ion channels providing a negative feedback response to prolonged depolarizations. Under physiological conditions, inactivation of the L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channel proceeds mostly in response to localized elevation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (deLeon et al., 1995; Bernatchez et al., 1998) through constitutively bound calmodulin (CaM) (Qin et al., 1999; Zuhlke et al., 1999; Peterson et al., 1999; Lee et al., 1999b). Recent observations suggest that CDI and VDI could proceed from similar molecular mechanisms since stripping off preassociated CaM (apocalmodulin) from the C-terminal results both in the ablation of CDI and in a striking acceleration of VDI (Liang et al., 2003). CaM preassociation on the C-terminal could thus be a potent determinant of VDI in  $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$  channels (Liang et al., 2003).

Voltage-dependent inactivation (VDI) has been traditionally investigated in the presence of  $Ba^{2+}$  as the charge carrier. Fast and slow VDI mechanisms have been proposed in  $Ca_v1.2$  channels based on the kinetics of  $Ba^{2+}$ -dependent inactivation. The analysis of gating currents has further shown that the fast VDI component ( $<1$  s depolarization) involves charge immobilization similar to voltage-gated  $Na^+$  and  $K^+$  channels (Ferreira et al., 2003) suggesting that cationic selective voltage-gated channels share similar structural mechanisms of VDI. As in voltage-gated  $K^+$  channels (Liu et al., 1996), mutations in the pore region (IIS6, IIIS6 and IVS6) of  $Ca_v1.2$  have been shown to slow VDI gating (Hering et al., 1996; Hering et al., 1998; Stotz et al., 2000; Stotz and Zamponi, 2001; Berjukow and Hering, 2001; Shi and Soldatov, 2002). In addition to C-type inactivation, a hinged-lid type mechanism could contribute to the fast VDI gating in HVA  $Ca_v1$  and  $Ca_v2$  channels (see for review, (Stotz et al., 2004)). Molecular studies have rapidly converged towards the high-affinity  $Ca_v\beta$  subunit binding site AID (alpha-1 subunit interaction domain) in the I-II linker of HVA  $Ca_v$  channels (Page et al., 1997; Herlitze et al., 1997; Cens et al., 1999; Stotz et al., 2000; Bernatchez et al., 2001a,b; Berrou et al., 2001). The AID region displays a high degree of identity between the HVA  $Ca_v1$  and  $Ca_v2$  families with 10 out of 18 residues being strictly conserved (see Fig 2A). We have shown that introducing negatively charged residues at the fifth position of the AID region significantly decreased the VDI kinetics and voltage-dependence of  $Ca_v2.3$  whereas the combined mutations of other nonconserved residues had little impact on VDI gating (Berrou et al., 2001). These observations have led to the attractive suggestion that the AID region forms a blocking particle contributing to a hinged-lid type inactivation mechanism in HVA  $Ca_v2$  channels (Stotz et al., 2004; Kim et



al., 2004). The presence of a negatively charged residue at the equivalent position in L-type  $\text{Ca}_v1.2$  is believed to account for the slower VDI kinetics in this channel although in that case, the data have long been limited to the single E462R mutation (Herlitze et al., 1997; Berrou et al., 2001).

In the recently solved crystal structures of the AID- $\text{Ca}_v\beta$  regions in L-type  $\text{Ca}_v1.1$  and  $\text{Ca}_v1.2$  channels (Van Petegem et al., 2004; Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004), the AID region adopts an  $\alpha$ -helical structure upon binding to the  $\text{Ca}_v\beta$  subunit with hydrophilic residues lined up exclusively on the face of the helix opposite to  $\text{Ca}_v\beta$  (Fig. 1). The hydrophilic E462 was thus shown to be correctly positioned to interact with other proteins and / or regions of the channel as postulated in a hinged-lid type inactivation mechanism. According to the published 3-D structures, the side-chains of Q458, Q459, E461, K465, D469, and T472 are equally available and poised to interact with other proteins / regions of the channel. In this regard, Q458, Q459, and E461 residues are strictly conserved between  $\text{Ca}_v1$  and  $\text{Ca}_v2$  families and were consequently believed to participate to  $\text{Ca}_v\beta$  binding. Their role in VDI gating was never investigated before.

Given that the I-II linker has been proposed as a universal gating particle in both HVA  $\text{Ca}_v1$  (Erickson et al., 2003) and  $\text{Ca}_v2$  channels, we undertook a detailed mutational analysis of the structural determinants underlying VDI within the I-II linker of  $\text{Ca}_v1.2$ . Point mutations Q458A, Q459A, K465N, L468R, D469A, T472D, and Q473K did not significantly increase VDI gating. In contrast, mutations of the negatively charged E461, E462, and D463 to neutral or positively charged residues increased VDI gating suggesting

that the cluster of negatively charged residues in the N-terminal end of the AID helix could account for the slower VDI kinetics of L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels.

## MATERIAL AND METHODS

**Recombinant DNA techniques.** cDNAs coding for wild-type rabbit  $Ca_v1.2$  (GenBank X15539), rat  $Ca_v\beta3$  (Genbank M88751) (Castellano et al., 1993), and rat  $Ca_v\beta2a$  (Genbank M80545) were kindly donated by Dr. E. Perez-Reyes (University of Virginia). The wild-type human  $Ca_v2.3$  (GenBank L27745) was a gift from Dr T. Schneider (University of Köln). The rat brain  $Ca_v \alpha2b\delta$  subunit provided by Dr. T.P. Snutch (University of British Columbia) is > 90% similar to Genbank NM\_000722 (Williams et al., 1992).

Point mutations in  $Ca_v1.2$ , CEEE, and  $Ca_v\beta2a$  were obtained with the Quick-Change XL-mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) using 39 bp primers. The CEEE chimera was constructed using the  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) channel as described previously (Bernatchez et al., 2001a).  $Ca_v1.2$  and CEEE mutations were performed by cassette cloning using the naturally occurring *SacI* (956) site and the *XhoI* site that was engineered at position 1530 nt in the I-II linker of  $Ca_v1.2$  (42 residues before IIS1) (Berrou et al., 2001; Bernatchez et al., 2001a). This is a non-silent mutation creating a Gly to Arg mutation (G511R). The resulting  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) channel (that will be referred to herein as  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) wt) displayed inactivation and activation kinetics similar to the wild-type  $Ca_v1.2$  (Berrou et al., 2001; Bernatchez et al., 2001a) (Fig 2). Constructs were verified by restriction mapping after religation of the mutated fragment into the *SacI* / *XhoI* sites of the wild-type  $Ca_v1.2$  and the CEEE chimera. Recombinant clones were screened by double-stranded sequence analysis of the entire ligated cassette. cDNA constructs for the wild-type and mutated  $Ca_v1.2$  subunits were linearized at the 3' end by *Hind III* digestion, whereas

the rat brain  $\text{Ca}_v\beta 3$  and  $\text{Ca}_v\beta 2a$  subunits were digested by *Not I*. Run-off transcripts were prepared using methylated cap analog  $m^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{G}$  and T7 RNA polymerase with the mMessage mMachine<sup>®</sup> transcription kit (Ambion, Austin, TX). The final cRNA products were resuspended in DEPC-treated  $\text{H}_2\text{O}$  and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The integrity of the final product and the absence of degraded RNA were determined by a denaturing agarose gel stained with ethidium bromide.

**Functional expression of wild-type and mutants channels.** Oocytes were obtained from female *Xenopus laevis* clawed frog (Nasco, Fort Atkinson, WI) as described previously (Berrou et al., 2002; Parent et al., 1997,1995). Individual oocytes free of follicular cells were obtained after 30-40 minutes incubation in a calcium-free solution (in mM: 82.5 NaCl; 2.5 KCl; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 5 HEPES; pH 7.6) containing 2 mg/ml collagenase (Gibco, Burlington, Ontario, Canada). A solution of 46 nl containing between 35 and 50 ng of cRNA coding for the wild-type or mutated  $\alpha 1$  subunit was injected 16 hours later into stage V and VI oocytes. cRNA coding for rat brain  $\text{Ca}_v\alpha 2b\delta$  and rat brain  $\text{Ca}_v\beta 3$  were co-injected with the  $\alpha 1$  subunit at a 3:1:2 weight ratio. In some cases, the wild-type  $\text{Ca}_v\beta 2a$  or the  $\text{Ca}_v\beta 2a$  C3S + C4S (referred to as  $\text{Ca}_v\beta 2a$  CS) mutant replaced the  $\text{Ca}_v\beta 3$  subunit. Oocytes were incubated at  $19^\circ\text{C}$  in a Barth's solution (in mM): 100 NaCl; 2 KCl; 1.8  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 5 HEPES; 2.5 pyruvic acid; 100 units/ml of penicillin; 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin (pH 7.6). The inactivation properties of each mutant channel herein described was studied in a minimum of 3 different oocyte batches. Furthermore, the wild-type channel was always measured under the same experimental conditions with every new mutant, thus insuring that the inactivation properties of the channels would be recorded

under the same level of endogenous  $\text{Ca}_v\beta$  subunits (Lacerda et al., 1994; Tareilus et al., 1997).

**Electrophysiological recordings in oocytes.** Wild-type and mutant channels were screened at room temperature for macroscopic barium current 4 - 6 days after RNA injection using a two-electrode voltage-clamp amplifier (OC-725C, Warner Instruments, Hamden, CT) as described earlier (Berrou et al., 2001; Bernatchez et al., 2001a; Parent et al., 1997). Voltage and current electrodes were filled with 3 M KCl; 1 mM EGTA; 10 mM HEPES (pH 7.4). Whole-cell currents were measured in a 10  $\text{Ba}^{2+}$  solution (in mM; 10  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; 110 NaOH; 1 KOH; 20 Hepes titrated to pH 7.3 with methane sulfonic acid (MeS)) or exceptionally a 10  $\text{Ca}^{2+}$  solution where  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  replaced  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . To minimize kinetic contamination by the endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{Cl}^-$  current, oocytes were injected with 18.4 nl of a 50 mM EGTA (ethylene glycol- bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) (Sigma, St-Louis, MO) 0.5 - 2 hours before the experiments. Oocytes were superfused by gravity flow at a rate of 2 ml/min that was fast enough to allow complete chamber fluid exchange within 30 seconds. Experiments were performed at room temperature (20 – 22°C).

**Data Acquisition and Analysis.** PClamp software 6.02 (Axon instruments, Foster City, CA) was used for on-line data acquisition and analysis. Unless stated otherwise, data were sampled at 10 kHz and low pass filtered at 5 kHz using the amplifier built-in filter. For all recordings, a series of 450-ms voltage pulses were applied from a holding potential of -80 mV at a frequency of 0.2 Hz from -40 to +60 mV. Isochronal

inactivation data (h 5000) were obtained from normalized currents measured at 0 or +10 mV after a series of 5 sec prepulses that varied from -100 to +30 mV (Berrou et al., 2001; Bernatchez et al., 2001a). For the isochronal inactivation figures, data points represent the mean of  $n \geq 5$  and were fitted to the Boltzmann equation 1.

$$\frac{i}{i_{\max}} = 1 - \frac{1 - Y_0}{1 + \left\{ \exp - \frac{zF}{RT} (V_m - E_{0.5}) \right\}} \quad (1)$$

Pooled data points (mean  $\pm$  S.E.M.) were fitted to equation 1 using user-defined functions and the fitting algorithms provided by Origin 6.1 (Microcal Software) analysis software. Equation 1 accounts for the fraction of non-inactivating current with  $E_{0.5}$ , mid-point potential;  $z$ , slope parameter;  $Y_0$ , fraction of non-inactivating current;  $V_m$ , the prepulse potential, and  $RT/F$  with their usual meanings. The fitting process generated values estimating errors on the given fit values.

Activation parameters were estimated from the mean I-V curves obtained for each channel combination. The I-V relationships were normalized to the maximum amplitude and were fitted to the Boltzmann equation 2.

$$\frac{i}{i_{\max}} = G_{rel} \frac{V_m - V_{rev}}{1 + \left\{ \exp - \frac{zF}{RT} (V_m - E_{0.5,act}) \right\}} \quad (2)$$

$E_{0.5}$  is the potential for 50 % activation ;  $G_{rel}$  is the normalized conductance;  $z$ , slope parameter;  $V_m$ , the test potential, and  $RT/F$  with their usual meanings. The fitting process generated values estimating errors on the given fit values.

Inactivation kinetics were quantified using  $r_{300}$  values, that is the ratio of the whole-cell current remaining at the end of a 300 ms pulse. Capacitive transients were erased for clarity in the final figures. Statistical analyses were performed using the Student t-test for two independent populations fitting routines provided by Origin 6.1 (Microcal Software, Northampton, MA).

## RESULTS

### Accessible residues in the AID helix contributes to VDI in Ca<sub>v</sub>1.2

The AID region of the rabbit Ca<sub>v</sub>1.2 channel **QQLEEDLKG**YLDWITQAE with conserved residues shown in bold letters, forms an  $\alpha$ -helix upon binding to Ca<sub>v</sub> $\beta$  subunits (Van Petegem et al., 2004; Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004). In the three-dimensional representation shown in Figure 1B, Y467, W470, and I471 are seen to be buried in the Ca<sub>v</sub> $\beta$  subunit-fold and unavailable to interact with other proteins. In contrast, Q458, Q459, E461, E462, K465, L468, D469, T472, and Q473 line the face of the helix opposite to the Ca<sub>v</sub> $\beta$  subunit (Fig 1B) and appear to remain fairly accessible even in the presence of Ca<sub>v</sub> $\beta$ . In fact, no interaction could be detected between Q458, Q459, E461, E462, K465, D469, or T472 and the Ca<sub>v</sub> $\beta$  subunit in any of the three crystal structures of the AID region (Van Petegem et al., 2004; Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004). To investigate the role of these free residues in a hinged-lid type inactivation mechanism, alanine residues were introduced at the positions occupied by conserved residues (Q458A, Q459A, and E461A) whereas nonconserved residues were mutated to their equivalent in Ca<sub>v</sub>2.3 channels (E462R, K465N, L468R, D469A, T472D, and Q473K) (Fig 2A). Except for Q458A and Q459A, all point mutations involve a change in the net charge carried by the residue. Mutant channels were co-expressed with Ca<sub>v</sub> $\beta$ 3 that emphasizes closed-state inactivation (Patil et al., 1998). Robust Ba<sup>2+</sup> currents were measured for all mutants (Fig 2B) (see Table I for details). As shown in the r300 analysis of Fig 2C, E461A inactivated significantly faster than the parent Ca<sub>v</sub>1.2 (*Xho*I) wt channel ( $p < 0.001$ ) although it remained slightly slower than E462R ( $p < 0.01$ ). In contrast, Q458A (not shown), Q459A



(not shown), and D469A were similar to  $Ca_v1.2$  whereas K465N, L468R, T472D, and Q473K mutants were significantly slower than the wt channel ( $p < 0.01$ ).

The voltage-dependence was not significantly altered although the fraction of the noninactivating current remaining after the 5-s prepulses varied significantly among mutants (Fig 2D). The least inactivated mutants include T472D and K465N with fractional residual currents as high as  $0.46 \pm 0.03$  (9) and  $0.46 \pm 0.05$  (10) respectively at +10 mV. L468R and Q473K form a second group with fractional residual currents of  $0.38 \pm 0.04$  (7) and  $0.30 \pm 0.03$  (15). Under the same experimental conditions, inactivation was almost complete for E461A, E462R, and D469A with fractional currents of  $0.14 \pm 0.02$  (10),  $0.09 \pm 0.01$  (19), and  $0.11 \pm 0.03$  (5) respectively as compared with  $0.20 \pm 0.02$  (19) for the parent channel  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) wt. These data show that mutations of two consecutive residues E461 and E462 in the N-terminal end of the AID helix accelerate VDI gating, whereas any mutation in the C-terminal region tends to decrease VDI gating.

#### **Alanine scan of the N-terminal end of the AID helix**

To further assess the role of the N-terminal end of the AID region, the VDI gating of four consecutive residues from 461 to 464 were analyzed with alanine mutants (Fig 3A). As seen, the E461A, E462A, and D463A (EED) mutants displayed  $Ba^{2+}$ -dependent kinetics that were faster than the  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) wt and more clearly voltage-dependent (Fig 3B). The behavior of the EED cluster contrasts with the relatively normal VDI kinetics of the neighboring L464A mutant. The faster VDI kinetics of E461A, E462A, and D463A were further echoed in the lower residual currents of  $0.14 \pm 0.02$  (10),  $0.09 \pm 0.02$  (6), and

$0.07 \pm 0.01$  (8) respectively of their isochronal inactivation curve (Fig 3C) (Table D). Altogether these data suggest that the cluster of negatively charged residues in the N-terminal end of the AID helix could account for the slower VDI kinetics of  $Ca_v1.2$ . Although the VDI kinetics of the D463A mutant were significantly faster than the wild-type channel, the D463R mutant (not shown) behaved like the wild-type channel indicating that effect of the arginine mutation is specific to position 462.

### **Positive and neutral residues at position E462 in the AID region increase VDI gating**

The structural requirements for increased VDI kinetics at position E462 were investigated with E462R, E462K, E462Q, E462N, E462A, E462G, and E462D mutants. The salient features are shown in Figure 4A. As previously reported, E462R inactivated significantly faster than the wild-type  $Ca_v1.2$  and the  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) wt channel ( $p < 10^{-16}$ ) between 0 and + 20 mV (Berrou et al., 2001). Herein we further show that E462R displayed faster VDI gating than any other point mutation including the positively charged E462K (Fig 4B). The positively charged E462K nonetheless inactivated significantly faster than the parent  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) wt channel at all voltages ( $p < 10^{-3}$ ) although the increased VDI kinetics were heightened by depolarization to + 20 mV. The VDI gating of the neutral-substituted residues E462A, E462N, E462Q, and E462G varied widely. The hydrophobic E462A behaved mostly like the positively charged E462K whereas E462G was closer to the parent channel. The VDI kinetics of hydrophilic E462N and E462Q were similar to the parent channel at 0 mV but depolarization to + 20 mV specifically increased the kinetics of E462N to the level of E462K and E462A. Finally, the E462D mutant

inactivated significantly slower than the parent channel ( $p < 10^{-4}$ ). The changes in the VDI kinetics occurred without any significant shift in the voltage-dependence of activation (Table I).

The voltage-dependence of inactivation was measured after 5 s depolarizing prepulses (Fig 4C). The mid-potential of inactivation was not significantly altered for most E462 mutations with values ranging from  $-19 \pm 1$  mV (7) for E462G channels to  $-24 \pm 1$  mV (19) for E462R. Inactivation was more complete for the E462R and the E462A channels than for the parent  $\text{Ca}_v1.2$  (*Xhol*) wt channel echoing the inactivation kinetics data obtained at +10mV. E462D was the least inactivated mutant with fractional residual currents of  $0.36 \pm 0.03$  (12) whereas E462G, E462N, and E462Q clustered around a fractional current of  $\approx 0.26$  (Table I). Altogether, these results depict the complex relations between the VDI kinetics and the charge, the size, and the hydrophilicity of the residue at position 462. The arginine - substituted E462R displayed faster VDI gating than the similarly positively charged E462K followed closely by the neutral and hydrophobic E462A mutant. E462G behaved like the wild-type channel between 0 and +20 mV. The VDI kinetics of the neutral and hydrophilic E462N and E462Q were similar at 0 mV but differed significantly at + 20 mV ( $p < 0.01$ ). In contrast, the conservative mutation E462D resulted in a channel with slower VDI kinetics than the wild-type channel.

### **E462R restores fast VDI gating to the CEEE chimera**

The hinged-lid mechanism supposes that the I-II linker will dock onto its receptor site thereby stopping the flow of ions. To investigate the structural determinants involved in the docking of the inactivating particle, E462 mutations were introduced in the slow CEEE chimera. The CEEE chimera encompasses Domain I + part of the I-II linker of  $Ca_v1.2$  including the whole AID region with its EED cluster in the N-terminal end, inserted into the  $Ca_v2.3$  host channel. Typical recordings are shown in Figure 5A for the CEEE, CEEE + E462R, and CEEE+ E462R+ Q473K constructs with the corresponding r300 analysis in Fig 5B. As seen in  $Ca_v1.2$ , the E462R and E462K mutations significantly accelerated the inactivation kinetics of CEEE at  $10^{-10} < p < 10^{-15}$  for voltages between 0 and + 20 mV but E462R remained more potent than E462K at  $V_m = -10$  and 0 mV ( $p < 10^{-3}$ ). The introduction of the E462R mutation significantly hyperpolarized the voltage-dependence of inactivation from  $E_{0.5} = -19 \pm 2$  (13) mV for CEEE to  $E_{0.5} = -35 \pm 1$  (17) mV for CEEE + E462R and decreased the fraction of the noninactivating current from  $0.15 \pm 0.01$  (13) to  $0.02 \pm 0.01$  (17) (Fig 5C). The mid-potential of inactivation in CEEE + E462R channels remained however more positive than the mid-potential of inactivation in the wild-type  $Ca_v2.3$  suggesting that all four domains are required to fully account for the voltage-dependence of inactivation. Furthermore, the stability of the inactivated state was not significantly affected by the introduction of the E462R mutation in the CEEE background. The time course of recovery from inactivation was well described by a sum of two exponential functions in both cases with a dominant fast time constant  $\tau_{REC} = 73 \pm 5$  ms (6) for CEEE + E462R that is comparable with the fast  $\tau_{REC} = 63 \pm 4$  ms (4) published previously for CEEE (Bernatchez et al., 2001b). The Q473K mutation had little impact on

the VDI kinetics and voltage-dependence of CEEE but the double E462R + Q473K mutation produced channels with VDI kinetics and voltage-dependence that are intermediary between CEEE and CEEE + E462R. The complete set of values is shown in Table II. Altogether, mutations at position E462 altered to the same extent the VDI gating of the CEEE chimera and the  $Ca_v1.2$  channel. These data indicate that the properties of the docking site are not rate limiting for VDI gating. Alternatively, it could also suggest that the docking site is contained within Domain I or else is strictly conserved between  $Ca_v1.2$  and  $Ca_v2.3$ .

**$Ca_v\beta2a$  abolished whereas  $Ca_v\beta2a$  C3S + C4S restored the fast VDI gating of E462R**

Coexpression of the auxiliary subunit  $Ca_v\beta2a$  with HVA  $\alpha1$  subunits such as  $Ca_v1.2$  (Chien and Hosey, 1998; Takahashi et al., 2003),  $Ca_v2.1$  (Restituito et al., 2000),  $Ca_v2.2$  (Stephens et al., 2000; Takahashi et al., 2003) and  $Ca_v2.3$  (Parent et al., 1997; Qin et al., 1998) is known to nearly eliminate VDI. The  $Ca_v\beta2a$ -mediated decrease in VDI kinetics is caused through the formation of a thioester bond with 3C and 4C in the N-terminus of  $Ca_v\beta2a$  (Chien et al., 1996). The palmitoylation of  $Ca_v\beta2a$  occurs in mammalian cells (Chien et al., 1996) as well as in *Xenopus* oocytes (Qin et al., 1998). The C3S + C4S mutations in  $Ca_v\beta2a$  eliminated the membrane anchoring of  $Ca_v\beta2a$  (Chien et al., 1996) while recovering the fast inactivation kinetics of  $Ca_v2.1$  (Restituito et al., 2000),  $Ca_v2.2$  (Stephens et al., 2000), and  $Ca_v2.3$  (Qin et al., 1998).

To test the hypothesis that E462R promotes the mobility of the inactivation gate,

the inactivation properties of  $\text{Ca}_v1.2$  E462R and CEEE + E462R were tested with either  $\text{Ca}_v\beta2a$  or  $\text{Ca}_v\beta2a$  C3S + C4S mutant ( $\text{Ca}_v\beta2a$  CS) as the auxiliary subunit (Fig. 6). As compared with  $\text{Ca}_v\beta3$ , co-expression with  $\text{Ca}_v\beta2a$  significantly decreased the VDI kinetics of  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.2$  E462R, CEEE, and CEEE + E462R (Fig 6C-D) and nearly abolished their voltage-dependence (Table III). Despite the retardation effect of  $\text{Ca}_v\beta2a$ , the VDI gating of the E462R mutant in  $\text{Ca}_v1.2$  and the CEEE + E462R channel remained faster than their respective parent channels  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*) wt ( $p < 0.05$ ) (Fig 6C) and CEEE ( $p < 0.001$ ) (Fig 6D). Although the VDI kinetics of  $\text{Ca}_v1.2$  E462R were faster in the presence of  $\text{Ca}_v\beta2a$  than in the presence of the wild-type  $\text{Ca}_v\beta2a$ , they remained however significantly slower than VDI kinetics measured with  $\text{Ca}_v\beta3$  especially at 0 and +10 mV ( $p < 0.001$ ) (Fig 6C).

Similar observations were made for the CEEE + E462R chimera (Fig 6B). The VDI properties of CEEE were similar whether measured with  $\text{Ca}_v\beta2a$  and the palmitoylated-deficient  $\text{Ca}_v\beta2a$  subunit (Fig 6D). Co-injection with  $\text{Ca}_v\beta2a$  CS significantly accelerated the VDI kinetics as well as significantly shifting by  $-10$  mV the voltage-dependence of inactivation of CEEE + E462R when comparing the same construct with the wt  $\text{Ca}_v\beta2a$  (Table III). Nonetheless, the co-injection with  $\text{Ca}_v\beta2a$  CS did not restore the VDI kinetics of CEEE + E462R to the level of  $\text{Ca}_v\beta3$ -injected oocytes. A similar observation has been reported for the  $\text{Ca}_v2.3$  channel where the time course of inactivation of  $\text{Ca}_v2.3$  +  $\text{Ca}_v\beta2a$  CS channels remained slower than with  $\text{Ca}_v2.3$  +  $\text{Ca}_v\beta3$  channels (Qin et al., 1998) indicating that palmitoylation alone does not account completely for the difference between  $\text{Ca}_v\beta2a$  and  $\text{Ca}_v\beta3$ . The difference between  $\text{Ca}_v\beta2a$

CS- and Ca<sub>v</sub>β3- inactivated channels was carried over in the voltage-dependence of inactivation with E<sub>0.5</sub> values decreasing from  $-27.3 \pm 0.5$  mV (12) with Ca<sub>v</sub>β2a, to E<sub>0.5</sub> =  $-32.2 \pm 0.4$  mV (16) without Ca<sub>v</sub>β, to E<sub>0.5</sub> =  $-33.6 \pm 0.7$  mV (6) with Ca<sub>v</sub>β2a CS, and to E<sub>0.5</sub> =  $-35.4 \pm 0.2$  mV (17) with Ca<sub>v</sub>β3. Altogether, these observations confirm that Ca<sub>v</sub>β2a and E462R modulate VDI through common structural determinants and further suggest that the presence of a positively charged Arg residue at the fifth position of the AID region could promote the mobility of the I-II linker in Ca<sub>v</sub>1.2.

## DISCUSSION

### **The role of the EED cluster in the VDI gating of Cav1.2**

Before this work, the role of the I-II linker in the VDI gating of Cav1.2 was embodied in the single-point mutation E462R that was shown by the group of Catterall (Herlitze et al., 1997) and later by us (Berrou et al., 2001) to promote faster Ba<sup>2+</sup>-dependent inactivation. The crystal structures of the AID-Cav $\beta$  complex from L-type Cav1.1 and Cav1.2 channels (Van Petegem et al., 2004; Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004) have confirmed that the side-chain of E462 projects in the direction opposite to Cav $\beta$  and could hence participate to VDI through a hinged-lid type mechanism. In addition to E462, the side-chains of Q458, Q459, E461, K465, L468, D469, and T472 in the AID region were also found to line the hydrophilic face of the AID helix where they could also potentially contribute to a hinged-lid type mechanism. Herein we have shown that charge mutations in the C-terminal end of the AID helix, namely K465N, L468R, D469A, and T472D failed to increase significantly the VDI gating kinetics. In contrast, charge mutations in the EED cluster (E461, E462, D463) increased VDI kinetics suggesting that negatively charged residues in the N-terminal end of the AID helix could account for the slower VDI kinetics of Cav1.2. The increase in the rate of inactivation of E462R was observed without any significant change in the rate of recovery from inactivation (Bernatchez et al., 2001b). Despite the increased VDI gating of E461A, E462R, and D463A, their voltage-dependence of activation and their voltage-dependence of inactivation were not significantly altered. It is worth noting that we had previously reported (Berrou et al., 2001) a steep increase in the slope and a -10 mV shift in the



voltage-dependence of inactivation for the E462R mutant that were never reproduced in the course of the last four years.

The concentration of negative charges in the EED cluster makes it an interesting candidate for an inactivating particle that could sense changes in the local electrical field. One can envision that the EED cluster interacts with another region of the channel under resting conditions. The stability of the AID helix – channel interaction could be enhanced by negatively charged residues and could consequently modulate the rate at which the I-II linker detaches itself from the interaction site and blocks the channel. The observation that the kinetics of recovery from inactivation were not affected suggests indeed that the EED mutations were not altering the affinity between the inactivating particle and the pore anchoring region (Isacoff et al., 1991; Zhou et al., 2001).

The role of the EED cluster appears to be unique to the L-type  $\text{Ca}_v1.2$ . In  $\text{Ca}_v2.1$  channels, positive or neutral residues at positions 387 and 388, equivalent to E462 and D463 in  $\text{Ca}_v1.2$ , were found to increase VDI gating only when measured in the absence of  $\text{Ca}_v\beta$  (Sandoz et al., 2004) in contrast to the observations reported here. In  $\text{Ca}_v2.3$  channels, the decrease in VDI gating observed with negatively charged residues at R378 (Berrou et al., 2001, 2002) was restricted to that residue since the VDI gating of adjacent residues E377A and E379A was normal (L. Berrou, Y. Dodier, A. Raybaud, A. Tousignant, O. Dafi, J. Pelletier, and L. Parent, unpublished data). In contrast, our data suggest that even neutral substitutions in the EED locus could promote a faster VDI gating of  $\text{Ca}_v1.2$  channels.

Within the EED cluster, D463 is the only residue facing the  $\text{Ca}_v\beta$  subunit (Van Petegem et al., 2004; Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004). It thus remains possible that the increased VDI kinetics we observed with D463A result from a change in the interaction between the AID region and  $\text{Ca}_v\beta 3$ . Charged mutations are indeed likely to modify the formation of hydrogen bonds that exist between D463 and  $\text{Ca}_v\beta 3$  (Chen et al., 2004) or at least the nature of electrostatic interactions between the two proteins. It remains to be seen whether the Asp to Ala mutation at this position could alter the protein conformation to such an extent that it could release the side-chain of D463 from the  $\text{Ca}_v\beta$  fold. Evidently, the accelerating effect observed with a  $\text{Ca}_v\beta$ -interacting AID residue appears to be specific to D463. When measured under the same experimental conditions, the VDI gating of the interacting residues L464, G466, Y467, and I471 were not altered by mutations with an alanine residue (Fig 3 and *unpublished data*). Furthermore, there is no information available hinting that mutations at the fifth position of the AID region could significantly alter  $\text{Ca}_v\beta$ -subunit binding onto  $\text{Ca}_v 1.2$ . At least under denaturing conditions, the Arg to Glu mutation (R378E) at the same position in  $\text{Ca}_v 2.3$  did not decrease the [ $^{35}\text{S}$ ]- $\text{Ca}_v\beta 3$  subunit overlay binding to  $\text{GST}_{\text{AID}}$ -fusion proteins in contrast to mutations of the conserved Trp residue that disrupted both the  $\text{Ca}_v\beta$ -subunit binding and  $\text{Ca}_v\beta$ -subunit modulation of  $\text{Ca}_v 2.3$  (Berrou et al., 2002).

#### **Mutations of E462 restore fast VDI gating to the CEEE chimera**

E462 mutations significantly increased VDI gating to the CEEE chimera following the same order of potency seen with  $\text{Ca}_v 1.2$ , namely  $\text{E462R} > \text{E462K} \approx \text{E462A}$ .

This observation confirms that a positively charged Arg at the fifth position in the AID motif is critical to confer fast VDI gating in both  $Ca_v1.2$  and  $Ca_v2.3$  and strongly indicates that the I-II linker is the single most important determinant in this process even when possibly acting in concert with other cytoplasmic linkers (Sandoz et al., 2004). Furthermore, since the increase in VDI kinetics was similar in both channel background, our data suggest that the interaction between the AID helix and the channel pore is either not the rate limiting step for VDI gating or else that this interaction is taking place within Domain I.

The E462R mutation increased the voltage-dependence of inactivation by imparting a  $-15$  mV shift in steady-state inactivation of CEEE whereas the same mutation failed to affect the inactivation curves of  $Ca_v1.2$ . The observation that the voltage-dependence of inactivation of E462R was affected by the host channel could stem from the intrinsic voltage-dependent properties in  $Ca_v1$  versus  $Ca_v2$  channels. Mutations in IVS5, IIS6, IIS6, and IVS6 were reported to decrease VDI kinetics of  $Ca_v1.2$  without any significant change in its voltage-dependence of inactivation (Bodi et al., 2002; Shi and Soldatov, 2002). In one case, the acceleration of VDI kinetics brought by the F823A mutation in the IIS6 region of the rat  $Ca_v1.2$  was accompanied by the hyperpolarization of both the voltage-dependence of activation and the voltage-dependence of inactivation (Stotz and Zamponi, 2001). Moreover, Herlitze and coll. pointed out that the conversion of QXXEE to QXXER in  $Ca_v1.2$  ( $\alpha1C$ ) produced “effects (that) are not as large as the effects of the converse mutation in  $Ca_v2.1$  ( $\alpha1A$ )” (Herlitze et al., 1997). Hence in contrast to

Ca<sub>v</sub>1.2, the charge mutations at the fifth position of the AID region in Ca<sub>v</sub>2.3 and Ca<sub>v</sub>2.1 channels caused a significant decrease in VDI kinetics accompanied by a robust +20 mV shift the voltage-dependence of inactivation (Herlitz et al., 1997).

### **Mutations of E462 confers greater mobility to the inactivation gate**

In order to confirm the hypothesis that E462 constitutes an intrinsic component of the inactivation gate, the inactivation properties of Ca<sub>v</sub>1.2 E462R and CEEE + E462R were tested with Ca<sub>v</sub>β2a and its nonpalmitoylated form Ca<sub>v</sub>β2a CS. Ca<sub>v</sub>β2a locks the Ca<sub>v</sub>α1 subunit in a rigid conformation that slows down VDI gating whereas the Ca<sub>v</sub>β2a CS mutant could effectively counter that effect (Chien et al., 1996). Co-expression with Ca<sub>v</sub>β2a was shown herein to abolish the faster VDI kinetics of E462R in both Ca<sub>v</sub>1.2 and the CEEE chimera suggesting that E462R was not sufficient to counteract the slowing effect of Ca<sub>v</sub>β2a. The fast inactivation kinetics of the Ca<sub>v</sub>1.2 E462R and the CEEE + E462R mutants were however restored to some extent when using the non-palmitoylated form of Ca<sub>v</sub>β2a CS indicating that Ca<sub>v</sub>β2a and E462R modulate VDI through a common pathway in which the mobility of the I-II linker is likely to play a significant role.

Our observations further suggest that positively charged residues are required at the fifth position of the AID helix of the HVA Ca<sub>v</sub>1-2 α1 subunits for Ca<sub>v</sub>β2a CS to promote VDI gating. Co-injection with Ca<sub>v</sub>β2a CS did not significantly increase the VDI gating of the wild-type Ca<sub>v</sub>1.2 channel expressed in *Xenopus* oocytes (our data) or in mammalian cells (Chien et al., 1996). In addition, co-injection with Ca<sub>v</sub>β2a CS did not significantly increase the VDI gating of the CEEE chimera even though it is in fact 90%

identical to  $Ca_v2.3$ . The charge mutation (Glu to Arg) was however sufficient to re-establish the accelerating effect of  $Ca_v\beta2a$  CS on VDI gating suggesting that the accelerating effect of  $Ca_v\beta2a$  CS requires positively charged residues at position 462. Indeed, the Arg residue is strictly conserved within the  $Ca_v2$  channel family for which the accelerating effect of  $Ca_v\beta2a$  CS has been thoroughly documented (Qin et al., 1998; Restituto et al., 2000; Stephens et al., 2000).

### **Structural requirements of VDI at position E462**

The mutational analysis carried out at position 462 confirmed that positively charged and/or neutral residues speed up inactivation kinetics in  $Ca_v1.2$ . The increase in the VDI kinetics was significantly larger with the Arg residue than with the Lys residue even though both residues carry a net positive charge at physiological pH. The VDI gating of E462K (positive) and E462A (neutral) were similar whereas the E462D substitution that switched two negatively charged residues significantly decreased VDI. The E462N channel was similar to E462Q at 0 mV but behaved more like E462A at + 20 mV. Altogether, our results indicate that positively charged residues yield faster VDI kinetics than negatively substituted mutants. The volume of the residue further modulates the VDI response such that small positively charged residues yielded faster VDI kinetics than larger ones whereas the reverse was observed for negatively substituted mutants. Neutral hydrophobic residues displayed faster VDI gating than hydrophilic neutral ones. In fact, the VDI kinetics of the small but neutral and hydrophobic substituted E462A mutant was similar to the positively charged E462K at most voltages. Among residues of similar hydrophilicity, smaller residues were also more likely to speed up VDI kinetics as seen with the distinct kinetics

obtained with E462N and E462Q at + 20 mV. Finally, the glycine-substituted mutant behaved like a negatively charged mutant as documented before for Ca<sub>v</sub>2.3 (Berrou et al., 2001). Hence, our observations are compatible with a molecular model where negatively charged residues in the N-terminal region of the AID helix region decrease the mobility of the I-II loop.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Ed Perez-Reyes for the Cav $\beta$ 3, Cav $\beta$ 2a, and the Cav1.2 clones as well as for stimulating discussions; Gérald Bernatchez for preliminary experiments; Nicole Isaac and Stéphanie Bourbonnais for DNA work; Julie Verner for assistance with oocyte culture; and Claude Gauthier for artwork. This work was completed with grant MOP13390 from the Canadian Institutes of Health Research MOP13390 and from a grant of the Canadian Heart and Stroke Foundation to L. P.

### Reference List

1. Bernatchez,G., L.Berrou, Z.Benakezouh, J.Ducay, and L.Parent. 2001a. Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca<sub>v</sub>2.3 channel. *Bioch. Biophys. Acta* 1514:217-229.
2. Bernatchez,G., R.Sauvé, and L.Parent. 2001b. State-dependent inhibition of inactivation-deficient Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>2.3 channels by mibefradil. *J. Memb. Biol.* 184:143-159.
3. Bernatchez,G., D.Talwar, and L.Parent. 1998. Mutations in the EF-hand motif of the cardiac  $\alpha_{1C}$  calcium channel impair the inactivation of barium currents. *Biophys. J.* 75:1727-1739.
4. Berrou,L., G.Bernatchez, and L.Parent. 2001. Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of  $\alpha_{1E}$  (Ca<sub>v</sub>2.3) Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys. J.* 80:215-228.
5. Berrou,L., H.Klein, G.Bernatchez, and L.Parent. 2002. A Specific Tryptophan in the I-II Linker Is a Key Determinant of  $\beta$ -Subunit Binding and Modulation in Ca<sub>v</sub>2.3 calcium channels. *Biophys. J* 83:1429-1442.
6. Bodi,I., S.E.Koch, H.Yamaguchi, G.P.Szigeti, A.Schwartz, and G.Varadi. 2002. The role of region IVS5 of the human cardiac calcium channel in establishing inactivated channel conformation: use-dependent block by benzothiazepines. *J Biol Chem.* 277:20651-20659.
7. Castellano,A., X.Wei, L.Birnbaumer, and E.Perez-Reyes. 1993. Cloning and expression of a third calcium channel  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* 268:3450-3455.
8. Cens,T., S.Restituito, S.Galas, and P.Charnet. 1999. Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J. Biol. Chem.* 274:5483-5490.



9. Chen, Y.H., M.H.Li, Y.Zhang, L.L.He, Y.Yamada, A.Fitzmaurice, Y.Shen, H.Zhang, L.Tong, and J.Yang. 2004. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca channels. *Nature*. 429:675-680.
10. Chien, A.J., K.M.Carr, R.E.Shirokov, E.Rios, and M.M.Hosey. 1996. Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel  $\beta$ 2a subunit and effects on channel function. *J. Biol. Chem* 271:26465-26468.
11. Chien, A.J. and M.M.Hosey. 1998. Post-translational modifications of  $\beta$  subunits of voltage-dependent calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30:377-386.
12. deLeon, M., Y.Wang, L.Jones, E.Perez-Reyes, X.Wei, T.W.Soong, T.P.Snutch, and D.T.Yue. 1995. Essential  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif for  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive inactivation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Science*. 270:1502-1506.
13. Erickson, M.G., H.Liang, M.X.Mori, and D.T.Yue. 2003. FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel CaM preassociation. *Neuron* . 39:97-107.
14. Ertel, E.A., K.P.Campbell, M.M.Harpold, F.Hofmann, Y.Mori, E.Perez-Reyes, A.Schwartz, T.P.Snutch, T.Tanabe, L.Birnbaumer, R.W.Tsien, and W.A.Catterall. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
15. Ferreira, G., E.Rios, and N.Reyes. 2003. Two components of voltage-dependent inactivation in Ca(v)1.2 channels revealed by its gating currents. *Biophys. J.* 84:3662-3678.
16. Herlitze, S., G.H.Hockerman, T.Scheuer, and W.A.Catterall. 1997. Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel  $\alpha_{1A}$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:1512-1516.
17. Isacoff, E.Y., Y.N.Jan, and L.Y.Jan. 1991. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K channel. *Nature*. 353:86-90.

18. Kim,J., S.Ghosh, D.A.Nunziato, and G.S.Pitt. 2004. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca(2+) channels. *Neuron*. 41:745-754.
19. Lacerda,A.E., E.Perez-Reyes, X.Wei, A.Castellano, and A.M.Brown. 1994. T-type and N-type calcium channels of *Xenopus* oocytes: evidence for specific interactions with  $\beta$  subunits. *Biophys. J.* 66:1833-1843.
20. Lee,A., S.T.Wong, D.Gallagher, B.Li, D.R.Storm, T.Scheuer, and W.A.Catterall. 1999b. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature*. 399:155-159.
21. Lee,J.H., A.N.Daud, L.L.Cribbs, A.E.Lacerda, A.Pereverzev, U.Klockner, T.Schneider, and E.Perez-Reyes. 1999a. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci.* 19:1912-1921.
22. Liang,H., C.D.DeMaria, M.G.Erickson, M.X.Mori, B.A.Alseikhan, and D.T.Yue. 2003. Unified mechanisms of Ca regulation across the Ca channel family. *Neuron* 39:951-960.
23. Monteil,A., J.Chemin, E.Bourinet, G.Mennessier, P.Lory, and J.Nargeot. 2000. Molecular and functional properties of the human  $\alpha$ 1G subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 275:6090-6100.
24. Opatowsky,Y., C.C.Chen, K.P.Campbell, and J.A.Hirsch. 2004. Structural Analysis of the Voltage-Dependent Calcium Channel beta Subunit Functional Core and Its Complex with the alpha1 Interaction Domain. *Neuron* 42:387-399.
25. Page,K.M., G.J.Stephens, N.S.Berrow, and A.C.Dolphin. 1997. The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. *J. Neurosci.* 17:1330-1338.

26. Parent, L., M. Gopalakrishnan, A. E. Lacerda, X. Wei, and E. Perez-Reyes. 1995. Voltage-dependent inactivation in a cardiac-skeletal chimeric calcium channel. *FEBS Lett.* 360:144-150.
27. Parent, L., T. Schneider, C. P. Moore, and D. Talwar. 1997. Subunit regulation of the human brain  $\alpha_{1E}$  calcium channel. *J. Membr. Biol.* 160:127-140.
28. Patil, P. G., D. L. Brody, and D. T. Yue. 1998. Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron* 20:1027-1038.
29. Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, J. P. Adelman, and D. T. Yue. 1999. Calmodulin is the  $Ca^{2+}$  sensor for  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22:549-558.
30. Piedras-Renteria, E. S. and R. W. Tsien. 1998. Antisense oligonucleotides against  $\alpha_{1E}$  reduce R-type calcium currents in calcium currents in cerebellar granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:7760-7765.
31. Qin, N., R. Olcese, M. Bransby, T. Lin, and L. Birnbaumer. 1999.  $Ca^{2+}$ -induced inhibition of the cardiac  $Ca^{2+}$  channel depends on calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:2435-2438.
32. Qin, N., D. Platano, R. Olcese, J. L. Costantin, E. Stefani, and L. Birnbaumer. 1998. Unique regulatory properties of the type 2a  $Ca^{2+}$  channel  $\beta$  subunit caused by palmitoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:4690-4695.
33. Restituito, S., T. Cens, C. Barrere, S. Geib, S. Galas, W. M. De, and P. Charnet. 2000. The  $\beta_{2a}$  subunit is a molecular groom for the  $Ca^{2+}$  channel inactivation gate. *J. Neurosci.* 20:9046-9052.
34. Sandoz, G., I. Lopez-Gonzalez, S. Stamboulian, N. Weiss, C. Arnoult, and M. De Waard. 2004. Repositioning of charged I-II loop amino acid residues within the electric field by beta subunit as a novel working hypothesis for the control of fast P/Q calcium channel inactivation. *Eur. J Neurosci* 19:1759-1772.

35. Shi,C. and N.M.Soldatov. 2002. Molecular determinant of voltage dependent slow inactivation of Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem* 277:6813-6821.
36. Stephens,G.J., K.M.Page, Y.Bogdanov, and A.C.Dolphin. 2000. The  $\alpha$ 1B Ca<sup>2+</sup> channel amino terminus contributes determinants for subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J. Physiol. (Lond)* 525:377-390.
37. Stotz,S.C., J.Hamid, R.L.Spaetgens, S.E.Jarvis, and G.W.Zamponi. 2000. Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels: A hinged-lid mechanism. *J. Biol. Chem.* 275:24575-24582.
38. Stotz,S.C., S.E.Jarvis, and G.W.Zamponi. 2004. Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol.* 554:263-273.
39. Stotz,S.C. and G.W.Zamponi. 2001. Identification of inactivation determinants in the domain IIS6 region of high voltage activated calcium channels. *J. Biol. Chem* 276:33001-33010.
40. Takahashi,S.X., S.Mittman, and H.M.Colecraft. 2003. Distinctive modulatory effects of five human auxiliary  $\beta$ 2 subunit splice variants on L-type calcium channel gating. *Biophys. J.* 84:3007-3021.
41. Tareilus,E., M.Roux, N.Qin, R.Olcese, J.Zhou, E.Stefani, and L.Birnbaumer. 1997. A *Xenopus* oocyte  $\beta$  subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 94:1703-1708.
42. Van Petegem,F., K.A.Clark, F.C.Chatelain, and D.L.Minor, Jr. 2004. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature.* 429:671-675.

43. Williams, M.E., D.H. Feldman, A.F. McCue, R. Brenner, G. Velicelebi, S.B. Ellis, and M.M. Harpold. 1992. Structure and functional expression of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8:71-84.

44. Zhou, M., J.H. Morais-Cabral, S. Mann, and R. MacKinnon. 2001. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*. 411:657-661.

45. Zuhlke, R.D., G.S. Pitt, K. Deisseroth, R.W. Tsien, and H. Reuter. 1999. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*. 399:159-162.

Table I. Biophysical properties of Ca<sub>v</sub>1.2 mutants

with $\alpha 2b\delta / \beta 3$ in 10 Ba <sup>2+</sup>	INACTIVATION ( 5s)		ACTIVATION	
	E <sub>0.5</sub> (mV)	Fractional currents	E <sub>0.5</sub> (mV)	Peak I <sub>Ba</sub> ( $\mu$ A)
wt	-23 ± 1 (21) z = 2.5	0.17 ± 0.02 (21)	-8 ± 2 (23) z = 3.7 ± 0.4	-2.5 ± 0.3 (43)
<i>Xhol</i>	-24 ± 1 (19) z = 2.3	0.20 ± 0.02 (19)	-5 ± 1 (16) z = 3.8 ± 0.4	-1.9 ± 0.3 (23)
Q458A	-16 ± 1 (10) z = 1.7	0.23 ± 0.04 (10)	-7 ± 1 (14) z = 4.0 ± 0.2	-1.3 ± 0.3 (14)
Q459A	-22 ± 1 (10) z = 2.4	0.21 ± 0.02 (10)	-7 ± 1 (13) z = 3.7 ± 0.3	-1.9 ± 0.3 (13)
E461A	-25 ± 2 (8) z = 2.3	0.14 ± 0.02 (8)	-10 ± 1 (17) z = 4.3 ± 0.7	-0.9 ± 0.2 (9)
E462R	-24 ± 1 (19) z = 2.9	0.09 ± 0.01 (19)	-1 ± 2 (4) z = 3.5 ± 0.6	-1.7 ± 0.7 (17)
E462K	-22 ± 1 (14) z = 1.9	0.22 ± 0.02 (14)	-4 ± 1 (7) z = 4.2 ± 0.4	-0.7 ± 0.2 (4)
E462A	-20 ± 1 (6) z = 2.7	0.09 ± 0.02 (6)	-0.3 ± 0.4 (13) z = 3.3 ± 0.1	-1.0 ± 0.1 (7)
E462G	-19 ± 1 (7) z = 1.9	0.27 ± 0.01 (7)	0.3 ± 0.5 (11) z = 3.5 ± 0.3	-0.9 ± 0.1 (11)
E462N	-20 ± 2 (4) z = 2.7	0.26 ± 0.06 (4)	-4 ± 1 (6) z = 3.7 ± 0.4	-1.1 ± 0.1 (6)
E462Q	-22 ± 2 (11) z = 1.9	0.21 ± 0.02 (11)	-1.4 ± 0.3 (16) z = 3.4 ± 0.2	-1.1 ± 0.1 (16)
E462D	-19 ± 2 (12) z = 2.6	0.36 ± 0.03 (12)	-2 ± 1 (19) z = 3.5 ± 0.2	-1.0 ± 0.1 (19)
D463A	-21 ± 1 (8) z = 2.5	0.07 ± 0.01 (8)	-12 ± 1 (5) z = 5.3 ± 0.5	-0.73 ± 0.05 (4)
D463R	-22 ± 1 (6) z = 3.5	0.11 ± 0.01 (6)	-6 ± 1 (12) z = 3.7 ± 0.3	-2.8 ± 0.5 (5)
L464A	-21 ± 0.8 (5) z = 2.4 ± 0.7	0.31 ± 0.05 (5)	-7.1 ± 0.6 (11) z = 3.4 ± 0.6	-1.6 ± 0.3 (11)
K465N	-17 ± 1 (10) z = 1.5	0.46 ± 0.05 (10)	-6 ± 1 (7) z = 3.9 ± 0.2	-1.4 ± 0.1 (12)
L468R	-22 ± 1 (7) z = 2.5	0.38 ± 0.04 (7)	-15 ± 1 (12) z = 5.6 ± 0.4	-2.0 ± 0.3 (7)
D469A	-25 ± 1 (13) z = 3.6	0.13 ± 0.02 (5)	-3 ± 1 (14) z = 3.8 ± 0.2	-7 ± 2 (12)
D469R	-20 ± 1 (16) z = 1.9	0.49 ± 0.03 (16)	-10 ± 1 (16) z = 4.1 ± 0.3	-1.6 ± 0.2 (14)

<b>T472D</b>	$-11 \pm 1$ (9) $z = 1.6$	$0.46 \pm 0.03$ (9)	$-8 \pm 1$ (15) $z = 4.2 \pm 0.3$	$-2.7 \pm 0.4$ (16)
<b>Q473K</b>	$-18 \pm 1$ (15) $z = 2.4$	$0.30 \pm 0.03$ (15)	$-3 \pm 0.4$ (8) $z = 3.6 \pm 0.4$	$-1.7 \pm 0.4$ (15)
<b>Q473R</b>	$-27 \pm 2$ (8) $z = 1.6$	$0.51 \pm 0.07$ (8)	$-6 \pm 1$ (13) $z = 3.7 \pm 0.2$	$-1.0 \pm 0.2$ (8)

**TABLE I.** Biophysical parameters of  $Ca_v1.2$  wild-type and mutant channels expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of  $Ca_v\alpha2b\delta$  and  $Ca_v\beta3$  subunits. The background channel used for the mutations was the  $Ca_v1.2$  (*XhoI*) with a unique *XhoI* site at G511R. Whole-cell currents were measured in 10 mM  $Ba^{2+}$  throughout. The voltage-dependence of inactivation was determined from the peak currents measured at 0 mV after 5 s pulses from -100 to +50 mV. Relative currents were fitted to Boltzmann equation 1. The fractional currents represent the fraction of whole-cell currents remaining at the end of a 5 s conditioning pulse to +10 mV. Activation data were estimated from the mean I-V relationships and fitted to Boltzmann equation 2. Peak  $I_{Ba}$  was determined from I-V relationships for the corresponding experiments. The data are shown with the mean  $\pm$  S.E.M. and the number n of samples appears in parentheses.

Table II. Biophysical properties of CEEE mutants

with $\alpha 2b\delta$ in 10 $Ba^{2+}$	Inactivation (5s) $E_{0.5}$ (mV)		Activation $E_{0.5}$ (mV)		Peak $I_{Ba}$ ( $\mu A$ )	
	$-\beta$	$+\beta 3$	$-\beta$	$+\beta 3$	$-\beta$	$+\beta 3$
<b>CEEE</b>	$-17 \pm 1$ (3) $z = 2.6$	$-19 \pm 1$ (13) $z = 2.6$	$-4 \pm 1$ (6) $z = 4.1 \pm 0.3$	$-7 \pm 0.5$ (23) $z = 4.4 \pm 0.2$	$-0.39 \pm$ 0.02(6)	$-1.9 \pm 0.2$ (23)
<b>CEEE + E462R</b>	$-30 \pm 1$ (20) $z = 2.8$	$-35 \pm 1$ (17) $z = 3.1$	$-7 \pm 1$ (12) $z = 4.0 \pm 0.5$	$-9 \pm 1$ (18) $z = 4.0 \pm 0.3$	$-1.4 \pm 0.2$ (7)	$-2.1 \pm 0.4$ (13)
<b>CEEE + E462K</b>	$-19 \pm 1$ (4) $z = 2.2$	$-28 \pm 1$ (10) $z = 2.5$	$-4 \pm 1$ (6) $z = 4.0 \pm 0.2$	$-10 \pm 1$ (14) $z = 4.3 \pm 0.3$	$-0.61 \pm$ 0.5 (6)	$-1.5 \pm 0.2$ (14)
<b>CEEE + Q473K</b>	n.d.	$-23 \pm 1$ (8) $z = 3.1$	n.d.	$-12 \pm 1$ (5) $z = 4.7 \pm 0.5$	n.d.	$-1.9 \pm 0.5$ (5)
<b>CEEE + E462R + Q473K</b>	$-25 \pm$ 1(5) $z = 2.6$	$-30 \pm 1$ (8) $z = 2.9$	$-3 \pm 1$ (6) $z = 4.0$	$-6 \pm 1$ (7) $z = 3.7$	$-1.1 \pm 0.1$ (6)	$-0.8 \pm 0.1$ (7)

TABLE II. Biophysical parameters of the CEEE chimera and its derivative mutant channels expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of  $Ca_v\alpha 2b\delta$  and  $Ca_v\beta 3$  subunits. Whole-cell currents were measured in 10 mM  $Ba^{2+}$  throughout. The voltage-dependence of inactivation was determined from the peak currents measured at 0 mV after 5 s pulses from -100 to +50 mV. Relative currents were fitted to Boltzmann equation 1. Activation data were estimated from the mean I-V relationships and fitted to Boltzmann equation 2. Peak  $I_{Ba}$  was determined from I-V relationships for the corresponding experiments. The data are shown with the mean  $\pm$  S.E.M. and the number n of samples appears in parentheses. The abbreviation “n.d.” stands for “not determined”.



Table III. Biophysical properties of E462R mutants with  $\text{Ca}_v\beta 2a$ 

with $\alpha 2b\delta$ in 10 $\text{Ba}^{2+}$	Inactivation (5s) $E_{0.5}$ (mV)		Activation $E_{0.5}$ (mV)		Peak $I_{\text{Ba}}$ ( $\mu\text{A}$ )	
	+ $\beta 2a$	+ $\beta 2a\text{CS}$	+ $\beta 2a$	+ $\beta 2a\text{CS}$	+ $\beta 2a$	+ $\beta 2a\text{CS}$
CEEE	$-18 \pm 1(5)$ $z = 2.3$	n.d.	$-4.6 \pm 0.7$ (2) $z = 4.6 \pm 0.3$	$-5.1 \pm 0.6$ (6) $z = 3.8 \pm 0.1$	$-0.51 \pm 0.03$ (2)	$-0.66 \pm 0.06$ (6)
CEEE + E462R	$-25 \pm 1(13)$ $z = 2.5$	$-34 \pm 1$ (6) $z = 2.6$	$-9.0 \pm 0.4$ (9) $z = 5.0 \pm 0.3$	$-5.7 \pm .5$ (14) $z = 4.0 \pm 0.2$	$-4.6 \pm 0.9$ (9)	$-1.6 \pm 0.2$ (14)
$\text{Ca}_v1.2$ ( <i>Xhol</i> )	n.d.	n.d.	$-8.8 \pm 0.6$ (8) $Z = 3.9 \pm 0.3$	$-5.9 \pm 0.7$ (4) $z = 3.7 \pm 0.2$	$-0.8 \pm 0.1$ (8)	$-0.58 \pm 0.05$ (4)
$\text{Ca}_v1.2$ E462R	n.d.	n.d.	$-11 \pm 1$ (8) $z = 4.2 \pm 0.3$	$-7.7 \pm 0.9$ (7) $z = 4.9 \pm 0.6$	$-0.9 \pm 0.2$ (8)	$-0.63 \pm 0.08$ (7)

TABLE III. Biophysical parameters of  $\text{Ca}_v1.2$  and CEEE mutants expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of  $\text{Ca}_v\alpha 2b\delta$  and  $\text{Ca}_v\beta 2a$  or  $\text{Ca}_v\beta 2a$  C3S + C4S subunits. Whole-cell currents were measured in 10 mM  $\text{Ba}^{2+}$  throughout. The voltage-dependence of inactivation was determined from the peak currents measured at 0 mV after 5 s pulses from -100 to +50 mV. Relative currents were fitted to Boltzmann equation 1. Activation data were estimated from the mean I-V relationships and fitted to Boltzmann equation 2. Peak  $I_{\text{Ba}}$  was determined from I-V relationships for the corresponding experiments. The data are shown with the mean  $\pm$  S.E.M. and the number n of samples appears in parentheses. The abbreviation “n.d.” stands for “not determined” .

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1. A. A 3-D representation** of the AID helix of the rabbit Cav1.2 obtained with INSIGHT II using the human Cav1.2 crystal structure co-crystallized with Cav $\beta$ 2a (1T0J.pdb) as a template (Van Petegem et al., 2004). The core of the AID helix appears in white. Side-chains are color-coded : E461 (orange); E462 (yellow); D463 (turquoise); D469 (green); Q473 (red). The hydrophobic face of the AID helix interacts with the Cav $\beta$ 2a subunit shown in blue. **B. A 2-D helical wheel representation** of the AID region between Q458 and E475 as predicted in the rabbit Cav1.2. Helical wheel projections were carried out with ANTHEPROT. As seen, the hydrophobic (circles) and hydrophilic (diamonds) residues line up on opposite sides of the helix. Filled black symbols highlight the residues that were shown to interact strongly with Cav $\beta$ 2a or Cav $\beta$ 3 in every crystal structure published to this date (Van Petegem et al., 2004; Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004); the empty symbols represent residues that were shown to be clearly non-interacting with either Cav $\beta$ 2a or Cav $\beta$ 3; and the gray symbols show residues for which some degree of interaction was found in either crystal structure.

**FIGURE 2. E461A accelerates VDI kinetics in Cav1.2. A.** The Cav $\beta$  subunit binding site on the  $\alpha$ 1 subunit (AID) is located within 22 residues of the IS6 transmembrane segment. The primary sequence for the AID helix in Cav2.3 and Cav1.2 channels is shown with the residues putatively accessible for protein interaction highlighted in bold letters. The residues specific to Cav2.3 are shown in italic. **B.** Whole-cell current traces are shown from left to right for Cav1.2 (*XhoI*) wt, E461A, K465N, and T472D in 10 mM Ba<sup>2+</sup>. Unless specified otherwise, mutants were expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of

$Ca_v\alpha 2b\delta$  and  $Ca_v\beta 3$  subunits and currents were recorded using the two-electrode voltage-clamp technique in the presence of 10 mM  $Ba^{2+}$ . Holding potential was -80 mV throughout. Oocytes were pulsed from -40 mV to +60 mV using 10 mV steps for 450 ms. Capacitive transients were erased for the first ms after the voltage step. All mutants tested expressed significant whole-cell currents with similar activation properties (Table I). **C.** The r300 values (the fraction of whole-cell currents remaining at the end of a 300 ms pulse) are shown  $\pm$  S.E.M. for the mutated hydrophilic residues from 0 to +20 mV for  $Ca_v1.2$  (*Xhol*) wt; E461A, E462R, K465N, L468R, D469A, T472D, and Q473K (from left to right). The r300 ratios varied from  $0.73 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.67 \pm 0.02$  at +20 mV (23) for  $Ca_v1.2$  (*Xhol*) wt;  $0.53 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.44 \pm 0.03$  at +20 mV (11) for E461A;  $0.38 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.29 \pm 0.01$  at +20 mV (20) for E462R;  $0.87 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.82 \pm 0.01$  at +20 mV (10) for K465N;  $0.82 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.76 \pm 0.02$  at +20 mV (7) for L468R;  $0.69 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.63 \pm 0.03$  at +20 mV (11) for D469A;  $0.85 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.77 \pm 0.01$  at +20 mV (16) for T472D;  $0.81 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.71 \pm 0.01$  at +20 mV (15) for Q473K. As compared with  $Ca_v1.2$  (*Xhol*) wt, the r300 were significantly smaller at  $p < 10^{-16}$  for E462R and at  $p < 10^{-6}$  for E461A when measured at 0 mV whereas they were significantly larger for K465N, L468R, T472D, and Q473K at  $0.001 < p < .01$  under the same conditions. In contrast, r300 were not significantly different between  $Ca_v1.2$  (*Xhol*) wt and D469A. **D.** The voltage-dependence of inactivation was estimated from isochronal inactivation data points measured after 5 s conditioning pulses applied between -100 and +30 mV from a holding potential of -100 mV. The fraction of the non-inactivating current was recorded at the end of the pulse and data were fitted to Boltzmann equation 1. The voltage-dependence of inactivation was similar for all constructs. The final fraction of

noninactivating  $\text{Ba}^{2+}$  current decreased from  $0.46 \pm 0.03$  (9) for T472D and  $0.46 \pm 0.05$  (10) for K465N; to  $0.38 \pm 0.04$  (7) for L468R,  $0.33 \pm 0.02$  (8) for L460I, and  $0.30 \pm 0.03$  (15) for Q473K; to  $0.20 \pm 0.02$  (19) for  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*) wt; to  $0.14 \pm 0.04$  (10) for E461A,  $0.13 \pm 0.02$  (5) for D469A, and  $0.09 \pm 0.01$  for E462R (19) at +10 mV. Complete set of fit values are shown in Table I.

**FIGURE 3. Alanine mutations in the EED locus accelerates the VDI kinetics. A.** Whole-cell current traces are shown for  $\text{Ca}_v1.2$  mutants E461A, E462A, D463A, and L464A (from left to right). **B.** The corresponding r300 values are shown  $\pm$  S.E.M. from 0 to +20 mV for E461A, E462A, D463A, and L464A (from left to right). The r300 ratios varied from  $0.73 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.67 \pm 0.02$  at +20 mV (23) for  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*);  $0.53 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.44 \pm 0.03$  at +20 mV (11) for E461A;  $0.67 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.49 \pm 0.02$  at +20 mV (7) for E462A;  $0.67 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.53 \pm 0.03$  at +20 mV (9) for D463A;  $0.80 \pm 0.04$  at 0 mV to  $0.74 \pm 0.02$  at +20 mV (3) for L464A. At +20 mV, r300 were significantly different between  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*) wt and E461A, E462A, and D463A at  $p < 10^{-5}$ . **C.** The fraction of noninactivating  $\text{Ba}^{2+}$  current increased from  $0.07 \pm 0.01$  (8) for D463A and  $0.09 \pm 0.02$  (6) for E462A, to  $0.14 \pm 0.02$  (10) for E461A, to  $0.31 \pm 0.05$  (5) for L464A. Fit values are shown in Table I.

**FIGURE 4. Positive and neutral residues at position 462 accelerates the VDI kinetics in  $\text{Ca}_v1.2$ . A.** Whole-cell current traces are shown for  $\text{Ca}_v1.2$  mutants: E462R, E462K, E462A, and E462D (from left to right). **B.** The corresponding r300 values are shown  $\pm$  S.E.M. from 0 to +20 mV for  $\text{Ca}_v1.2$  wt;  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*) wt; E462R; E462K; E462A; and

E462D (from left to right). The  $r_{300}$  ratios varied from  $0.74 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.72 \pm 0.01$  at +20 mV (45) for  $\text{Ca}_v1.2$  wt;  $0.73 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.67 \pm 0.02$  at +20 mV (23) for  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*);  $0.38 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.29 \pm 0.01$  at +20 mV (20) for  $\text{Ca}_v1.2$  E462R;  $0.62 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.54 \pm 0.02$  at +20 mV (16) for  $\text{Ca}_v1.2$  E462K;  $0.67 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.49 \pm 0.02$  at +20 mV (7) for  $\text{Ca}_v1.2$  E462A;  $0.73 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.58 \pm 0.02$  at +20 mV (6) for  $\text{Ca}_v1.2$  E462N;  $0.74 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.70 \pm 0.02$  at +20 mV (14) for  $\text{Ca}_v1.2$  E462Q;  $0.79 \pm 0.02$  at 0 mV to  $0.73 \pm 0.02$  at +20 mV (8) for  $\text{Ca}_v1.2$  E462G;  $0.86 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.79 \pm 0.01$  at +20 mV (19) for  $\text{Ca}_v1.2$  E462D. At +20 mV,  $r_{300}$  were significantly different between  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*) wt and E462R at  $p < 10^{-18}$ ; E462K, E462A, and E462D at  $p < 10^{-4}$ ; E462N and E462Q at  $p < 0.05$  but were not statistically significantly different between  $\text{Ca}_v1.2$  wt,  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*) wt and E462G ( $p > 0.5$ ). C. The voltage-dependence of inactivation was not significantly different for  $\text{Ca}_v1.2$  wt (21),  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*) wt (19), E462K (14), E462A (6), E462N (4), and E462R (19) channels but were shifted slightly to the right for E462Q, E462G, and E462D. The fraction of noninactivating  $\text{Ba}^{2+}$  current decreased from  $0.36 \pm 0.03$  (12) for E462D, to  $0.27 \pm 0.01$  (7) for E462G, to  $0.26 \pm 0.06$  (4) for E462N, to  $0.21 \pm 0.02$  (11) for E462Q, to  $0.22 \pm 0.02$  (14) for E462K, to  $0.20 \pm 0.02$  (19) for  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*), to  $0.09 \pm 0.02$  (6) for E462A, and  $0.09 \pm 0.01$  (19) for E462R at +10 mV. Isochronal data points for  $\text{Ca}_v1.2$  wt;  $\text{Ca}_v1.2$  (*XhoI*) wt and E462K were superimposed. Fit values are shown in Table I.

**FIGURE 5. E462R increases the VDI kinetics and voltage-dependence of the CEEE chimera.** A. Whole-cell current traces are shown for CEEE mutants: CEEE; CEEE + E462R; CEEE + Q473K; CEEE + E462R + Q473K (CEEE + ER + QK) in 10 mM  $\text{Ba}^{2+}$

(from left to right). **B.** The  $r_{300}$  values are shown  $\pm$  S.E.M. from -10 to +20 mV for CEEE; CEEE+ E462R; CEEE + E462K; CEEE + Q473K; CEEE + E462R + Q473K (from left to right). The  $r_{300}$  ratios were strongly voltage-dependent for all constructs. The E462R (29) and E462K (14) point mutations significantly increased the inactivation kinetics of CEEE (26) at  $p < 10^{-15}$  and  $p < 10^{-10}$  respectively. In contrast the inactivation kinetics of CEEE (26) and CEEE + Q473K (12) were not significantly different ( $p > 0.1$ ).

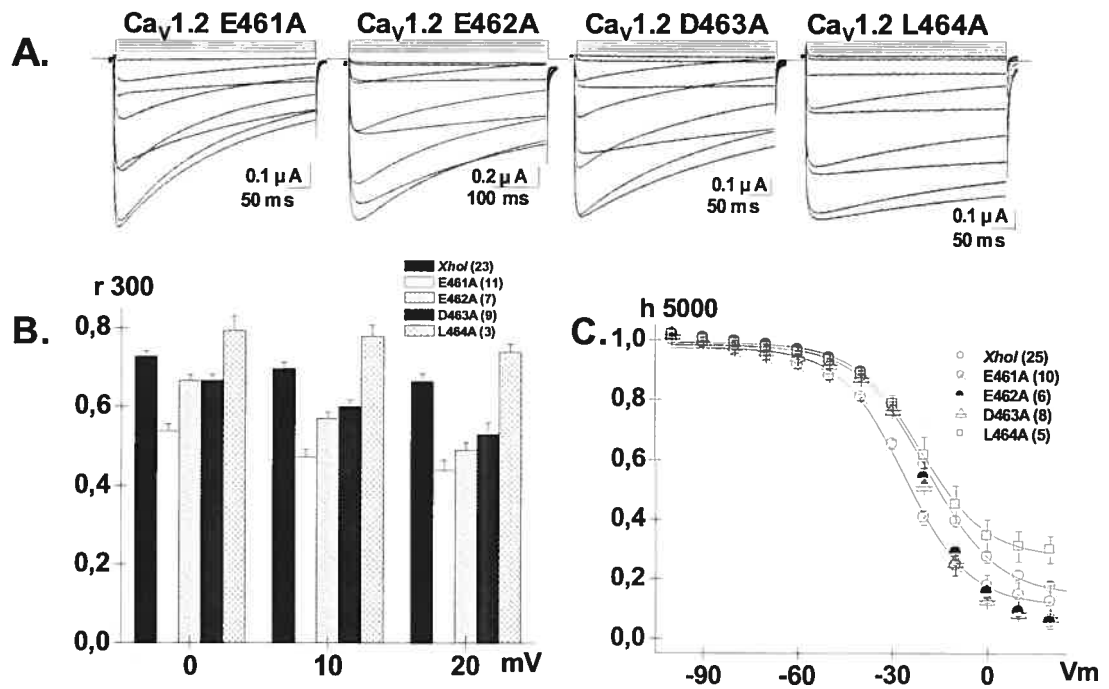
**C.** The voltage-dependence of inactivation was estimated from isochronal inactivation data points measured after 5 s conditioning pulses. Point mutations at position E462 shifted significantly the voltage-dependence of inactivation toward negative potentials from  $E_{0.5} = -19 \pm 1$  mV (13) for CEEE to  $E_{0.5} = -35 \pm 1$  mV (17) for CEEE + E462R ( $p < 10^{-4}$ );  $E_{0.5} = -30 \pm 1$  mV (8) for CEEE + E462R + Q473K ( $p < 10^{-3}$ ); and  $E_{0.5} = -28 \pm 1$  mV (10) for E462K ( $p < 10^{-3}$ ). In contrast, the Q473K mutation did not significantly alter the voltage-dependence of inactivation with  $E_{0.5} = -23 \pm 1$  mV (8). Complete set of fit values are shown in Table II.

**FIGURE 6. The faster VDI of E462R are abolished by  $Ca_v \beta 2a$  and restored in part by  $Ca_v \beta 2a$  C3S + C4S. A.** Whole-cell current traces are shown for  $Ca_v 1.2$  (*Xhol*) wt and  $Ca_v 1.2$  E462R after co-expression with the palmitoylated-deficient  $Ca_v \beta 2a$  C3S + C4S ( $Ca_v \beta 2a$  CS) mutant in 10 mM  $Ba^{2+}$ . **B.** Whole-cell current traces are shown for the CEEE chimera and CEEE + E462R (CEEE + ER) after co-expression with  $Ca_v \beta 2a$  CS. **C.** Bar graph displaying the  $r_{300}$  values  $\pm$  S.E.M. from 0 to +20 mV for  $Ca_v 1.2$  (*Xhol*) wt and  $Ca_v 1.2$  E462R contrasting the VDI kinetics in the presence of  $Ca_v \beta 3$  (data shown in Fig 2) (solid black and white bars), of  $Ca_v \beta 2a$  (black and white bars with vertical stripes), or of

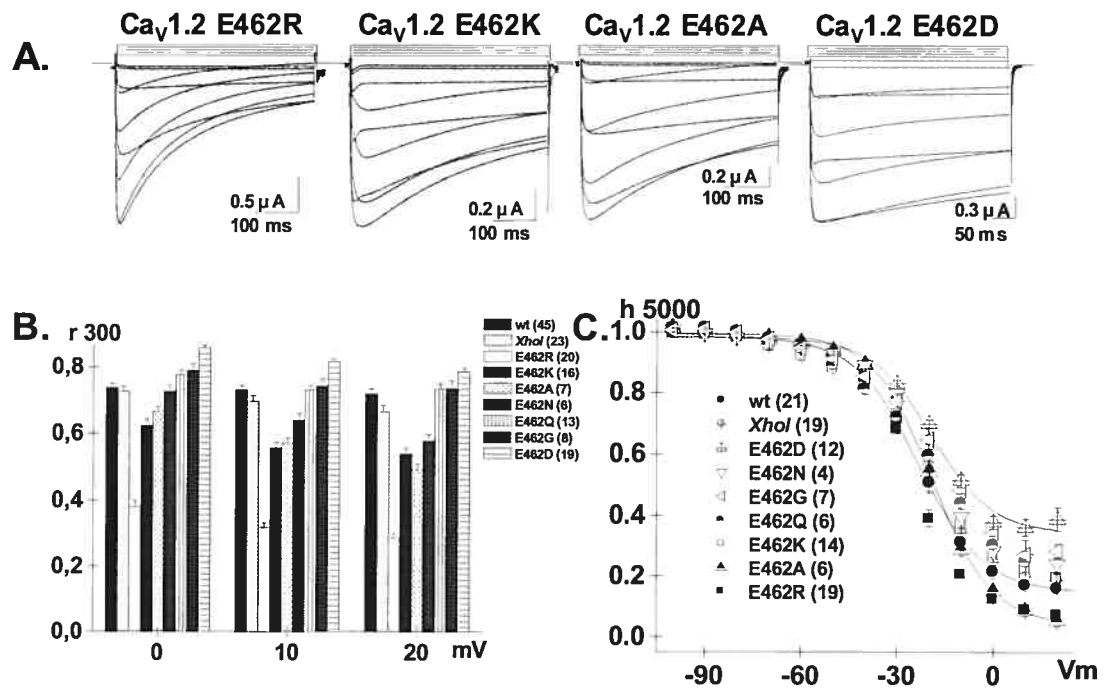
Ca<sub>v</sub>β2a CS (crossed black and white bars). In the presence of Ca<sub>v</sub>β2a CS, r300 were significantly different at  $10^{-7} < p < 10^{-3}$  between E462R and for Ca<sub>v</sub>1.2 (*XhoI*) wt with values decreasing from  $0.87 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.68 \pm 0.06$  at +20 mV (4) for Ca<sub>v</sub>1.2 (*XhoI*) wt and  $0.57 \pm 0.01$  at 0 mV to  $0.36 \pm 0.05$  at +20 mV (7) for Ca<sub>v</sub>1.2 E462R. The statistical significance however decreased with depolarization. The r300 for Ca<sub>v</sub>1.2 E462R with Ca<sub>v</sub>β2a CS were not significantly different from r300 measured with Ca<sub>v</sub>β3 except at 0 mV ( $p < 0.05$ ) **D.** Bar graph displaying the r300 values  $\pm$  S.E.M. from 0 to +20 mV for CEEE and CEEE + E462R contrasting the VDI kinetics in the presence of Ca<sub>v</sub>β3 (solid black and white bars), of Ca<sub>v</sub>β2a (black and white bars with vertical stripes), or of Ca<sub>v</sub>β2a CS (crossed black and white bars). In the presence of Ca<sub>v</sub>β2a CS, r300 were significantly different at  $10^{-5} < p < 10^{-3}$  between CEEE + E462R and CEEE with values ranging from  $0.86 \pm 0.03$  at 0 mV to  $0.71 \pm 0.05$  at +20 mV (7) for CEEE and  $0.33 \pm 0.04$  at 0 mV to  $0.29 \pm 0.07$  at +20 mV (14) for CEEE+ E462R. The statistical significance decreased with depolarization. The r300 for CEEE + E462R with Ca<sub>v</sub>β2a CS remained significantly different from r300 measured with Ca<sub>v</sub>β3 at  $p < 10^{-3}$ . The complete set of data is shown in Table III.



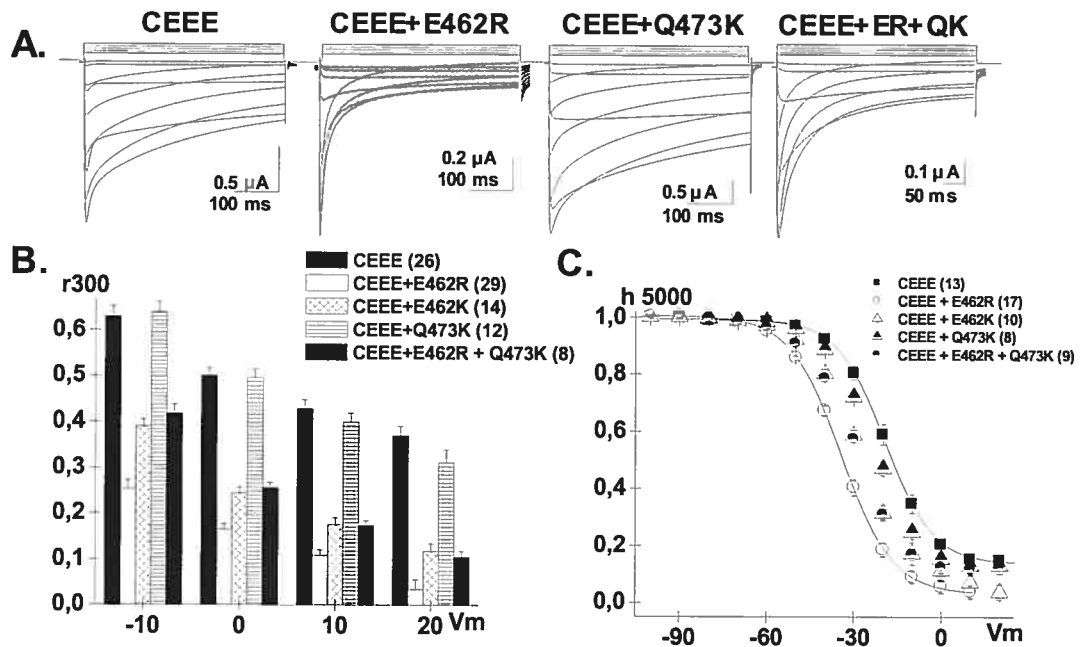




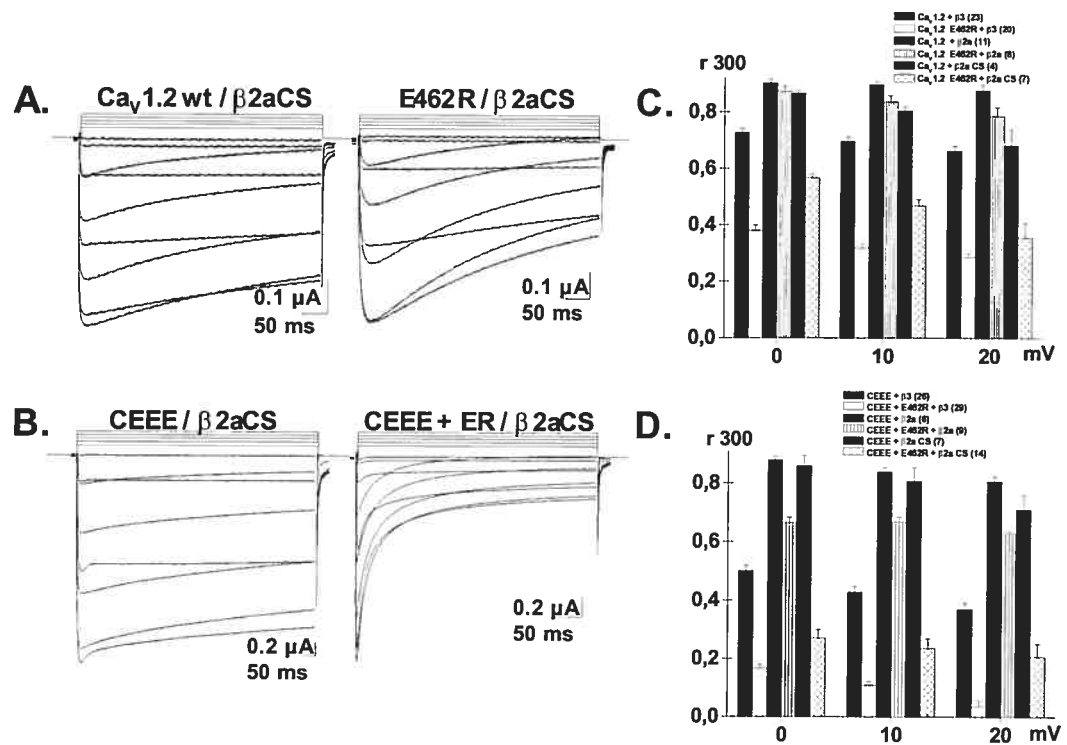
**Figure 3.** Alanine mutations in the EED locus accelerates the VDI kinetics



**Figure 4.** Positive and neutral residues at position 462 accelerates the VDI kinetics in  $Ca_v1.2$



**Figure 5.** E462R increases the VDI kinetics and voltage-dependence of the CEEE chimera



**Figure 6.** The faster VDI of E462R are abolished by  $Ca_v \beta 2a$  and restored in part by  $Ca_v \beta 2a$  C3S + C4S

#### **IV. DISCUSSION**

#### **IV.I Le locus EED constitue le déterminant moléculaire de l'inactivation du canal Ca<sub>v</sub>1.2**

Le rôle du segment I-II dans l'inactivation dépendante du potentiel membranaire a déjà fait l'objet d'études cherchant à établir les éléments structuraux et moléculaires qui participent à l'inactivation des canaux calciques Ca<sub>v</sub>2.1-2.3. Le mécanisme le plus souvent évoqué est celui de « hinged-lid » qui implique certaines régions cytoplasmiques ainsi que les hélices transmembranaires S6 (Ellinor et al., 1993; Herlitz et al., 1997; Stotz et al., 2000, 2004; Berrou et al., 2001; Bernatchez et al., 2001b). Quoique ce modèle ait été étendu aux canaux de type Ca<sub>v</sub>1.2, peu d'études ont été consacrées au rôle de la boucle I-II dans la dépendance au voltage de l'inactivation (VDI) de ces canaux. Dans le canal Ca<sub>v</sub>1.2, la plupart des mutations ont porté sur l'inactivation dépendante du calcium (CDI) au niveau du C-terminal (deLeon et al., 1995; Bernatchez et al., 1998; Qin et al., 1999; Peterson et al., 1999; Lee et al., 1999b; Peterson et al., 2000; Romanin et al., 2000; Pate et al., 2000; Mouton et al., 2001; Erickson et al., 2003; Liang et al., 2003; Kim et al., 2004).

Le déterminant moléculaire de l'inactivation dépendante du potentiel membranaire du canal calcique Ca<sub>v</sub>1.2 a été jusqu'à présent représenté par la mutation E462R qui accélère les cinétiques d'inactivation en présence du Ba<sup>2+</sup> (Herlitz et al., 1997; Berrou et al., 2001). La mise en évidence du rôle clé de la mutation E462R dans l'accélération des cinétiques d'inactivation du canal Ca<sub>v</sub>1.2 (Berrou et al., 2001) nous a incité à explorer le rôle que pourrait jouer chaque résidu de la région AID dans ce processus d'inactivation qui dépend du voltage (VDI). L'analyse des mutations dans cette région a confirmé que les

résidus chargés positivement ou neutres à la position 462 accélèrent les cinétiques d'inactivation du canal  $Ca_v1.2$ . L'accélération des cinétiques d'inactivation a été plus importante avec la mutation impliquant une arginine qu'avec une lysine, même si les deux résidus portent une charge nette positive au pH physiologique. Les cinétiques d'inactivation produites par les mutations E462K (résidu positif) et E462A (résidu négatif) étaient similaires alors que le remplacement conservateur du résidu négatif E par D ralentit ces cinétiques, ce qui implique que la charge ou l'hydrophilicité du résidu ne peuvent pas à elles seules rendre compte des cinétiques d'inactivation du canal  $Ca_v1.2$ .

Par ailleurs, les structures cristallines du complexe AID- $Ca_v\beta$  des canaux  $Ca_v1.1$  et  $Ca_v1.2$  de type L (Van Petegem et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Chen et al., 2004) ont révélé que la région AID est hélicoïdale. Les résidus conservés (L463, D463, L464, Y467, L468, W470, I471, Q473, A474, E475) sont localisés le long d'un seul côté de l'hélice où ils peuvent interagir avec une région hydrophobe de la sous-unité  $Ca_v\beta$ . La plupart des résidus conservés hydrophobes sont enfouis dans la sous-unité  $Ca_v\beta2a$  (Van Petegem et al., 2004), ce qui suggère le rôle important de ces résidus dans l'interaction entre la région AID et la sous-unité  $Ca_v\beta$  (Tableau V). Les mêmes structures cristallines montrent que le résidu E462 est situé du côté opposé et hydrophile de l'hélice et pourrait par conséquent participer à l'inactivation par un mécanisme de type « hinged-lid », soit en influençant le mouvement du segment IS6, soit en tant que constituant moléculaire du « lid » ou « couvercle » de l'inactivation.

En plus de E462, les chaînes latérales des résidus Q458, Q459, E461, K465, L468, D469 et T472 de la région AID dépassent aussi du côté hydrophile de l'hélice AID où elles seraient susceptibles de contribuer au mécanisme d'inactivation de type « hinged-lid ». Nous avons donc étudié les mutations K465N, L468R, D469A et T472D (qui impliquent un changement de charge nette des résidus au niveau C-terminal de l'hélice AID) et montré qu'elles n'affectent pas les cinétiques d'inactivation. Par contre, les mutations de charge au niveau N-terminal (E461, E462, D463) altèrent les cinétiques d'inactivation. Nos résultats suggèrent que les résidus chargés négativement au niveau N-terminal de l'hélice AID pourraient être importants pour expliquer les cinétiques lentes et la faible dépendance en voltage du canal  $Ca_v1.2$ . Le fait que ces trois résidus chargés négativement soient regroupés au niveau N-terminal de la boucle AID permet de supposer qu'ils affectent les cinétiques d'inactivation suite à une modification du champ électrique local. On peut ici présumer que des charges négatives dans cette région augmentent la stabilité de l'interaction entre l'hélice AID et le reste du canal. La stabilité de cette interaction ralentirait le mouvement de la boucle I-II pendant la dépolarisation. La présence de résidus chargés positivement comme dans  $Ca_v2.3$  (Berrou et al., 2001) aurait un effet opposé.

À l'intérieur de ce locus, seul le résidu D463 est situé du côté hydrophobe de l'hélice AID. Toutefois, des résultats récents obtenus dans notre laboratoire suggèrent que ce résidu ne participe pas activement à la liaison de la sous-unité  $Ca_v\beta$  (Berrou et al., 2005). La chaîne latérale du résidu D463 forme un pont hydrogène avec les résidus N340 et S295 de la région ABP (« alpha-binding pocket ») de la sous-unité  $Ca_v\beta3$ . L'introduction d'une alanine à cette position ne permettrait plus la formation de ce pont

hydrogène entre D463 et la sous-unité  $Ca_v\beta_3$ , ce qui peut provoquer un changement de conformation qui libérerait la chaîne latérale de D463 de sa zone d'enfouissement au niveau de la sous-unité  $Ca_v\beta_3$ . L'accélération des cinétiques d'inactivation que cette mutation engendre pourrait ainsi résulter d'une modification de l'interaction entre la boucle AID et la sous-unité  $Ca_v\beta$ . Il semble par ailleurs que cet effet soit unique au résidu D463 puisque la mutation en alanine des résidus hydrophiles adjacents à D463 (L464, G466, Y467, et I471) n'a d'effet ni sur les cinétiques d'inactivation ni sur la VDI (résultats non publiés).

D'autre part, le rôle du locus EED serait spécifique au canal  $Ca_v1.2$ . En effet, dans le canal  $Ca_v2.1$ , il a été démontré que les résidus R387 et E388, correspondant aux résidus E462 et D463 dans le canal  $Ca_v1.2$ , contribuent au processus d'inactivation induit par la boucle I-II (Geibs et al., 2002a). Ces résidus affectent les cinétiques d'inactivation, mais la valeur de la charge nette à ces positions n'a aucun effet en l'absence de la sous-unité  $Ca_v\beta$  (Sandoz et al., 2004). Par ailleurs, l'altération des cinétiques d'inactivation du canal  $Ca_v2.3$  qu'implique la mutation R378E (Berrou et al., 2002) est limitée à ce résidu puisque les mutations adjacentes n'affectent pas les cinétiques d'inactivation (Berrou et al., 2005). Par contre dans le canal  $Ca_v1.2$ , nos données montrent que même des mutations neutres au niveau du locus EED produisent des cinétiques rapides d'inactivation.

Résidus du canal Ca <sub>v</sub> 1.2 du lapin	Surface accessible dans le complexe AID-Ca <sub>v</sub> β2a (Å <sup>2</sup> )	Surface accessible dans la région AID seule (Å <sup>2</sup> )	% d'accessibilité dans le complexe AID-Ca <sub>v</sub> β2a
Q 458	176	176	100.0
Q 459	125	135	92.5
L 460	49	123	39.8
E 461	88	109	80.7
E 462	101	112	90.1
D 463	19	62	30.6
<b>L 464</b>	<b>34</b>	<b>107</b>	<b>31.7</b>
K465	104	104	100.0
<b>G 466</b>	<b>1</b>	<b>39</b>	<b>2.5</b>
<b>Y 467</b>	<b>4</b>	<b>136</b>	<b>2.9</b>
L 468	62	97	63.9
D 469	77	92	83.7
<b>W 470</b>	<b>0</b>	<b>177</b>	<b>0.0</b>
<b>I 471</b>	<b>15</b>	<b>139</b>	<b>10.7</b>
T 472	124	124	100.0
Q 473	107	199	53.7

**Tableau V:** Accessibilité des résidus de la boucle AID dans le complexe AID-Ca<sub>v</sub>β2a.

L'hélice α est ancrée à une "poche" de liaison de la sous-unité Ca<sub>v</sub>β2a grâce à un ensemble de résidus conservés (en caractères gras) (adapté de Van Petegem et al, 2004)



## **IV.2 Le résidu arginine à la 5<sup>ème</sup> position de la région AID accélère les cinétiques d'inactivation du canal Ca<sub>v</sub>1.2 et de la chimère CEEE**

Le canal chimère CEEE produit des cinétiques lentes d'inactivation et une faible VDI comparativement au canal Ca<sub>v</sub>2.3, malgré le fait qu'ils soient à 90% identiques au niveau de leurs structures primaires (Bernatchez et al., 2001a). Cette observation suggère que la région AID du canal Ca<sub>v</sub>1.2 contient les éléments structuraux qui empêchent une inactivation plus rapide et une plus grande VDI, et que la boucle I-II serait une région importante dans le processus d'inactivation. La présence d'un glutamate à la 5<sup>ème</sup> position de la région AID serait responsable d'un tel effet. En effet, la mutation E462R impliquant la substitution d'une charge positive à une charge négative produit des cinétiques d'inactivation rapides dans le canal Ca<sub>v</sub>1.2 et la chimère CEEE. Ces résultats suggèrent qu'une charge positive ou neutre à la position 462 accélère les cinétiques d'inactivation. Cependant, il n'existe pas de corrélation stricte entre les cinétiques d'inactivation et une seule propriété chimique (charge, hydrophilicité, hydrophobicité, polarité) du résidu muté. Dans certains cas, la taille du résidu semble affecter les cinétiques d'inactivation puisque les acides aminés neutres mais de petites tailles produisent des cinétiques d'inactivation plus rapides que des mutations avec des résidus neutres mais plus gros. En effet, pour les résidus ayant la même hydrophilicité, ceux qui sont plus petits sont les plus susceptibles d'accélérer les cinétiques d'inactivation. C'est le cas des résidus N et Q qui sont tous les deux hydrophiles, neutres et polaires, mais N ayant une taille plus petite produit des cinétiques plus rapides à +20 mV comparativement à Q.

Aucune autre mutation au niveau de la boucle AID n'a pu reproduire les effets de E462R sur les cinétiques d'inactivation du canal  $Ca_v1.2$  ou de la chimère CEEE même si on a introduit une arginine dans la moitié C-terminale de l'hélice AID telles que dans les mutations L468R, D469R et Q473R. Ces observations confirment l'importance des résidus chargés positivement dans la partie N-terminale de l'hélice pour obtenir des cinétiques rapides d'inactivation dans les canaux  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . On peut, en effet, supposer que l'introduction de l'arginine provoque un changement structural qui favorise l'accélération des cinétiques d'inactivation.

#### **IV.3 E462R module la dépendance en voltage de l'inactivation de la chimère CEEE**

L'augmentation de la VDI est significativement plus importante avec une mutation impliquant une arginine qu'avec une lysine, quoique les deux résidus portent une même charge nette positive au pH physiologique. Les VDI des mutations E462K impliquant l'introduction d'une charge positive et E462A impliquant une charge neutre, étaient similaires, alors que le remplacement de l'aspartate par un glutamate portant la même charge diminue la VDI. La mutation E462N est similaire à E46Q à 0 mV mais se comporte comme E462A à +20 mV. Ces effets confirment le rôle distinct du résidu arginine dans la VDI.

Le changement des cinétiques d'inactivation provoqué par les mutations effectuées dans la boucle I-II n'est accompagné d'aucune augmentation dans dépendance au voltage de l'inactivation du canal  $Ca_v1.2$ , ce qui suggère que la stabilité de l'état d'inactivation n'a

pas été significativement affectée par ces mutations. Cette observation est confirmée par le fait que le recouvrement de l'inactivation était similaire dans le canal mutant  $Ca_v1.2 + E462R$  et dans le canal  $Ca_v1.2$  de type sauvage (Bernatchez et al., 2001b). Il est à noter que des mutations dans les segments IIS6, IIIS6 et IVS6 ralentissent les cinétiques d'inactivation dépendante du potentiel sans toutefois avoir un effet significatif sur la VDI (Bodi et al., 2002, Shi et Soldatov, 2002).

Dans la chimère CEEE, le potentiel de la mi-inactivation est déplacé de +40 mV vers les potentiels plus positifs comparativement au canal  $Ca_v2.3$  (Bernatchez et al., 2001a). Ce changement peut être dû aux différences intrinsèques entre les familles des canaux  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$ . Lorsqu'on introduit la mutation E462R dans CEEE le potentiel de mi-inactivation se déplace de -15 mV. Ensemble ces résultats indiquent que le résidu arginine chargé positivement introduit à la 5<sup>ème</sup> position de la boucle AID peut moduler la VDI quand il est en présence d'éléments structuraux des segments II, III et/ou IV du canal  $Ca_v2.3$ . L'observation que le potentiel de mi-inactivation reste significativement plus positif comparativement au canal  $Ca_v2.3$  de type sauvage suggère que le segment I contient des éléments supplémentaires qui déterminent la dépendance au voltage de l'inactivation du canal  $Ca_v2.3$ .

#### **IV.4 $Ca_v\beta_2a$ et E462R modulent les cinétiques d'inactivation via le même mécanisme**

Le modèle d'inactivation de type « hinged-lid » des canaux calciques de type HVA implique un changement conformationnel de la boucle I-II de la sous-unité  $Ca_v\alpha_1$  qui peut alors obstruer la région du pore formée par les segments S6. Dans le canal  $Ca_v1.2$ , ce modèle est justifié à la fois par le rôle des segments IIS6 et IIIS6 (Hockerman et al., 1997; Stotz et Zamponi, 2001; Shi et Soldatov, 2002) et par le rôle dans la VDI de la boucle I-II et notamment la mutation E462R (nos travaux).

Pour confirmer l'hypothèse que la mutation E462R constitue une composante intrinsèque du segment d'inactivation, nous avons testé les propriétés de  $Ca_v1.2 + E462R$  et de CEEE + E462R en présence de la sous-unité  $Ca_v\beta_2a$  et sa forme non palmitoylée  $Ca_v\beta_2a$  C3S+C4S. La co-expression des sous-unités  $Ca_v\alpha_1$  des canaux calciques de type HVA tels que  $Ca_v1.2$  (Chien et Hosey, 1998),  $Ca_v2.1$  (Restituto et al., 2000),  $Ca_v2.2$  (Stephens et al., 2000; Takahashi et al., 2003) et  $Ca_v2.3$  (Parent et al., 1997; Qin et al., 1998) avec la sous-unité  $Ca_v\beta_2a$  provoque une diminution importante de la VDI. Le ralentissement des cinétiques d'inactivation est causé par la palmitoylation de  $Ca_v\beta_2a$  qui permet l'ancrage de cette sous-unité à la membrane plasmique (Restituto et al., 2000) grâce à la formation d'un pont disulfure entre C3 et C4 au niveau N-terminal et les phospholipides de la membrane plasmique. La mutations des deux résidus cystéine en serine (C3S + C4S) brise ce lien et permet de récupérer les cinétiques rapides des canaux  $Ca_v2.1$  (Restituto et al., 2000) et  $Ca_v2.3$  (Qin et al., 1998), ce qui indique que la palmitoylation de la sous-unité  $Ca_v\beta_2a$  peut directement empêcher le segment

d'inactivation de participer à la VDI en l'ancrant dans une conformation inaccessible (Restituito et al., 2000).

La co-expression du  $Ca_v1.2 + E462R$  et de  $CEEE + E462R$  avec la sous-unité  $Ca_v\beta2a$  ralentit significativement les cinétiques d'inactivation. L'utilisation de la forme mutée ( $Ca_v\beta2a C3S+C4S$ ) rétablit partiellement les cinétiques rapides d'inactivation de  $Ca_v1.2 + E462R$  et de  $CEEE + E462R$ . Malgré l'effet ralentisseur de  $Ca_v\beta2a$ , les cinétiques d'inactivation des canaux  $Ca_v1.2 + E462R$  et de  $CEEE + E462R$  restent respectivement plus rapides que les canaux de type sauvage  $Ca_v1.2$  et  $CEEE$ . Les valeurs  $r_{300}$  de  $Ca_v1.2 + E462R$  restent cependant significativement plus grandes avec la sous-unité  $Ca_v\beta2a C3S+C4S$  qu'avec  $Ca_v\beta3$ .

Ces résultats montrent que  $Ca_v\beta2a$  et  $E462R$  modulent la VDI par un mécanisme moléculaire commun où la mobilité de la boucle I-II jouerait un rôle significatif.

#### **IV.5 Structures déterminant l'inactivation dépendant du potentiel membranaire**

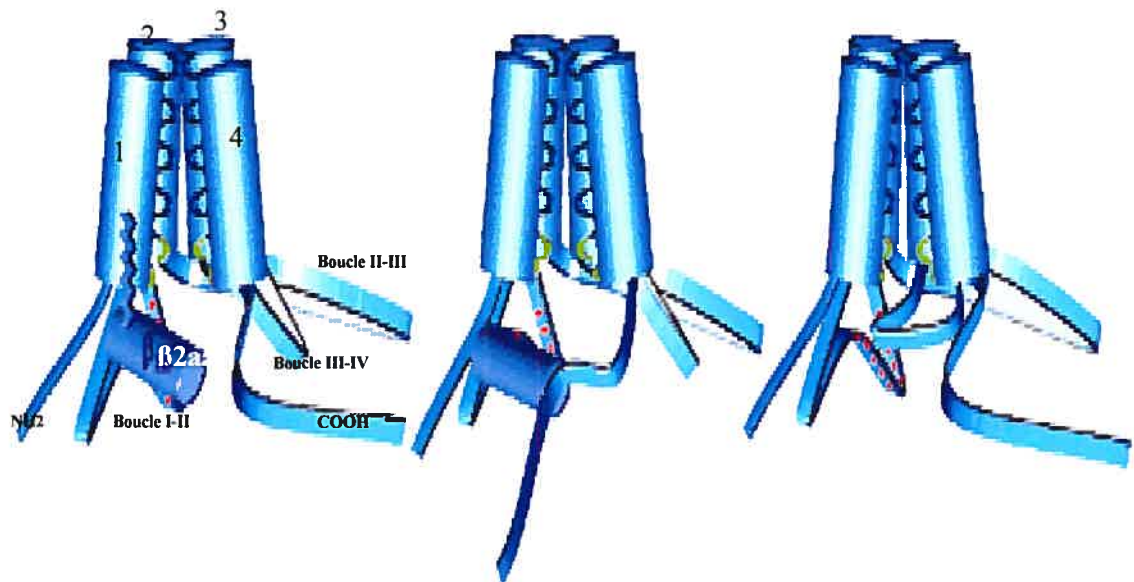
Un résidu arginine est requis à la 5<sup>ème</sup> position de la région AID de la sous-unité  $Ca_v\alpha1$  des canaux  $Ca_v1$  et  $Ca_v2$  pour que  $Ca_v\beta2a CS$  puisse avoir un effet sur la VDI. Cet acide aminé est en effet strictement conservé dans la famille de canaux  $Ca_v2$  pour lesquels l'effet accélérateur de  $Ca_v\beta2a CS$  a été reporté (Qin et al., 1998; Restituito et al., 2000; Stephens et al., 2000). La co-injection dans les ovocytes de xénope de  $Ca_v\beta2a CS$  n'a pas

affecté significativement les cinétiques d'inactivation du canal  $Ca_v1.2$  de type sauvage comparativement aux cinétiques mesurées avec la sous-unité non mutée  $Ca_v\beta2a$ . La même observation a été reportée pour le canal  $Ca_v1.2$  exprimé dans les cellules de mammifères (Chien et al., 1996).  $Ca_v\beta2a$  CS n'a pas affecté significativement la VDI de la chimère CEEE bien que cette dernière soit à 90% identique au canal  $Ca_v2.3$ . Cependant, une seule mutation (E462R) permet de rétablir l'effet accélérateur de  $Ca_v\beta2a$  CS sur les cinétiques d'inactivation, ce qui indique que cet effet de  $Ca_v\beta2a$  CS requiert une structure déterminante qui est absente dans la chimère CEEE mais présente dans CEEE + E462R. Il est peu probable que l'introduction d'un résidu arginine ait altéré la liaison de la sous-unité  $Ca_v\beta$  à la sous-unité principale  $Ca_v\alpha1$ . Nos expériences de protéines de fusion ont montré que la mutation inverse R378E correspondant au même emplacement au niveau du canal  $Ca_v2.3$  n'affecte pas la liaison [ $^{35}S$ ]-  $Ca_v\beta3$  à la boucle AID, alors que la mutation de l'acide aminé W386 conservé perturbe la liaison de la sous-unité  $Ca_v\beta3$  à  $Ca_v\alpha1$  et sa modulation des cinétiques d'inactivation (Berrou et al., 2002). En utilisant les mêmes techniques de protéines de fusion, nous avons montré que les résidus de l'extrémité N-terminale AID situés du côté hydrophile de l'hélice AID ne jouent pas un rôle déterminant dans l'interaction entre  $Ca_v\alpha1$  et  $Ca_v\beta$  du canal  $Ca_v 2.3$  (Berrou et al., 2005).

Le mécanisme régissant les cinétiques d'inactivation rapides du canal  $Ca_v1.2$  + E462R reste à élucider. Un tel mécanisme pourrait comprendre une interaction avec d'autres régions cytoplasmiques de la sous-unité  $Ca_v\alpha1$ . Il a été montré récemment que la mutation de deux résidus non conservés de la région AID (R387E et E388R) altère l'interaction protéine-protéine entre les boucles I-II et III-IV du canal  $Ca_v2.1$  (Geib et al.,

2002), ce qui augmenterait la mobilité de la boucle I-II (Sandoz et al., 2004). DeWaard et coll. ont proposé que le résidu arginine à la 5<sup>ème</sup> position de la région AID accentue l'interaction entre les boucles I-II et III-IV alors que la sous-unité  $Ca_v\beta_4$  atténuerait cette interaction (Geib et al., 2002; Sandoz et al., 2004). Cependant l'effet du résidu arginine ne semble pas être toujours contrecarré par  $Ca_v\beta$  puisque la mutation R378E dans le canal  $Ca_v2.3$  entraîne une baisse de la VDI en présence ou en absence de la sous-unité  $Ca_v\beta_3$  (Berrou et al., 2001; Berrou et al., 2002). Finalement les cinétiques d'inactivation de  $Ca_v1.2 + E462R$  sont toujours plus rapides que celles du canal  $Ca_v1.2$  de type sauvage quelle que soit la sous-unité auxiliaire ( $Ca_v\beta_3$ ,  $Ca_v\beta_2a$ ,  $Ca_v\beta_2a$  CS). Ainsi, les effets de la sous-unité  $Ca_v\beta_4$  dans la boucle I-II du canal  $Ca_v2.1$  pourraient être spécifiques à ce système.

Toutes nos observations sont compatibles avec un modèle où l'introduction d'un acide aminé arginine à la 5<sup>ème</sup> position de la région AID pourrait augmenter la mobilité de la boucle I-II. Nos résultats indiquent que les résidus chargés négativement dans la région amino-terminale de l'hélice AID ralentissent les cinétiques d'inactivation. Ces observations confirment le rôle de la boucle I-II dans l'inactivation du canal  $Ca_v1.2$  et favorisent un modèle moléculaire de type « hinged-lid » faisant intervenir la boucle cytoplasmique I-II comme dans la majorité des canaux  $Ca_v2$  (Figure 13).



**Figure 13** : Modèle d'inactivation dépendante du potentiel membranaire. Les segments S6 sont représentés en hélices, le segment d'inactivation est représentée par des astérisques rouges sur la boucle I-II.

Panneau de gauche, l'ancrage de Ca<sub>v</sub>β2a palmitoylée restreint la mobilité de la particule d'inactivation.

Panneau du milieu, l'interaction entre la sous-unité Ca<sub>v</sub>β et la région N- et/ou C-terminale de la sous-unité Ca<sub>v</sub>α1 altère la fonction de la boucle I-II.

Panneau de droite, la boucle I-II module l'inactivation du canal

(Adapté de Stotz et al., 2004).



## **V. LISTE DES RÉFÉRENCES**

Arikkath J, Chen CC, Ahern C, Allamand V, Flanagan JD, Coronado R, Gregg RG, Campbell KP. Gamma 1 subunit interactions within the skeletal muscle L-type voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem*. 2003 Jan 10;278(2):1212-9

Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):264-7

Bernatchez G, Berrou L, Benakezouh Z, Ducay J, Parent L. Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca(V)2.3 channel. *Biochim Biophys Acta*. 2001a Oct 1;1514(2):217-29

Bernatchez G, Sauvé R, Parent L. State-dependent inhibition of inactivation-deficient Ca(V)1.2 and Ca(V)2.3 channels by mibefradil. *J Membr Biol*. 2001b Nov 15;184(2):143-59

Bernatchez G, Talwar D, Parent L. Mutations in the EF-hand motif impair the inactivation of barium currents of the cardiac alpha1C channel. *Biophys J*. 1998 Oct;75(4):1727-39

Berrou L, Bernatchez G, Parent L. Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of alpha1E (Ca<sub>v</sub>2.3) calcium channels. *Biophys J*. 2001 Jan;80(1):215-28

Berrou L, Dodier Y, Raybaud A, Tousignant A, Dafi O, Pelletier JN, Parent L. The C-terminal residues in the AID helix anchor CaVbeta -subunit interaction and modulation of CaV2.3 channels. *J Biol Chem*. 2005 Jan 7;280(1):494-505

Berrou L, Klein H, Bernatchez G, Parent L. A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels. *Biophys J*. 2002 Sep;83(3):1429-42

Brice NL, Berrow NS, Campbell V, Page KM, Brickley K, Tedder I, Dolphin AC. Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody. *Eur J Neurosci.* 1997 Apr;9(4):749-59

Bulman DE, Scoggan KA, van Oene MD, Nicolle MW, Hahn AF, Tollar LL, Ebers GC. A novel sodium channel mutation in a family with hypokalemic periodic paralysis. *Neurology.* 1999 Dec 10;53(9):1932-6

Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron.* 2000 Apr;26(1):13-25. Review

Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:493-531

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-55. Review

Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature.* 2000 Dec 21-28;408(6815):936-43

Chen YH, Li MH, Zhang Y, He LL, Yamada Y, Fitzmaurice A, Shen Y, Zhang H, Tong L, Yang J. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature.* 2004 Jun 10;429(6992):675-80

Chien AJ, Carr KM, Shirokov RE, Rios E, Hosey MM. Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function. *J Biol Chem.* 1996 Oct 25;271(43):26465-8

Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ Res.* 1998 Jul 13;83(1):103-9

De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP. Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature.* 1997 Jan 30;385(6615):446-50

Dolphin AC, Wyatt CN, Richards J, Beattie RE, Craig P, Lee JH, Cribbs LL, Volsen SG, Perez-Reyes E. The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G. *J Physiol.* 1999 Aug 15;519 Pt 1:35-45

Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Bagstrom E, Lacerda AE, Wei XY and Birnbaumer L, Cloning and expression of a cardiac/brain  $\beta$  subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem.* 1992 Jan 25;267(3):1792-7

Ertel SI, Ertel EA. Low-voltage-activated T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 Feb;18(2):37-42

Fontaine B, Vale-Santos J, Jurkat-Rott K, Reboul J, Plassart E, Rime CS, Elbaz A, Heine R, Guimaraes J, Weissenbach J, et al. Mapping of the hypokalaemic periodic paralysis (HypoPP) locus to chromosome 1q31-32 in three European families. *Nat Genet.* 1994 Mar;6(3):267-72

Goldin AL. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol.* 2003 Jun;13(3):284-90

Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP. Dual function of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha 2\delta$  subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron.* 1996 Feb;16(2):431-40

Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, Tsien RW. Dominant role of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239: 57-61, 1988

Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for  $\text{Ca}^{2+}$  channel diversity. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:399-418

Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science.* 1990 Oct 26;250(4980):533-8

Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V. Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* 1992 Mar;11(3):885-90

Jen J, Yue Q, Nelson SF, Yu H, Litt M, Nutt J, Baloh RW. A novel nonsense mutation in CACNA1A causes episodic ataxia and hemiplegia. *Neurology.* 1999 Jul 13;53(1):34-7

Jimenez C, Bourinet E, Leuranguer V, Richard S, Snutch TP, Nargeot J. Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels. *Neuropharmacology.* 2000;39(1):1-10

Joutel A, Bousser MG, Biousse V, Labauge P, Chabriat H, Nibbio A, Maciazek J, Meyer B, Bach MA, Weissenbach J. A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nat Genet.* 1993 Sep;5(1):40-5

Kang, M. G., and Campbell, K. P. (2003)  $\gamma$ Subunit of Voltage-activated Calcium Channels *J. Biol. Chem.* 278, 21315–21318

Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuron.* 2004 Mar 4;41(5):745-54

Kim SH, Kim UK, Chae JJ, Kim DJ, Oh HY, Kim BJ, Lee CC. Identification of mutations including de novo mutations in Korean patients with hypokalaemic periodic paralysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 May;16(5):939-44

Klockgether T, Wullner U, Spauschus A, Evert B. The molecular biology of the autosomal-dominant cerebellar ataxias. *Mov Disord*. 2000 Jul;15(4):604-12. Review

Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F. Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunit. *J Neurosci*. 1999 Jan 15;19(2):684-91

Kubalova Z. Inactivation of L-type calcium channels in cardiomyocytes. Experimental and theoretical approaches. *Gen Physiol Biophys*. 2003 Dec;22(4):441-54

Lacerda AE, Perez-Reyes E, Wei X, Castellano A, Brown AM. T-type and N-type calcium channels of *Xenopus* oocytes: evidence for specific interactions with beta subunits. *Biophys J*. 1994 Jun;66(6):1833-43

Lambers TT, Weidema AF, Nilius B, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of the mouse epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel TRPV6 by the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensor calmodulin. *J Biol Chem*. 2004 Jul 9;279(28):28855-61

Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci*. 1999 Mar 15;19(6):1912-21

Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1317-72.

Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS 2nd, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN. The mouse stargazer gene encodes a neuronal  $\text{Ca}^{2+}$ -channel gamma subunit. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):340-7

Li J, Stevens L, Klugbauer N, Wray D. Roles of molecular regions in determining differences between voltage dependence of activation of CaV3.1 and CaV1.2 calcium channels. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):26858-67

Lory P, Monteil A. Physiopathology of calcium channels: identification of calcium channelopathies, *C R Seances Soc Biol Fil*. 1998;192(1):137-47

Lory P, Ophoff RA, Nahmias J. Towards a unified nomenclature describing voltage-gated calcium channel genes. *Hum Genet*. 1997 Aug;100(2):149-50

Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F. Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci*. 1997 Feb 15;17(4):1339-49

Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME. P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA. *Nature*. 1992 Feb 27;355(6363):827-9

Monnier, N.; Procaccio, V.; Stieglitz, P.; Lunardi, J. : Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha-1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet*. 1997 Jun;60(6):1316-25

Moss FJ, Dolphin AC, Clare JJ. Human neuronal stargazin-like proteins, gamma2, gamma3 and gamma4; an investigation of their specific localization in human brain and their influence on CaV2.1 voltage-dependent calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Neurosci*. 2003 Sep 23;4(1):23

Opatowsky Y, Chen CC, Campbell KP, Hirsch JA. Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha1 interaction domain. *Neuron*. 2004 May 13;42(3):387-99

Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell*. 1996 Nov 1;87(3):543-52

Parent L, Gopalakrishnan M. Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophys J*. 1995 Nov;69(5):1801-13

Parent L, Schneider T, Moore CP, Talwar D. Subunit regulation of the human brain alpha 1E calcium channel. *J Membr Biol*. 1997 Nov 15;160(2):127-40

Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature*. 1998 Feb 26;391(6670):896-900

Perez-Reyes E, Schneider T. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int*. 1995 Oct;48(4):1111-24

Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT. Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*. 1999 Mar;22(3):549-58

Peterson BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca(2+)-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J*. 2000 Apr;78(4):1906-20

Randall AD, Tsien RW. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology*. 1997 Jul;36(7):879-93

Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron*. 1993 Aug;11(2):291-303



Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253: 1553-1556, 1991

Stotz SC, Hamid J, Spaetgens RL, Jarvis SE, Zamponi GW. Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem*. 2000 Aug 11;275(32):24575-82

Stotz SC, Zamponi GW. Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Neurosci*. 2001 Mar;24(3):176-81. Review

Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*. 1989 Jun 22;339(6226):597-603

Tareilus E, Roux M, Qin N, Olcese R, Zhou J, Stefani E, Birnbaumer L. A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 4;94(5):1703-8

Vahedi, K., A. Joutel, P. Van Bogaert, A. Ducros, J. Maciaseck, J. F. Bach, M. G. Bousser, And E. Tournier-Lasserre. A gene for hereditary paroxysmal cerebellar ataxia maps to chromosome 19p. *Ann Neurol*. 1995 Mar;37(3):289-93

Van den Berg A, Buys CH. Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Jun;19(2):59-76

Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, Minor DL Jr. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*. 2004 Jun 10;429(6992):671-5

Wakamori M, Mikala G, Mori Y. Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type Ca<sup>2+</sup> channel current in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 1999 Jun 15;517 ( Pt 3):659-72

Walker D, De Waard M. Subunit interaction sites in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* 1998 Apr;21(4):148-54

Wei XY, E Perez-Reyes, AE Lacerda, G Schuster, AM Brown and L Birnbaumer: Heterologous regulation of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channel alpha 1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Biol. Chem.* 266: 21943-21947, 1991

Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron.* 1992 Dec;9(6):1099-115

Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TV, Snutch TP, Catterall WA. Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci.* 1995 Oct;15(10):6403-18

Wu XS, Edwards HD, Sather WA. Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *J Biol Chem.* 2000 Oct 13;275(41):31778-85

Yang J, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW. Molecular determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity and ion permeation in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Nature.* 1993 Nov 11;366(6451):158-61

Yokoyama CT, Westenbroek RE, Hell JW, Soong TW, Snutch TP, Catterall WA. Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *J Neurosci.* 1995 Oct;15(10):6419-32

Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature.* 1994 Nov 3;372(6501):97-100

## **VI. ANNEXES**

## **Annexe 1**

### **Contribution de chacun des coauteurs à la réalisation de l'article**

#### **Omar Dafi**

Le cosignataire a réalisé la plupart des manipulations sous la supervision de Dr. Lucie Parent. Il a effectué les mesures électrophysiologiques pour chaque mutant exprimé dans les œufs de xénope, l'analyse des enregistrements obtenus, une partie de la mutagenèse dirigée, la traduction de l'ADN en ARNm et l'injection des ARNm dans les ovocytes de xénope.

De plus, le cosignataire a suivi de près la réalisation de l'article en participant à la rédaction de certains passages, en apportant des idées et des éléments de discussion, et en révisant le contenu de l'article.

#### **Laurent Berrou**

Le cosignataire a produit quelques mesures électrophysiologiques utilisées dans l'article. Il a en outre participé à la révision du contenu de l'article.

#### **Yolaine Dodier**

La cosignataire a contribué à la réalisation de ce travail de recherche en effectuant la majeure partie des mutations en utilisant la technique de mutagenèse dirigée.

De plus, la cosignataire a suivi la réalisation de l'article en révisant le contenu.

#### **Alexandra Raybaud**

La cosignataire a contribué à ce travail en préparant la figure de la structure tridimensionnelle de l'hélice AID du canal calcique Cav1.2 obtenue par le logiciel «InsightII »

De plus, la cosignataire a suivi la réalisation de l'article en révisant le contenu.

#### **Rémy Sauvé**

Le cosignataire a suivi de près la réalisation de l'article en apportant des opinions et des éléments de discussion, et en révisant le contenu final de l'article.

#### **Lucie Parent**

La cosignataire a supervisé les manipulations effectuées et a analysé les résultats obtenus pour ce travail.

La cosignataire était responsable de l'élaboration et de la rédaction de l'article, assistée de tous les co-signataires.

**Annexe 2**

**Déclaration de coauteurs de l'article**

## Déclaration des coauteurs de l'article

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

DAFI, Omar (DAFO25076908)

M.Sc Physiologie (2-525-1-0), option physiologie et biophysique moléculaire

### 2. Description de l'article

Auteurs : Omar Dafi, Laurent Berrou, Yolaine Dodier, Alexandra Raybaud,  
Rémy Sauvé, Lucie Parent.

Titre : *negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer  
slow voltage dependent inactivation gating to  $ca_v1.2$*

Revue : *Biophysical Journal*, publié le 1<sup>er</sup> Novembre 2004.

### 3. Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Omar Dafi inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Le locus EED de la partie amino-terminale de l'hélice AID confère des cinétiques d'inactivation lentes au canal calcique  $Ca_v1.2$  »

Lucie Parent Coauteur		15 déc 2004 Date
Rémy Sauvé Coauteur		15 dec 2004 Date
Laurent Berrou Coauteur		15 dec 2004 Date
Yolaine Dodier Coauteur		15 déc 2004 Date
Alexandra Raybaud Coauteur		15/12/04 Date

**Annexe 3**

**Permission de l'éditeur de la revue**

## REQUEST TO REPRINT ARTICLE

## 1. Journal

- Nom complet de la revue  
Biophysical Journal.
- Adresse  
Biophysical Journal Permission Office  
Biophysical Society Office  
9650 Rockville Pike, Suite L-0512  
Bethesda, Maryland 20814-3998 USA  
Telephone: (301) 530-7114 Fax: (301) 530-7133  
E-Mail: society@biophysics.org
- Date  
December 15, 2004

2. Identification de l'éditeur  
Biophysical Society

## 3. Identification de l'article

Omar DAFI, Laurent BERROU, Yolaine DODIER, Alexandra RAYBAUD, Rémy SAUVÉ, Lucie PARENT. 2004. Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to Cav1.2. *Biophys. J.* 87(5): 3181-3192.

Mr Omar DAFI, who is currently a graduate student at the Université de Montréal, is hereby authorized to include the article mentioned above in his M.Sc. dissertation entitled : "*Le locus EED de la partie amino-terminale de l'hélice AID confère des cinétiques lentes d'inactivation au canal calcique Cav1.2*".

  
\_\_\_\_\_  
Editor  
\_\_\_\_\_  
Date

12/17/2004