

Université de Montréal

**Identification biochimique et fonctionnelle des domaines  
structuraux d'une sous-unité auxiliaire des canaux  
calciques**

par Briot Julie

Département de Pharmacologie et Physiologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D)  
en Physiologie  
option physiologie et biophysique moléculaires

mars, 2018

© Briot Julie, mars 2018

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Identification biochimique et fonctionnelle des domaines structuraux d'une sous-unité  
des canaux calciques

Présenté par

Briot Julie

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre PARENT Lucie, Directrice de recherche

Dr COMTOIS Philippe, Président- rapporteur

Dr LEDOUX Jonathan, Membre du jury

Dr CHAHINE Mohamed, Examineur externe

Dr LAFLEUR Michel, Représentant de la doyenne

## Résumé

Les canaux calciques  $\text{Ca}_v1.2$  activés par la dépolarisation membranaire jouent un rôle majeur dans le couplage excitation-contraction en promouvant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules cardiaques. Une perturbation de la fonction de ces canaux a été associée avec l'apparition de maladies cardiovasculaires telles que les arythmies cardiaques. Ces canaux forment un complexe hétéromérique constitués de la sous-unité principale  $\text{Ca}_v\alpha1\text{C}$  formant le pore et de l'association d'au moins deux sous-unités auxiliaires. L'interaction avec la sous-unité cytoplasmique  $\text{Ca}_v\beta$  est importante pour l'adressage membranaire du canal tandis que la liaison de la sous-unité extracellulaire  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  augmente les densités de courant d'un facteur 5 à 10 et permet l'activation du canal à des potentiels physiologiques. L'ensemble de ces sous-unités est donc nécessaire pour reproduire les propriétés biophysiques du canal natif.

Tandis que la modulation fonctionnelle du canal  $\text{Ca}_v\alpha1$  par  $\text{Ca}_v\beta$  a été bien caractérisée, les mécanismes de régulation par la protéine  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  ne sont pas encore élucidés. La caractérisation structurale de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  a été entreprise mais l'extrême complexité d'organisation de cette protéine en raison de ces multiples modifications post-traductionnelles (seize sites de glycosylation, ponts disulfures intra- et intermoléculaires, délétion du C-terminal pour son ancrage membranaire) a limitée cette étude. Notre stratégie alternative a alors été de purifier séparément les domaines structuraux de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  dans le but d'étudier leurs structures 3D. La structure du domaine Cache2 obtenue à basse résolution par diffusion des rayons X aux petits angles a révélé un repliement majoritairement en feuillets- $\beta$  et la présence de nombreuses régions flexibles. Cependant, la publication en 2016 de la structure du canal calcique homologue  $\text{Ca}_v1.1$  purifié à partir de muscle squelettique à une résolution de 3.6 Å par cryo-microscopie électronique a fourni l'essentiel des détails structuraux sur la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . Cette structure a montré que le domaine VWA de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  se situe à une distance atomique de  $\text{Ca}_v\alpha1\text{S}$ . Dans le but de mieux comprendre comment cette association contribue à la fonction de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  dans les cellules cardiaques, nous a amené à étudier les déterminants moléculaires responsables de l'interaction entre  $\text{Ca}_v\alpha1\text{C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) et  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . Nos études combinées de modélisation par homologie, électrophysiologie et co-

immunoprécipitation ont montré, dans un premier temps, que les deux résidus aspartates (Asp-180 et Asp-181) situés dans la boucle S1S2 du domaine I (IS1S2) de Cav1.2 étaient critiques pour la modulation du canal par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Plus particulièrement, l'Asp-181 est crucial pour l'interaction physique avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 tandis que l'Asp-180 joue un rôle important dans le déplacement du potentiel d'activation du canal vers des valeurs hyperpolarisantes. Nous avons, dans un second temps, montré que l'Asp-259 dans Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 était nécessaire pour capter un ion Ca<sup>2+</sup> et permettre le repliement optimal du site MIDAS (*metal-ion-dependant adhesion site*) sur le domaine VWA (*Won Willebrand factor A*) de la protéine. Dans cette conformation, la Ser-261 et la Ser-263 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 peuvent alternativement établir une liaison électrostatique avec l'Asp-181 de Cav1.2 ce qui stabilise l'interface et permet la régulation du canal par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.

Nos travaux ont révélé de nouveaux mécanismes moléculaires, par lesquels, la liaison de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 avec la boucle IS1S2 de Cav1.2 induit un réarrangement structural local à travers de multiples interactions fonctionnant en synergie ce qui facilite l'ouverture du canal, et indirectement l'augmentation des densités de courants à travers le pore.

**Mots-clés :** Canaux calciques, Cav1.2-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, domaine Cache2, interface macromoléculaire, interaction protéine-protéine, co-immunoprécipitation, électrophysiologie, modélisation moléculaire par homologie, dynamique moléculaire.

## Abstract

Voltage-gated calcium channels play a key role in the excitation-contraction coupling by promoting  $\text{Ca}^{2+}$  influx through  $\text{Ca}_v1.2$  into the cardiac cells. A dysregulation in the function of this channel has been involved in cardiac arrhythmias. L-type voltage-gated calcium channels are formed by the main pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha1C$  subunit assembled with two auxiliary subunits. The cytoplasmic  $\text{Ca}_v\beta$  subunit strongly interacts with the intracellular loop between repeat I and II of  $\text{Ca}_v\alpha1$  and promote cell surface expression of the channel whereas the interaction with the extracellular  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  subunit increases by 5- to 10-fold the peak current density and promote channel activation within a physiological range. The full set of subunits is required to reproduce the biophysical properties of the native channel.

For L-type voltage-gated calcium channel, the mechanism whereby  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  exerts its function is still not fully understood. A structural determination of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  conducted using a typical biochemical approach was initiated but many post-translational modifications (16 *N*-glycosylation sites, intra- and extra-disulfide bonds, glycosylphosphatidylinositol anchor) prevented the purification of the entire protein. We then devised a “divide-and-conquer” strategy that lead to the purification of the Cache2 domain of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . The low-resolution structure of the Cache2 domain by small angle X-rays scattering revealed a predominantly fold in  $\beta$ -sheet with multiple flexible regions. The publication in 2016 of the high-resolution structure of the homologous  $\text{Ca}_v1.1$  channel complex at 3.6 Å of resolution solved by cryo-electronic microscopy provided crucial molecular details regarding the organization of the structural domains of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  but also its spatial orientation within the  $\text{Ca}_v1.1$  complex. In particular, the VWA domain of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  appears to come within atomic distance of many extracellular loops of  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit. To establish whether physical interaction between the two proteins is essential to mediate the functional regulation of  $\text{Ca}_v1.2$  current by  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ , we investigated the molecular determinants responsible for the interaction between  $\text{Ca}_v\alpha1C$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) and  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . Using homology modeling, electrophysiology and co-immunoprecipitation experiments we demonstrated that residues in the first extracellular loop in repeat I of  $\text{Ca}_v1.2$  play a dominant role in the interaction and modulation by  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . In

particular, Cav1.2 Asp-181 anchors the physical interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 while Cav1.2 Asp-180 mediates the channel activation in a physiological range of membrane potential. In addition, we have explored the contribution of metal ion-dependant adhesion site (MIDAS) residues within the Von Willebrand Factor-A (VWA) domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 in mediating channel modulation. Our results show that mutating side chain at position Asp-259 and Ser-261 eliminate channel modulation although these residues are not predicted to be within atomic distance of Cav $\alpha$ 1. Hence, we propose that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259 captures the Ca<sup>2+</sup> ion which in turn folds the MIDAS motif within the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. The folding of the MIDAS around the Ca<sup>2+</sup> locks Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 and Ser-263 within atomic distance of Cav $\alpha$ 1C Asp-181.

This network of molecular interactions stabilizes the protein-protein interface demonstrating that high affinity binding of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 induce a local structural rearrangement that facilitate Cav1.2 channel opening and consequently increase Ca<sup>2+</sup> influx through the pore. Al together, the result emerging from these studies provide novel mechanism insight regarding the function of the cardiac Cav1.2 channel.

**Keywords** : Calcium channels, Cav1.2-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, Cache2 domain structure, macromolecular interface, protein-protein interaction, co-immunoprecipitation, electrophysiology, 3D homology modelling, molecular dynamics simulations.

# Table des matières

Chapitre 1 - Introduction.....	1
1.1 Importance biologique du calcium.....	1
1.1.1 Distribution du calcium dans l'organisme.....	1
1.1.2 Rôle du Ca <sup>2+</sup> dans les processus cellulaires.....	1
1.2 La contraction musculaire.....	2
1.2.1 Le potentiel d'action cardiaque d'une cellule humaine.....	2
1.2.2 Le potentiel de repos.....	4
1.2.3 Le potentiel d'action cardiaque ventriculaire humain.....	5
1.3 Le couplage excitation-contraction dans le muscle cardiaque.....	7
1.4 Identification des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire.....	9
1.5 Découverte des canaux calciques de type-L.....	13
1.6 Physiopathologie des canaux calciques de type-L Cav1.2.....	14
1.6.1 Maladies cardiaques.....	14
1.6.2 Autres maladies.....	17
1.7 Structure moléculaire des canaux calciques Cav1.2.....	18
1.7.1 Sous-unité Cav $\alpha$ 1.....	18
1.7.1.1 Structure secondaire.....	18
1.7.1.2 Propriétés structurales responsables de l'activation du canal.....	21
1.7.1.3 Propriétés structurales déterminant la conduction ionique.....	21
1.7.1.4 Propriétés biophysiques d'inactivation du canal.....	23
1.7.2 Sous-unité Cav $\beta$ .....	28
1.7.3 Sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$ .....	31
1.7.3.1 Rôle.....	32
1.7.3.2 Modifications post-traductionnelles.....	33
1.7.3.3 Domaines structuraux.....	35
1.8 Structure 3D du complexe des canaux calciques.....	39
1.8.1 Cryo-microscopie électronique (cryo-ME).....	39
1.8.2 Structure 3D du canal calcique cardiaque Cav1.2 à basse résolution.....	41

1.8.3 Structure 3D du canal homologue Cav1.1 à résolution quasi-atomique .....	44
1.8.3.1 Purification du complexe .....	44
1.8.3.2 Détails structuraux du complexe .....	44
1.8.3.3 Détails structuraux de la sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.....	46
1.8.3.4 Limites de la structure 3D.....	48
1.9 Objectifs du projet de recherche .....	49
1.9.1 Mise en contexte.....	49
1.9.2 Objectifs spécifiques.....	50
Chapitre 2 - Méthodologie .....	53
2.1 ADN utilisés.....	53
2.1.1 Obtention de mutants de Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 par mutagenèse dirigée.....	53
2.2 Expression et purification du domaine Cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.....	54
2.2.1 Expression hétérologue de Cache2 chez <i>E. coli</i> .....	54
2.2.2 Extraction des protéines en conditions dénaturantes.....	55
2.2.3 Purification de Cache2 en conditions dénaturantes.....	56
2.2.3.1 Chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC) .....	56
2.2.3.2 Chromatographie échangeuses d'anions.....	57
2.2.3.3 Repliement de la protéine Cache2 .....	58
2.2.3.4 Chromatographie d'exclusion stérique .....	58
2.3 Caractérisation de la structure secondaire par dichroïsme circulaire.....	59
2.4 Caractérisation structurale par SAXS.....	60
2.5 Interaction protéine-protéine.....	62
2.5.1 Co-immunoprécipitation.....	62
2.5.1.1 Billes magnétiques Anti-c-Myc.....	63
2.5.1.2 Billes magnétiques Anti-HA .....	63
2.5.2 Immunobuvardage de type Western-blot.....	64
2.6 Modélisation par homologie .....	64
2.6.1 Dynamique moléculaire.....	65
2.7 Mesure d'électrophysiologie.....	66
2.7.1 Enregistrement des données.....	66



2.7.2 Analyse des données.....	68
2.8 Cytométrie en flux.....	69
2.8.1 Acquisition des données .....	69
2.8.2 Quantification des données de cytométrie .....	73
Chapitre 3 - Organisation spatiale du canal calcique de type-L : donnée structurale sur la sous-unité auxiliaire Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.....	75
Chapitre 4 - Les résidus chargés négativement sur la première boucle extracellulaire du canal de type-L Cav1.2 sont responsables de l'interaction avec la sous-unité auxiliaire Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 ...	95
Chapitre 5 – Les interactions intermoléculaires au sein de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 sont nécessaires pour promouvoir sa liaison avec Cav1.2 et la modulation des courants calciques.....	142
Chapitre 6 – Discussion et conclusion .....	190
6.1 « <i>Divide-and-conquer</i> », vers une architecture des domaines structuraux de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 .....	192
6.1.1 Les protéines recombinantes VWA et Cache2 s'accumulent dans les corps d'inclusion .....	193
6.1.2 Le domaine Cache2 est replié dans sa conformation « native » .....	194
6.1.3 La structure du domaine Cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 révèle de nombreuses régions flexibles et un repliement en feuillets- $\beta$ .....	195
6.1.4 Est ce que le domaine cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est régulé par un ligand ?.....	196
6.2 Progrès dans la compréhension des mécanismes moléculaires de régulation de Cav1.2 par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 .....	198
6.2.1 L'interface d'interaction entre la boucle extracellulaire S1S2 du domaine I de Cav1.2 a été modélisée avec le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 .....	198
6.2.2 Les deux aspartates (Asp-181 et Asp-180) dans Cav1.2 contrôlent la modulation du canal par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 .....	201
6.2.3 Les résidus Asp-259 et Ser-261 du motif MIDAS dans Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 sont importants pour l'interaction et la modulation des courants de Cav1.2 .....	205
6.2.4 Méthodes expérimentales d'investigation de la liaison Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-Cav1.2.....	208
6.2.5 Vers un mécanisme d'action commun aux « <i>integrin-like proteins</i> ».....	209

6.2.6 Importance de cette étude dans un contexte physiologique.....	212
6.3 Conclusion .....	213
Chapitre 7 - Bibliographie.....	214
Annexe 1 : Publication d'un article de revue .....	i

## Liste des tableaux

Tableau I.	Potentiel électrochimique pour chaque espèce ionique. ....	5
Tableau II.	Classification moléculaire, localisation tissulaire et pharmacologie des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire.....	12
Tableau III.	Informations complémentaires sur l'ADN des différentes sous-unités des canaux calciques utilisés au cours de mes travaux de recherche.....	53

## Liste des figures

Figure 1.	Tracé typique d'un ECG montrant l'activité électrique du cœur humain au cours du temps	3
Figure 2.	Représentation schématique des principaux courants ioniques responsable du potentiel d'action ventriculaire dans une cellule humaine.....	6
Figure 3.	Couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes ventriculaires .....	9
Figure 4.	Arbre phylogénique représentant les dix sous-unités Cav $\alpha$ 1 des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire.....	13
Figure 5.	Représentation de la structure secondaire du canal calcique Cav1.2 montrant les différentes mutations associées à des pathologies cardiaques.....	17
Figure 6.	Représentation schématique de la structure secondaire de la sous-unité Cav $\alpha$ 1 de Cav1.2	20
Figure 7.	Alignement de séquence primaire des segments S4 pour les quatre domaines des différentes sous-unités Cav $\alpha$ 1 des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire	21
Figure 8.	Filtre de sélectivité du canal calcique cardiaque Cav1.2 de rat.....	23
Figure 9.	Représentation schématique d'un modèle possible d'inactivation rapide dépendante du voltage des canaux calciques.....	25
Figure 10.	Mécanisme potentiel d'inactivation dépendante du Ca <sup>2+</sup> des canaux calciques de type-L	26
Figure 11.	Structure 3D du complexe Ca <sup>2+</sup> /calmoduline avec le domaine IQ du canal Cav1.2 humain.....	28
Figure 12.	Organisation des domaines structuraux de la sous-unité Cav $\beta$ 3 .....	29
Figure 13.	Structure 3D de la sous-unité Cav $\beta$ 3 en complexe avec le domaine AID du canal Cav1.2 chez le rat.....	30
Figure 14.	Effet de l'expression de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 avec les sous-unités Cav1.2-Cav $\beta$ 3 du canal dans les cellules HEKT .....	33
Figure 15.	Organisation structurale de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de rat .....	38

Figure 16.	Description des étapes permettant de déterminer la structure 3D d'une protéine par cryo-ME	41
Figure 17.	Structure à basse résolution du complexe calcique cardiaque Cav1.2 obtenue par microscopie électronique à transmission et révélée après coloration négative.....	43
Figure 18.	Structure 3D du canal calcique Cav1.1 à une résolution moyenne de 3.6 Å de résolution (PDB 5GJV).....	46
Figure 19.	Structure cryo-ME de la sous-unité extracellulaire Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de lapin.....	48
Figure 20.	Première étape de purification.....	56
Figure 21.	Deuxième étape de purification de la protéine Cache2 .....	57
Figure 22.	Dernière étape de purification de Cache2 .....	59
Figure 23.	Profil de dichroïsme circulaire .....	60
Figure 24.	Schéma représentant le principe de l'acquisition des données par SAXS.....	61
Figure 25.	Schéma représentant le principe des deux méthodes utilisées pour la co-immunoprécipitation du complexe calcique.....	62
Figure 26.	Principe de la technique de patch-clamp en confirmation cellule entière (voltage-clamp).....	67
Figure 27.	Principe de la cytométrie en flux.....	70
Figure 28.	Représentation schématique de la détection des fluorophores sur Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 en cellules perméabilisées ou non-perméabilisées .....	72
Figure 29.	Représentation schématique de la détection des fluorophores sur la protéine Cav1.2	72
Figure 30.	Analyse des données de cytométrie en flux .....	74
Figure 31.	Modèle de l'interface d'interaction entre Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 .....	203
Figure 32.	Modèle de l'interface entre les segments S1S4 du domaine I de Cav1.2 et le mutant D259A de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 .....	204
Figure 33.	Mécanisme moléculaire proposé pour l'interface d'interaction entre le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et l'Asp-181 de Cav1.2.....	208

## Liste des abréviations

2D : deux dimensions

3D : trois dimensions

A : Alanine (Ala)

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : Adénosine di-phosphate

AID : «  *$\alpha$ -interaction domain* »

ATP : Adénosine tri-phosphate

C : Cystéine (Cys)

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

Cl<sup>-</sup> : Chlore

Cryo-ME : Cryo-microscopie électronique

D : Aspartate (Asp)

$\Delta G_{act}$  : Energie libre d'activation

DHP : Dihydropyridine

DPPC : Dipalmitoyl phosphatidylcholine

DSF : Fluorimétrie à balayage différentiel

E : Glutamate (Glu)

ECG : Électrocardiogramme de surface

E<sub>ion</sub> : Potentiel d'équilibre de l'ion

E<sub>0.5, act</sub> : Potentiel de mi-activation

ERS : Syndrome de repolarisation rapide

F : Phenylalanine (Phe)

FITC : « Fluorescein isothiocyanate »

G : Glycine (Gly)

GFP : Green Fluorescent Protein

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

H : Histidine (His)

HA : « *Human influenza hemagglutinin* »  
HEK : « *Human embryonic kidney* »  
HVA : « *High voltage activation* »  
I : Isoleucine (Iso)  
K : Lysine (Lys)  
K<sup>+</sup> : Potassium  
L : Leucine (Leu)  
LQTS : Syndrome du QT long  
LVA : « *Low voltage activation* »  
M : Methionine (Met)  
N : Asparagine (Asn)  
Na<sup>+</sup> : Sodium  
P : Proline (Pro)  
PDB : « *protein data bank* »  
Pi : Phosphate inositol  
pS : Picosiemens  
Q : Glutamine (Gln)  
R : Arginine (Arg)  
RMSD : « *root-mean-square deviation* »  
RyR : Récepteur à la ryanodine  
S : Sérine (Ser)  
SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles  
SQTS : Syndrome du QT court  
T : Thréonine (Thr)  
V : Valine (Val)  
V<sub>m</sub> : Potentiel de membrane  
W : Tryptophane (Trp)  
WT : « *Wild-type* »  
Y : Tyrosine (Tyr)

*Truly original discoveries in science are often triggered by unpredictable and unforeseen small findings.*

**Y. Ohsumi.**

**Prix Nobel de Médecine en 2016**



## Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de recherche, Dr. Lucie Parent, pour m’ avoir offert l’ opportunité de faire une thèse de doctorat et de m’ avoir gentiment accueillie au sein de son laboratoire. Au cours de ces 5 années, vous m’ avez toujours poussée à donner le meilleur de moi-même pour réussir et je vous en suis très reconnaissante.

Je tiens également à remercier chaleureusement le président rapporteur, Dr. Comtois Philippe, le membre du jury Dr. Ledoux Jonathan et l’ examinateur externe Dr. Chahine Mohamed pour avoir gracieusement accepté d’ évaluer mon travail.

Mes pensées se tournent bien évidemment vers mes collègues de laboratoire, à ceux qui sont déjà partis ou encore présent mais qui m’ ont soutenu dans les moments difficiles et fait rigoler dans les moments d’ accalmies ! Merci à Benoîte pour ta bonne humeur et ton écoute, tes péripéties quotidiennes vont me manquer mais j’ espère que je pourrai continuer à les suivre régulièrement de l’ autre côté de l’ atlantique... À Marie-Philippe, Émilie, Behzad et tous les stagiaires qui sont partis poursuivre leurs rêves quelque part mais dont leurs brins de folie ont contribué à faire de cette expérience un moment unique.

Je remercie le gang de l’ Université de Montréal et les sorties avec les « radicaux libres », tous ces moments précieux qui font redescendre la pression et qui regonfle le moral pour continuer cette aventure. Parmi eux, je remercierai plus particulièrement Paul & Marissa pour cette belle amitié et toutes les découvertes en Amérique du nord à leurs cotés!

Durant tous ces mois très difficiles, le soutien inconditionnel de ma famille et de mes amis aura été un pilier pour moi alors je tiens à remercier personnellement Maëva, Laurie et Constance pour toutes ces heures volées au téléphone, mon père Jean-Paul et ma belle-mère Josie, et bien sur ma maman, Marthe pour son appui infaillible, son écoute attentive et ces précieux conseils.

Finalement, je dédie cette thèse à Bastien, ma moitié, sans qui cette thèse n’ aurait jamais vu le jour car je n’ aurais jamais réussi à tenir aussi longtemps en expatriation. « *Grazie Mille amore* » pour ton aide indéfectible au quotidien, ta patience et tous ces mots d’ encouragements, je t’ en serais éternellement reconnaissante.

# Chapitre 1 - Introduction

## 1.1 Importance biologique du calcium

### 1.1.1 Distribution du calcium dans l'organisme

Le calcium est le 5<sup>ème</sup> élément le plus abondant sur la terre. Dans le corps humain, le calcium est un nutriment essentiel dont la concentration doit être en permanence finement régulée pour le bon fonctionnement de l'organisme (Beto, 2015). Le calcium joue un rôle fondamental dans divers processus cellulaires tels que la transduction du signal en tant que second messenger ou neurotransmetteur, ou encore dans la contraction musculaire (Clapham, 2007). Environ 99% du calcium est stocké dans les os et les dents tandis que seulement 1% se retrouve dans le sang. La concentration du calcium plasmatique s'élève à  $2.5 \text{ mM} \pm 0.5 \text{ mM}$  (O'Dell & Sunde, 1997), parmi lequel on retrouve une fraction « biologiquement inactive » liée à des protéines (albumine, globuline), et une fraction « métaboliquement active » qui correspond au calcium libre ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et dont la concentration est d'environ 1.5-1.8 mM. Par comparaison, la concentration calcique intracellulaire libre dans le cytoplasme est très faible puisqu'elle se situe aux alentours de  $0.1 \text{ }\mu\text{M}$ , ce qui correspond à une valeur  $10^4$  fois inférieure à celle du milieu extracellulaire (Bronner, 2001). Dans la cellule, le stockage du calcium est compartimentalisé et il se retrouve essentiellement dans le réticulum endo/sarcoplasmique, les mitochondries ou le noyau (Bootman, 2012). De ce fait, la cellule possède une machinerie adéquate et optimale pour contrôler et maintenir en tout temps l'homéostasie calcique ainsi que sa disponibilité en fonction des besoins de l'organisme.

### 1.1.2 Rôle du $\text{Ca}^{2+}$ dans les processus cellulaires

L'identification du calcium comme messenger intracellulaire date de 1883 suite à l'expérience du physiologiste Sidney Ringer qui avait observé que l'immersion des cœurs de grenouille dans une solution saline faite avec de l'eau du robinet de Londres permettait la contraction des cœurs contrairement à l'utilisation d'eau distillée (Ringer, 1883). Il détermina que pour maintenir la contraction, il fallait rajouter du calcium dans la solution saline ce qui donna naissance à la solution de Ringer. Ainsi, cette découverte démontra que le calcium

n'était pas seulement un sel minéral mais aussi un élément actif dans l'organisme qui jouait une fonction biologique. Plusieurs autres découvertes majeures incluant la liaison du calcium nécessaire pour l'activation de l'actomyosine (Weber, 1959), le stockage du calcium dans les vésicules sarcoplasmiques (Ebashi, 1961), ou encore la démonstration que la troponine C était la protéine responsable de la contraction des myofibrilles (Ebashi & Kodama, 1965), ont clairement démontré l'importance du calcium. Le calcium est présentement considéré comme un messenger essentiel qui régule, positivement (activation) ou négativement (inhibition), une grande variété de processus cellulaires tels que la fécondation, la transcription, la différenciation, la sécrétion, la mémoire et l'apprentissage, la mort cellulaire ou encore la contraction musculaire (Carafoli, Santella, Branca, & Brini, 2001). La régulation de l'ensemble de ces processus nécessite une augmentation de la concentration calcique permettant majoritairement l'activation de protéines spécifiques dont l'activité est dépendante de la liaison du calcium sur leur(s) site(s) actif(s) comme c'est le cas par exemple de la famille des kinases ou des phosphatases.

## **1.2 La contraction musculaire**

### **1.2.1 Le potentiel d'action cardiaque d'une cellule humaine**

Le cœur humain est un muscle capable de se contracter entre 60 à 100 fois par minute, de façon autonome durant toute la vie. Grâce à leurs activités pacemakers, les cellules cardionectrices du nœud sinusal vont se dépolariser spontanément et cette dépolarisation va se propager à l'ensemble des cellules excitables environnantes via les jonctions communicantes. Lorsque le potentiel d'action arrive au niveau de la membrane des tubules-T des cellules contractiles des ventricules, il en résulte un battement cardiaque nécessaire à l'éjection du sang vers les tissus périphériques via la veine aortique et l'aorte.

Le potentiel d'action cardiaque représente l'évolution temporelle de l'activité électrique transmembranaire pendant un cycle cardiaque. Le potentiel d'action est constitué de cinq phases qui correspondent chacune à l'activation de courants ioniques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) à travers des canaux ioniques sélectifs de la membrane des cardiomyocytes. L'électrocardiogramme de surface (ECG) reflète la séquence d'évènements électriques associée à la dépolarisation et la repolarisation du myocarde et traduit l'ensemble des

potentiels d'action des cellules du cœur bien que la majeure partie provienne de l'activité électrique des ventricules (**Figure 1**). L'activité électrique du cœur humain est caractérisée par plusieurs ondes : (1) l'onde P est caractéristique de la dépolarisation auriculaire et dure environ 0.12 secondes, (2) l'onde QRS correspond à la dépolarisation des ventricules et son amplitude est plus importante que l'onde P car la masse des ventricules est supérieure à celle des oreillettes et dure de 0.06 à 0.10 secondes, (3) l'onde T concorde avec la repolarisation des ventricules. L'intervalle QT est le résultat de la somme de la dépolarisation (QRS) et de la repolarisation (T) et correspond à la systole ventriculaire qui commence avec l'excitation des ventricules et se termine avec leurs relaxations. La durée du potentiel d'action varie en fonction du rythme cardiaque de 320 à 440 millisecondes (Johnson & Ackerman, 2009).

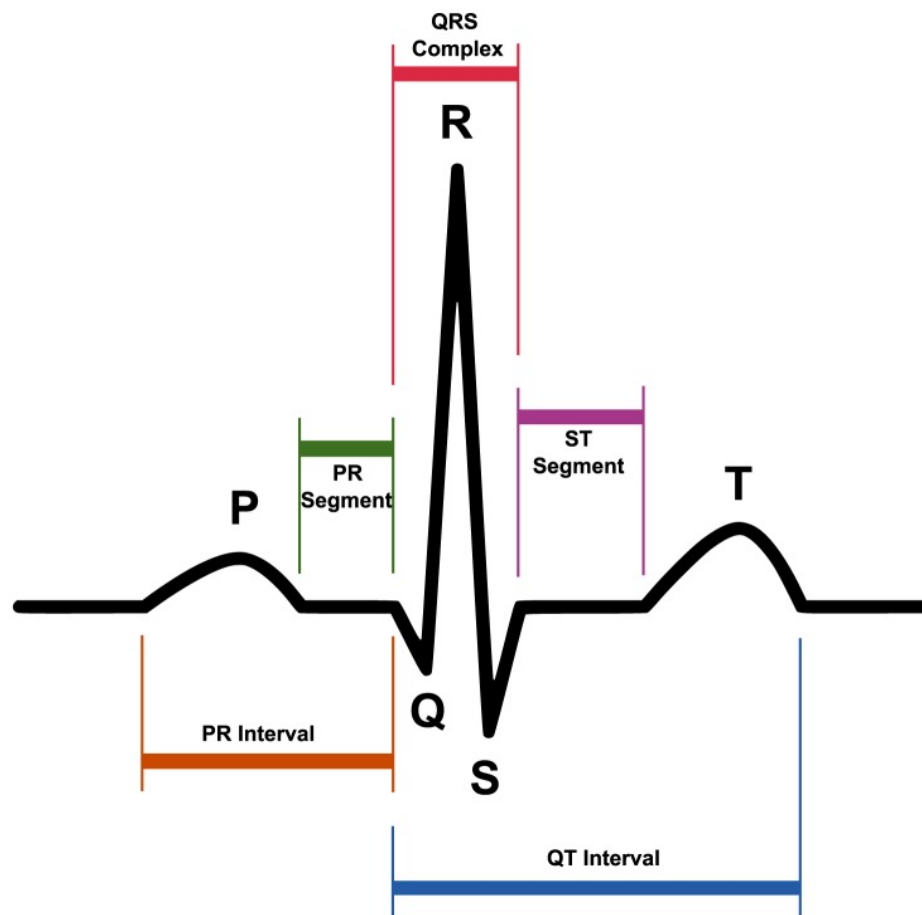


Figure 1. **Tracé typique d'un ECG montrant l'activité électrique du cœur humain au cours du temps.** L'onde P coïncide à la dépolarisation auriculaire. Le complexe QRS correspond à la dépolarisation ventriculaire et l'onde T montre la repolarisation ventriculaire. Les segments PR et ST représentent les intervalles entre les courbes de

chaque cycle. L'intervalle QT correspond au temps de systole ventriculaire qui commence avec l'excitation des ventricules et se termine à la fin de leurs relaxations (Image extraite de l'article (Elgendi, Eskofier, Dokos, & Abbott, 2014)).

### 1.2.2 Le potentiel de repos

En condition physiologique, les concentrations ioniques dans le milieu extracellulaire sont de 145 mM Na<sup>+</sup>, 5 mM K<sup>+</sup>, 120 mM Cl<sup>-</sup> et 2 mM Ca<sup>2+</sup> et de 10 mM Na<sup>+</sup>, 140 mM K<sup>+</sup>, 4 mM Cl<sup>-</sup> et 0.1 μM Ca<sup>2+</sup> à l'intérieur des cellules (Lodish H, 2000). Les ions sont répartis de façon inégale de part et d'autre de la membrane plasmique et cette répartition est soumise à deux contraintes que sont l'électroneutralité des deux compartiments (les charges positives sont équilibrées par les charges négatives) et un équilibre osmotique (même nombre de particule). La diffusion des ions à travers la membrane, par l'intermédiaire de canaux ioniques spécifiques, se fait selon un gradient de concentration (compartiment le plus concentré vers le moins concentré). Ce déplacement des ions est à l'origine d'un déséquilibre électrique responsable de l'apparition d'un gradient électrique. Ainsi, pour traverser la membrane, chaque ion est soumis à un gradient électrochimique, qui correspond à la différence entre le potentiel de membrane (V<sub>m</sub>) et le potentiel d'équilibre de l'ion (E<sub>ion</sub>). Le potentiel d'équilibre d'un ion donné peut être calculer à l'aide de l'équation de Nernst :

$$E_{ion} = \frac{RT}{z.F} \cdot \ln \frac{[ion]_{ext}}{[ion]_{int}}$$

Avec R = 8.314 J Mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> la constante des gaz parfaits, T la température en kelvin, z la charge de l'ion, F = 96485 C mol<sup>-1</sup> la constante de Faraday, et [ion] la concentration de l'ion dans le milieu extracellulaire et intracellulaire.

Au repos, la membrane plasmique est 40 fois plus perméable aux ions K<sup>+</sup> qu'aux ions Na<sup>+</sup> ce que crée une différence de potentiel membranaire négatif proportionnel au potentiel d'inversion des ions K<sup>+</sup> soit ≈ -97 mV (**Tableau I**) (Matsudaira, 2000). Si la membrane n'était perméable qu'aux ions K<sup>+</sup>, le potentiel de repos serait de -97 mV, or celui-ci prend aussi en compte les ions Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et Ca<sup>2+</sup> et cette valeur se situe aux alentours de -90 mV pour une cellule cardiaque ventriculaire.

**Tableau I. Potentiel électrochimique pour chaque espèce ionique.**

Ions	Concentration intracellulaire (mM)	Concentration extracellulaire (mM)	Potentiel d'équilibre à 22°C (mV)
K <sup>+</sup>	150	4	-97
Na <sup>+</sup>	20	145	52
Ca <sup>2+</sup>	10 <sup>-4</sup>	2	120
Cl <sup>-</sup>	4	120	-85

### 1.2.3 Le potentiel d'action cardiaque ventriculaire humain

Lorsque le potentiel d'action, généré par les cellules du nœud sinusal et se propageant à travers les jonctions gap des cardiomyocytes, arrive au niveau du tissu ventriculaire, le potentiel de membrane, qui est de -90 mV au repos, va devenir de plus en plus positif. Les canaux sodiques  $\text{Na}_v$  activés par la dépolarisation ( $\text{Na}_v1.5$ ) vont alors s'ouvrir et contribuent majoritairement au début de la phase 0 correspondant à une entrée brève mais massive (+120 mV en quelques millisecondes) d'ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule (**Figure 2**). Cette phase est rapide puisqu'elle dure entre 3 à 5 ms et permet au potentiel de la cellule de s'inverser pour atteindre +30 mV. Lors de la phase 1, les canaux sodiques vont progressivement s'inactiver et les canaux potassiques  $\text{K}_v4.3$  vont s'ouvrir, créant un courant transitoire sortant ce qui fait diminuer légèrement le potentiel de membrane d'environ 10 mV. Lors de la phase 2, le potentiel de membrane va continuer à diminuer très lentement grâce à l'ouverture des canaux calciques activés par la dépolarisation ( $\text{Ca}_v1.2$ ) qui vont permettre une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. C'est durant cette phase que le couplage excitation-contraction va s'enclencher dans le ventricule. La phase de plateau dure environ 175 ms, pendant laquelle le potentiel membranaire se retrouve aux alentours de 0 mV. Simultanément, les canaux potassiques dépendant du voltage ( $\text{K}_v7.1$ ,  $\text{K}_v11.1$ ) vont s'ouvrir entraînant une sortie d'ion  $\text{K}^+$  de la cellule, ce qui permet de débiter la phase 3, qui correspond à la repolarisation de la membrane. Au cours de cette phase, les canaux calciques s'inactivent. Durant la phase 4, les canaux potassiques dépendant du voltage se ferment et les canaux potassiques ( $\text{Kir}2.1-2.3$ ) s'ouvrent permettant une sortie plus importante d'ions  $\text{K}^+$  responsable d'une hyperpolarisation de la membrane. Finalement, les pompes ioniques (échangeur  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  NCX et la pompe

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPse) rétablissent les concentrations ioniques et le potentiel de membrane revient à sa valeur de repos. La durée totale du potentiel d'action ventriculaire varie entre 250 et 300 ms (Nerbonne & Kass, 2005).

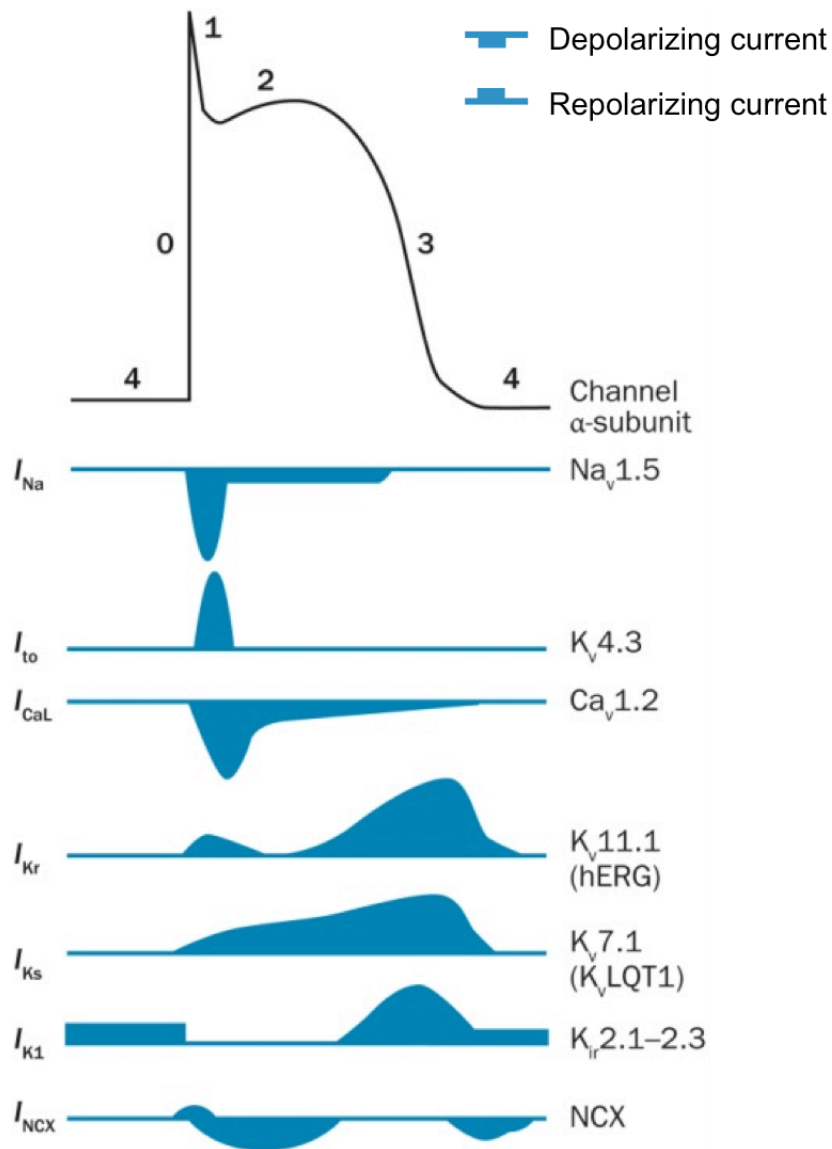


Figure 2. **Représentation schématique des principaux courants ioniques responsable du potentiel d'action ventriculaire dans une cellule humaine.** Le potentiel d'action ventriculaire est composé de quatre phases. Sous la courbe est montré l'amplitude des principaux courants générés par les différents canaux ioniques et participant au potentiel d'action. Les courants entrants dépolarisants sont négatifs (↓) et

les courants sortants repolarisants sont positifs ( $\uparrow$ ) (Image adaptée de (Boukens, Christoffels, Coronel, & Moorman, 2009)).

### 1.3 Le couplage excitation-contraction dans le muscle cardiaque

Lors de la phase 2 du potentiel d'action, les canaux calciques activés par la dépolarisation ( $\text{Ca}_v1.2$ ) vont s'ouvrir et permettent l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule ce qui va engendrer une augmentation de la concentration calcique locale. Ces canaux sont principalement localisés sur la membrane des tubules T (transverses), un espace créé à partir d'une invagination du sarcolemme. Les tubules T sont répartis régulièrement le long de la cellule. Cette configuration de la cellule cardiaque crée un espace fonctionnel qui permet au réticulum sarcoplasmique d'être localisé à proximité des canaux calciques (**Figure 3**). Ainsi, à leur tour, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  vont permettre l'ouverture des récepteurs à la ryanodine ( $\text{RyR2}$ ), ce qui va induire la libération d'une plus grande quantité d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire totale va augmenter d'un facteur 10 en passant de  $0.1 \mu\text{M}$  à  $1 \mu\text{M}$  (Carafoli et al., 2001). Ce mécanisme est connu sous le nom de libération de calcium induite par le calcium ou « *calcium-induced calcium release* ». Le calcium ainsi disponible va diffuser dans le cytosol pour venir se fixer sur les éléments contractiles des myofibrilles. La cellule musculaire est majoritairement composée de myofibrilles tandis que le cytosol et les organites n'occupent qu'une petite place dans la cellule. Chaque myofibrille comprend des protéines contractiles telles que l'actine et la myosine associées à des protéines régulatrices (troponine I/C/T, tropomyosine) et accessoires (titine, nébuline). Au repos, les chaînes d'actine qui sont couplées à l'adénosine di-phosphate (ADP) et au phosphate inorganique ( $\text{P}_i$ ) sont en contact avec la tropomyosine et les trois protéines de troponines (I, C et T) de sorte que le site de liaison de l'actine à la myosine est inaccessible (Galinska-Rakoczy et al., 2008). Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  augmente dans la cellule, il vient se fixer sur la troponine C et déplace la tropomyosine démasquant ainsi les sites de fixation de la myosine sur l'actine. La libération de ce site va permettre à la myosine de créer un pont d'union avec l'actine, ce qui engendre une flexion de la tête de myosine de  $90^\circ$  à  $45^\circ$  et initie le glissement des filaments de myosine sur les filaments d'actine voisin suivi de la libération de l'ADP et du  $\text{P}_i$ . Le site ATPase devient donc disponible. La liaison d'une nouvelle molécule l'ATP a pour effet de dissocier le pont d'union entre l'actine et la myosine, ce qui va permettre à la myosine de



retourner à sa position initiale. L'hydrolyse de la molécule d'ATP en ADP + Pi emmagasine de l'énergie permettant au prochain cycle de recommencer. La liaison de la myosine avec une molécule d'actine voisine fait coulisser petit à petit le filament fin et produit la contraction. La libération de l'ATP est rapide ( $\sim 200$  à  $800 \text{ s}^{-1}$ ) tandis que l'ADP reste accroché à la myosine ( $\sim 16 \text{ s}^{-1}$ ) ce qui ramène le complexe à sa position de départ ( $45$  à  $90^\circ$ ). Ce cycle de liaison/libération ATP/ ADP + Pi se répète tant que le réticulum sarcoplasmique n'a pas recapté tout le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré en réponse au potentiel d'action (Cooper & Hausman, 2013).

Suite à la contraction, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire va diminuer, grâce à l'action de plusieurs transporteurs, pour retourner à sa valeur de base ( $0.1 \mu\text{M}$ ). Ce processus engendre la dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  de la troponine C et le retour de l'inhibition du complexe tropomyosine-troponine sur l'actine ce qui engendre la relaxation du muscle. Un des principaux effecteurs est la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, aussi connu sous le nom de SERCA, présente sur la membrane du réticulum sarcoplasmique mais dont l'activité est normalement inhibée par le phospholamdan (PLB) (Gorski, Trieber, Ashrafi, & Young, 2015). La phosphorylation du PLB par la protéine kinase A (PKA) va lever cette inhibition et permettre de recapter activement les ions  $\text{Ca}^{2+}$  contre son gradient de concentration dans les citernes réticulaires en hydrolysant de l'ATP (Periasamy & Huke, 2001). Il y a également une contribution importante de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) localisé sur la membrane plasmique, qui en utilisant le gradient électrochimique du  $\text{Na}^+$  permet l'entrée de 3 ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule contre l'expulsion d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Shattock et al., 2015).

Dans le cœur humain, l'ensemble de ce processus comprenant la dépolarisation du cardiomyocyte, la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le  $\text{Ca}^{2+}$ , la contraction, la relaxation et la période réfractaire dure en moyenne 600 ms.

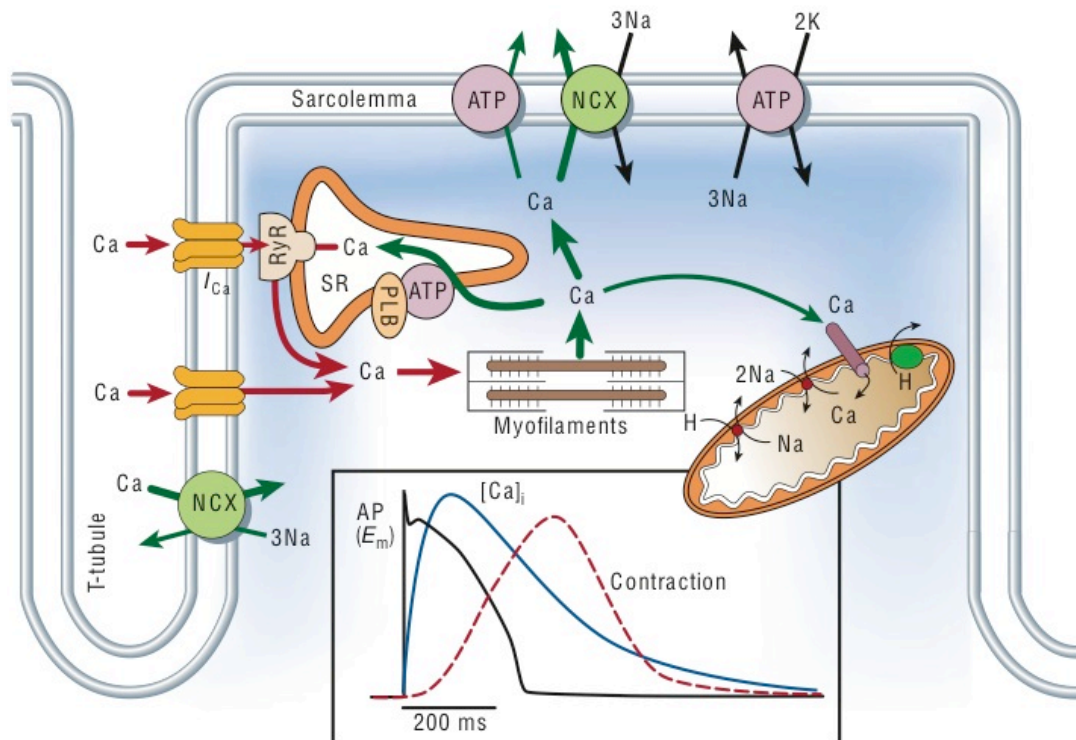


Figure 3. **Couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes ventriculaires.** Dans les tubules T, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les canaux  $\text{Cav}1.2$  va engendrer l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR) et le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum sarcoplasmique. Le  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi disponible va se lier aux protéines de la fibre musculaire entraînant la contraction de la cellule cardiaque (flèche rouge). Lors de la relaxation (flèche verte), la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire va diminuer grâce à l'action de plusieurs systèmes. Le mécanisme principal de recapture des ions  $\text{Ca}^{2+}$  a lieu dans le réticulum sarcoplasmique via la pompe SERCA. Trois autres mécanismes moins importants permettent la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie par un système uniport ou bien le  $\text{Ca}^{2+}$  sera excrété dans le milieu extracellulaire grâce à l'échangeur NCX et la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (Image extraite de l'article (Bers, 2002)).

## 1.4 Identification des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire

Les canaux calciques activés par la dépolarisation ( $\text{Cav}$ ) jouent un rôle physiologique crucial en convertissant un signal électrique en un influx calcique dans la cellule, ce qui va engendrer une série d'évènements en fonction du type cellulaire dans lequel ce canal est exprimé, allant de la contraction des cellules musculaires à la libération de neurotransmetteurs dans les neurones ou encore la sécrétion d'hormones par les cellules pancréatiques par exemple.

Dans les cellules de mammifères, les canaux calciques  $Cav$  ont été répertoriés en cinq classes distinctes en fonction des propriétés physiologiques et pharmacologiques de la sous-unité principale  $Cav\alpha1$  qui forme le pore du canal: (1) type L, (2) type T, (3) type P/Q, (4) type N et (5) type R (**tableau II**) (Peracchia, 1994). Les canaux de type L, P/Q, N et R appartiennent à la classe de canaux qui sont activés par de forte dépolarisation (« *High Voltage Activation* » HVA) typiquement entre -30 et -20 mV par opposition aux canaux LVA (« *Low Voltage Activation* ») de type T qui s'activent près du potentiel membranaire soit aux alentours de -70 mV.

Dans les cellules cardiaques, l'entrée de  $Ca^{2+}$  se fait majoritairement à travers les canaux calciques de type L et les canaux calciques de type T. Les canaux de type L sont exprimés dans tous les tissus cardiaques tandis que les canaux de type T sont principalement observés dans les oreillettes, les fibres de Purkinje et les cellules pacemakers. Les canaux calciques de type L pour « *long-lasting* » se caractérisent par une activation à des potentiels membranaires élevés (entre -30 et -10 mV), une conductance unitaire élevée pour les ions  $Ba^{2+}$  (15-25 picoSiemens pS), une inactivation lente (>500 ms) et une perméabilité plus grandes pour les ions  $Ba^{2+}$  que  $Ca^{2+}$  (Yamakage & Namiki, 2002). Ces canaux sont sensibles aux antagonistes tels que les dihydropyridines (nifedipine), phenylalkylamines (verapamil) et benzothiazepine (diltiazem) utilisés en thérapeutique cardiovasculaire (Hofmann, Flockerzi, Kahl, & Wegener, 2014). Les composés de la famille des dihydropyridines vont se lier avec une forte affinité (de l'ordre du nM) dans la section extracellulaire du pore (IIS6, IVS6), préférentiellement quand le canal est dans un état inactivé, alors que le site de liaison des phenylalkylamines et benzothiazepines se situe à l'intérieur du pore et il est accessible seulement quand le canal est dans un état ouvert (Hockerman, Peterson, Johnson, & Catterall, 1997). Ces médicaments sont généralement prescrits dans le traitement des arythmies cardiaques, les angines de poitrine et de l'hypertension. Les canaux de type L sont constitués de quatre sous-familles :  $Cav1.1$  est majoritairement retrouvé dans le muscle squelettique,  $Cav1.2$  et  $Cav1.3$  sont essentiellement exprimés dans le muscle cardiaque, les neurones et les cellules endocrines, tandis que  $Cav1.4$  est localisé dans la rétine et les cellules immunitaires (Catterall, 2011).

Au sein des canaux HVA, il existe également une sous famille de canaux qui se compose de Cav2.1 (type P/Q pour « *Purkinje* ») fortement exprimé au niveau des cellules de Purkinje du cervelet, Cav2.2 (type N pour « *Neuronal* ») exprimé dans les neurones et les cellules endocrines, et Cav2.3 (type R pour « *Residual* ») retrouvé dans le muscle lisse et cardiaque, les neurones et les cellules endocrines (Simms & Zamponi, 2014). Les canaux Cav2.1 et Cav2.2 jouent un rôle majeur dans la libération de neurotransmetteurs et dans la transmission synaptique. Ces canaux présentent des similarités structurales et fonctionnelles avec les canaux type L, mais sont résistants aux dihydropyridines, phenylalkylamines et benzothiazepines et sont sensibles à certaines toxines ( $\omega$ -agatoxine et  $\omega$ -conotoxine) (Dolphin, 2006).

Les canaux de type T pour « *Transient or tiny* » appartiennent à la famille des canaux LVA et sont activés à de faibles dépolarisations (-70 V), ont une faible conductance (8-12 pS) et une inactivation rapide (20-50 ms). La sélectivité pour les ions  $Ba^{2+}$  est similaire aux ions  $Ca^{2+}$ . Les canaux de type T sont subdivisés en trois familles moléculaires: Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 et sont majoritairement retrouvés dans les neurones, les cellules de conduction cardiaque, les cellules du foie et du rein (Yunker & McEnery, 2003). Ces canaux sont résistants aux dihydropyridines qui bloquent les canaux Cav1 et les toxines qui bloquent les canaux Cav2 mais sont la cible de médicaments prescrits comme antiépileptiques tels que zonisamide (Cav3.1-3.3), triméthadione (Cav3.2) et ethosuximide (Cav3.1, Cav3.2) (Kopecky, Liang, & Bao, 2014). Contrairement aux deux autres familles de canaux (Cav1-2), il y a encore très peu d'agents pharmacologiques bloquant spécifiquement les canaux de type T sur le marché.

**Tableau II. Classification moléculaire, localisation tissulaire et pharmacologie des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire ((Catterall, Perez-Reyes, Snutch, & Striessnig, 2005; Ertel et al., 2000; Wormuth et al., 2016)).**

Classification				Localisation tissulaire	Pharmacologie
Seuil d'activation	Courant	Sous unité $\alpha 1$	Ancienne nomenclature		
Haut seuil d'activation (HVA)	Type-L	Ca <sub>v</sub> 1.1	$\alpha 1S$	Muscle squelettique	Dihydropyridine Phénylalkylamine Benzothiazépine
		Ca <sub>v</sub> 1.2	$\alpha 1C$	Muscles cardiaque et lisse, neurones et cellules endocrines	
		Ca <sub>v</sub> 1.3	$\alpha 1D$	Neurones, muscle cardiaque, cellules endocrines	
		Ca <sub>v</sub> 1.4	$\alpha 1F$	Rétine	
	Type-P/Q	Ca <sub>v</sub> 2.1	$\alpha 1A$	Neurones, cellule pancréatique $\beta$	$\omega$ -Agatoxine
	Type-N	Ca <sub>v</sub> 2.2	$\alpha 1B$	Neurones	$\omega$ -Conotoxine
	Type-R	Ca <sub>v</sub> 2.3	$\alpha 1E$	Neurones, cellules endocrines	c-Vc1.1 (version cyclique de la $\alpha$ -Conotoxine)
Bas seuil d'activation (LVA)	Type-T	Ca <sub>v</sub> 3.1	$\alpha 1G$	Neurones, muscles cardiaque et lisse, cellules endocrines	Zonisamide Ethosuximide Triméthadione
		Ca <sub>v</sub> 3.2	$\alpha 1H$		
		Ca <sub>v</sub> 3.3	$\alpha 1I$		

Les canaux calciques Cav1, Cav2 et Cav3 ont une homologie de séquence de plus de 80 % entre les mêmes membres de leur sous-famille (**Figure 4**). La comparaison des séquences primaires des segments transmembranaires et du pore (environ 350 acides aminés) a montré que les canaux calciques Cav1 sont les plus proches des canaux Cav2 avec une identité de séquence de 52 % tandis que les canaux HVA (Cav1 et Cav2) sont plus éloignés des canaux LVA (Cav3) avec seulement une identité de séquence de 28 % (Ertel et al., 2000).

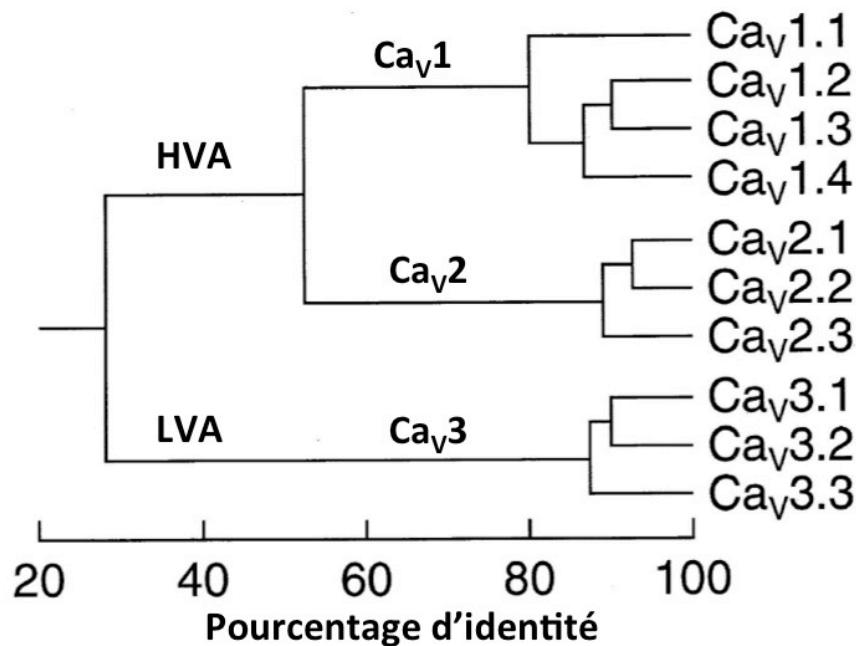


Figure 4. **Arbre phylogénétique représentant les dix sous-unités Cav $\alpha$ 1 des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire.** Le schéma montre le pourcentage d'identité au niveau de la séquence primaire des segments transmembranaires et le pore (environ 350 acides aminés) pour les différentes familles de canaux : Cav1, Cav2 et Cav3 (Image adaptée de (Ertel et al., 2000)).

## 1.5 Découverte des canaux calciques de type-L

Les canaux calciques de type L ont été découverts vers le milieu des années 1980. Au départ, ces canaux ont été appelés les « récepteurs à la dihydropyridine » en raison de leur habileté à lier une molécule de dihydropyridine. Le récepteur à la dihydropyridine a d'abord été purifié à partir de muscle squelettique de lapin par l'équipe de William Catterall (Curtis & Catterall, 1984) puis plus tard, dans d'autres tissus, par d'autres laboratoires (Flockerzi, Oeken, & Hofmann, 1986; Leung, Imagawa, & Campbell, 1987; Takahashi & Catterall, 1987). La purification de ce récepteur à partir de tubules transverses solubilisés dans un tampon contenant de la digitonine a permis l'identification, à l'aide d'anticorps polyclonaux spécifiques, de quatre sous-unités ayant des poids moléculaires distincts : 175 kDa (sous-unité  $\alpha$ 1), 170 kDa (sous-unité  $\alpha$ 2 $\delta$ ), 52 kDa (sous-unité  $\beta$ ) et 32 kDa (sous-unité  $\gamma$ ) avec une stœchiométrie de 1 : 1 : 1 : 1 (Leung et al., 1987). En 1987, le groupe de Numa (Tanabe et al.,

1987) rapporte pour la première fois le clonage de l'ADNc codant pour la sous unité  $\alpha 1$  du récepteur à la dihydropyridine provenant de muscle squelettique. Peu de temps après, l'ADNc des sous-unités auxiliaires du récepteur ( $\alpha 2\delta$  (Ellis et al., 1988),  $\beta$  (Ruth et al., 1989) et  $\gamma$  (Jay et al., 1990b)) sont aussi clonés. En 1989, l'ADNc correspondant au récepteur à la dihydropyridine issu de tissu cardiaque est lui aussi cloné (Mikami et al., 1989). Ainsi, le clonage de l'ensemble des protéines formant le récepteur à la dihydropyridine ouvre la porte à l'étude de ces protéines en système recombinant permettant d'avoir accès à la fois aux rôles physiologiques de chacune de ces sous-unités auxiliaires et à la caractérisation structurale de l'ensemble du complexe. La reconstitution de ce récepteur dans des bicouches lipidiques et son étude par des techniques électrophysiologiques a montré qu'il avait des propriétés fonctionnelles, biochimiques et pharmacologiques similaires à celles des canaux calciques de type L (Flockerzi, Oeken, Hofmann, et al., 1986) prouvant alors que le récepteur à la dihydropyridine est en fait un canal calcique. Finalement, bien que l'ancien nom perdure encore dans quelques ouvrages, le récepteur à la dihydropyridine dans le muscle squelettique correspond au canal Cav1.1 tandis que le récepteur à la dihydropyridine dans le muscle cardiaque est Cav1.2.

## **1.6 Physiopathologie des canaux calciques de type-L Cav1.2**

### **1.6.1 Maladies cardiaques**

Dans les cellules cardiaques, les canaux calciques de type L jouent un rôle unique dans l'initiation du couplage excitation-contraction. Une perturbation de la fonction de ce canal suite à une mutation génétique, engendre dans certain cas, l'apparition de situations pathologiques.

Chez les souris, une invalidation du gène *CACNA1C* (« *knock-out* ») sur les deux allèles codant pour Cav1.2 (Cav1.2 *-/-*) entraîne la mort du fœtus au cours de son développement embryonnaire suite à un défaut de contraction du myocarde (Seisenberger et al., 2000). Toutefois, il est intéressant de noter que dans le cas d'une inactivation du gène *CACNA1C* sur une seule des allèles codantes pour Cav1.2 (Cav1.2 *-/+*), les souris survivent et ont une fonction cardiaque identique au souris WT « *wild-type* » (Rosati et al., 2011). Ces

résultats montrent que l'expression d'un seul allèle de  $Cav1.2$  est suffisant pour observer des densités de courant calcique non significativement différentes de ceux obtenus avec les souris WT. Compte tenu de l'importance de ce gène, la cellule a développé une pression sélective en mettant en place un ou plusieurs mécanismes pouvant compenser la diminution d'expression de l'ARMM et de la protéine pour maintenir une fonction physiologique normale. Il a notamment été suggéré qu'une diminution des courants calciques de  $Cav1.2$  pouvait représenter un signal de « feedback » pour déclencher un processus compensatoire en mobilisant la machinerie transcriptionnelle au niveau de ce gène (Schroder, Byse, & Satin, 2009).

De nombreuses mutations génétiques sur le gène *CACNA1C* (identifiées chez des patients) sont associées à des arythmies cardiaques telles que le syndrome du QT long (LQTS), le syndrome du QT court (SQTS), le syndrome de Brugada (BrS) et le syndrome de repolarisation précoce (ERS) (Betzenhauser, Pitt, & Antzelevitch, 2015) (**Figure 5**).

Les syndromes SQTS, BrS et ERS sont la conséquence de mutations dites perte de fonction qui entraînent une diminution des courants calciques pouvant provenir d'un défaut d'adressage du canal à la membrane ou bien d'un changement fonctionnel du canal soit au niveau de l'activation ou de l'inactivation du canal. Les mutations par substitution A39V et G490R dans la protéine  $Cav1.2$  ont été reportées chez des patients et ont pour conséquence une forte diminution des courants calciques (Antzelevitch et al., 2007). Cette étude a démontré que la mutation A39V entraînait une accumulation sous-membranaire de la protéine indiquant un défaut dans l'adressage membranaire de  $Cav1.2$  toutefois les effets de cette mutation n'ont pas pu être reproduit avec le canal  $Cav1.2$  de rat soulignant les restrictions phénotypiques de cette mutation (Bourdin et al., 2010). Une étude plus récente a montré que la mutation A39V empêcherait la liaison du canal  $Cav1.2$  avec le lobe N-terminal de la calmoduline, et aurait pour conséquence une modification des cinétiques d'inactivation du canal dépendante du calcium (Simms, Souza, & Zamponi, 2014).

Il existe également des mutations gains de fonction dans  $Cav1.2$ . Les mutations G402S, G406R et A582D situées dans l'exon 8 du gène *CACNA1C* provoquent un ralentissement des cinétiques d'inactivation du canal et sont associées au LQT8 (Fukuyama et al., 2014; Raybaud et al., 2006; Wemhoner et al., 2015). Quatre autres mutations ont été



rapportées : P857R et R858H dans la boucle intracellulaire entre le domaine II et III, I1166T dans la boucle intracellulaire entre le domaine III-IV et A1473G à la fin du segment transmembranaire S6 dans le domaine IV. Il a été montré par une technique de quantification relative des protéines à la surface membranaire (biotinylation) que les mutations P857R et R858H entraînent une augmentation de la quantité des canaux présents à la membrane plasmique après surexpression dans ces cellules HEK (Boczek et al., 2013). La mutation I1166T cause une augmentation du courant de fenêtre qui correspond à un recouvrement de l'activation et de l'inactivation dépendante du voltage, ce qui prolonge légèrement la durée du potentiel d'action mais suffisamment pour déclencher des arythmies (Boczek et al., 2015). Concernant les effets biophysiques de la mutation A1473G, ils ne sont pas clairement établis (Gillis et al., 2012). En revanche, la majorité de ces mutations sont responsables d'un gain de fonction aboutissant à une prolongation du potentiel d'action qui se traduit par un allongement de l'intervalle QT.

L'activité des canaux  $\text{Ca}_v1.2$  est régulée par des protéines auxiliaires telles que  $\text{Ca}_v\beta$ ,  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ , la calmoduline, des protéines kinases, qui peuvent elles aussi être la cible de mutations, ce qui augmente considérablement la probabilité d'une dysfonction du canal. En effet, à ce jour, 11 mutations « faux sens » ont été identifiées sur la protéine  $\text{Ca}_v\beta2$  (T11I, A73V, S143F, S160T, K170N, L399S, T450I, S481L, D538E, R552G, R571C) et 5 mutations « faux sens » sur  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  (D550Y, S709N, S755T, Q917H, S956T) (Burashnikov et al., 2010; Templin et al., 2011). Les patients ayant une de ces mutations perte de fonction ont été diagnostiqués majoritairement avec un syndrome de Brugada, ou bien un syndrome de repolarisation précoce ( $\text{Ca}_v\beta2$  S160T et R571C,  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  S956T) ou encore une fibrillation ventriculaire idiopathique ( $\text{Ca}_v\beta2$  A73V). Sur  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ , il a été montré dans le laboratoire qu'en système recombinant les mutations simples D550Y et S709N réduisent l'expression membranaire de 30 % tandis que la double mutation D550Y/Q917H diminue de 60 % l'expression à la membrane de  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . Le double mutant diminue significativement les densités de courant de  $\text{Ca}_v1.2$  suggérant que ce variant présente un défaut d'adressage de la protéine à la surface membranaire (Bourdin et al., 2015). Sur la calmoduline, 3 mutations « faux sens » perte de fonction (D96V, D130G, F142L) ont été identifiés chez des patients et sont responsables d'une prolongation du potentiel d'action ventriculaire associée avec le

développement d'un LQTS congénital (Limpitikul et al., 2014). Ces mutations sont toutes situées sur le domaine *EF-hand* du lobe C-terminal de la calmoduline et leurs études en système recombinant ont montré que ces mutations induisaient une suppression de l'inactivation dépendante du calcium (CDI) en diminuant l'affinité du  $Ca^{2+}$  pour le domaine *EF-hand* d'un facteur 10 à 100 avec pour une conséquence une perturbation de la régulation des canaux calciques cardiaques (Crotti et al., 2013).

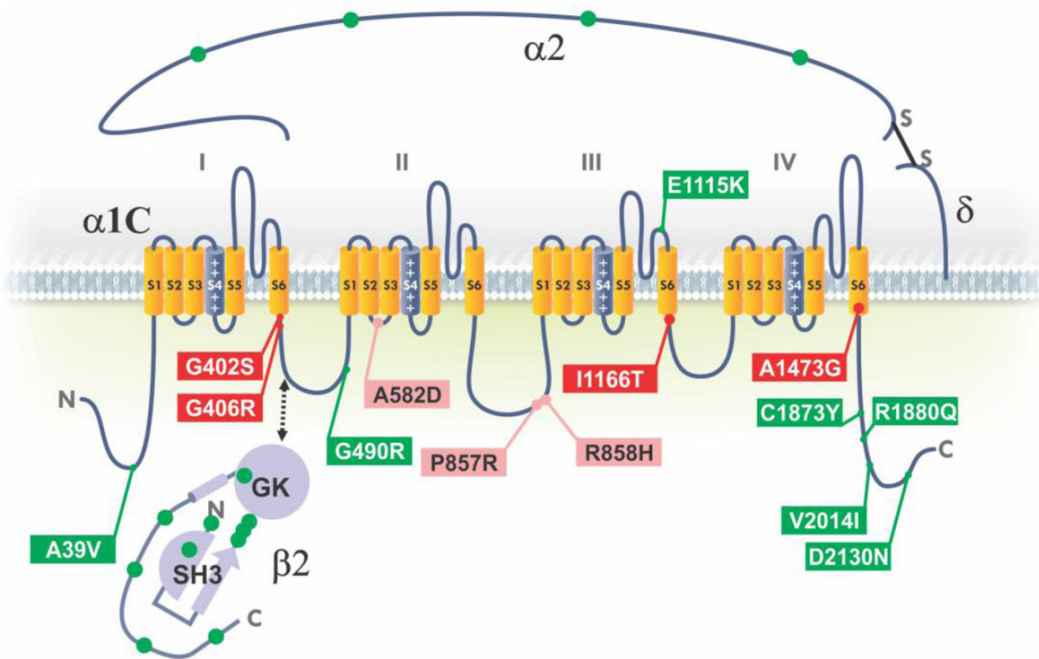


Figure 5. **Représentation de la structure secondaire du canal calcique Cav1.2 montrant les différentes mutations associées à des pathologies cardiaques.** Les variants « pertes de fonction » associées aux syndromes BrS et ou ERS et ou SQTS sont identifiées en vert. La nature et la position du variant sont seulement indiquées pour la sous-unité Cav $\alpha$ 1 tandis que les points verts indiquent le même type de mutation dans les sous-unités auxiliaires Cav $\beta$ 2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. La nature et la position des variants « gains de fonction » associées au LQTS8 (syndrome de Timothy) sont représentées en rouge et rose sur Cav $\alpha$ 1 (Image non modifié de l'article (Betzenhauser et al., 2015)).

### 1.6.2 Autres maladies

Les canaux Cav1.2 sont également abondamment exprimés dans le système nerveux, où ils représentent 90 % des canaux calciques activés par la dépolarisation (Sinnegger-Brauns et al., 2009). Ces canaux Cav1.2 sont principalement localisés sur la membrane post-

synaptique des cellules du soma et des épines dendritiques où ils participent à l'excitation et la plasticité neuronale ainsi qu'au couplage excitation-transcription. Cette voie de signalisation contrôle l'expression de gènes impliqués dans les processus d'apprentissage, de mémorisation, d'addiction aux drogues et de développement neuronal (Zamponi, Striessnig, Koschak, & Dolphin, 2015). Une altération de l'activité de ces canaux a été mise en cause dans un grand nombre de pathologies neurologiques (maladie de Parkinson, schizophrénie, autisme, épilepsie) (Simms & Zamponi, 2014). Au niveau des neurones de la substance noire, les canaux calciques  $\text{Cav}1.2$  sont présents en grande quantité et contribuent à l'élévation de la concentration calcique intracellulaire. Il en résulte un accroissement de l'activité métabolique pour maintenir l'homéostasie calcique corrélé à une augmentation du stress oxydatif mitochondrial qui fragiliserait les neurones et entraînerait leurs dégénérescences menant au développement de la maladie de Parkinson (S. M. Berger & Bartsch, 2014). Plusieurs études ont montrés que les DHPs auraient un effet neuroprotecteur sur le cerveau, et notamment l'isradipine qui est en phase III des essais cliniques pour son effet neuroprotecteur dans les premiers stade de développement de la maladie de Parkinson (Ortner & Striessnig, 2016).

## **1.7 Structure moléculaire des canaux calciques $\text{Cav}1.2$**

Les canaux calciques de type L  $\text{Cav}1.2$  forment un complexe hétéromérique constitué d'au moins trois sous-unités différentes.  $\text{Cav}\alpha1$  est la sous-unité principale du canal, entouré de deux sous unités auxiliaires,  $\text{Cav}\beta$  et  $\text{Cav}\alpha2\delta$ , qui régulent ses propriétés biophysiques. Du coté intracellulaire,  $\text{Cav}\alpha1$  est associé de façon constitutive à la calmoduline, qui régule ces cinétiques d'inactivation. La sous-unité  $\text{Cav}\alpha1$  du canal  $\text{Cav}1.2$  sera par la suite nommée  $\text{Cav}1.2$  pour faciliter la compréhension. Les différentes protéines formant le canal s'assemblent avec une stœchiométrie de 1:1:1:1. Il existe une sous-unité auxiliaire supplémentaire,  $\text{Cav}\gamma$  qui module les canaux  $\text{Cav}1.1$  mais sa présence et/ou son rôle dans le canal calcique cardiaque  $\text{Cav}1.2$  n'a jamais été démontré.

## 1.7.1 Sous-unité Cav $\alpha$ 1

### 1.7.1.1 Structure secondaire

La sous-unité principale du canal Cav $\alpha$ 1 est une protéine de 250 kDa, constituée de 24 segments transmembranaires qui se replient pour former un pore unique qui permet le passage des ions Ca<sup>2+</sup> du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Lacinova, 2005). Cav $\alpha$ 1 se replie sous une forme de pseudo-tétramère (**figure 6**) car il se compose (sur la même chaîne polypeptidique) de 4 domaines homologues mais non identiques (I, II, III et IV). Chacun de ces domaines est constitué de 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Les segments transmembranaires S1 à S4 forment le senseur de voltage tandis que les quatre régions S5-S6 s'associent pour définir le pore. Tous les domaines sont reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques (boucle I-II, boucle II-III et boucle III-IV). Les domaines N et C-terminal du canal sont situés du côté cytoplasmique et sont la cible de plusieurs protéines régulatrices intracellulaire (protéines kinases, calmoduline) et des facteurs de signalisation (facteurs de transcription).

Le canal Cav1.2 de rat contiendrait 4 sites de glycosylations sur des résidus asparagines (Asn, N) dont la mutation simultanée des quatre sites aux positions N124, N299, N1359 et N1410 diminue de moitié l'expression membranaire du canal corrélé à une diminution significative des densités de courants calciques indiquant que cette modification post-traductionnelle joue un rôle déterminant pour la fonction du canal (Park, Min, Won, & Lee, 2015). Les 4 positions équivalentes sur le canal Cav1.2 humain sont situés sur la boucle extracellulaire S1S2 ou S5S6 dans le domaine I (N153 et N328) et deux sur la boucle extracellulaire S5S6 du domaine IV (N1436 et N1487) (Lazniewska & Weiss, 2017). Toutefois, la structure 3D du canal calcique Cav1.1 de muscle squelettique a montré que seul le site N257 serait glycosylé (équivalent à N328 dans Cav1.2) (J. Wu et al., 2016a).

D'un point de vue structural, les canaux calciques sont proches des canaux sodiques Nav avec qui ils partagent la même topologie, à savoir une structure pseudo-tétramérique à 24 segments transmembranaires avec une organisation similaire des différents domaines (Tang et al., 2014). L'architecture d'un seul domaine évoque la structure des canaux potassiques Kv à 6 segments transmembranaires (Salkoff et al., 2005) à la différence que la structure tétramérique

des canaux  $K_v$  est obtenue suite à l'assemblage post-traductionnel de 4 sous-unités à 6 domaines transmembranaires (Long, Campbell, & MacKinnon, 2005).

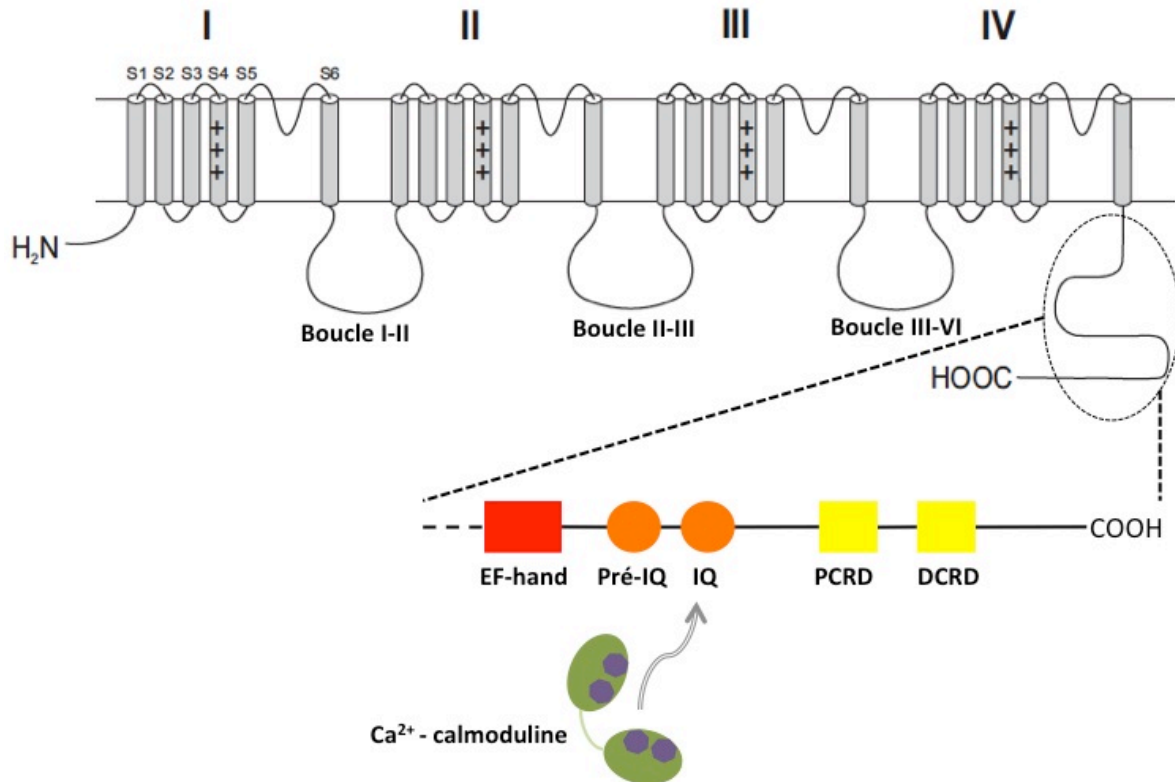


Figure 6. **Représentation schématique de la structure secondaire de la sous-unité Cav $\alpha$ 1 de Cav1.2.** Le canal forme une structure pseudo-tétramérique se composant de 4 domaines (I à IV) à 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Le segment S4 riche en acides aminés basiques constitue le point central du senseur de voltage et la boucle semi-transmembranaire entre les segments S5 et S6 forme le pore ionique. La région C-terminale a été agrandie afin de visualiser les différents domaines le constituant tel que les domaines « *EF-hand* », IQ (Isoleucine-Glutamine) et de régulation proximale (PCRD) et distale (DCRD) (Image adaptés de (Lacinova, 2005) et (Striessnig, Pinggera, Kaur, Bock, & Tuluc, 2014)).

### 1.7.1.2 Propriétés structurales responsables de l'activation du canal

Dans chacun des domaines homologues, le segment transmembranaire S4 porte une charge nette positive à pH physiologique de part la présence d'une série de cinq à six acides aminés chargés positivement de type lysine (Lys, K) ou arginine (Arg, R) qui sont intercalés tous les 3 résidus (R/K-XX) et qui se retrouvent alignés sur la même face de l'hélice- $\alpha$ . La

majorité de ces acides aminés est conservée dans les différents isoformes des canaux calciques activés par la dépolarisation (**Figure 7**). Ces résidus forment le senseur de voltage ce qui permet au canal de s'ouvrir en réponse à la dépolarisation membranaire (Lacinova, 2005). Lorsque le potentiel d'action dépolarise la membrane, les résidus positifs, sous l'influence du champ électrique, vont déplacer l'hélice- $\alpha$  du S4 vers le milieu extracellulaire et ce changement de conformation va permettre le mouvement du segment transmembranaire S6 aboutissant à l'ouverture du pore du canal (Bezanilla & Perozo, 2003).

	<b>IS4</b>	<b>IIS4</b>	<b>IIIS4</b>	<b>IVS4</b>
<b>Ca<sub>v</sub>1.1</b>	KALRAF <b>R</b> VLRPLRLVSGV	SVLRC <b>T</b> RLLRIFK <b>I</b> TKYW	VKILR <b>V</b> LRVLRPL <b>R</b> AINRA	SAFF <b>R</b> LF <b>R</b> VM <b>R</b> LI <b>K</b> LL <b>S</b> R
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	KALRAF <b>R</b> VLRPLRLVSGV	SVLRC <b>V</b> RLLRIFK <b>I</b> TRYW	VKILR <b>V</b> LRVLRPL <b>R</b> AINRA	ITFF <b>R</b> LF <b>R</b> VM <b>R</b> LV <b>K</b> LL <b>S</b> R
<b>Ca<sub>v</sub>1.3</b>	KALRAF <b>R</b> VLRPLRLVSGV	S <b>V</b> FC <b>V</b> RLLRIFK <b>V</b> TRHW	VKILR <b>V</b> LRVLRPL <b>R</b> AINRA	ITFF <b>R</b> LF <b>R</b> VM <b>R</b> LV <b>K</b> LL <b>S</b> R
<b>Ca<sub>v</sub>1.4</b>	KALRAF <b>R</b> VLRPLRLVSGV	SVLRC <b>V</b> RLLRIFK <b>V</b> TRHW	VKILR <b>V</b> LRVLRPL <b>R</b> AINRA	ITFF <b>R</b> LF <b>R</b> VM <b>R</b> LV <b>K</b> LL <b>S</b> K
<b>Ca<sub>v</sub>2.1</b>	<b>R</b> TLRA <b>V</b> RVLRPL <b>K</b> LVSGI	SVLR <b>A</b> L <b>R</b> LLRIFK <b>V</b> TKYW	<b>I</b> KSLR <b>V</b> LRVLRPL <b>K</b> TIKRL	LSFL <b>R</b> LF <b>R</b> AAR <b>L</b> I <b>K</b> LL <b>R</b> Q
<b>Ca<sub>v</sub>2.2</b>	<b>R</b> TLRA <b>V</b> RVLRPL <b>K</b> LVSGI	SVLR <b>A</b> L <b>R</b> LLRIFK <b>V</b> TKYW	<b>I</b> KSLR <b>V</b> LRVLRPL <b>K</b> TIKRL	LSFL <b>R</b> LF <b>R</b> AAR <b>L</b> I <b>K</b> LL <b>R</b> Q
<b>Ca<sub>v</sub>2.3</b>	<b>R</b> TLRA <b>V</b> RVLRPL <b>K</b> LVSGI	SVLR <b>A</b> L <b>R</b> LLRIFK <b>I</b> TKYW	<b>I</b> KSLR <b>V</b> LRVLRPL <b>K</b> TIKRL	MSFL <b>K</b> LF <b>R</b> AAR <b>L</b> I <b>K</b> LL <b>R</b> Q
<b>Ca<sub>v</sub>3.1</b>	SA <b>V</b> RT <b>V</b> RVLRPL <b>R</b> AINRV	SVLR <b>T</b> F <b>R</b> LM <b>R</b> VL <b>K</b> LV <b>R</b> FL	LRVLRLL <b>R</b> TL <b>R</b> PL <b>R</b> VISRA	IR <b>I</b> MR <b>V</b> L <b>R</b> IAR <b>V</b> L <b>K</b> LL <b>K</b> M
<b>Ca<sub>v</sub>3.2</b>	SA <b>I</b> RT <b>V</b> RVLRPL <b>R</b> AINRV	SVLR <b>T</b> F <b>R</b> LL <b>R</b> VL <b>K</b> LV <b>R</b> FL	LRVLRLL <b>R</b> TL <b>R</b> PL <b>R</b> VISRA	IR <b>I</b> MR <b>V</b> L <b>R</b> IAR <b>V</b> L <b>K</b> LL <b>K</b> M
<b>Ca<sub>v</sub>3.3</b>	SA <b>I</b> RT <b>V</b> RVLRPL <b>K</b> AINRV	SVLR <b>T</b> F <b>R</b> LL <b>R</b> VL <b>K</b> LV <b>R</b> FM	LRVLRLL <b>R</b> TL <b>R</b> PL <b>R</b> VISRA	IR <b>I</b> MR <b>V</b> L <b>R</b> IAR <b>V</b> L <b>K</b> LL <b>K</b> M

Figure 7. **Alignement de séquence primaire des segments S4 pour les quatre domaines des différentes sous-unités Ca<sub>v</sub>α1 des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire.** Les séquences des canaux calciques Ca<sub>v</sub>1.1, Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3, Ca<sub>v</sub>1.4, Ca<sub>v</sub>2.1, Ca<sub>v</sub>2.2 et Ca<sub>v</sub>2.3, Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 et Ca<sub>v</sub>3.3 sont données chez l'humain. Les acides aminés positifs formant le senseur de voltage sur chaque domaine (I à IV) sont surlignés en rouge (Image reproduite de l'article (Lacinova, 2005))

### 1.7.1.3 Propriétés structurales déterminant la conduction ionique

Tandis que la concentration de Na<sup>+</sup> dans le milieu extracellulaire est 70 fois plus élevée que la concentration de Ca<sup>2+</sup>, et que ces deux ions, sous leurs formes déshydratées, possèdent un diamètre similaire de 2 Å, il est essentiel que le pore du canal contienne les éléments nécessaires pour laisser passer majoritairement les ions Ca<sup>2+</sup> (Conway, 1981).

Le pore du canal est formé par l'association des boucles semi-transmembranaires situées entre les segments S5 et S6 de chaque domaine (**Figure 6**). La forte sélectivité de ces canaux pour les ions Ca<sup>2+</sup> provient de la présence d'un résidu glutamate (Glu, E) sur chaque domaine formant ainsi un pore avec une sélectivité fortement électro-négative « EEEE » (**Figure 8A**) (Parent & Gopalakrishnan, 1995a; Sather & McCleskey, 2003). De part leurs

rôles cruciaux pour la fonction des canaux calciques, ces quatre résidus glutamates sont fortement conservés à travers la famille des canaux calciques. Dans la structure tertiaire d'un canal bactérien modifié, les quatre résidus glutamates se font face et leurs chaînes latérales carboxyliques (COO<sup>-</sup>) se projettent vers l'intérieur du pore pour former un anneau cylindrique de charge négative capable de coordonner majoritairement le passage des ions Ca<sup>2+</sup>, bien que d'autres cations divalents (Ba<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>) puissent également traverser le filtre de sélectivité (**Figure 8B**) (J. Yang, Ellinor, Sather, Zhang, & Tsien, 1993). De plus, des études ont démontré que la contribution des quatre résidus glutamates sur les domaines I, II, III et IV dans la liaison avec le Ca<sup>2+</sup> n'est pas identique et suggérerait l'ordre d'importance suivant : E<sub>III</sub> > E<sub>IV</sub> > E<sub>II</sub> > E<sub>I</sub> (Parent & Gopalakrishnan, 1995a; J. Yang et al., 1993). L'étude menée en canal unitaire a également montré que le résidu glutamate du domaine IV jouait un rôle déterminant dans la perméabilité aux cations divalents (Parent & Gopalakrishnan, 1995a).

Par comparaison, les canaux sodiques activés par la dépolarisation (Nav) possèdent un pore de sélectivité ayant seulement deux résidus chargés négativement dans leur séquence qui est formé du motif suivant « DEKA ». Il a été montré que l'introduction de trois mutations de substitution pour créer un filtre de sélectivité « EEEE » permettait d'améliorer la perméabilité du canal Nav1.2 pour les ions Ca<sup>2+</sup> (Heinemann, Terlau, Stuhmer, Imoto, & Numa, 1992).

**A.**

Domaine I	V	F	Q	C	I	T	M	<b>E</b>	G	W	T	D	386-371
Domaine II	V	F	Q	I	L	T	G	<b>E</b>	D	W	N	S	729-740
Domaine III	V	F	T	V	S	T	F	<b>E</b>	G	W	P	E	1138-1149
Domaine IV	L	F	R	C	A	T	G	<b>E</b>	A	W	Q	D	1439-1450

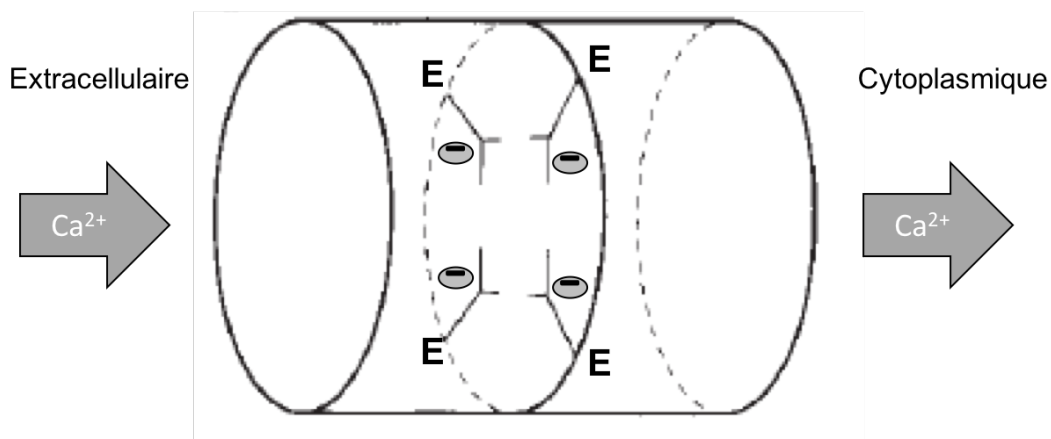
**B.**

Figure 8. **Filtre de sélectivité du canal calcique cardiaque Cav1.2 de rat.** **A.** Alignement de la séquence primaire de la boucle extracellulaire (pore) situé entre les segments semi-transmembranaire S5 et S6 pour chaque domaine. Les quatre résidus glutamates « EEEE » formant le filtre de sélectivité sont encadrés. **B.** Représentation schématique du pore de sélectivité montrant l'agencement symétrique des chaînes carboxyliques (représenté par des fourches) des quatre résidus glutamates qui permettent le passage sélectif des ions Ca<sup>2+</sup> (Image adaptée de l'article (J. Yang et al., 1993)).

#### 1.7.1.4 Propriétés biophysiques d'inactivation du canal

L'inactivation du canal survient après l'activation et plonge le canal dans un état non conducteur pendant lequel il ne peut pas être ouvert de nouveau suite à une dépolarisation membranaire. Cette propriété est importante puisqu'elle contrôle l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule au cours d'un potentiel d'action.

##### i. Inactivation dépendante du voltage (VDI)



Les canaux Cav1.2 ont la propriété intrinsèque de s'inactiver en fonction du voltage en faisant appel à un mécanisme analogue à celui des canaux potassiques (Hoshi, Zagotta, & Aldrich, 1990) et sodiques dépendant du voltage (K. S. Lee, Marban, & Tsien, 1985; Stotz & Zamponi, 2001). Les canaux potassiques s'inactivent selon un modèle de « la balle et de la chaîne (*ball-and-chain*) » dans lequel le repliement de la chaîne N-terminale cytoplasmique vient physiquement obstruer le pore bloquant ainsi le passage des ions K<sup>+</sup> (Armstrong & Bezanilla, 1977; Demo & Yellen, 1991). Dans les canaux sodiques, c'est les résidus successifs isoleucine-phénylalanine-méthionine formant le motif IFM sur la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV qui sont responsables de l'obstruction du pore et de inhibition du flux sodique (McPhee, Ragsdale, Scheuer, & Catterall, 1995).

Pour les canaux calciques, le mécanisme d'inactivation dépendante du voltage est un peu plus complexe. Les premières études réalisées à l'aide de canaux chimériques obtenus à partir des canaux Cav1.2 (lapin), Cav2.1 (rat) et Cav2.3 (raie) ont montré que l'inactivation serait médiée par le segment transmembranaire S6 du domaine I de Cav $\alpha$ 1 (Parent, Gopalakrishnan, Lacerda, Wei, & Perez-Reyes, 1995; J. F. Zhang, Ellinor, Aldrich, & Tsien, 1994). Des études complémentaires ont mis en évidence que la boucle intracellulaire entre les domaines I-II, qui contient le site de liaison de la sous-unité Cav $\beta$ , et les segments transmembranaires S6 des domaines II et III joueraient également un rôle déterminant dans l'inactivation du canal Cav $\alpha$ 1. Il a été proposé que le repliement de cette boucle I-II viendrait obstruer le pore en interagissant avec les régions distales des segments S6, empêchant ainsi le flux d'ions Ca<sup>2+</sup> de traverser le canal (**Figure 9**) (Berrou, Bernatchez, & Parent, 2001; Herlitze, Hockerman, Scheuer, & Catterall, 1997; Stotz, Hamid, Spaetgens, Jarvis, & Zamponi, 2000). De plus, il a été montré dans le canal Cav1.2 de lapin que la Gly-436, en apportant de la flexibilité à l'hélice- $\alpha$  constituant le segment transmembranaire S6 du domaine I, agit comme un pivot pour le repliement de la boucle I-II (Raybaud et al., 2006). Une étude publiée par notre groupe a démontré que le cluster de résidus négatifs (Glu-461, Glu-462, Asp-463) et plus particulièrement le Glu-462 sur la boucle I-II influence les cinétiques d'inactivation du canal Cav1.2 (Dafi et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les régions en amont ou en aval de la boucle I-II jouent un rôle déterminant dans le réarrangement structural de cette boucle lors de l'inactivation du canal.

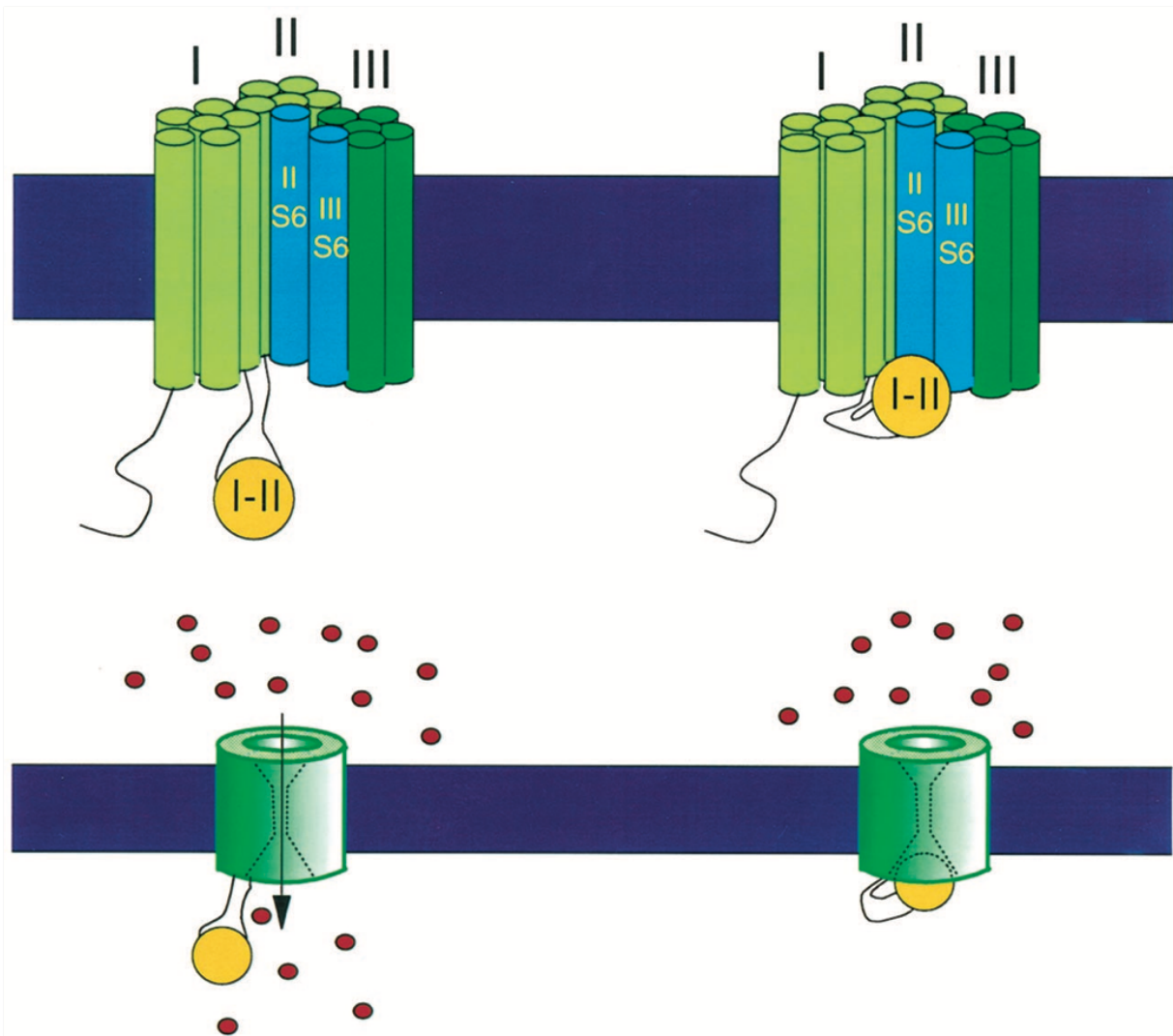
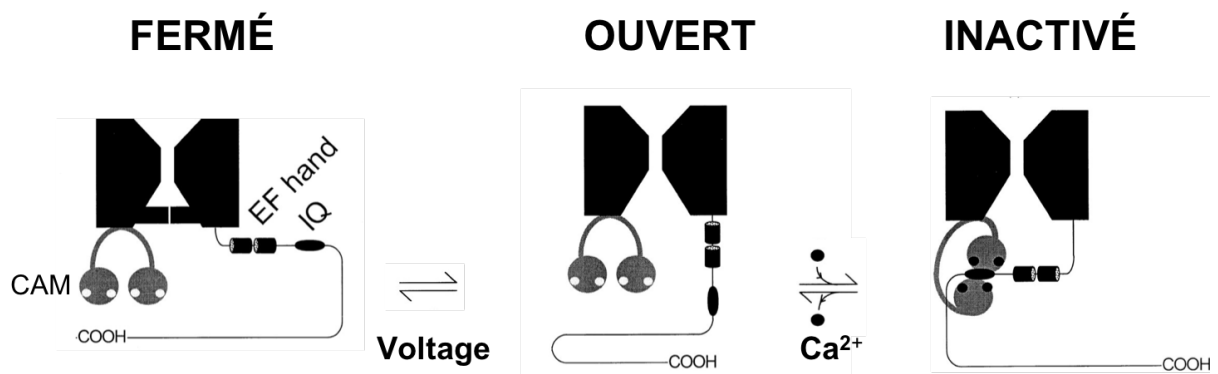


Figure 9. **Représentation schématique d'un modèle possible d'inactivation rapide dépendante du voltage des canaux calciques.** Selon le modèle de « la balle et de la chaîne », le mouvement de la boucle intracellulaire située entre les domaines I et II (I-II) de  $\text{Ca}_v\alpha 1$  viendrait obstruer physiquement le vestibule intracellulaire du pore en interagissant avec les régions distales des segments S6 sur les domaines II et III, ce qui bloquerait le flux ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Image extraite de l'article (Stotz et al., 2000)).

## ii. Inactivation dépendante du calcium (CDI)

Mise à part l'inactivation dépendante du voltage, l'augmentation de la concentration calcique dans la cellule engendre également une inactivation des canaux calciques  $\text{Cav}1.2$ , un « *feedback* » négatif nécessaire afin d'éviter que le  $\text{Ca}^{2+}$  devienne cytotoxique (Soldatov, 2012).

C'est la région C-terminale cytoplasmique, située à environ 150 acides aminés après la fin du segment S6 du domaine IV, qui contient les domaines de régulation (*EF hand* et IQ) nécessaires au contrôle de ce mécanisme (**Figure 6**) (Striessnig et al., 2014). Ce processus nécessite aussi la présence de la calmoduline, une protéine intracellulaire ubiquitaire dont l'activité est régulée par le  $\text{Ca}^{2+}$ . La calmoduline est constituée de deux lobes (N et C-terminal) pouvant lier une molécule de  $\text{Ca}^{2+}$  sur chacun de ses 4 domaines « *EF-hand* », une structure particulière en hélice-boucle-hélice. La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  sur ces quatre sites est essentielle pour l'inactivation du canal comme l'a montré la mutation simultanée des quatre aspartates en alanine (D20A, D56A, D93A, D129A) qui engendre une prolongation des courants calciques à travers le canal  $\text{Cav}1.2$  (**Figure 10**) (Peterson, DeMaria, Adelman, & Yue, 1999; Xia et al., 1998). La calmoduline, qui se lie de façon constitutive au domaine IQ de  $\text{Cav}1.2$ , joue le rôle de senseur de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.



**Figure 10. Mécanisme potentiel d'inactivation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  des canaux calciques de type-L.** Lorsque le canal est en état fermé, la calmoduline (CAM), qui n'est pas lié au  $\text{Ca}^{2+}$ , interagit de façon constitutive avec  $\text{Cav}\alpha 1$  (le site de liaison exact est encore à l'étude). Quand le canal est ouvert, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  se lient sur les domaines *EF-hand* de la CAM, et favorise sa liaison avec le domaine IQ localisé sur le domaine C-terminal de  $\text{Cav}\alpha 1$  ce qui induit l'inactivation du canal (Image adaptée de l'article (Peterson et al., 1999)).

La structure tridimensionnelle (3D) du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-domaine IQ de  $\text{Cav}1.2$  a été obtenue à haute résolution (2 Å) par cristallographie (F. Van Petegem, F. C. Chatelain, & D. L. Minor, Jr., 2005b). Cette structure montre que l'hélice- $\alpha$  adoptée par les 22 résidus du domaine IQ se loge entre les lobes N et C-terminal du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline grâce à de multiples interactions électrostatiques et hydrophobes de type van der Waals entre

les résidus aromatiques de Cav1.2 et l'anneau de résidus chargés négativement sur la calmoduline (**Figure 11**). Selon la conformation, entre 21 et 22 résidus dans Cav1.2 sont impliqués dans le réseau complexe d'interaction avec la calmoduline. Sur le domaine IQ de Cav1.2, l'ancre aromatique formée des résidus Tyr-1627, Phe-1628, Phe-1631 agrippe le lobe N-terminal de la calmoduline tandis que les résidus Ile-1624 et Gln-1625 positionnent et stabilisent l'hélice- $\alpha$  du domaine IQ en faisant contact avec le lobe C- et N-terminal respectivement. De plus, en amont du domaine IQ est situé le domaine « *EF-hand* » du canal Cav1.2 qui ne joue pas de rôle directement dans l'inactivation du canal mais dont les changements structuraux après liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  sont nécessaires pour l'interaction entre le domaine IQ et la calmoduline (Bernatchez, Talwar, & Parent, 1998; de Leon et al., 1995).

En amont du domaine IQ, il existe deux autres domaines de régulation, un proximal (PCRD) et un distal (DCRD) ayant chacun une structure en hélice- $\alpha$ , qui ont la particularité d'interagir pour former le complexe de régulation C-terminal. Il a été montré que ce complexe de régulation C-terminal est capable de diminuer les effets de l'inactivation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  en entrant en compétition avec la liaison de la calmoduline sur le domaine IQ (Hulme, Yarov-Yarovoy, Lin, Scheuer, & Catterall, 2006).

Il a également été proposé dans les canaux calciques de type-L neuronaux que l'inactivation par le  $\text{Ca}^{2+}$  pouvait être régulée par un mécanisme enzymatique. Ainsi, il a été montré que la phosphorylation de la Ser-1928 sur le canal Cav1.2 de souris par la protéine kinase A (PKA) augmenterait l'activité du canal tandis que la déphosphorylation de ce site par les phosphatase 1 (PP1) et 2A (PP2A) interviendrait dans l'inactivation du canal (Budde, Meuth, & Pape, 2002; Davare, Horne, & Hell, 2000; Meuth, Pape, & Budde, 2002; Qian et al., 2017).

Bien qu'il ait été montré que l'expression de la sous-unité Cav $\alpha$ 1 dans des fibres musculaires squelettiques était suffisante pour générer un courant calcique (Perez-Reyes et al., 1989), les niveaux d'expression du canal étaient relativement bas et les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal étaient anormales. La co-expression du canal avec les sous-unités auxiliaires est essentielle pour rétablir les propriétés biophysiques du canal natif.

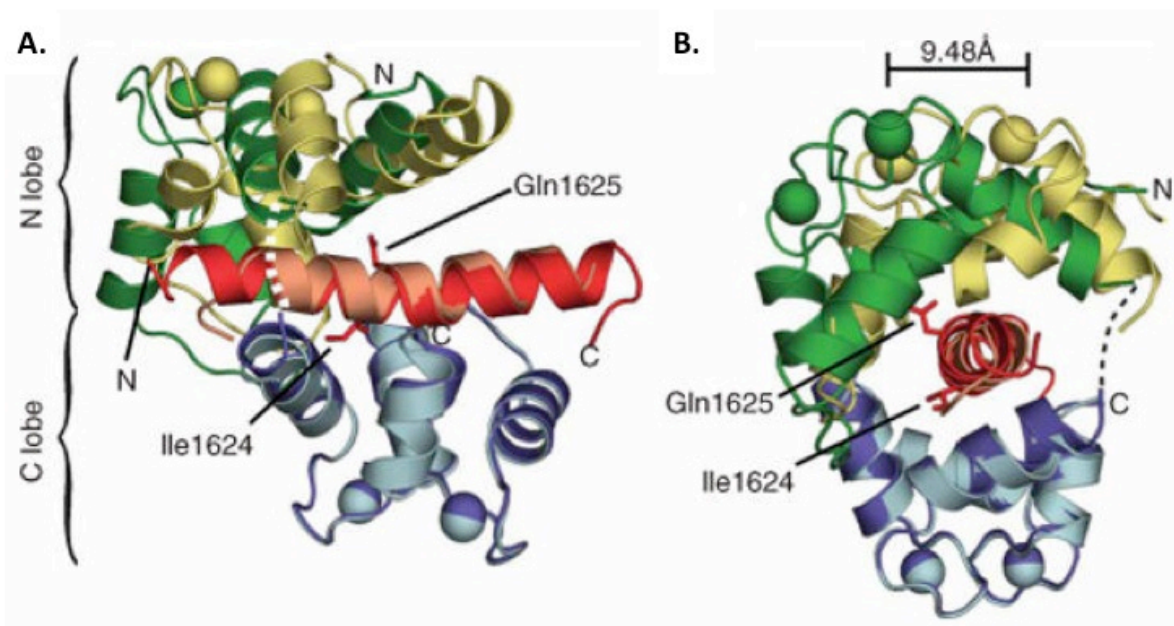


Figure 11. **Structure 3D du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline avec le domaine IQ du canal  $\text{Ca}_v1.2$  humain.** Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-domaine IQ a été obtenu dans 2 types de conformation montrant une certaine flexibilité dans l'interaction entre les deux protéines. **A.** La calmoduline est formé de 2 lobes, le N-terminal (en vert dans la conformation 1, en jaune dans la conformation 2) et le C-terminal (en bleu dans la conformation 1, en violet dans la conformation 2). Le domaine IQ est formé d'une hélice- $\alpha$ , en rouge dans la conformation 1 ou rose pâle dans la conformation 2. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont modélisés avec des sphères de la couleur sur laquelle ils lient le domaine de la calmoduline. **B.** La structure a pivoté de  $90^\circ$  par rapport au panneau A et montre que la calmoduline est enroulée autour du domaine IQ (Image extraite de l'article (F. Van Petegem, F. C. Chatelain, & D. L. Minor, 2005a)).

### 1.7.2 Sous-unité $\text{Ca}_v\beta$

Il existe quatre isoformes de la sous-unité  $\text{Ca}_v\beta$  ( $\text{Ca}_v\beta 1-4$ ), encodées par quatre gènes différents (*CACNB1-B4*), qui partagent la même organisation structurale, à savoir, trois domaines variables et deux domaines fortement conservés (entre 68 et 92 %) incluant le domaine SH3 (*Src Homology 3*) et le domaine GK (*guanylate kinase*). Les domaines SH3 et GK sont connectés par une région flexible HOOK (**Figure 12**).



Figure 12. **Organisation des domaines structuraux de la sous-unité Cav $\beta$ 3.** Cav $\beta$ 3 est formé de l'enchaînement du côté N- à C-terminal d'un domaine SH3, d'une région HOOK et d'un domaine NK (*nucleotide kinase*) (Image reproduite de l'article (Bourdin et al., 2010))

La distribution tissulaire des sous-unités Cav $\beta$  dépend des isoformes et des variants (produit par épissage alternatif du gène) mais Cav $\beta$ 1–3 sont majoritairement exprimés dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique et lisse tandis que Cav $\beta$ 4 est généralement retrouvé dans le cerveau. Dans le cœur humain, c'est la protéine Cav $\beta$ 2b qui est l'isoforme majoritaire mais on y retrouve également Cav $\beta$ 3 (Buraei & Yang, 2010).

Cav $\beta$  est une sous-unité auxiliaire entièrement cytoplasmique d'environ 60 kDa, qui interagit avec le domaine AID ( *$\alpha$ -interaction domain*) situé sur la boucle intracellulaire reliant le domaine I et II (boucle I-II) de tous les canaux Cav1 et Cav2 (Buraei & Yang, 2010). Le domaine AID est constitué de 18 acides aminés fortement conservés entre les différents isoformes, et adopte une structure secondaire en hélice- $\alpha$ . Plusieurs études par des analyses mutationnelles ont montrées que sur cette hélice- $\alpha$ , une série de résidus hydrophobes conservés (Tyr-437, Trp-440, Ile-441 sur Cav1.2) permettaient l'interaction spécifique avec le domaine GK de Cav $\beta$  (Berrou et al., 2005; Berrou, Klein, Bernatchez, & Parent, 2002; Witcher, De Waard, Liu, Pragnell, & Campbell, 1995). Ces résultats fonctionnels ont été confirmés par la détermination de la structure 3D de la sous-unité Cav $\beta$  en complexe avec le domaine AID de Cav1.2, résolu à haute résolution par cristallographie (**Figure 13A**) (Y. H. Chen et al., 2004; Opatowsky, Chen, Campbell, & Hirsch, 2004; F. Van Petegem, K. A. Clark, F. C. Chatelain, & D. L. Minor, 2004a). Les structures ont révélé un réseau complexe d'interactions majoritairement hydrophobes de type van der Waals mais incluant aussi des liaisons hydrogènes et ioniques entre les deux protéines qui se lient avec une affinité de l'ordre du nM (2 à 54 nM selon l'isoforme de la sous-unité Cav $\alpha$ 1 et la nature de la sous-unité Cav $\beta$ ) (Van Petegem, Duderstadt, Clark, Wang, & Minor, 2008). La structure 3D a montré que 8 des

18 résidus formant le domaine AID de Cav $\nu$ 1.2 viendraient se loger à l'intérieur d'un sillon hydrophobe sur le domaine GK de Cav $\nu$  $\beta$ 3, expliquant ainsi la forte affinité entre les deux protéines (Figure 13B).

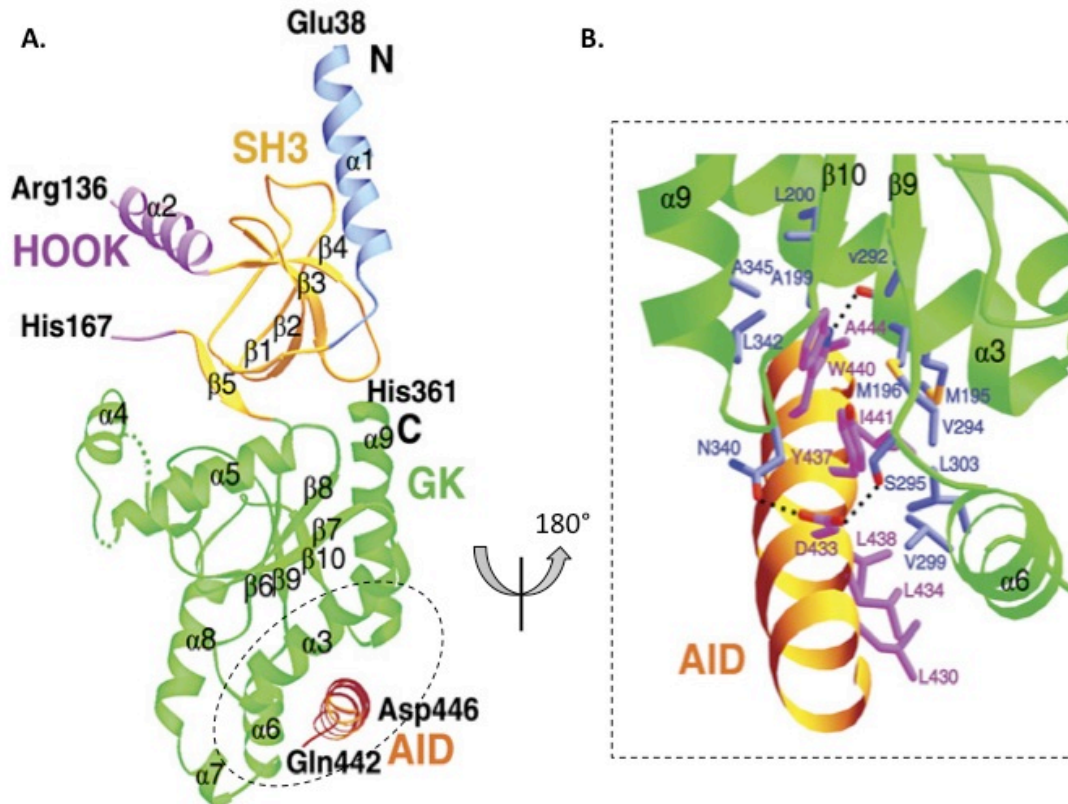


Figure 13. **Structure 3D de la sous-unité Cav $\nu$  $\beta$ 3 en complexe avec le domaine AID du canal Cav $\nu$ 1.2 chez le rat.** **A.** Les différentes régions de la Cav $\nu$  $\beta$ 3 sont colorées : le côté N-terminal est en bleu, le domaine SH3 en jaune, la région HOOK connectant les domaines SH3/GK est en violet et le domaine GK est en vert. Le domaine d'interaction AID sur Cav $\nu$ 1.2 est en dégradé rouge-jaune. **B.** Le panel B correspond à un agrandissement de l'interface d'interaction GK-AID montrant les principaux résidus impliqués dans la liaison (Image adaptée de l'article (Buraei & Yang, 2010)).

Au sein des canaux calciques Cav $\nu$ 1.2 et Cav $\nu$ 2.3, Cav $\nu$  $\beta$  joue un rôle de chaperonne en favorisant l'adressage membranaire du canal (Bourdin et al., 2010; Shakeri, Bourdin, Demers-Giroux, Sauve, & Parent, 2012). En systèmes recombinants, la surexpression de Cav $\nu$  $\alpha$ 1 en présence de Cav $\nu$  $\beta$  augmente significativement la densité de canaux à la membrane plasmique.

Il a été proposé que ces effets seraient médiés via l'interaction de Cav $\beta$  avec Cav $\alpha$ 1, qui d'une part viendrait couvrir le signal de rétention dans le réticulum endoplasmique permettant ainsi la libération du complexe vers les protéines de transport membranaire. D'autre part, Cav $\beta$  pourrait augmenter la stabilité du canal une fois à la membrane plasmique (Bichet et al., 2000). En effet, Cav $\beta$  protégerait Cav $\alpha$ 1 de la dégradation par le système ERAD (*Endoplasmic reticulum (ER)-associated proteasomal degradation*), ce qui a pour conséquence une augmentation des canaux calciques parvenant à la membrane plasmique (Altier et al., 2011). Ce complexe multi-protéique prend en charge les protéines mal repliées, qui sont poly-ubiquitinylées puis reconnues par le protéasome cytoplasmique 26S afin d'être dégradées (Simms & Zamponi, 2012b).

Cav $\beta$  joue un rôle dans la modulation des cinétiques d'activation de Cav $\alpha$ 1 en augmentant la probabilité d'ouverture du canal unitaire et en causant l'ouverture du canal à des potentiels membranaires plus négatifs (Hullin et al., 2003). Il a été aussi reporté que Cav $\beta$ , à travers son domaine flexible HOOK, contribuerait à l'inactivation dépendante du voltage en interagissant avec la boucle intracellulaire I-II de Cav $\alpha$ 1 tel que mentionné dans la **Figure 9** (Colecraft et al., 2002; Qin et al., 1996).

De nombreuses études ont également montré que Cav $\beta$  interagit avec de nombreuses protéines régulatrices intracellulaires tels que des kinases, des protéines G et des RGK (Rad-Rem-Rem2-Gem/Kir). Parmi ces régulateurs, les RGK appartiennent à la famille des protéines Ras, qui ont la particularité de lier une molécule de GTP et dont la fonction serait, à travers son interaction avec Cav $\beta$ , de prévenir l'activation des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire Cav1 (Cav1.1-3) et Cav2 (Cav2.1-2) (Buraei & Yang, 2010; T. Yang & Colecraft, 2013).

### 1.7.3 Sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$

Jusqu'à présent, quatre gènes codant pour les protéines Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 2, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 3 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 4 ont été identifiés. *CACNA2D1* qui code pour Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 a été le premier à être découvert dans le muscle squelettique, mais on sait maintenant qu'il est également exprimé dans le muscle cardiaque, le muscle lisse, le système nerveux central et périphérique et les



cellules endocrines. *CACNA2D2* et *CACNA2D3* qui codent pour Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 3 respectivement sont principalement retrouvés dans le système nerveux tandis que *CACNA2D4* est surtout exprimé dans la rétine et les tissus endocriniens (Dolphin, 2013). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 partage au niveau de la structure primaire, une identité de 55.6 % avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 2 et seulement 30.3 % avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 3 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 4 (Klugbauer, Lacinova, Marais, Hobom, & Hofmann, 1999; Qin, Yagel, Momplaisir, Codd, & D'Andrea, 2002).

Dans le laboratoire, nous travaillons exclusivement avec la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, j'ai donc décidé de présenter seulement les travaux publiés avec cet isoforme pour la suite de l'introduction.

### 1.7.3.1 Rôle

Alors que l'expression de Cav $\beta$  est importante pour l'adressage membranaire de la sous-unité principale Cav1.2, la sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est requise pour reproduire l'ensemble des propriétés biophysiques du canal natif.

Il a été montré dans les cellules HEKT-293 que la co-expression de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 avec Cav1.2 augmente les densités de courant calcique de  $-5 \pm 1$  pA/pF (n=26) (en absence de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1) à  $-56 \pm 3$  pA/pF (n=23) en présence des trois sous-unités du canal (**Figure 14A**) (Bourdin et al., 2015). Chez la souris, la délétion du gène codant pour la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 n'est pas létale mais les souris présentent une diminution significative de la contraction du myocarde et de la relaxation corrélée à une diminution de 50% de l'amplitude des courants calciques (Fuller-Bicer et al., 2009). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 modifie également les paramètres d'activation du canal en déplaçant le potentiel d'activation d'environ -15 mV (vers des valeurs plus négatives) (**Figure 14B**) (Bourdin et al., 2015; Fuller-Bicer et al., 2009). A ce jour, les mécanismes moléculaires responsables de ces effets n'ont toujours pas été complètement élucidés.

Le complexe calcique Cav1.2, composé des sous unités Cav1.2/Cav $\beta$ 3/Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 exprimé dans des œufs de grenouille, a été récemment étudié par « *voltage-clamp fluorimetry* », une technique qui permet de suivre les réarrangements structuraux des canaux ioniques à l'aide d'un fluorophore après leur activation par le voltage (Gandhi & Olcese,

2008). Cette étude a montré que l'interaction physique de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  avec  $\text{Ca}_v1.2$  modifie les propriétés biophysiques des senseurs de voltage formés par les hélices transmembranaires S1 à S4 des domaines I à III mais pas du domaine IV (Savalli et al., 2016). Ces réarrangements structuraux augmenteraient l'énergie de couplage entre les senseurs de voltage des domaines I-III et du pore favorisant ainsi l'ouverture du canal à des potentiels membranaires physiologiques et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pantazis, Savalli, Sigg, Neely, & Olcese, 2014).

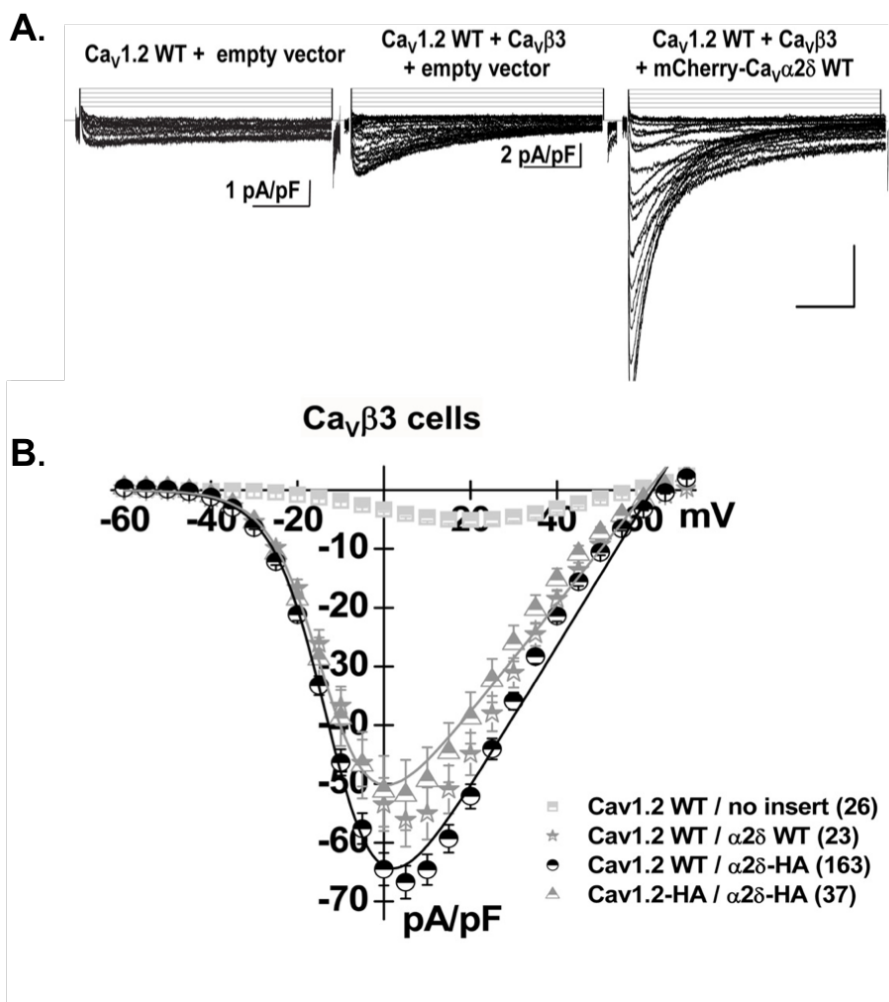


Figure 14. **Effet de l'expression de la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  avec les sous-unités  $\text{Ca}_v1.2$ - $\text{Ca}_v\beta 3$  du canal dans les cellules HEK293.** **A.** Tracés représentatifs des courants calciques lorsque  $\text{Ca}_v1.2$  est exprimé seul, ou exprimé avec  $\text{Ca}_v\beta 3$ , ou exprimé avec  $\text{Ca}_v\beta 3$  et  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . **B.** Sur la courbe IV, l'expression des sous-unités  $\text{Ca}_v1.2$  et  $\text{Ca}_v\beta 3$  donne des densités moyenne de courant de  $-5 \pm 1$  pA/pF ( $n=26$ ). Lorsque les protéines recombinantes  $\text{Ca}_v1.2$  et  $\text{Ca}_v\beta 3$  sont exprimés en présence de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , les densités moyenne de courant augmente à  $-56 \pm 3$  pA/pF ( $n=23$ ) et déplace le potentiel d'activation de  $E_{0.5, \text{act}} = 5 \pm 2$  ( $n=26$ ) à  $E_{0.5, \text{act}} = -10.1 \pm 0.5$  ( $n=23$ ). L'insertion d'un

épitope HA à la position D676 sur Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 donne des densités de courant similaire à Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT et ne modifie pas l'interaction avec Cav1.2 (Image adaptée de l'article (Bourdin et al., 2015))

### 1.7.3.2 Modifications post-traductionnelles

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est une protéine entièrement extracellulaire ayant un poids moléculaire prédit de 123 kDa. Toutefois, sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 migre à un poids moléculaire de 175 kDa après surexpression dans les cellules HEK. Nos travaux ont montré que Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est glycosylée sur 16 résidus asparagine et ces glycosylations augmenteraient le poids moléculaire d'environ 50 kDa. La glycosylation est un mécanisme qui se produit dans le réticulum endoplasmique et qui consiste en l'ajout d'un ou plusieurs sucres par une enzyme sur des résidus asparagines (glycosylation de type « N ») ou lysine-thréonine (glycosylation de type « O »). Pour les glycosylations de type « N », il existe une séquence consensus Asparagine-Xaa-Serine/thréonine (Xaa peut être n'importe quel acide aminé sauf une proline) (Aebi, 2013). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 compte 16 sites de glycosylation de type « N » (Asn-92, Asn-136, Asn-184, Asn-324, Asn-348, Asn-468, Asn-585, Asn-594, Asn-663, Asn-769, Asn-812, Asn-876, Asn-986) parmi lesquels Asn-663 joue un rôle dominant dans l'adressage membranaire et la stabilité de la protéine (Tetreault et al., 2016). Néanmoins, le nombre, l'enchaînement et la nature des sucres accrochés à ces sites ne sont pas connus à ce jour.

Il a été reporté que Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est synthétisé à partir d'un seul et même gène (*CACNA2D1*) et qu'au cours d'un clivage post-traductionnel, la protéine serait coupée en 2 protéines soit Cav $\alpha$ 2 et Cav $\delta$ 1, pour être ensuite reliés par un ou plusieurs ponts disulfures (Calderon-Rivera et al., 2012b). La migration de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 en condition dénaturante après réduction des ponts disulfures a permis l'identification d'au moins 2 bandes qui ont été identifiées à 150 kDa correspondant à Cav $\alpha$ 2 et 17-22 kDa pour Cav $\delta$ 1 (Jay et al., 1991a). Cependant, la ou les protéases responsables de ce mécanisme et le site exact du clivage reste encore à être déterminé. Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 possède dans sa séquence primaire 20 cystéines qui pourraient potentiellement être impliquées dans des ponts disulfures intra- et intermoléculaires. Une étude récente du complexe purifié a montré par spectrométrie de masse que Cav $\alpha$ 2 et Cav $\delta$ 1 de lapin serait reliés par 4 ponts disulfures entre la Cys-305 et Cys-1047,

Cys-356 et Cys-1062, Cys-406 et Cys-1074 et Cys-907 et Cys-977 (J. Wu et al., 2016b). Dans le laboratoire nous avons montré que la mutation ponctuelle de la Cys-1059 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de rat (équivalent de la Cys-1074 chez le lapin) en alanine et sérine n'empêchait pas la fonction de la protéine (Segura et al., 2017). Ainsi, des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer et confirmer la position de l'ensemble des ponts disulfures intra- et intermoléculaires de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 notamment en utilisant une électrophorèse bidimensionnelle (Winger, Taylor, Heazlewood, Day, & Millar, 2007).

La sous-unité Cav $\alpha$ 2 est entièrement extracellulaire alors que Cav $\delta$ 1 est attaché à la membrane externe à l'aide d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'ajout de cette modification post traductionnelle du côté C-terminal de la protéine a lieu dans le réticulum endoplasmique et l'ancre GPI se compose d'un groupement phosphatidylinositol attaché à un glycane (résidus mannose et N-acétylglucosamine), lui-même lié au groupement phosphore de la phosphoétanolamine (Paulick & Bertozzi, 2008). Cette modification procure une grande mobilité aux protéines ainsi ancrées dans la membrane. L'ajout d'une ancre GPI requiert la présence de trois domaines essentiels : (1) l'enchaînement de trois acides aminés de « petit volume » inférieur à 100 Å<sup>3</sup> (alanine, asparagine, aspartate, cystéine, glycine ou sérine) localisé au site  $\omega$  (attachement de l'ancre GPI),  $\omega+1$  et  $\omega+2$  (premier et deuxième résidu après clivage du peptide) (2) une région polaire d'environ 10-20 acides aminés (3) une région hydrophobe 15-20 résidus (Ferguson, Hart, & Kinoshita, 2015). Nous avons montré que Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 du rat possède tous ces éléments. L'ajout de l'ancre GPI sur la Cys-1059 nécessite un clivage de la séquence sur une des deux glycines situées à la position 1060-1061 sur Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Segura et al., 2017). Ce clivage libère une région hydrophobe, située huit acides aminés après la glycine qui est prédite comme étant un segment transmembranaire (Davies et al., 2007). Ainsi, le clivage du domaine transmembranaire permet à Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 d'adopter une conformation optimale requise pour son interaction avec Cav1.2. Cette étape est nécessaire pour permettre l'ajout d'une ancre GPI, qui est essentielle pour la régulation de l'activité de Cav1.2 par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Segura et al., 2017).

### 1.7.3.3 Domaines structuraux

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est composé de plusieurs domaines structuraux conservés à travers les espèces et les différentes isoformes incluant un domaine « Von Willebrand Factor A » ou VWA et quatre domaines Cache pour « *Calcium Channel CHEmotaxis Receptor* » (**Figure 15**). Ces domaines extracellulaires ont été identifiés par leur forte identité de séquence primaire avec des domaines structuraux connus.

Le domaine VWA a été identifié pour la première fois chez le facteur de Von Willebrand, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire jouant un rôle dans l'homéostasie et l'agrégation plaquettaire (Bork & Rohde, 1991). Il s'est ensuite avéré que ce même domaine était particulièrement répandu dans les protéines d'adhésion telles que le collagène et les récepteurs aux intégrines. Plus largement, il a été montré que ce domaine, présent dans plus de 40 000 protéines eucaryotes, exerce un rôle dans l'adhésion cellulaire et dans les interactions protéine-protéine ou protéine-ligand (Whittaker & Hynes, 2002). Le domaine VWA des différentes protéines possède une similarité de séquence limitée mais suffisante pour assurer un repliement caractéristique dit « *Rossmann fold* » qui consiste en une alternance de feuillet- $\beta$ -hélice- $\alpha$ -feuillet- $\beta$  dans laquelle les feuillets- $\beta$  sont pris en sandwich par de multiples hélices- $\alpha$ . Ce domaine possède aussi la particularité d'avoir un motif MIDAS « *Metal Ion Dependant Adhesion Site* ». Ce motif, comme son nom l'indique, est capable de lier des cations divalents tel que le Ca $^{2+}$ , Mg $^{2+}$  et Zn $^{2+}$ . Il existe des motifs MIDAS dit « parfaits » constitués de 5 acides aminés situés sur 3 boucles différentes ayant la séquence consensus suivante Asp-Xaa-Ser-Xaa-Ser...Thr...Asp. Dans la structure 3D de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, les cinq premiers résidus (Asp- Xaa-Ser-Xaa-Ser) sont situés sur la boucle 1, tandis que la Thr est située sur la boucle 2 (à environ 70 résidus de la Ser) et le dernier Asp sur la boucle 3 (à environ 100 résidus de la Ser) (Springer, 2006). L'abréviation Xaa représente n'importe quel acide aminé. Les chaînes latérales de ces résidus sont orientées de manière à stabiliser, dans son centre, le cation divalent. Ce domaine a été particulièrement étudié chez les protéines qui appartiennent à la famille des intégrines. En effet, il a été montré que l'interaction intégrine-ligand nécessite la liaison d'un cation divalent par les cinq résidus MIDAS de l'intégrine afin de structurer le domaine dans une conformation qui permettait la coordination de l'ion divalent par une 6<sup>ème</sup> liaison provenant du carboxylate d'un résidu aspartate fournit par le

ligand (Plow, Haas, Zhang, Loftus, & Smith, 2000). Ainsi, il a été suggéré que la liaison des intégrines avec leurs ligands sont médiée à travers des interactions électrostatiques de type van Der Waals (Emsley, Knight, Farndale, Barnes, & Liddington, 2000). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 contient au sein de son domaine VWA un motif MIDAS « parfait » composé des acides aminés Asp-259, Ser-261, Ser-263, Thr-331 et Asp-363 (Canti et al., 2005). Le mécanisme moléculaire gouvernant l'interaction entre Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et la sous-unité Cav $\alpha$ 1 n'est pas connu mais pourrait impliquer le motif MIDAS de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et un résidu aspartate de Cav $\alpha$ 1 .

Avant la publication de la première structure 3D du complexe calcique Cav1.1, il était prédit que Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 contenait seulement un seul domaine structural Cache (Dolphin, 2013). Or, la structure 3D publiée en 2015 mentionnée la présence de 2 domaines Cache (Cache1 et Cache2) tandis que la structure 3D publiée en 2016 a révélé que Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 été constitué de 4 domaines Cache (Cache1, Cache2, Cache3 et Cache4) (J. Wu et al., 2016a; J. Wu et al., 2015). Il s'est avéré que plusieurs régions des domaines Cache ne sont pas contigües sur la séquence primaire bien que l'organisation 3D de la protéine montre que le domaine Cache1 est situé du côté N-terminal du domaine VWA, lui-même suivi par les domaines Cache2, 3 et 4. Dans la structure 3D, le domaine VWA fait face à Cav $\alpha$ 1 tandis que les domaines Cache se projettent vers le milieu externe (J. Wu et al., 2016a). Le domaine Cache1 fait contact avec le domaine Cache2, qui lui-même est en contact avec le domaine Cache3 qui interagit avec Cache4. Dans la littérature, le domaine Cache est un domaine sensoriel extracellulaire d'abord identifié dans des protéines provenant d'organisme procaryotes (bactéries) telles que les histidines kinases de classe I et l'adénylate cyclase (Zhulin, Nikolskaya, & Galperin, 2003). Ce domaine est homologue aux protéines PAS (Per-Arnt-Sim), qui ont été décrites comme des senseurs intracellulaires (Zhulin, Taylor, & Dixon, 1997). Il a été ainsi postulé que le domaine extracellulaire Cache serait l'évolution du domaine intracellulaire PAS (Upadhyay, Fleetwood, Adebali, Finn, & Zhulin, 2016). Des études ont reporté que, chez les procaryotes, le domaine Cache jouerait un rôle de perceuteur sensoriel des nutriments et serait capable de lier de nombreux ligands tels que des acides aminés et des acides organiques (pyruvate, malate, acétate, urée) (Kneuper et al., 2005; Meier, Muschler, & Scharf, 2007). D'un point de vue structural, le domaine Cache est composé du côté N-terminal de trois feuillets- $\beta$  et d'une hélice- $\alpha$  tandis que le domaine C-terminal est replié en feuillets- $\beta$  suivi par une région

déstructurée. La fonction exacte de ce domaine est encore à l'étude bien qu'il pourrait intervenir dans des voies de transduction du signal chez les protéines eucaryotes (Anantharaman & Aravind, 2000).

Le domaine VWA de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 possède un site à haute affinité ( $K_D = 59$  nM) pour la gabapentine (1-aminométhylcyclohexane acetic acid) (Field et al., 2006; Marais, Klugbauer, & Hofmann, 2001) et son analogue la prégabaline (Joshi & Taylor, 2006). Ces médicaments sont actuellement commercialisés sous les appellations Neurontin<sup>©</sup> et Lyrica<sup>©</sup> respectivement et sont utilisés dans le traitement des crises d'épilepsie et le soulagement des douleurs neurologiques. Des études par mutagenèse dirigée ont montré que le résidu Arg-217 dans l'isoforme de porc (équivalent de Arg-241 chez la souris et le rat), situé sur un motif constitué de 3 arginines consécutives, serait responsable de l'interaction gabapentine-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (M. Wang, Offord, Oxender, & Su, 1999). De surcroît, des souris transgéniques portant la mutation de Arg-241 en alanine ont montré une sensibilité à la gabapentine fortement diminuée tandis que les effets de la prégabaline étaient également limités (Taylor, 2004). Le mécanisme d'action de la gabapentine sur Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 n'est pas connu, néanmoins il a été postulé que l'interaction de la gabapentine avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 diminuerait l'excitabilité neuronale en réduisant les courants calciques à travers Cav $\alpha$ 1 (Chincholkar, 2018). D'après les données récentes sur la structure 3D du complexe calcique de lapin, l'Arg-241 est localisé à l'extrémité distale du domaine VWA (par rapport à la membrane) de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, à proximité du domaine Cache2. En revanche, ce résidu est situé à environ 40 Å de l'interface protéine-protéine avec Cav $\alpha$ 1S ce qui exclut que la liaison de la gabapentine puisse empêcher l'interaction directe entre Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et Cav $\alpha$ 1. D'autres études ont suggérés que la liaison de la gabapentine réduirait l'interaction de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 avec d'autres protéines synaptiques tel que la thrombospondine, ce qui aurait pour conséquence une réduction de la migration et du relargage des vésicules contenant les neurotransmetteurs (Eroglu et al., 2009; Rogawski & Taylor, 2006).

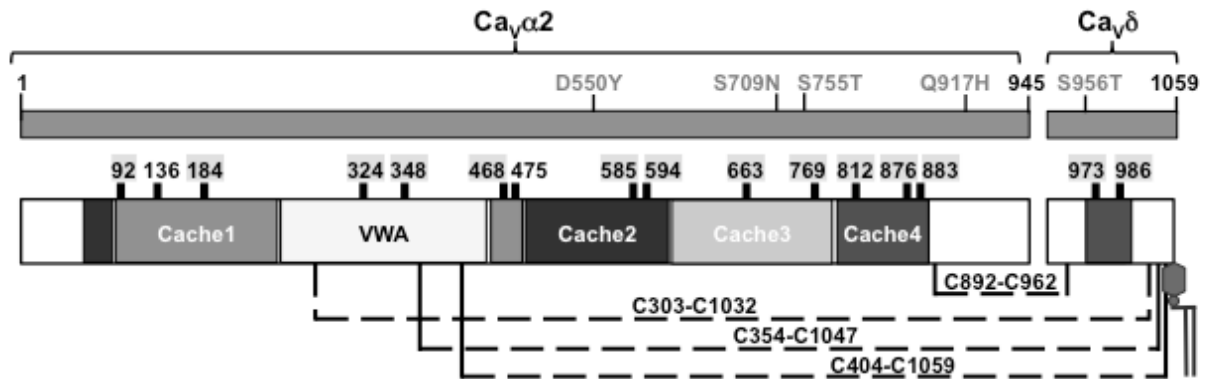


Figure 15. **Organisation structurale de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de rat.** Les cinq domaines de Cav $\alpha$ 2 sont représentés : Cache1, VWA, Cache2, Cache3 et Cache4. Les 16 sites de N-glycosylation sont indiqués au-dessus de chaque domaine. Les positions des quatre ponts disulfures reliant la sous-unités Cav $\alpha$ 2 avec Cav $\delta$ 1 sont identifiés en lignes pointillées. L'ancre GPI est située sur la cystéine 1059. Les sites correspondant à cinq mutations identifiées chez Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 qui ont été associés avec des arythmies cardiaques de type QT court (Image extraite de (Briot, Tetreault, Bourdin, & Parent, 2017)).

La poids moléculaire élevé et les nombreuses modifications post-traductionnelles de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 expliquent en partie l'absence de structure 3D à haute résolution de cette protéine. En effet, l'ensemble de ces caractéristiques rend complexe son étude en système bactérien. Ce système est généralement utilisé dans le but d'obtenir des quantités de protéine de l'ordre du mg/ml, nécessaire pour la détermination de la structure 3D à haute résolution par cristallographie aux rayons X.

## 1.8 Structure 3D du complexe des canaux calciques

La structure 3D du complexe des canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire a été obtenue à basse résolution (27 et 25 Å) pour l'isoforme cardiaque (Walsh, Davies, Nieto-Rostro, Dolphin, & Kitmitto, 2009; M. C. Wang et al., 2004) et plus récemment à haute résolution (4.2 et 3.6 Å) pour l'isoforme purifié à partir de muscle squelettique par cryo-microscopie électronique (Briot et al., 2017; J. Wu et al., 2016b; J. Wu et al., 2015), pour revue (Briot et al., 2017).



### 1.8.1 Cryo-microscopie électronique (cryo-ME)

Cette technique d'imagerie a permis à ces inventeurs Jacques Dubochet, Joachim Franck et Richard Henderson de décrocher le prix Nobel de chimie en 2017. La cryo-ME a commencé à être utilisée au début des années 1980, mais les nouvelles avancées technologiques dans la discipline ont récemment révolutionné le domaine de la biologie structurale. En 2015, 15.8 % des structures de protéines membranaires déposées dans la « *Protein Data Bank* » (PDB) ont été résolues par cryo-ME contre 3.5 % en cristallographie des rayons X et 2.3 % en résonance magnétique nucléaire (RMN) (Fernandez-Leiro & Scheres, 2016). Par ailleurs, il est attendu que ce chiffre augmente d'un facteur 5 à 10 d'ici 2020 (Milne et al., 2013). Grâce à des instruments de plus en plus performants, d'immenses progrès ont été réalisés dans le développement de caméras à détection directe d'électrons, dans l'amélioration de la puissance des ordinateurs et le développement continu des logiciels d'analyse des images (augmentation du nombre de reconstruction 3D) qu'il est maintenant possible d'élucider la structure 3D de très gros complexes protéiques (> 500 kDa), tel que les canaux calciques activés par la dépolarisation ou le récepteurs à la ryanodine, à une résolution quasi atomique (Bai, McMullan, & Scheres, 2015). Ainsi, les progrès de cette technique ont contribué à une compréhension détaillée de nouveaux mécanismes moléculaires.

Contrairement à la cristallographie aux rayons X ou la RMN, la cryo-ME ne nécessite pas l'obtention préalable d'un cristal et n'est pas limitée par la taille du complexe. L'un des avantages de la cryo-ME est que les échantillons sont étudiés dans un milieu hydraté, afin de préserver la structure dans un milieu optimal, après congélation brutale et acquisition des données à basse température. Ce processus est possible suite à la vitrification de l'eau qui permet de conserver l'intégrité de l'échantillon. En solution, les échantillons de protéines sont souvent hétérogènes car ils contiennent différentes orientations et états conformationnels des protéines qui sont seules ou en complexe. En cryo-ME, lors du traitement des données, les images 2D des différentes populations vont être sélectionnées et classifiées afin de reconstruire une structure 3D pour chaque conformation (**Figure 16**) (Cheng, Grigorieff, Penczek, & Walz, 2015). À l'aide d'une seule expérience, il est souvent possible d'obtenir des informations sur la dynamique de ces protéines via la conformation (protéine seule) ou son assemblage (complexe protéique) dans un contexte membranaire. Compte tenu du nombre

important de particules par échantillon, le rapport signal sur bruit est augmenté permettant de calculer les structures dans les trois dimensions de l'espace (Murata & Wolf, 2017). Cette technique requiert des concentrations protéiques relativement faibles ( $\approx 5 \mu\text{l}$  microlitres à 0.1-2 mg/ml) tandis que les autres méthodes de biologie structurale nécessitent des volumes d'échantillon et des concentrations plus élevées de protéine ( $\approx 200 \mu\text{l}$  à 5-20 mg/ml) (Fernandez-Leiro & Scheres, 2016). De plus, les structures des protéines eucaryotes obtenues en cryo-ME sont plus proches des structures natives puisque cette technique est compatible avec la présence de modifications post-traductionnelles telles que les glycosylations ou les ponts disulfures.

Il est toutefois important de noter que cette technique est souvent combinée avec la cristallographie aux rayons X ou la RMN afin d'obtenir une meilleure résolution finale de la structure notamment dans des complexes protéiques de haut poids moléculaire (Venien-Bryan, Li, Vuillard, & Boutin, 2017).

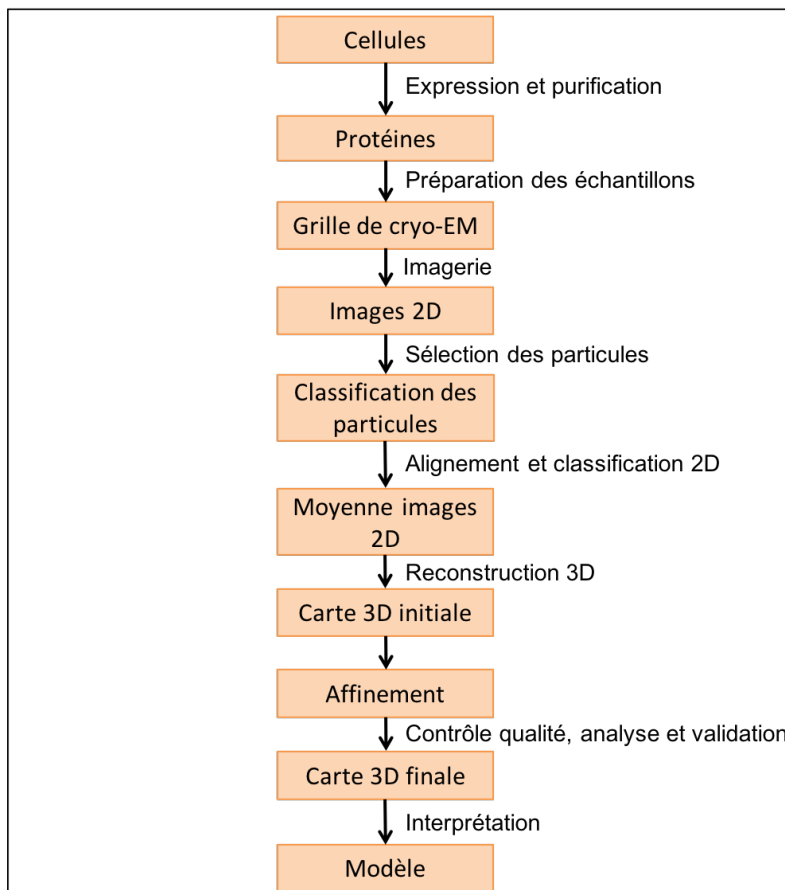


Figure 16. **Description des étapes permettant de déterminer la structure 3D d'une protéine par cryo-ME.** Les protéines purifiées vont être analysées sur grille après congélation rapide à une température inférieure à  $-160^{\circ}\text{C}$  dans de l'azote liquide par exemple. Les projections 2D des différentes conformations vont être classées. L'image moyenne 2D va être utilisée pour construire une carte de densité, qui sera affinée afin d'obtenir un modèle final. Tout au long du processus, les conditions expérimentales doivent être ajustées afin d'obtenir un modèle avec la meilleure résolution possible. Image inspirée de l'article (Fernandez-Leiro & Scheres, 2016).

### 1.8.2 Structure 3D du canal calcique cardiaque Cav1.2 à basse résolution

La structure 3D monomérique du canal calcique cardiaque Cav1.2 a été obtenue par microscopie électronique à transmission à une résolution de 25 Å (Walsh, Davies, Butcher, Dolphin, & Kitmitto, 2009). A très basse résolution, seules les formes grossières de la structure sont visibles. Les structures secondaires en hélices- $\alpha$  ou feuilletts- $\beta$ , les chaînes principales et latérales des acides aminés ou encore les interfaces d'interaction protéine-protéine ne sont pas résolues. En revanche, la composition des sous-unités et leurs orientations au sein du complexe calcique cardiaque peuvent parfois être déduites.

D'après cette structure 3D, le complexe calcique cardiaque est constitué des sous-unités Cav1.2, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et Cav $\beta$ . Aucune densité électronique n'a été proposée pour la sous-unité transmembranaire Cav $\gamma$  suggérant que cette dernière n'est pas associée aux canaux cardiaques ou que son affinité pour Cav1.2 est faible et que la sous-unité a été perdue après plusieurs étapes de purification successives dans des tampons contenant des détergents.

Le canal calcique cardiaque Cav1.2 a été purifié à partir de membranes sarcoplasmiques des cellules cardiaques issues de cœur bovin. Environ 200 g de ventricule de cœur sont nécessaires pour obtenir 10-20  $\mu\text{g}$  de protéines purifiées (M. C. Wang et al., 2004). Le complexe protéique a été purifié à l'aide de plusieurs étapes successives, comprenant une colonne DEAE (diéthylaminoéthyle) qui permet de séparer les protéines en fonction de leur charge, puis sur colonne d'agglutinine de germe de blé (WGA), grâce à sa capacité à lier les protéines glycosylées par des sucres de type N-acétylglucosamine, permettant ainsi d'isoler Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (et les protéines associées) en raison de ces multiples sites de glycosylation.

Le complexe protéique dont la masse est de 540 kDa, possède des dimensions de 170 Å x 140 Å x 120 Å et correspond à l'association de Cav $\alpha$ 1.2, Cav $\beta$  et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. La densité

représentant le complexe protéique est allongé et compacte (*body*) tandis qu'une autre densité ayant la forme d'un « doigt » (*finger*) dépasse de cette structure (**Figure 17**). La position des différentes sous-unités dans la structure du complexe calcique a été déterminée à l'aide de la concanavaline A, une protéine de la famille des lectines qui reconnaît les protéines glycosylées extracellulaires modifiées par du glucose ou du mannose. Les auteurs ont montré que la concanavaline A s'est associée avec la structure en forme de « doigt », ce qui suggère que cette densité correspondrait à la protéine fortement glycosylée Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Ainsi les auteurs ont conclu que la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 était localisée au-dessus du pore de Cav $\alpha$ 1.2. En revanche, le positionnement de la sous-unité intracellulaire Cav $\beta$  n'a pas pu être discriminé du canal Cav1.2.

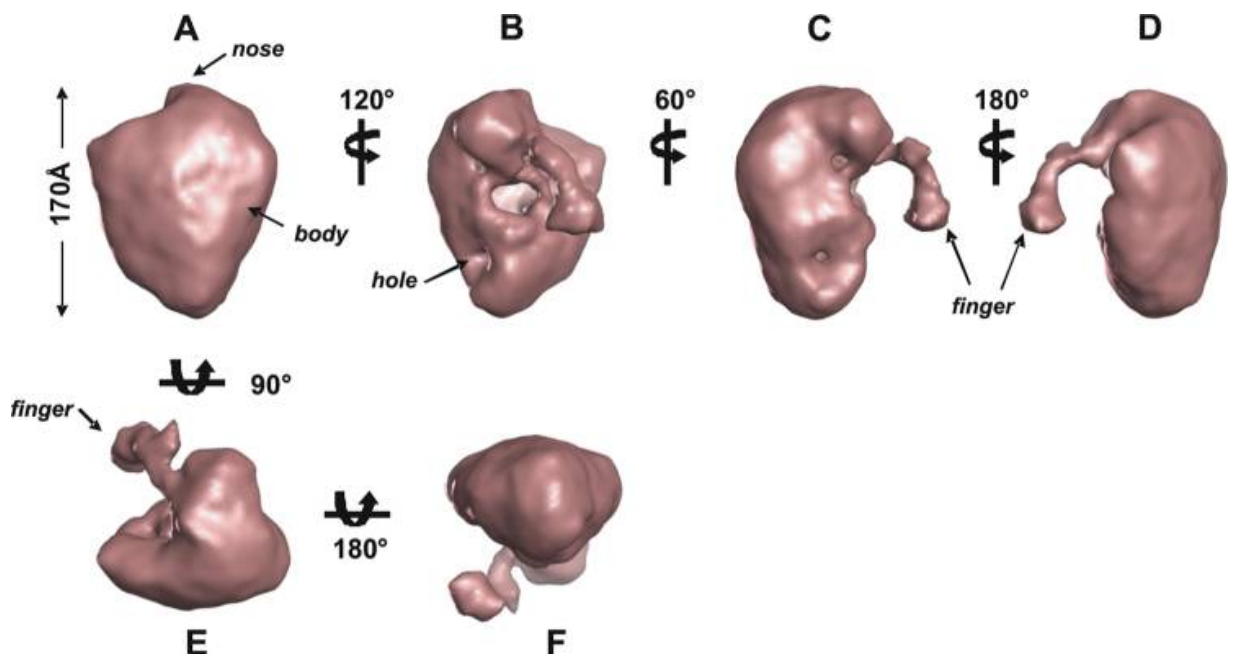


Figure 17. **Structure à basse résolution du complexe calcique cardiaque Cav1.2 obtenue par microscopie électronique à transmission et révélée après coloration négative.** Les images de A-F représentent différentes orientations du complexe après une rotation latérale de 120° (B), ou de 60° (C) ou 180° (D) de la structure en A. Les vues (E) et (F) sont des rotations transversales de A. Les dimensions du complexe de 540 kDa sont 170 x 140 x 120 Å. Image extraite de l'article (Walsh, Davies, Nieto-Rostro, et al., 2009).

### 1.8.3 Structure 3D du canal homologue Cav1.1 à résolution quasi-atomique

#### 1.8.3.1 Purification du complexe

La structure du canal calcique Cav1.1 purifié à partir de muscle squelettique de lapin a été obtenue, par le même groupe de recherche à quelque mois d'intervalle, à une résolution de 4.2 puis 3.6 Å (J. Wu et al., 2016b; J. Wu et al., 2015). Afin de purifier le complexe calcique au complet, la haute affinité d'interaction entre Cavβ et Cav1.1 a été utilisée. La protéine Cavβ1a contenant une étiquette glutathione S-transferase (GST) a été exprimée dans les bactéries *Escherichia. coli* BL21 puis purifiée selon le protocole déjà établi par d'autres groupes de recherche en utilisant une chromatographie d'affinité avec une résine de glutathionne-sépharose (GS4B) couplé à une colonne échangeuses d'anions (Y. H. Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegem et al., 2004a). La protéine Cavβ1a a ensuite été utilisée comme « appât » dans un lysat contenant les membranes de muscle squelettique de lapin afin d'isoler les autres sous-unités du complexe calcique (Cavα1.1 et Cavα2δ1 et Cavγ1). De nombreux détergents ont été testés pour optimiser la purification du complexe calcique Cav1.1 et la digitonine a été sélectionnée.

#### 1.8.3.2 Détails structuraux du complexe

Malgré la taille importante du complexe calcique (> 500 kDa), l'utilisation de la cryo-ME a permis d'obtenir une résolution moyenne de 3.6 Å pour l'ensemble du modèle atomique dans lequel il est possible d'observer les structures secondaires telles que les hélices-α et les feuillets-β. La structure 3D à haute résolution a révélé l'architecture globale du complexe macromoléculaire incluant le positionnement et l'orientation des 4 sous-unités les unes par rapport aux autres (**Figure 18**). Les sous-unités auxiliaires s'organisent autour de la sous-unité principale Cavα1 qui occupe une position centrale bien que le complexe ne soit pas symétrique. Le complexe se projette à 170 Å dans le plan vertical, réparti majoritairement du coté extracellulaire par la protéine Cavα2δ1 et à une distance de 100 Å dans le plan horizontal. La majorité des structures secondaires en hélices-α et feuillets-β des différentes protéines a été reconstruite.

Un site de *N*-glycosylation a été identifié dans la structure 3D de la sous-unité Cav $\alpha$ 1 du canal Cav1.1 à la position Asn-257 localisé sur la boucle S5S6 du domaine I. Une étude précédente a suggéré que le site Asn-79 sur la boucle IS1S2 de Cav1.1 serait également glycosylé (Lazniewska & Weiss, 2017) mais d'après la structure 3D, cette boucle est localisée à proximité du domaine VWA de la sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et ne semble pas accessible pour être modifié par un sucre chez l'isoforme de lapin.

La carte de densité électronique de la protéine cytoplasmique Cav $\beta$ 2 était en majorité absente de la structure à 4.2 Å et 3.6 Å. Par contre, le domaine AID sur Cav $\alpha$ 1 était visible et associé à une faible densité électronique correspondant vraisemblablement à Cav $\beta$ 2. Les auteurs ont donc virtuellement inséré la structure 3D de Cav $\beta$ 2 obtenue précédemment par cristallographie (PDB 4DEY) de cette sous-unité dans leur modèle pour reconstruire le complexe (Almagor et al., 2012).

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est localisé entièrement du côté extracellulaire et surplombe la sous-unité Cav $\alpha$ 1. Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 apparaît faire face aux boucles extracellulaires S1S2 et S5S6 du domaine I, S5S6 du domaine II et S5S6 du domaine III de Cav $\alpha$ 1.

Les domaines transmembranaires, cinq feuillets- $\beta$  extracellulaires et les boucles N- et C-terminale de la sous-unité Cav $\gamma$ 1 ont été résolus. La structure 3D montre qu'une série de résidus hydrophobes situés sur les domaines transmembranaires 2 et 3 de Cav $\gamma$ 1 forment des ponts hydrogènes avec les segments transmembranaires senseurs de voltage du domaine IV de Cav $\alpha$ 1. Chez la souris, il a été montré qu'une inactivation du gène codant pour la sous-unité Cav $\gamma$ 1 (-/-) augmentait les courants calciques à travers les canaux Cav1.1. Au vu des résultats structuraux et fonctionnels, il a été proposé que Cav $\gamma$ 1, en interagissant avec le senseur de voltage pourrait favoriser un réarrangement conformationnel de Cav $\alpha$ 1 qui viendrait inactiver le canal plus rapidement ce qui induirait une diminution des courants calciques (Andronache et al., 2007).

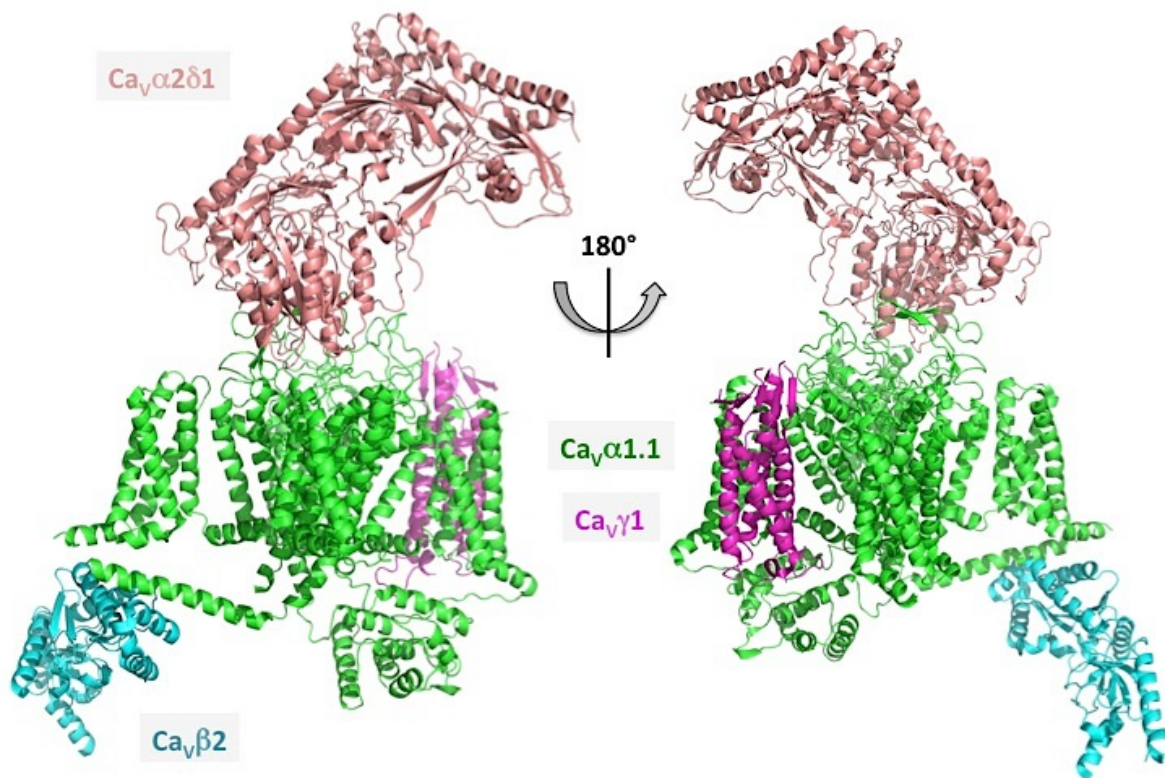


Figure 18. **Structure 3D du canal calcique Cav1.1 à une résolution moyenne de 3.6 Å de résolution (PDB 5GJV).** Les quatre sous-unités du canal Cav1.1 sont montrées selon différentes couleurs dans une configuration où seules les structures secondaires sont modélisées. La sous-unité transmembranaire Cavα1.1 formant le pore est en vert, la sous-unité extracellulaire Cavα2δ1 est en rose pâle, la sous-unité cytoplasmique Cavβ2 est en bleu cyan et la sous-unité transmembranaire Cavγ1 est en rose foncé (Figure originale produite à l'aide de PyMOL).

### 1.8.3.3 Détails structuraux de la sous-unité Cavα2δ1

La structure 3D de la sous-unité Cavα2δ1 reflète l'extrême complexité de cette protéine. Cette sous-unité apparaît être entièrement extracellulaire et aucune densité électronique pour le domaine transmembranaire n'est visible. La première structure (4.2 Å) avait identifié 2 domaines Cache et un domaine VWA. L'organisation structurale de Cavα2δ1 dans la structure la plus récente (3.6 Å) montre 4 domaines Cache. Les quatre domaines Cache font face au milieu extracellulaire et pourraient interagir avec d'autres protéines partenaires.

Dans la structure 3D, la carte de densité électronique est absente entre les résidus 912 et 973. Les auteurs ont suggéré que cette région pouvait contenir le site de clivage protéolytique de la pré-protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Ainsi ils ont déterminé que la sous-unité Cav $\alpha$ 2 comprend les acides aminés 1 à 912 tandis que Cav $\delta$ 1 se compose de 101 résidus de 973 à 1074. L'ancrage GPI permettant d'ancrer Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 dans la membrane n'a pas pu être identifiée. Le dernier acide aminé assigné dans la structure, la cystéine 1074, est par ailleurs situé à proximité de la membrane plasmique (**Figure 19**). De plus, la structure a confirmé la présence de 14 des 16 sites de glycosylation sur les résidus asparagines aux positions N94, N186, N326, N350, N470, N606, N615, N678, N784, N827, N891, N898 sur Cav $\alpha$ 2 et N988 et N1001 sur Cav $\delta$ 1.

Quatre ponts disulfures intermoléculaires ont été observés dans la structure 3D entre Cav $\alpha$ 2 et Cav $\delta$ 1 entre les cystéines Cys-30 et Cys-1047, Cys-356 et Cys-1062, Cys-406 et Cys-1074, Cys-907 et Cys-977 et 2 ponts intramoléculaires entre les Cys-999 et Cys-1029, Cys-1002 et Cys-1027 au sein de Cav $\delta$ 1. Trois des points disulfures intramoléculaires ont pour origine le domaine VWA.

Le domaine VWA est positionné parallèlement à la membrane face à la sous-unité Cav $\alpha$ 1. Ainsi, la structure 3D semble démontrer que ce domaine joue un rôle crucial dans l'interaction protéine-protéine. Par comparaison avec les structures cristallographiques du domaine VWA obtenues chez les intégrines, le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 adopte une conformation « ouverte » souvent retrouvée lorsque ce domaine interagit avec un ligand. De plus, au sein de son domaine VWA, le motif MIDAS semble adopter une conformation qui positionne des résidus polaires tel que la Ser-263 (équivalent à la Ser-261 dans l'isoforme de rat) et la Ser-265 (équivalent à la Ser-263 dans l'isoforme de rat) à l'interface entre Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et Cav $\alpha$ 1. Ce motif est connu pour avoir la capacité de coordonner un cation divalent. La purification a été réalisée en présence d'une concentration élevée de CaCl<sub>2</sub> (10 mM) dans le but d'identifier un cation divalent dans le site MIDAS de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Or, la densité électronique était trop basse pour pouvoir discriminer un ion Ca<sup>2+</sup> d'un ion Mg<sup>2+</sup>.

Au sein du domaine VWA, le site prédit de liaison de la gabapentine (Arg-241 chez le lapin) est situé au centre de la protéine sur une boucle qui est accessible au milieu externe, à une distance suffisamment éloignée (environ 40 Å) de l'interface d'interaction de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-Cav $\alpha$ 1.1 ce qui indique que cette molécule ne produit pas ses effets en abolissant l'interaction



directe entre ces deux protéines. Il a été suggéré que la gabapentine préviendrait l'interaction de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 avec d'autres protéines régulatrices (thrombospondines) ce qui pourrait « *in fine* » influencer indirectement la régulation de Cav $\alpha$ 1 (Lana et al., 2016).

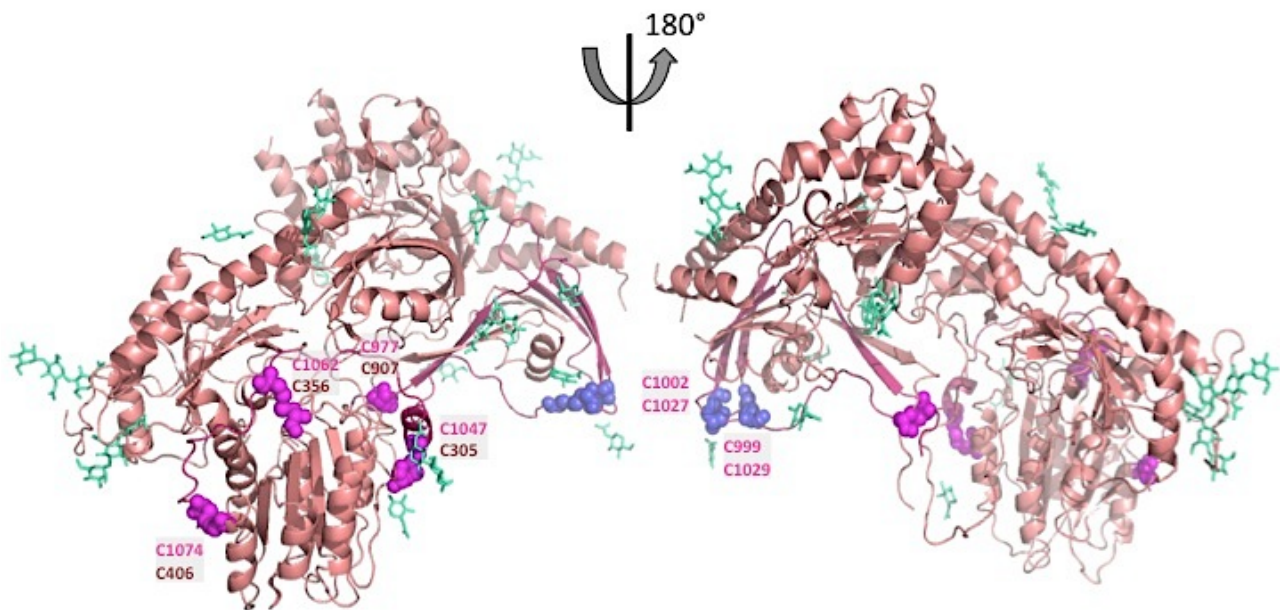


Figure 19. **Structure cryo-ME de la sous-unité extracellulaire Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de lapin** (PDB 5GJV). Les structures secondaires de Cav $\alpha$ 2 sont représentées de couleur rose pâle et celles de Cav $\delta$ 1 sont en rose foncé selon deux orientations. Les sucres formant les 14 sites de glycosylations sont colorés en cyan. Les ponts disulfures intramoléculaires sont représentés en sphère de couleur magenta et les ponts intramoléculaires sont en sphère de couleur violette et leurs positions sont annotées en fonction de la couleur de la sous-unité sur laquelle ils se trouvent. Le dernier résidu visible dans la structure 3D est la Cys-1074 (équivalent de la Cys-1059 chez le rat) (Figure originale produite avec PyMOL).

#### 1.8.3.4 Limites de la structure 3D

Plusieurs détails structuraux sur les différentes protéines du canal calcique Cav1.1 n'ont pas pu être résolus par cryo-ME et sont absents dans la structure 3D. De nombreuses boucles intracellulaires (entre les résidus 343-357 et 372-425 sur IS3S4, 669-798 sur IIS6-IIIS1, 1076-1103 sur IIIS5-IVS1 et 1396-1671 sur IVS6) et extracellulaires (139-161 sur

IS3S4 et 1204-1229 sur IVS3S4) de la sous-unité  $Ca_v\alpha 1$  n'ont pas pu être reconstruites dû à une absence de densité électronique pour ces éléments. En ce qui concerne le filtre de sélectivité, les chaînes latérales des quatre résidus glutamate faisant partie du locus EEEE ne sont pas visibles sur la carte de densité électronique en raison des dommages d'irradiation provenant du faisceau d'électrons durant l'acquisition des données. Des données complémentaires seront nécessaires pour comprendre le déplacement des ions  $Ca^{2+}$  sur ces différents sites de fixation ainsi que le nombre d'ions présents dans le pore lorsque le canal est ouvert. Bien que tous les domaines « senseur de voltage (S1-S4) » aient été élucidés, la densité électronique pour les segments transmembranaires S3 et S4 du domaine III n'est pas assez suffisante pour clairement supporter une analyse détaillée des interactions dans ce domaine. Toutefois, compte tenu de la dimension du pore et de l'orientation des senseurs de voltage, la structure du canal a été probablement obtenue dans un état fermé.

Au sein de la sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ , plusieurs régions (acides aminés 1 à 29, 121 à 126 et 226 à 234) sont absentes. Une analyse plus approfondie de la position des ponts disulfures devra également être envisagée pour déterminer avec précision les acides aminés impliqués dans ces liaisons.

De plus, seulement les régions structurées de la sous-unité  $Ca_v\gamma 1$  ont été reconstruites et il manque toutes les boucles intracellulaires et extracellulaires qui relient les différentes structures secondaires entre elle sur la protéine.

De surcroît, bien que la calmoduline soit une protéine régulatrice du domaine C-terminal de  $Ca_v 1.1$  (Halling et al., 2009a), cette protéine n'a pas été observée dans la carte de densité électronique. Il est possible que la calmoduline se soit dissociée du complexe en raison des conditions d'extraction et de purification.

## 1.9 Objectifs du projet de recherche

### 1.9.1 Mise en contexte

Les canaux calciques cardiaques forment un complexe hétéromérique constitué de la sous-unité principale  $\text{Cav}\alpha 1$  ( $\text{Cav}1.2$ ) formant le pore, et de deux sous-unités auxiliaires  $\text{Cav}\beta$  et  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$ . Tandis que  $\text{Cav}\beta$  est importante pour l'adressage membranaire du canal,  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  permet de reproduire les propriétés biophysiques du canal en augmentant les densités de courant et en activant le canal aux potentiels physiologiques. La régulation de la fonction du canal par la sous-unité  $\text{Cav}\beta$  a été bien caractérisé mais peu d'informations étaient disponibles sur la manière dont  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  exerce ces effets fonctionnels suite à sa liaison avec la sous-unité principale  $\text{Cav}\alpha 1$  au début de mes études de Ph. D.

### 1.9.2 Objectifs spécifiques

L'objectif général de mon projet de recherche est de comprendre les mécanismes moléculaires de régulation des canaux calciques cardiaques  $\text{Cav}1.2$  par la protéine auxiliaire  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$ . Lorsque j'ai entrepris mes études de doctorat en 2013, il n'y avait alors aucune structure à haute résolution des sous-unités  $\text{Cav}\alpha 1$  et  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  des canaux calciques de mammifère. Ma contribution à l'élucidation de ces mécanismes a été menée à travers deux projets : 1) la structure 3D de la protéine  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  ainsi que 2) l'étude des déterminants moléculaires responsables de son interaction avec  $\text{Cav}\alpha 1\text{C}$ .

Notre hypothèse de recherche pour le projet 1 est que la protéine  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  est constituée de domaines structuraux modulaires et stables. Les objectifs spécifiques de ce projet, illustrés dans les chapitres 2 et 3, sont :

**1.1.Expression des domaines VWA et cache2 de  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  dans un système bactérien d'expression.** L'analyse bio-informatique de  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  menée en 2013 prédisait deux domaines structuraux principaux conservés (VWA et Cache). Le domaine Cache a été renommé par Cache2 par le groupe de Yan dans la structure du canal calcique  $\text{Cav}1.1$

publiée en décembre 2015, nous avons donc utilisé cette nouvelle nomenclature dans notre étude. Les domaines VWA et Cache2, clonés dans un vecteur d'expression bactérien (pET30a) contenant une étiquette histidine en N- ou C-terminal de la protéine seront exprimés individuellement chez *E. coli* BL21(DE3)pLYS.

**1.2. Purification des domaines de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.** Les protéines recombinantes VWA et Cache2 seront extraites et purifiées par une série de chromatographie (affinité sur colonne de nickel, exclusion stérique) et la pureté sera confirmée par un gel SDS-PAGE.

**1.3. Caractérisation structurale des domaines VWA et Cache2 par cristallographie aux rayons X.** Les conditions de cristallisation pour chaque protéine individuelle seront déterminées et les cristaux seront analysés au synchrotron. Le traitement des données permettra d'obtenir la structure à haute résolution de chaque domaine.

Ce projet a été réalisé en collaboration avec le Pr. Nazzareno D'Avanzo (Département de Pharmacologie et Physiologie) et le Pr. Jurgen Sygusch (Département de Biochimie et Médecine moléculaire).

Notre hypothèse de recherche pour le projet 2 est que l'interface d'interaction entre Cav $\alpha$ 1/Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est conservée dans tous les canaux HVA. Les objectifs spécifiques de ce projet, illustrés dans les chapitres 4 et 5, sont :

**1.1 Modélisation de l'interface d'interaction entre les sous-unités Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.** À l'aide de la structure cryo-ME du canal calcique homologue Cav1.1 et de l'outil bio-informatique PiSA (EMBL), des interfaces intermoléculaires sont prédites entre les boucles extracellulaires S1S2 et S5S6 du domaine I, S5S6 du domaine II et S5S6 du domaine III de Cav $\alpha$ 1 et le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Afin de cibler les acides aminés potentiellement impliqués dans la liaison protéine-protéine, un modèle pour chaque interface d'interaction identifié entre Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 sera construit en utilisant le logiciel de modélisation par homologie Modeller.

**1.2 Identifier les résidus de Cav $\alpha$ 1C qui ancrent l'interaction avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.** Une analyse mutationnelle des acides aminés des boucles extracellulaires de Cav1.2 susceptibles de faire des interaction électrostatiques (distance entre les atomes inférieure à 3.5 Å) avec

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 sera réalisée. L'effet des mutations ponctuelles sur l'interaction protéine-protéine sera évalué par co-immunoprécipitation tandis que l'impact sur la fonction du canal sera étudié par patch-clamp après expression recombinantes dans les cellules HEK.

**1.3 Déterminer les résidus de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 qui contrôlent la liaison avec le canal Cav $\alpha$ 1C.** Le modèle de l'interface d'interaction positionne les résidus de la boucles S1S2 du domaine I de Cav1.2 à une distance suffisante ( $\approx 2\text{\AA}$ ) pour former un pont hydrogène avec la Gly-262 ou Ser-263 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. La Ser-263, avec quatre autres résidus (Asp-259, Ser-261, Thr-331 et Asp-363) forment le motif MIDAS (*metal-ion-dependant adhesion site*) qui joue un rôle au niveau des interfaces protéine-protéine. La contribution du motif MIDAS et des résidus adjacents dans la liaison avec Cav $\alpha$ 1C et dans la fonction de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 sera évaluée par mutagenèse dirigée, co-immunoprécipitation et patch-clamp.

Ce projet a été réalisé en collaboration avec le Pr. Rémy Sauvé (Département de Pharmacologie et Physiologie), Olivier Mailhot, étudiant au Ph. D dans le laboratoire du Pr. Rafael Najmanovich et Rafael Najmanovich (Département de Pharmacologie et Physiologie).

## Chapitre 2 - Méthodologie

### 2.1 ADN utilisés

Tableau III. Informations sur l'ADN des différentes sous-unités des canaux calciques utilisés au cours de mes travaux de recherche.

ADN	Numéros GenBank™	Espèces	Vecteur
Ca <sub>v</sub> 1.2	X15539	Lapin	pCMV-Tag5A
Ca <sub>v</sub> β3	M88751	Rat	pCMV-Tag5A
Ca <sub>v</sub> α2δ1	NM_012919	Rat	pmCherry-N1
Cache2	Acides aminés 446-551 de NM_012919	Rat	Modified pET30

#### 2.1.1 Obtention de mutants de Ca<sub>v</sub>1.2 et Ca<sub>v</sub>α2δ1 par mutagenèse dirigée

Les mutations par substitution dans les sous-unités Ca<sub>v</sub>1.2 et Ca<sub>v</sub>α2δ1 ont été introduites avec la trousse commerciale Q5® site-directed mutagenesis (*New England Biolabs*) par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Les amorces spécifiques sens et anti-sens (20 à 40 nucléotides) ont été conçues à l'aide de NEBasechanger (*New England Biolabs*) puis synthétisées commercialement (*Invitrogen*).

L'ADN d'intérêt est incubé avec les amorces (sens et anti-sens) et un mélange réactionnel contenant l'enzyme (*Q5 high fidelity DNA polymerase*), les nucléotides et du Mg<sup>2+</sup>. La réaction de PCR permet une amplification exponentielle de l'ADN avec la mutation désirée et comprend plusieurs cycles déterminés par le protocole suivant : une première étape de dénaturation (98°C, 30 sec), 25 cycles d'amplification (98°C, 10 sec; X°C, 30 sec; 72°C, 30 sec/kb (soit 5 min 50 pour Ca<sub>v</sub>1.2 et 4 min 30 pour Ca<sub>v</sub>α2δ1) et une extension finale (72°C, 2 min). La température X est définie lors de la synthèse des amorces et dépend de la composition relative des bases A/T, C/G. Le produit de PCR est ensuite incubé avec un mélange réactionnel (Kinase-Ligase-DpnI) contenant une kinase, la T4 DNA ligase et l'enzyme de restriction DpnI, étape qui permet respectivement la phosphorylation des produits

de PCR, la re-circularisation de l'ADN néoformé et la dégradation de l'ADN matrice. L'ADN double brin re-circularisé est ensuite amplifié par transformation dans des bactéries compétentes *E. coli* (souche confidentielle, *New England Biolabs*). L'ADN est inséré dans les bactéries par choc thermique 30 sec à 42°C puis incubé dans un milieu de culture liquide riche (Super Optimal broth with Catabolite repression SOC). Les bactéries sont ensuite étalées dans des boîtes d'agar contenant l'antibiotique de résistance présent sur le plasmide de notre ADN d'intérêt (Kanamycine pour Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1).

Les colonies sont sélectionnées et mises en culture dans du milieu LB liquide afin d'amplifier l'ADN d'intérêt. L'ADN est extrait des bactéries à l'aide d'une trousse commerciale *plasmid DNA purification (Qiagen)* à petit volume (10 ml), puis séquencé (séquençage de Sanger) sur la plateforme de génomique de l'IRIC (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Université de Montréal, Québec, Canada).

Les clones portant la mutation sont ensuite amplifiés par transformation dans des bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$  puis extrait à l'aide de la trousse commerciale *plasmid DNA purification (Qiagen)* à moyen volume (100 ml) afin d'obtenir des concentrations d'ADN de l'ordre de 1-3  $\mu$ g/ $\mu$ l.

## **2.2 Expression et purification du domaine Cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1**

### **2.2.1 Expression hétérologue de Cache2 chez *E. coli***

La séquence codante pour le domaine Cache2 correspondant aux acides aminés 446 à 551 de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 du rat (NM\_012919) a été clonée entre les sites de restrictions *SacI* et *Sall* dans le vecteur pET30-modifié (**Tableau III**). A l'origine, le vecteur pET30 (*Novagen*) contient en tandem une étiquette hexa-histidine, un site de clivage à la thrombine, une étiquette issue de la ribonucléase A pancréatique (S-Tag), un site de clivage à l'entérokinase ainsi qu'une étiquette hexa-histidine en C-terminal. Le plasmide que nous avons utilisé contenait seulement le domaine Cache2 suivi d'un site de clivage à la protéase TEV («*Tobacco Etch Virus*») et une étiquette hexa-histidine en position C-terminal. L'amplification du vecteur a été réalisée dans des bactéries compétentes de souche *E. coli* DH5 $\alpha$  (*Invitrogen*).

En ce qui concerne l'expression protéique, les bactéries issues de la souche *E. coli* BL21(DE3) pLYS (*Novagen*) ont été utilisées. Brièvement, une pré-culture de 100 ml de milieu 2YT (*Sigma-Aldrich*) supplémenté avec 50 µg/ml de Kanamycine (*Sigma-Aldrich*) et 37 µg/ml de Chloramphénicol (*Sigma-Aldrich*) est inoculée avec une colonie isolée et incubée entre 12-16h à 37°C dans l'agitateur à une vitesse de 240 RPM. Le lendemain, 10 ml de la pré-culture est utilisé pour inoculer 1 L de culture contenant les mêmes concentrations d'antibiotiques. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0.6, l'expression protéique de Cache2 est induite par ajout de 0.5 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 3h à 37°C. Les cultures sont ensuite centrifugées 20 min à 7000 RPM (rotor JA-14, *Beckman*) à 4°C et les culots bactériens récupérés puis conservés à -80 °C. Dépendamment de l'expérience pour laquelle la protéine Cache2 est nécessaire, entre 5-7 litres de culture sont nécessaires pour obtenir ≈ 5 mg/ml de protéines purifiées.

### **2.2.2 Extraction des protéines en conditions dénaturantes**

La majorité de la protéine Cache2 se retrouve dans les corps d'inclusions, qui sont des agrégats de protéines insolubles. Afin d'avoir accès à cette fraction, les culots bactériens sont resuspendus dans un tampon A dénaturant contenant 50 mM de sodium phosphate ajusté à un pH de 7.4, 300 mM de NaCl, 20 mM d'imidazole et 8 M d'urée supplémenté avec une tablette d'inhibiteur des protéases (*Roche*). Les bactéries sont lysées par ultrasons à l'aide de trois cycles de sonication successifs de 20 sec à une puissance de 80 W suivi de 20 sec d'incubation sur la glace. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 25 000 RPM (rotor 70ti, *Beckman*) pendant 30 minutes, le surnageant est récupéré puis centrifugé une nouvelle fois pendant 30 minutes supplémentaires afin d'éliminer complètement les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite filtré à l'aide d'une membrane dont le seuil de rétention est de 0.45 micron (*Sarstedt*) dans le but de retirer les particules qui pourraient obstruer le filtre de la colonne de chromatographie.



## 2.2.3 Purification de Cache2 en conditions dénaturantes

### 2.2.3.1 Chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC)

La totalité du surnageant est chargé sur une colonne d'affinité (HisTrap, *GE Healthcare*) branché sur un système de chromatographie automatisé FPLC de type AKTA™ (Äkta pure, *GE Healthcare*). La colonne est composée d'une résine de nickel préalablement équilibrée avec le tampon A mentionné précédemment. L'échantillon est chargé sur une colonne ayant un volume de 5 ml, ce qui correspond à une capacité de liaison d'environ 40 mg de protéines ayant une étiquette histidine par ml de surnageant. L'évolution de la purification est suivie en temps réel en mesurant l'absorbance à 280 nm et visualisé sur un ordinateur relié à l'Äkta. Une fois la totalité de l'échantillon chargé sur la colonne, la résine est rincée avec le tampon A jusqu'à ce que l'absorbance retourne à la ligne basale, ce qui signifie que plus aucune protéine sort de la colonne. La protéine d'intérêt est ensuite éluée en utilisant une concentration croissante linéaire d'imidazole et collectée dans des tubes numérotés (**Figure 20A**). Le début du gradient permet, grâce à des faibles concentrations d'imidazole, d'éliminer des protéines contaminantes ayant lié de façon non spécifique la colonne. Toutes les fractions récupérées aux différentes étapes du processus ont été analysées sur gel SDS-PAGE 12 % puis colorées au bleu de Coomassie (**Figure 20B**). Les fractions d'éluion contenant la protéine Cache2 sont regroupées puis l'imidazole et le NaCl sont éliminés du tampon en utilisant des colonnes de dessalage (PD-desalting column, *GE Healthcare*).

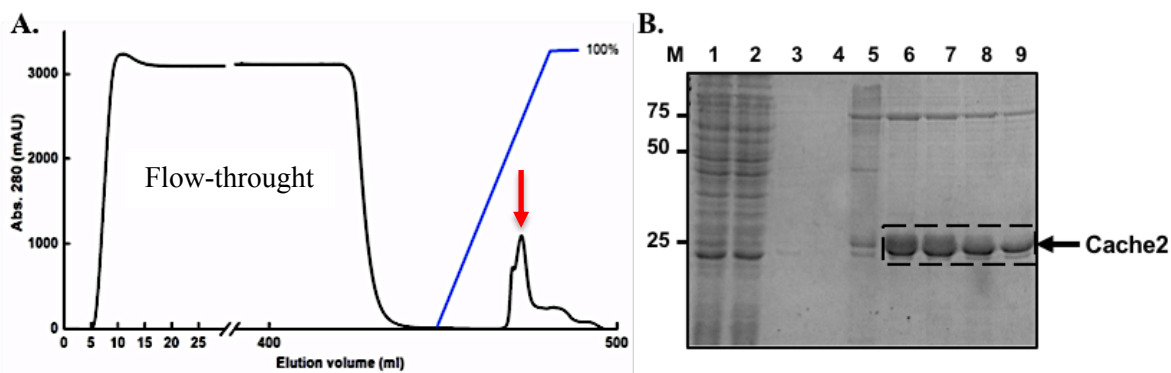


Figure 20. **Première étape de purification.** **A.** Profil typique d'éluion de Cache2 de la colonne d'affinité HisTrap. Le flow-through correspondant à la fraction protéique non

liée sur la colonne. Le gradient d'imidazole est indiqué par une rampe bleue. Le pic d'élution est indiqué par une flèche rouge. **B.** Les fractions de la protéine Cache2 sont analysées sur gel SDS-PAGE 12%. Cache2 est retrouvé dans les fractions (pistes 5-9) récoltées sous le pic d'élution. La piste 1 représente le lysat total avant injection, les pistes 2-4 proviennent du flow-through récoltés après 50, 100, 200 et 300 ml d'injection.

### 2.2.3.2 Chromatographie échangeuses d'anions

L'échantillon est chargé sur une colonne de sépharose tapissée de groupements diethylaminoethyl chargés positivement, (DEAE SE, *GE Healthcare*) après avoir été préalablement équilibré dans un tampon B contenant 50 mM de sodium phosphate pH 7.4 et 8 M d'urée. Cette colonne est branchée sur le système FPLC (*Äkta pure*, *GE Healthcare*) et l'évolution de la chromatographie est suivie en mesurant l'absorbance à 280 nm. Une fois la totalité de l'échantillon chargée, la colonne est rincée avec le tampon B jusqu'à ce que l'absorbance retourne à sa valeur de base. La protéine Cache2 est ensuite décrochée de la colonne en augmentant linéairement la concentration de NaCl jusqu'à une valeur de 1M dans le tampon B (**Figure 21A**). Les fractions récoltées sont analysées sur gel SDS-PAGE 12% colorées au bleu de Coomassie (**Figure 21B**). Les échantillons correspondant à la protéine Cache2 sont regroupés. A l'issue de ces deux étapes de purification, l'échantillon ne contient plus de protéines contaminantes et la protéine Cache2 est considéré comme pure.

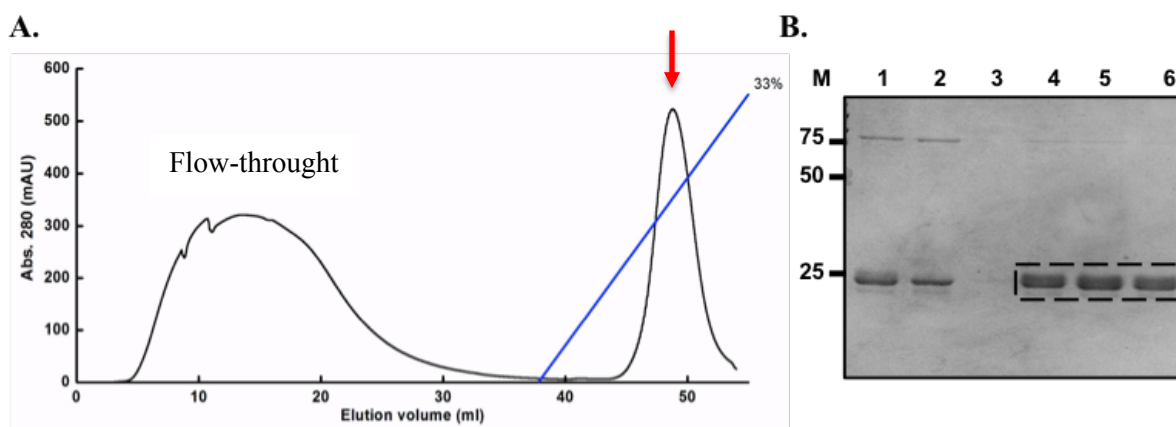


Figure 21. **Deuxième étape de purification de la protéine Cache2.** **A.** Profil typique d'élution de Cache2 sur colonne échangeuses d'anions. Les protéines non liées à la colonne se retrouvent dans le flow-through. La protéine Cache2 est décrochée dans un pic unique à une concentration de 100 mM NaCl (gradient de NaCl représenté par une

rampe bleue). **B.** L'analyse par SDS-PAGE 12% des fractions sous le pic d'élution indiqué par une flèche rouge (piste 4, 5 et 6) montre que Cache2 (25 kDa) est la protéine majoritaire dans l'échantillon. Les pistes 1 et 2 correspondent à l'échantillon avant l'injection sur la colonne et la piste 3 est la fraction avant le gradient d'élution (x = 39 ml).

### 2.2.3.3 Repliement de la protéine Cache2

L'échantillon contenant la protéine Cache2 pure est dilué dans un tampon C contenant 50 mM de sodium phosphate pH 7.4, 300 mM de NaCl, 0.5 M de L-arginine (*Sigma-Aldrich*) et 1 mM de dithiothreitol (*Sigma-Aldrich*), jusqu'à obtenir une concentration protéique de 0.1 mg/ml. L'échantillon dilué est ensuite disposé dans une pochette de dialyse (*Sigma-Aldrich*) immergé dans le tampon C toute la nuit, sur un agitateur à 4 °C dans le but d'éliminer l'urée. Le repliement de la protéine s'effectue grâce à l'élimination progressive de l'urée dans l'échantillon.

### 2.2.3.4 Chromatographie d'exclusion stérique

Le repliement et la stabilité de la protéine Cache2 est vérifié par chromatographie d'exclusion stérique à l'aide d'une colonne Superdex 200 10/300 GL (*GE Healthcare*) préalablement équilibré dans un tampon D (50 mM de sodium phosphate pH 7.4, 300 mM de NaCl). Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leurs rayons hydrodynamiques, une mesure qui prend en compte à la fois la forme et la couche d'hydratation de la protéine. Le volume d'élution est directement corrélé au rayon hydrodynamique et peut être calculé à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisé à l'aide de protéines standard de poids moléculaire connu (1350 à 600000 daltons). La protéine Cache2 est éluée après 15.9 ml (**Figure 22A**), ce qui correspond à un poids moléculaire apparent de 21 kDa et s'apparente à son poids moléculaire théorique de 24.9 kDa. La fraction d'élution obtenue à 15.9 ml analysée sur gel SDS-PAGE 15 % montre que Cache2 est pure et migre à son poids moléculaire attendu (**Figure 22B**).

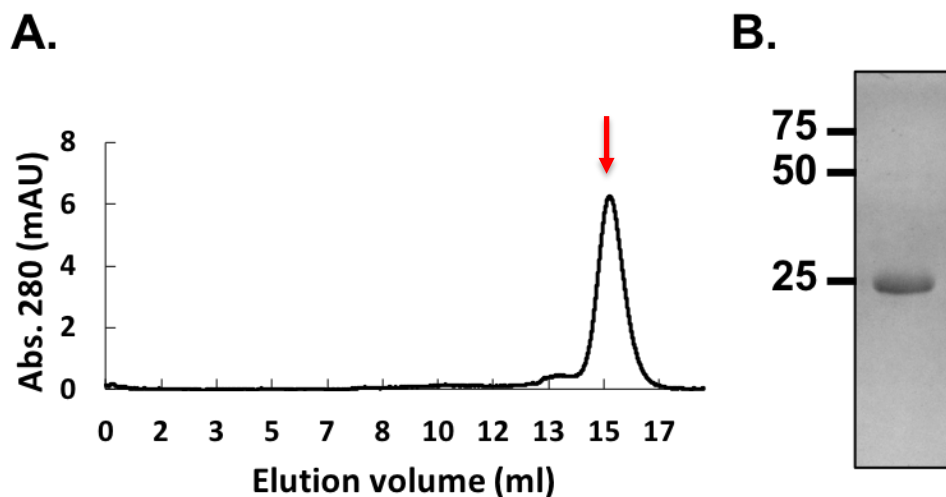


Figure 22. **Dernière étape de purification de Cache2.** **A.** Profil typique d'élution de la chromatographie d'exclusion stérique de Cache2 à un volume de 15.9 ml. **B.** Analyse par SDS-PAGE 12% de la fraction récoltée sous le pic d'élution, indiqué par une flèche rouge, à 15.9 ml. La protéine Cache2 purifiée migre à son poids moléculaire attendu de 25 kDa.

## 2.3 Caractérisation de la structure secondaire par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une technique qui permet de déterminer la proportion de structures secondaires (feuillet- $\beta$ , hélice- $\alpha$ , zone désordonnée) d'une protéine en solution. Le spectre dans l'UV lointain (180-260 nm - zone d'absorption de la liaison peptidique d'un acide aminé) est fonction de la structure secondaire (**Figure 23A**). L'analyse des données de dichroïsme circulaire permet de donner une estimation du pourcentage de chaque conformation dans la molécule. La protéine Cache purifiée a été dialysée contre un tampon 50 mM de sodium phosphate pH 7.4 afin d'éliminer le NaCl. Les spectres ont été obtenus aux concentrations protéiques suivantes : 0.075 mg/ml, 0.0037 mg/ml et 0.019 mg/ml à une température de 20°C, sur un spectropolarimètre JASCO 810 à une longueur d'onde de 240-180 nm en utilisant des cuvettes de 0.2 cm. Les spectres ont été enregistrés en triplicata et une moyenne des données a été réalisée. Les données brutes ont été traitées à l'aide du programme

CDSSTR disponible sur le serveur DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>). Le domaine Cache2 est majoritairement composé de structures secondaires en feuillet- $\beta$  (**Figure 23B**)

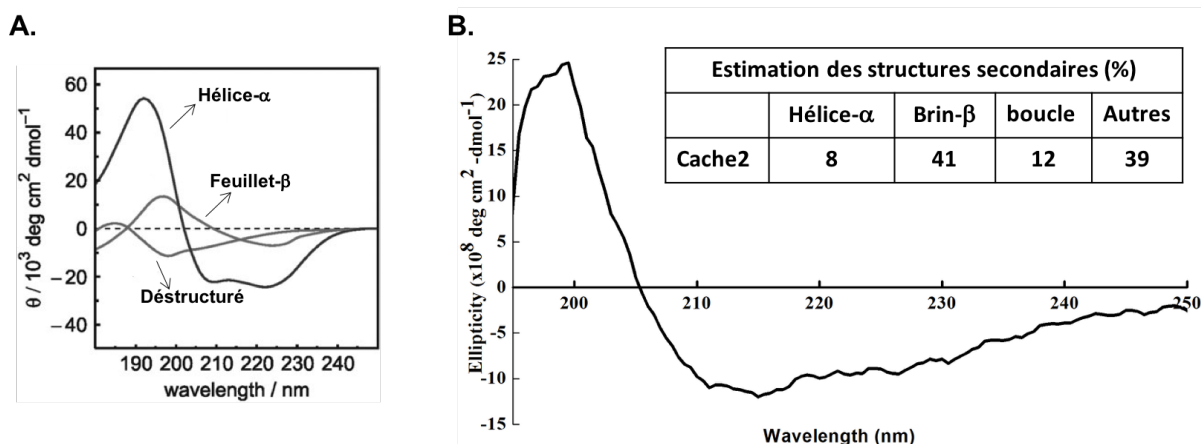


Figure 23. **Profil de dichroïsme circulaire.** **A.** Spectre caractéristique des structures secondaires d'une protéine (Image modifié de (Bulheller, Rodger, & Hirst, 2007)). **B.** Spectre obtenu pour Cache2 à une concentration de 1.8  $\mu\text{M}$ . L'analyse des résultats de dichroïsme ont montré que Cache2 est majoritairement constituée de feuillet- $\beta$ .

## 2.4 Caractérisation structurale par SAXS

Le SAXS est une technique qui permet d'obtenir des informations structurales des protéines en solution à basse résolution telles que la taille, la forme ou la conformation (globulaire et compacte ou allongée et étroite) et donne également des informations sur la dynamique (régions flexibles, désordonnées) des protéines. Les mesures de SAXS utilisent des faisceaux de rayons X produit par les accélérateurs de particules des synchrotrons (**Figure 24**). L'acquisition de nos données a été menée au synchrotron MacChess d'Ithaca (161 Wilson Laboratory, Synchrotron Drive, Ithaca, NY 14853, USA). Un échantillon de protéine en solution est traversé par un faisceau de rayons X et les rayons diffractés sont collectés par un détecteur. Au préalable, le faisceau de rayons X traverse également la solution contenant uniquement le tampon sans protéine (contrôle) pour pouvoir s'affranchir de la diffraction du tampon lors de l'analyse des données.

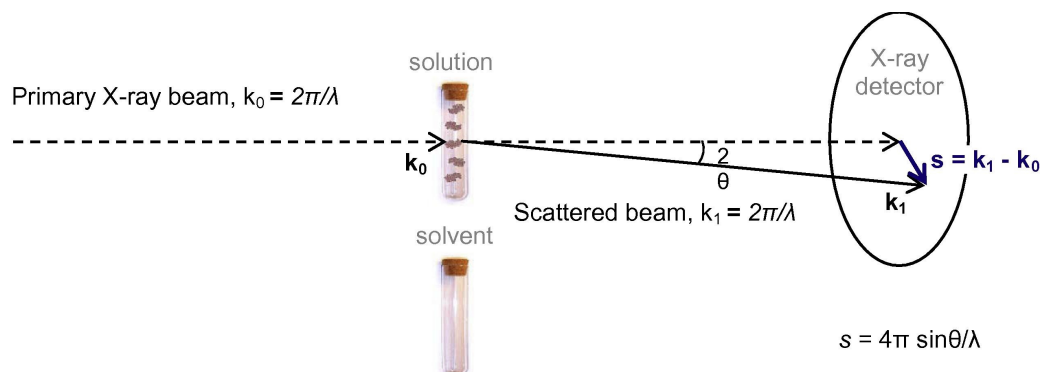


Figure 24. **Schéma représentant le principe de l'acquisition des données par SAXS.** Une solution protéique est injectée dans un capillaire de quartz, puis traversée par un faisceau de rayons X. L'intensité des rayons X diffusée, enregistrée par un détecteur de rayon X, est représenté par le vecteur de diffusion  $s = 4\pi \sin(\theta/\lambda)$  où  $\lambda$  est la longueur d'onde du faisceau incident et  $2\theta$  l'angle de diffusion. Le patron de diffusion du solvant (tampon) est également recueilli et sera soustrait de la valeur obtenue pour l'échantillon protéique afin d'avoir seulement accès au signal provenant de la protéine d'intérêt (image extraite de l'article (Kikhney & Svergun, 2015)).

Les expériences de SAXS nécessitent un volume d'échantillon de 100  $\mu$ l de protéine pure à plusieurs concentrations différentes (1.6, 0.8 et 0.4 mg/ml pour Cache2). L'analyse de Guinier a été réalisée à l'aide du logiciel RAW. Cette analyse des données (valeur  $q * R_g < 1.3$ ) a permis de déterminer le rayon de giration ( $R_g$ ) et l'intensité à l'angle de diffusion nul  $I(0)$ . Dans la région de Guinier, nos données montrent que le  $\log(I(q))$  sur  $q^2$  est linéaire avec un  $R_g$  qui varie très peu (entre 20.6 et 21.3 Å) pour les trois concentrations indiquant l'absence d'agrégation de Cache2 dans l'échantillon. L'enveloppe de Cache2 a été reconstruite à l'aide du logiciel DAMMIN disponible sur le serveur ATSAS (<https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/atsas-online/>). L'enveloppe de Cache2 a été superposée avec la structure 3D du domaine Cache2 issu de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de lapin obtenu en cryo-ME (PDB 3JBR) à l'aide du programme SUBCOMP (ATSAS). La déviation entre les données de l'enveloppe de Cache2 et la structure 3D de Cache2 issu de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de lapin montre un  $\chi^2$  (chi-square) de 1.14. La structure 3D de Cache2 a ensuite été déterminée à partir des données SAXS à l'aide de SAXSTER sur le serveur de I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/SAXSTER/>).

## 2.5 Interaction protéine-protéine

### 2.5.1 Co-immunoprécipitation

L'interaction entre les différentes sous-unités  $Ca_v\alpha 1$  ( $Ca_v1.2$  et  $Ca_v2.3$ ),  $Ca_v\beta 3$ -cMyc et  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA des canaux calciques a été évaluée par co-immunoprécipitation en utilisant des billes magnétiques anti-c-Myc (**Figure 25A**) dirigées contre la sous-unité  $Ca_v\beta 3$  ou anti-HA (**Figure 25B**) dirigées contre la sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ . L'épitope c-Myc dans  $Ca_v\beta 3$  est inséré du côté C-terminal de la protéine tandis que l'épitope HA dans  $Ca_v\alpha 2\delta 1$  est inséré entre les résidus Asp-676 et Asn-677.

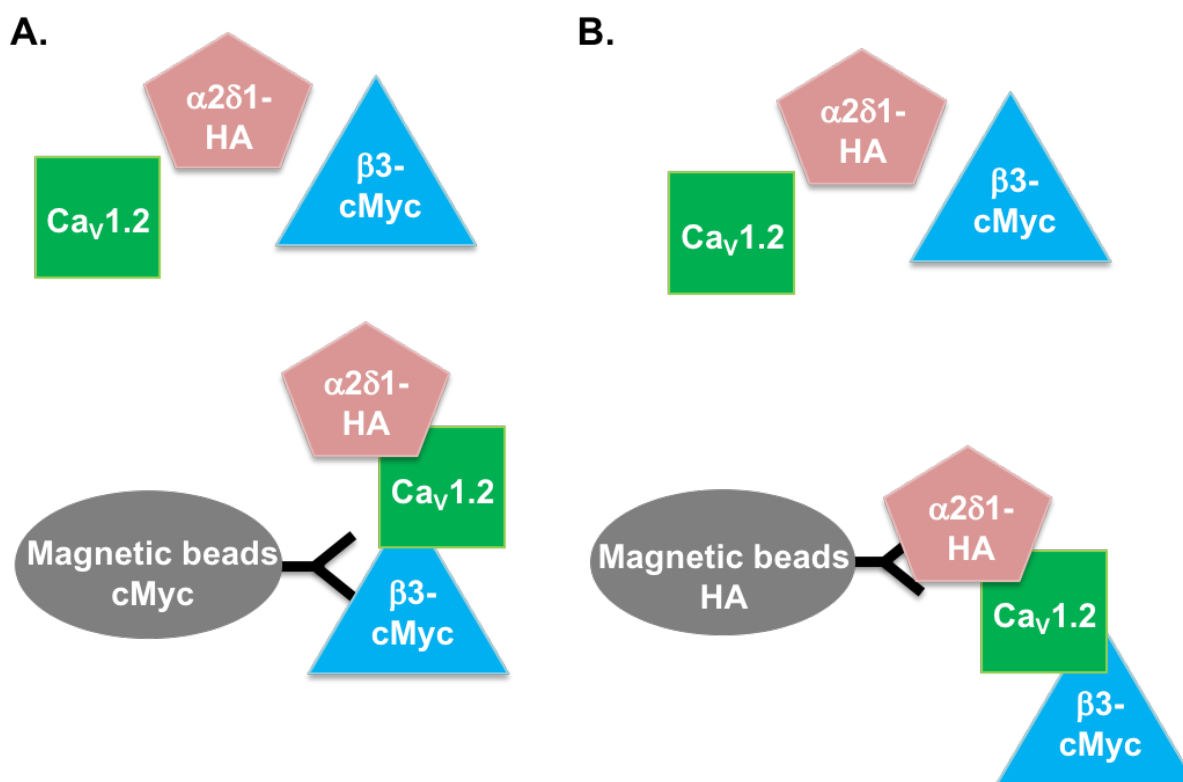


Figure 25. Schéma représentant le principe des deux méthodes utilisées pour la co-immunoprécipitation du complexe calcique. **A.** Les anticorps anti-cMyc couplés aux billes magnétiques se lient à  $Ca_v\beta 3$ -cMyc et co-immunoprécipite  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ . **B.** Les anticorps anti-HA couplés aux billes magnétiques interagissent avec  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ -HA et co-immunoprécipite  $Ca_v1.2$  et  $Ca_v\beta 3$ .

### **2.5.1.1 Billes magnétiques Anti-c-Myc**

Les protéines formant le complexe calcique Cav1.2 ont été exprimées dans des cellules HEK293T (*Human Embryonic Kidney T-antigen*). Cette lignée cellulaire a été modifiée par un antigène SV40 (*Simian Vacuolating Virus 40*) permettant une expression optimale des protéines recombinantes. Les cellules sont transfectées avec une même quantité d'ADN (4 µg) pour chaque sous-unité (Cav1.2, Cavβ3-cMyc et mCherry-Cavα2δ1-HA) dans une boîte de pétri (35 \* 10 mm) contenant 10 ml de milieu de culture DMEM-HG (*Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose*) à l'aide de 10 µl de lipofectamine®2000 (*Invitrogen*). Après une incubation de 48h à 37 °C, les cellules sont lysées dans un tampon comprenant 20 mM MOPS-Na pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 % digitonine puis soniquées 8 sec dans la glace. Après 1h de solubilisation à 4°C en rotation, les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines totales est ensuite incubé toute la nuit avec 50 µl de billes anti-cMyc à 4°C en rotation. Une fraction du surnageant (20 µl) est récupérée pour le dosage des protéines à l'aide de la protéine standard albumine de sérum bovin BCA Protein Assay Kit (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, États-Unis*). Le lendemain, les billes anti-cMyc sont récupérées à l'aide d'un portoir magnétique (*Millipore*) et le surnageant (« flow-through ») est éliminé. Les billes sont rincées 3 fois avec 300 µl de tampon contenant 20 mM MOPS-Na pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.2 % digitonine pendant 5 minutes. Les protéines liées aux billes sont ensuite éluées dans 20 µl de tampon de Laemmli 2X après une incubation de 2 minutes à 95°C.

### **2.5.1.2 Billes magnétiques Anti-HA**

Le protocole a été adapté de celui décrit dans la section précédente. Les protéines totales contenues dans le surnageant sont incubées avec 50 µl de billes anti-HA toute la nuit à 4°C en rotation. Le lendemain, les billes sont rincées puis les protéines liées sont éluées dans 20 µl de tampon de Laemmli 2X après une incubation de 2 minutes à 95°C.



## 2.5.2 Immunobuvardage de type Western-blot

Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE 8% à 120V pendant 90 min puis transférées sur une membrane de nitrocellulose (*Bio-Rad*) à 100V pendant 120 min. La membrane est bloquée dans du lait 5% (w/v) dilué dans du PBS 1X pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Chaque membrane est ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-Cav1.2 (1 :5000, *Alomone*), ou anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (1 :1000, *Alomone*), ou anti-Cav $\beta$ 3 (1 :10000, *Alomone*) ou anti-GAPDH (1 :10000, *Sigma*) toute la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, les membranes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du tampon de lavage (PBS 1X + 0.1% de tween20) puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué avec la peroxydase de raifort (Horseradish peroxidase) (1 :10000, *Jackson ImmunoResearch*) pendant 120 minutes à température ambiante sous agitation. Après 3 lavages de 10 minutes, la membrane est révélée par chimioluminescence. Le substrat chimio-luminescent ECL (*Thermo Fisher Scientific*) est incubé avec la membrane pendant 5 minutes et va réagir avec la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire qui produit un signal coloré visible à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc™ Touch (*Bio-Rad*). Lorsque Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 doivent être révélés sur la même membrane, la membrane est d'abord révélée avec un premier anticorps puis cet anticorps est éliminé à l'aide d'une solution commerciale (stripping buffer, *Thermo Fisher Scientific*). Ensuite, la membrane est bloquée dans du lait 5% (w/v) dilué dans du PBS 1X pendant 30 min puis incubée toute la nuit avec le nouvel anticorps.

## 2.6 Modélisation par homologie

Le domaine VWA (acide aminés 249 à 439) de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et les segments transmembranaires S1S4 du domaine I (acides aminés 32 à 179) (IS1S4) et S5S6 du domaine III (acides aminés 1059 à 1204) (IIS5S6) de Cav1.2 ont été modélisés à l'aide de MODELLER 9v17 (<https://salilab.org/modeller/>) en utilisant les coordonnées atomiques de la structure du canal calcique de muscle squelettique (PDB = 5GJV).

Les séquences primaires ont été alignées à l'aide de la commande Align2D sur MODELLER. Le domaine VWA de rat est entièrement conservé entre les isoformes Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de lapin et rat tandis que l'identité entre les régions IS1S4 et IIS5S6 de Cav1.1 et Cav1.2 de

lapin est de 70% et 74% respectivement. 100 modèles de chaque domaine (VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et IS1S4, IIS5S6 de Cav1.2) ont été produits. Les modèles ont été évalués en utilisant les scores DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) et molpdf (*Molecular pdf*). Ces deux paramètres sont des scores standard générés par MODELLER qui permettent de discriminer les meilleurs modèles en utilisant par exemple un classement selon le respect des contraintes spatiales (« clash stérique » et orientation des chaînes latérales des acides aminés). Les modèles avec les scores DOPE et molpdf les plus bas ont été sélectionnés pour l'étude.

La modélisation du domaine IS1S4 de Cav1.2 a nécessité une étape supplémentaire afin de reconstruire la boucle extracellulaire entre les segments transmembranaires S3S4 qui était manquante dans la structure du canal Cav1.1 (PDB = 5GJV). Les 25 acides aminés ont été reconstruits et optimisés en utilisant la commande « *automatic loop refinement* » dans MODELLER. 100 modèles de la boucle S3S4 ont été générés et ont été conservés pour l'étude seulement les modèles ayant les scores DOPE et molpdf les plus élevés.

### **2.6.1 Dynamique moléculaire (Expériences réalisées par Olivier Mailhot, étudiant au Ph. D sous la direction de Rafael Najmanovich)**

L'interaction entre le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et la région IS1S4 de Cav1.2 a été étudiée à l'aide du logiciel de dynamique moléculaire en champs de force GROMACS (<http://www.gromacs.org>). Les segments transmembranaires (S1 à S4) de Cav1.2 ont été insérés dans une bicouche lipidique constitué de 128 molécules de dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). Les segments transmembranaires ont été introduits manuellement dans la membrane en alignant les lipides avec les résidus hydrophobes sur Cav1.2. La position de la membrane a été validée en la comparant avec celle présente dans la carte de densité électronique de la structure cryo-ME de Cav1.1 (PDB : 5GJV). La membrane a été ensuite compactée autour de la protéine en utilisant le programme InflateGRO (Oostenbrink, Villa, Mark, & van Gunsteren, 2004). Des concentrations d'ions de 143 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> et 2 mM MgCl<sub>2</sub> ont été simulées dans le système à une température de 323K, valeur légèrement supérieure à la phase de transition du DPPC qui a été mesurée à 315K (Nagle, 1993). Un ion Ca<sup>2+</sup> a également été introduit virtuellement au centre géométrique du site MIDAS dans le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.

En dynamique moléculaire, les forces du système tendent à déplacer les atomes de la molécule vers des conformations de moindre énergie. Les mouvements de ces atomes sont enregistrés dans le temps et permettent de calculer une « trajectoire », qui correspond à une succession de conformations. La durée totale des simulations pour l'interface d'interaction IS1S4 Cav1.2- VWA Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est de 25-ns avec une intégration tous les 2 fs. Durant les 25-ns, notre système est stable (RMSD constant autour de 3Å) et aucune contrainte n'a été appliqué afin de ne pas biaiser notre modèle. Pour chaque système, 5 trajectoires ont été calculées avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A mais seulement les 3 trajectoires les plus représentatives (RMSD le plus bas par rapport au modèle de départ avant la dynamique moléculaire) ont été conservés pour l'analyse. Pour chaque modèle (WT et mutant D259A), le centroïde a été calculé et correspond à la conformation la plus représentative de la trajectoire.

## **2.7 Mesure d'électrophysiologie (Expériences réalisées par Benoîte Bourdin, Ph. D)**

### **2.7.1 Enregistrement des données**

Les cellules HEK293T (80 % de confluence) sont transfectées avec 12.2  $\mu$ g d'ADN correspondant à 4  $\mu$ g de chaque sous-unité du canal calcique (Cav1.2, Cav $\beta$ 3 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1) et 0.2  $\mu$ g de green fluorescent protein (GFP) (marqueur de transfection). Environ 24h plus tard, les cellules sont resuspendues puis diluées dans un volume de milieu de culture suffisamment grand pour que les cellules soient isolées (10 ml). Le lendemain, seules les cellules identifiées par l'expression de la GFP sont sélectionnées pour être étudiées en patch-clamp en configuration cellule entière.

Le patch-clamp est une technique qui permet d'enregistrer les courants à travers la membrane à l'aide d'une électrode de verre remplie d'une solution saline conductrice dont la pointe fait quelques  $\mu$ m déposée à la surface de la cellule et reliée à un amplificateur (**Figure 26**). La résistance électrique qui s'établit entre la pipette de verre et la cellule permet d'isoler le fragment de membrane sous la pipette. Nos expériences ont été réalisées en configuration cellule entière, qui permet de déterminer l'activité des canaux ioniques de toute la cellule en fonction du temps à de voltages déterminés. Une électrode de référence (pont d'agar) est

placée dans le pétri contenant une solution saline de Earle modifiée contenant : 135 mM NaCl, 20 mM TEA-Cl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM HEPES tamponné à pH 7.3 avec du KOH. Le pont d'agar est rempli d'une solution de KCl 3M et l'électrode d'enregistrement contient : 140 mM CsCl, 0.6 mM NaGTP, 3 mM MgATP, 10 mM EGTA et 10 mM HEPES tamponné à pH 7.3 avec du NaOH. Les données sont enregistrées sur un amplificateur Axopatch 200-B (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA*) connecté au logiciel PClamp Clampex 10.5 couplé au système d'acquisition Digita 1440 (*Molecular Devices*). Les cellules sont maintenues à un potentiel de -100 mV avant d'appliquer un protocole de pulse permettant d'imposer un voltage (voltage-clamp) de -60 mV à +70 mV avec un incrément de +5 mV pendant 450 ms à une fréquence de 0.2 Hz. Les courants sont enregistrés à température ambiante à une fréquence de 5 kHz et filtrés à 1 kHz.

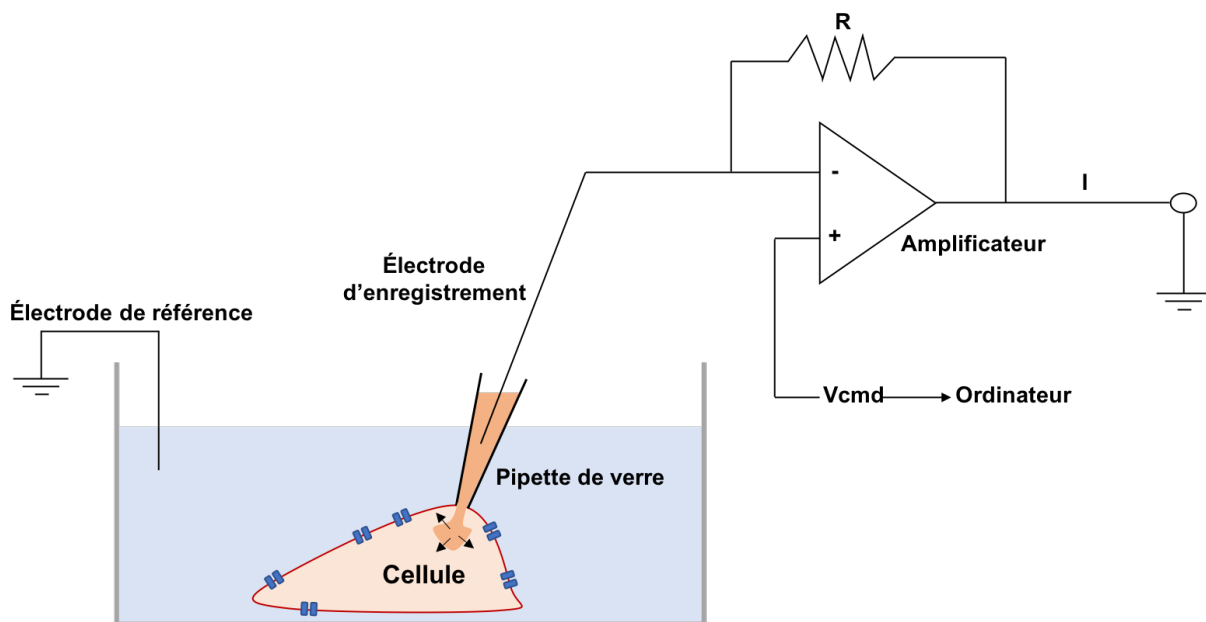


Figure 26. **Principe de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière (voltage-clamp).** Les deux électrodes permettent de mesurer le potentiel de membrane. La portion de membrane en contact avec la pipette est rompue (configuration cellule entière) et permet d'appliquer le voltage sur toute la cellule. Le voltage est défini par le protocole de pulse à l'aide du logiciel Clampex sur l'ordinateur (Vcmd). L'amplificateur permet d'imposer des potentiels et recueille des courants macroscopiques (I) (Figure inspiré de l'article (Meshik et al., 2017)).

## 2.7.2 Analyse des données

Les données digitales sont analysées à l'aide du logiciel PClamp Clampfit10.5. Pour chaque cellule enregistrée, la capacitance, qui est une estimation la taille de la cellule, va être déterminée. Les courants sont normalisés par rapport à la capacitance de la cellule (entre 10 et 20 pF en moyenne). Pour chaque tracé, le courant maximum est porté en ordonnée et le voltage en abscisse (courbe IV). Le potentiel de mi- activation ( $E_{0.5, act}$ ), qui représente les potentiels auxquels on observe 50% du courant maximal, est obtenu en lissant la courbe IV avec l'équation de Boltzmann. Cette donnée donne des informations sur la sensibilité du canal au voltage. L'énergie libre d'activation est calculée à partir du potentiel de mi- activation à l'aide de la formule suivante :

$$\Delta G_{act} = z \times F \times E_{0.5, act}$$

$\Delta G_{act}$  est l'énergie libre d'activation,  $z$  est le facteur de pente,  $F$  est la constante de Faraday,  $E_{0.5, act}$  est le potentiel de mi- activation

La mesure de l'énergie libre d'activation est une estimation de l'énergie associée au changement de conformation du canal observé lors du passage de l'état fermé à l'état ouvert (Wall-Lacelle, Hossain, Sauve, Blunck, & Parent, 2011). Un changement dans l'énergie libre d'activation est alors interprété comme une modification du ratio entre l'état ouvert et l'état fermé du canal. En présence de  $Cav\beta3$ ,  $Cav1.2$  et  $Cav\alpha2\delta1$ , le système est stable, l'énergie est minimale, les valeurs  $\Delta G_{act}$  centrées autour de  $-0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  suivent une distribution gaussienne ce qui suggère que  $Cav\alpha2\delta1$  stabilise le canal dans une conformation proche de l'état ouvert (Bourdin et al., 2015). En absence de  $Cav\alpha2\delta1$ , le système est instable et consomme de l'énergie, les valeurs  $\Delta G_{act}$  sont plus étendues (entre  $-0.2$  et  $1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) et la probabilité que le canal soit dans un état fermé est plus importante.

La valeur du  $\Delta G_{act}$  est calculée à partir d'une estimation des données d'activation qui sont normalisées par rapport au courant maximal. Pour une condition donnée, les valeurs obtenues pour chaque courbe d'activation ont été moyennés et l'incertitude sur ces valeurs (*Standard Error of Measurement SEM*) a été calculé par Origin 7.0. La comparaison entre la protéine sauvage et mutée a été évalué en utilisant un test ANOVA « *one-way* » intégré dans

le logiciel Origin 7.0. Les données sont considérées statistiquement différentes si l'analyse présente un facteur  $p < 0.01$  ou  $p < 0.001$  selon les mutants testés.

## **2.8 Cytométrie en flux (Expériences réalisées par Marie-Philippe Tétreault, M. Sc.)**

### **2.8.1 Acquisition des données**

La cytométrie en flux est une technique quantitative et qualitative qui permet de compter et caractériser physiquement (taille, granularité) une suspension cellulaire concentrée en un flux unique de cellule en passant à travers une source lumineuse (généralement un rayon laser). Il existe plusieurs types de rayon laser avec des longueurs d'onde spécifique tel que le laser bleu (488 nm) ou le laser rouge (635 nm). La lumière diffusée par les cellules après leur irradiation dans la chambre de flux est focalisée par des lentilles de focalisation (**Figure 27**). Les rayons lumineux sont ensuite dirigés vers un ensemble de filtres qui permettent de séparer les différentes longueurs d'onde présentent avant d'être dirigée vers le détecteur lumineux (système optique), qui convertis les signaux optiques en signaux électroniques à l'aide des tubes photomultiplicateurs (PMT). Les signaux électroniques sont ensuite numérisés par un convertisseur numérique puis analysés par des logiciels informatiques.

La technique de cytométrie en flux appliquée à la détermination de l'expression membranaire et totales des canaux calciques cardiaques de type-L et de leurs sous-unités a été publié par le laboratoire (Bourdin, Segura, Tetreault, Lesage, & Parent, 2016).

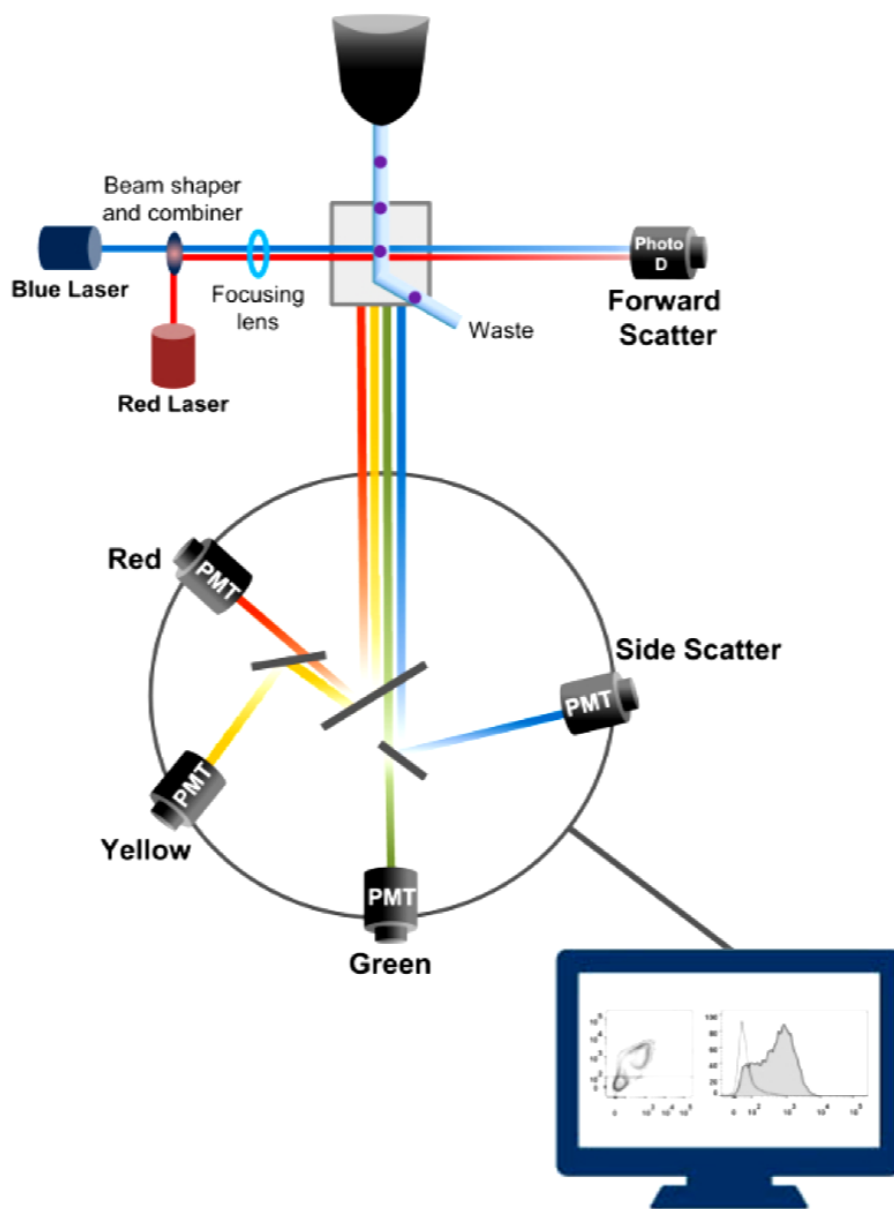


Figure 27. **Principe de la cytométrie en flux.** Les cellules rentrent une à une dans une chambre à flux et sont traversés par un faisceaux lasers dépendamment du marquage fluorescent. La lumière diffusée est ensuite filtrée puis recueillie par les détecteurs spécifiques à chaque longueur d'onde. Le signal optique est ensuite converti en signal électrique par un photomultiplicateur, collecté puis traité (Image extraite de l'article (Bourdin et al., 2016)).

Dans notre étude, cette technique a été utilisée pour détecter la présence à la membrane plasmique de la sous-unité  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ . Sur le domaine extracellulaire de  $Ca_v\alpha 2\delta 1$ , entre les résidus Asp-676 et Arg-677, une étiquette HA (*Human influenza hemagglutinin*) constituée de

9 acides aminés consécutifs (YPYDVPDYA) a été insérée (**Figure 28A**). L'étude de cette construction par patch-clamp a montré que l'insertion d'un épitope HA à cette position ne modifie pas la fonction de la protéine (Bourdin et al., 2015). Cette étiquette est reconnue par un anticorps anti-HA couplé à un fluorophore FITC (*fluorescein isothiocyanate*) qui émet un signal à 530 nm (dans le vert) après excitation à 488 nm (dans le bleu). En cellules HEK293T non perméabilisées, ce fluorophore ne sera accessible qu'aux protéines Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 localisées à la membrane externe de la cellule et traduit la présence relative de cette protéine à la membrane (**Figure 28B**). En cellules HEK293T perméabilisées, le signal fluorescent est mesuré sur toutes les protéines (membranaires et intracellulaires) (**Figure 28C**). De plus, une étiquette mCherry, constitutivement fluorescente, est exprimée du côté C-terminal de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et émet un signal à 610 nm (dans le rouge) après excitation à 561 nm (dans le vert-jaune). Ce fluorophore permet de vérifier que la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est correctement traduite (**Figure 28A**). Les conditions testées sont réalisées en triplicata et le signal est compté pour 10 000 cellules.

Les expériences de cytométrie en flux ont été réalisées sur un FACSAria III® SORP (BD Biosciences) au département de microbiologie et d'immunologie de l'Université de Montréal.

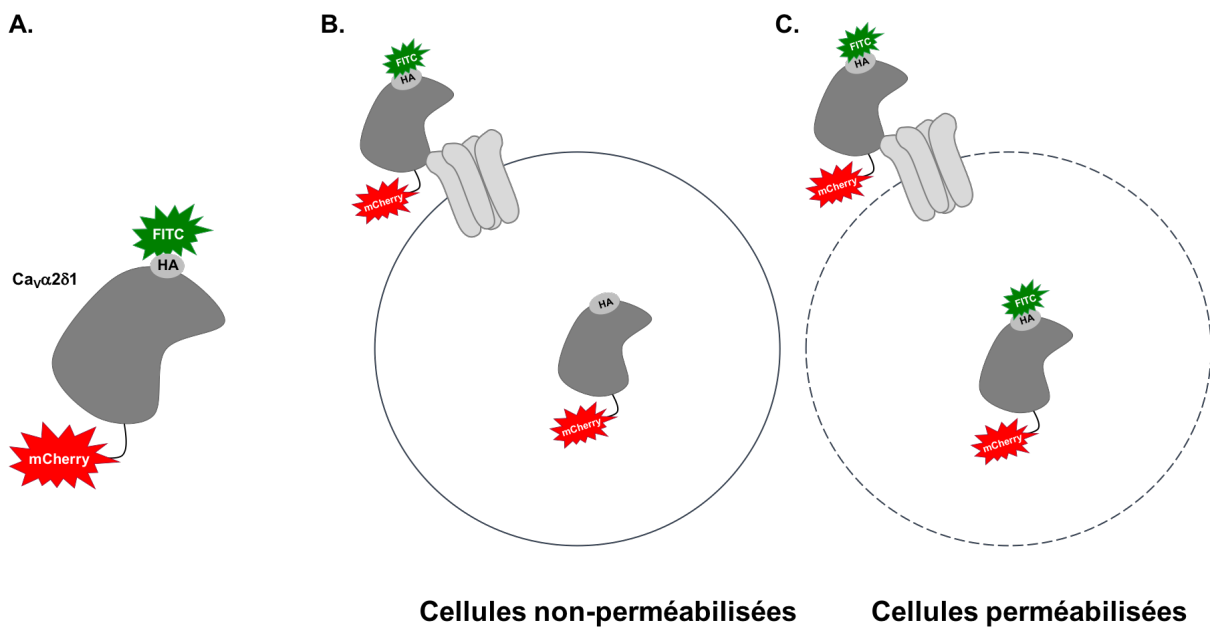




Figure 28. **Représentation schématique de la détection des fluorophores sur Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 en cellules perméabilisées ou non-perméabilisées.** **A.** Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 contient une étiquette HA sur son domaine Cache3 et exprime de façon constitutive une étiquette mCherry du côté C-terminal. **B et C.** En cellule non-perméabilisée, l'anticorps anti-HA couplé FITC est accessible seulement aux protéines Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 présentes à la membrane (fraction membranaire) alors qu'en cellules perméabilisées, l'anticorps a de plus accès aux protéines Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 intracellulaires (protéines totales).

Une stratégie identique a été utilisée pour étudier l'adressage membranaire de la protéine Cav1.2. Une étiquette HA a été insérée dans la boucle extracellulaire S5S6 dans le domaine II entre les résidus Asp-710 et Glu-711 tandis que l'épitope mCherry est exprimé de façon constitutive du côté C-terminal de la protéine (**Figure 29**). Il a été montré par patch-clamp que l'insertion de ces deux étiquettes ne modifie pas la fonction de la protéine (Bourdin et al., 2015).

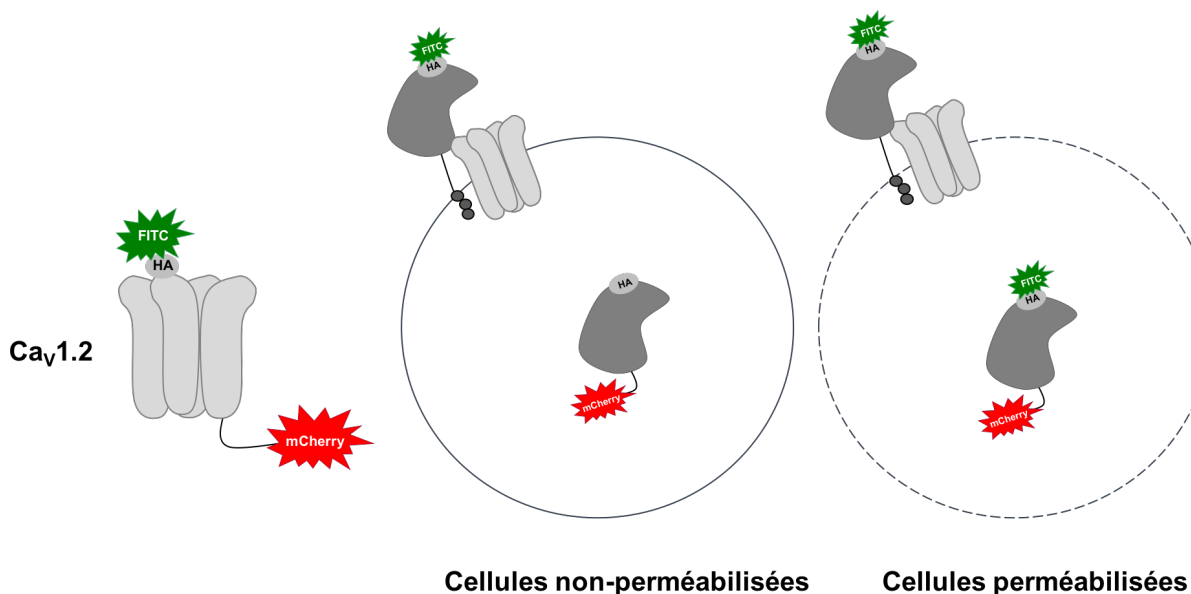


Figure 29. **Représentation schématique de la détection des fluorophores sur la protéine Cav1.2.** Cav1.2 contient une étiquette HA sur la boucle S5S6 du domaine II et une étiquette mCherry du côté C-terminal. En cellules non-perméabilisées, l'anticorps anti-HA couplé FITC est accessible seulement aux protéines Cav1.2 présentes à la membrane alors qu'en cellules perméabilisées, l'anticorps anti-HA couplé aux FITC a accès aux protéines intracellulaires et toutes les protéines Cav1.2 sont détectées.

## 2.8.2 Quantification des données de cytométrie

Les données de cytométrie en flux ont été traitées avec le logiciel FlowJo version 10 (*TreeStar, Ashland, OR*). Les caractéristiques des 10000 cellules analysées ont été classées selon leurs granulosités et leurs tailles tel que représentées dans le nuage de point à deux dimensions (**Figure 30A**).

Manuellement, les cellules viables sont sélectionnées (P1) pour la suite de l'analyse excluant les cellules mortes, les agrégats et les débris cellulaires. Un tracé de densité à deux dimensions est alors généré et montre le signal de fluorescence mCherry en fonction du signal de fluorescence FITC (**Figure 30B**). Les cellules négatives pour les 2 fluorophores se retrouvent dans le panel Q1 (auto fluorescence de la cellule), les cellules positives pour le signal mCherry se retrouvent dans le panel Q2 tandis que les cellules positives pour mCherry et FITC sont dans le panel Q4.

Pour l'analyse statistiques, un histogramme montrant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence pour chaque fluorophore (mCherry ou FITC) est construit (**Figure 30C**). A partir de cet histogramme, la délimitation du pic pour les cellules positives et négatives est positionnée manuellement en se basant sur les valeurs obtenues sur le tracé de densité. L'intensité de fluorescence médiane relative ( $\Delta\text{MedFI}$ ) pour chaque fluorophore est calculée en soustrayant l'intensité de fluorescence des cellules négatives (Q1) à l'intensité de fluorescence des cellules positives (Q2+Q4 ou Q3+Q4). La valeur médiane est utilisée au détriment de la valeur moyenne car lorsque les pics ne sont pas symétriques, cette valeur est plus précise. La valeur de  $\Delta\text{MedFI}$  pour les mutants est normalisée par rapport à la valeur maximale de  $\Delta\text{MedFI}$  obtenue pour le WT sur une même journée dans les mêmes conditions expérimentales. Dans les cellules non perméabilisées, le  $\Delta\text{MedFI}$  pour le fluorophore FITC renseigne sur la quantité relative de protéine possédant l'épitope HA à la surface membranaire. En cellules perméabilisées, cette valeur donne des informations sur l'expression totale des protéines ayant l'épitope HA.

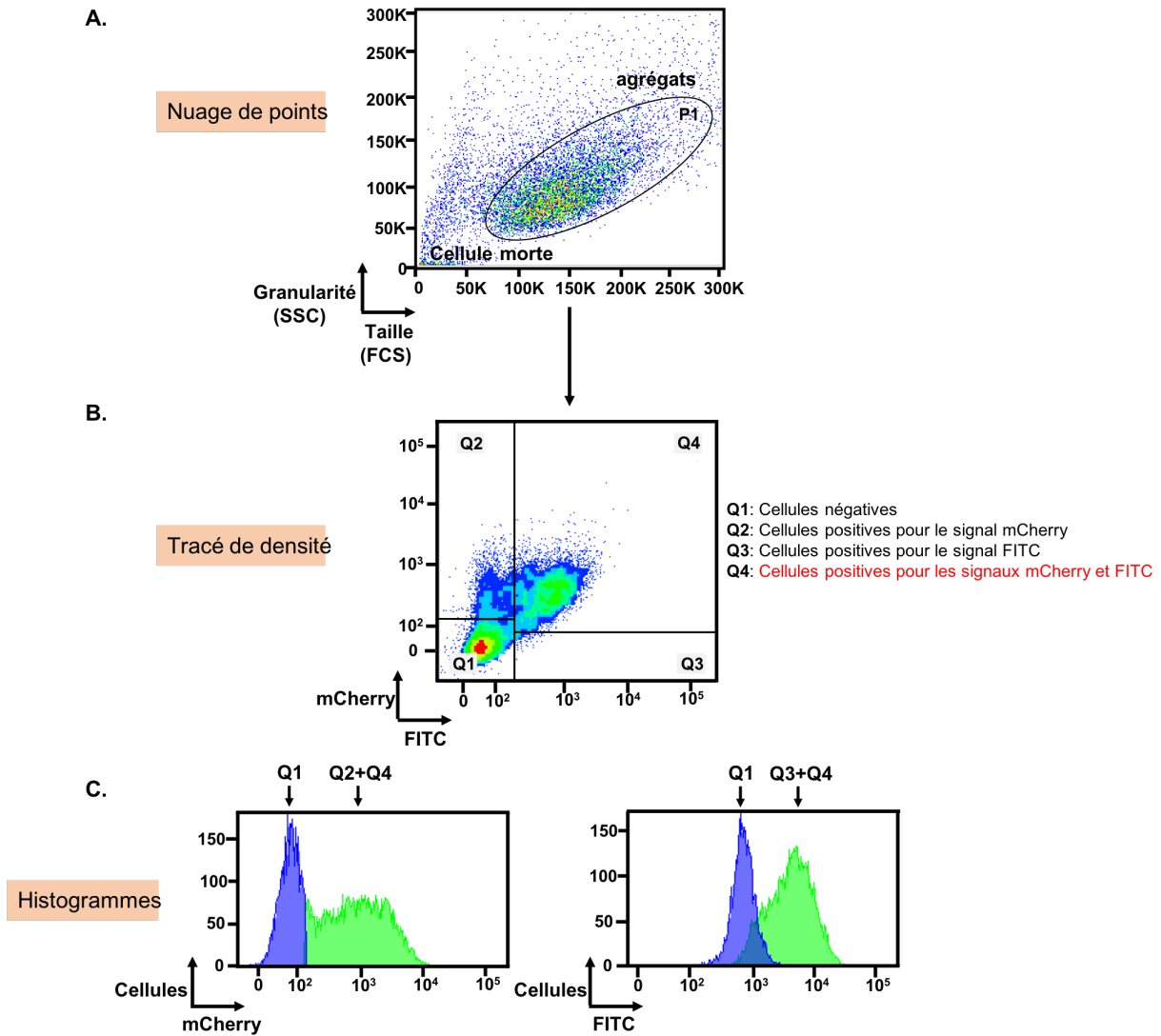


Figure 30. **Analyse des données de cytométrie en flux.** **A.** Le premier niveau d'analyse fournit un spectre qui montre la granulosité des cellules en fonction de leurs tailles. Les cellules vivantes sont sélectionnées (P1) pour la suite de l'analyse. **B.** Un tracé de densité à deux dimensions montre l'intensité de fluorescence de mCherry en fonction du FITC. **C.** Le nombre de cellules en fonction de l'intensité du signal pour chaque fluorophore est illustré par un histogramme et permet le calcul de l'intensité de fluorescence médiane relative pour le mCherry et le FITC (Image inspiré de l'article (Bourdin et al., 2016)).

# **Chapitre 3 - Organisation spatiale du canal calcique de type-L : donnée structurale sur la sous-unité auxiliaire Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1**

## **Three-dimensional architecture of the L-type calcium channel: Structural insights into the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 auxiliary protein**

**Julie Briot<sup>a,b,d</sup>, Nazzareno D'Avanzo<sup>a,b</sup>, Jurgen Sygusch<sup>b,c</sup>, and Lucie Parent<sup>a,b,d</sup>\***

a. Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Faculté de Médecine; b. Groupe d'étude des Protéines membranaires; c. Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada; d. Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada

\* To whom correspondence should be addressed: Lucie Parent, Département de Physiologie Moléculaire et Intégrative, Université de Montréal, Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada; Tel: 514-343-6673; E-mail: [lucie.parent@umontreal.ca](mailto:lucie.parent@umontreal.ca)

Cet article a été publié dans: Biochemistry and Molecular Biology Journal (Biochem Mol Biol J. 2016, 2:3, DOI: 10.21767/2471-8084.100025)

## **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

J.B. : Participation au design de l'expérience, préparation des échantillons (expression et purification du Cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1), acquisition et analyse des données SAXS, interprétation des résultats et rédaction de l'article

N.D.A. : Supervision de la purification de la protéine et discussion

J.S. : Supervision de l'analyse des données SAXS et discussion

L.P. : Élaboration et coordination de l'étude, interprétation des résultats et rédaction de l'article

## ABSTRACT

L-type calcium channels (LTCC) are responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  influx into muscle and neurons. These macromolecular complexes minimally comprise the main pore-forming  $\text{Cav}\alpha 1$  and auxiliary subunits  $\text{Cav}\beta$  and  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$ . The ultrastructure of the oligomeric LTCC complexes from heart and skeletal muscle has been reported previously at  $\approx 20 \text{ \AA}$ , a resolution that prevent identification of structural domains. Recent improvements in cryo-electronic microscopy (EM) methods made it possible to obtain a three-dimensional structure of the rabbit skeletal muscle LTCC  $\text{Cav}1.1$  complex at a resolution of  $4.2 \text{ \AA}$  and recently at  $3.6 \text{ \AA}$ . This technique requires only nanograms of purified proteins and circumvents crystallization as a means for structure determination. The high resolution cryo-EM structure shows the molecular architecture of the subunits comprising the oligomeric complex and for the first time, a high-resolution glance of the largely extracellular  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  protein with its extracellular domains (Cache1, VWA, and Cache2). Although the  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  protein is a single-pass transmembrane protein, the complex topology of its extracellular domain represents a technical challenge for structure determination using conventional purification approaches. Herein we show the merits of a strategy based upon the purification of small structural domains that can be elucidated individually before these domains are reassembled into the quaternary structure. A structural model was derived using ab initio structure prediction constrained by small angle X-ray scattering profile of the refolded Cache2 domain. The excellent agreement between the predicted structure and the available cryo-EM structure suggests a novel and rapid procedure to discover structural information of protein domains.

**KEYWORDS:** L-type calcium channel, complexes architecture,  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  subunit, electro-microscopy, small angle X-ray scattering, template-base modeling

**ABBREVIATIONS:** Cryo-EM: Cryo-electron microscopy, 3-D: three dimensional, PDB: protein data bank, SAXS: small angle X-ray scattering, LTCC: L-type calcium channel

## INTRODUCTION

L-type calcium channels (LTCC) form a large family of structurally related channels expression in skeletal muscle (Cav1.1), working myocardium (Cav1.2), neuroendocrine cells (Cav1.3), and the retina (Cav1.4). In cardiac cells, calcium ions entering into the cell through Cav1.2 channels during the plateau phase of the action potential are essential to initiate the excitation-contraction coupling (Catterall, 2011; Shaw & Colecraft, 2013). Together with voltage-gated sodium and potassium channels, Cav1.2 contributes to the heart rhythm and its activity can be derived from the measure of the QT interval on the electro cardiogram (Moss & Kass, 2005). Gain-of-function and loss-of-function genetic mutations of sodium and potassium channels have been associated with many forms of cardiac arrhythmias (Napolitano & Antzelevitch, 2011). To a smaller extent, mutations in the genes encoding for Cav1.2 channels have been associated with Timothy, Brugada, and early after depolarization syndromes (Bourdin et al., 2015; Burashnikov et al., 2010; Raybaud et al., 2006). Some of these cardiac dysfunctions are characterized by an increase in the QT interval, whereas others are manifested by a shorter QT interval and an elevated ST segment (Fukuyama et al., 2013; Napolitano & Antzelevitch, 2011).

In cardiomyocytes, Cav1.2 is an oligomer consisting of a main pore-forming Cav $\alpha$ 1 ( $\approx$  250 kDa) and additional auxiliary subunits: Cav $\beta$ 2 ( $\approx$  55 kDa) and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 ( $\approx$  150 kDa). The Cav $\alpha$ 1 subunit confers the biophysical and pharmacological properties of the channel and is the molecular target of the class IV antiarrhythmic drugs, among which dihydropyridine, verapamil, and diltiazem compounds are most widely used. This subunit is essential and targeted disruption of Cav $\alpha$ 1 is embryonically lethal in mice (Rosati et al., 2011). The intracellular Cav $\beta$  promotes cell surface trafficking of Cav1.2 through a nanomolecular interaction between the guanylate kinase domain of Cav $\beta$  and the hydrophobic residues of the  $\alpha$ -helix formed in the cytoplasmic loop of the Cav $\alpha$ 1 subunit of Cav1.2 (Bourdin et al., 2010). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 increases peak current density and stabilizes the channel open state (Bourdin et al., 2015; Fuller-Bicer et al., 2009). All three subunits are required to reproduce the biophysical properties of the native channel. Over the last 15 years, structural studies have revealed the high affinity interaction between Cav $\beta$  and Cav $\alpha$ 1 as well as the Ca<sup>2+</sup>/calmoduline- Cav $\alpha$ 1 association by X-ray crystallography (Y. H. Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van

Petegem et al., 2005b; F. Van Petegem, K. A. Clark, F. C. Chatelain, & D. L. Minor, Jr., 2004b). By contrast, there is little structural information on Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. The reason can be found in the complexity of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein topology that results from multiple co- and post-translational modifications including the addition of N-glycans at 16 Asn sites that is required for the folding and stability of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Tetreault et al., 2016; J. Wu et al., 2015). Furthermore, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is encoded by a single gene and is post-translationally cleaved into the large extracellular Cav $\alpha$ 2 and the putative transmembrane Cav $\delta$  proteins bound by disulfide bridges (Davies et al., 2010; Dolphin, 2013; Douglas, Davies, Wratten, & Dolphin, 2006). In fact, the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein includes 20 cysteine residues and it has been proposed that intramolecular disulfide bonds are required to stabilize its higher order structure (Klugbauer, Marais, & Hofmann, 2003). These features represent significant hurdles for expressing and purifying the protein complex in bacterial systems and account for the limited structural information on eukaryotic LTCC channels.

### **Three-dimensional structure of the mammalian Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins**

Structural data on the pore-forming subunit Cav $\alpha$ 1 has been mostly inferred from the high-resolution crystal structures ( $\approx 2.7 - 3.1 \text{ \AA}$ ) of bacterial homologs of voltage-gated sodium channels and a modified variant referred to as Ca<sup>2+</sup>-selective CavAb channels (Catterall & Swanson, 2015; Payandeh, Scheuer, Zheng, & Catterall, 2011; Tang et al., 2014). Unlike their mammalian homologues, the bacterial channels form symmetrical channels with 4 identical subunits forming the pore region and appear to be functional without specific auxiliary subunits. Low-resolution electron microscopic (EM) models of the LTCC complex purified from skeletal muscle at a concentration of 90-140  $\mu\text{g}$  LTCC complex for 400 g of skeletal muscle were first solved at 27  $\text{\AA}$  in 2004 (M. C. Wang et al., 2004). The relatively low resolution provided a general outline of the protein complex and confirmed that Cav $\alpha$ 2 was mostly extracellular. More recently improvements in the electron detection and image processing algorithms made it possible to reconstruct the three-dimensional structure of the endogenous Cav1.1 channel complex from rabbit skeletal muscle membranes (J. Wu et al., 2015) without the need to obtain crystals. Instead of photoaffinity-labeling the protein complex with radioactive dihydropyridine receptor ligands (Sharp, Imagawa, Leung, & Campbell, 1987), the authors chose the brilliant strategy to overexpress the cytosolic Cav $\beta$ 1a



subunit as a fusion protein in a bacterial system and use it as a bait to pull down with nanomolar affinity the entire LTCC complex (J. Wu et al., 2016b; J. Wu et al., 2015). Aliquots (4  $\mu$ l) of the digitonin-purified Cav1.1 complex at 0.1 mg/ml were examined by cryo-EM and more than  $10^6$  particles were selected for further analysis. A three-dimensional structure of the LTCC complex with dimension of 170 x 100  $\text{\AA}$  was obtained at 4.2  $\text{\AA}$  (J. Wu et al., 2015) and then at 3.6  $\text{\AA}$  in the presence of 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (J. Wu et al., 2016b). The electron density map revealed the position of the three subunits (Cav $\beta$ 1a, Cav $\gamma$ 1 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1) in relation to the pore-forming Cav $\alpha$ 1 subunit of the Cav1.1 complex. In particular, the 3-D structure demonstrates for the first time the position of the transmembrane Cav $\alpha$ 1 protein, which is the major isoform expressed in the skeletal muscle (Jay et al., 1990a). More importantly, the authors provide the first description of the extracellular structural domains within Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and their position relative to Cav $\alpha$ 1.

A BLASTP search conducted with the “conserved domain” tool in NCBI (Marchler-Bauer et al., 2015b) revealed four structural domains in the extracellular region of the rabbit (NP\_001075745.1) and the rat (NP\_037051.2) Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins: i.e., VWA-N, VWA, Cache2, and VGCC, the latter being included in the Cache2 domain identified in the cryo-EM structure of the rabbit Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (**Fig. 1**). The VWA domain, believed to be the molecular target of anti-epileptic drugs of the gabapentin family (Brown, Dissanayake, Briggs, Milic, & Gee, 1998) appears to be positioned just above the voltage sensor of the Cav $\alpha$ 1 subunit suggesting that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 could modulate the channel function by stabilizing the channel voltage sensor domain (Savalli et al., 2016). There was however insufficient electron density to support amino acid assignment for the region between amino acids 627 to 950 within the unstructured C-terminal domain of Cav $\alpha$ 2 as well as for the Cav $\delta$  transmembrane domain between 1065 and 1106 in the first structure at 4.2  $\text{\AA}$ . Unfortunately, this relatively low resolution precluded assignment of the side chains even in regions where the backbone has been solved confidently such as in the N-terminal of Cav $\alpha$ 2 (between 40 and 77 and between 112 and 178).

The Cache domains face the extracellular environment and projects approximately 60  $\text{\AA}$  away from the membrane where it could anchor an extracellular networking hub for LTCC.

Structural information could help identify crucial partners for protein trafficking and/or function (Minor & Findeisen, 2010). Few mammalian homologs of the Cache2 domain are known. The primary sequence of the rat Cache2 domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 share 24% and 34% identity in their primary sequences with the sensor domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase KinD (NP\_389249.1) and the Cache domain of the methyl-accepting chemotaxis protein from *Methanosarcina mazei* (GI:295789445) respectively according to the local alignment search tool (blast) from the PDB database (Marchler-Bauer et al., 2015a). This relatively low homology and the small number of templates highlight the challenges of elucidating the three-dimensional structure of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein. The latter might prove to be a slightly superior template because the Cache domain of methyl-accepting chemotaxis protein possesses the same number of residues as the Cache2 domain of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein thus introducing no gap in the alignment. This contrasts with a gap of 11 residues with the former protein which accounts in part for the lower sequence identity. The online server I-TASSER (Roy, Kucukural, & Zhang, 2010; J. Y. Yang et al., 2015; Y. Zhang, 2008) nonetheless confirmed these two proteins as the most appropriate templates for Cache2 domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 suggesting that these proteins may share similar folding patterns.

The structural complexity of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (disulfide bonds, multiple glycosylation sites, and one transmembrane domain) makes purification of the whole protein in a bacterial system quite challenging. To bypass these limitations, we implemented the "Divide and Conquer" approach (Gaudet, 2009) whereby the Cache2 domain, one of the basic building units of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Song, Espinoza-Fuenzalida, Etheridge, Jones, & Fitzgerald, 2015), was cloned into a bacterial expression vector and purified for structure determination.

### **SAXS structure of the Cache2 domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1**

The primary sequence of the rat Cache2 domains (between residues 446 and 636) display 93% identity with the rabbit isoform (between residues 448 and 651) (**Fig. 1**). However, the rabbit Cache2 domain in the cryo-EM structure includes residues numbered 76 to 91 that are absent in our protein (Song et al., 2015). We overexpressed the Cache2 protein (rat residues 446-636) as a 25-kDa (HIS)<sub>6</sub>-tagged protein in *E. coli* BL21(DE3)pLYS. The protein was purified using a three-step purification procedure including affinity, DEAE and

size exclusion chromatography. Most of the expressed protein found in inclusion bodies, was solubilized using 8 M urea and purified under denaturing conditions by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) using a nickel resin followed by diethylaminoethanol anion-exchange chromatography. Refolding was achieved by removing urea by overnight dialysis at 4°C in the presence of 0.5 M of L-arginine, a stabilizing agent (Baynes, Wang, & Trout, 2005) and 1 mM DTT (Tsumoto et al., 2004). The Cache2 protein eluted as a single symmetric peak at 15.9 ml thus having an apparent molecular weight of 21 kDa according to our gel filtration calibrations. This validated the monomeric state of the purified Cache2 protein. The secondary structure of the purified domain contained 8% alpha helix and 41% beta strands. The protein was stable at 4°C at a pH of 7.4 for up to 2 weeks although N-glycosylation of eukaryotic proteins is generally not adequately performed in bacteria (Nothaft & Szymanski, 2010).

Structural characterization of the rat Cache2 protein was carried out using SAXS (small angle X-ray scattering) to assess the authenticity of the structure of the refolded protein. SAXS is a powerful method that provides structural information of proteins in solution (Petoukhov & Svergun, 2015a), and requires small volumes (20-50 µl) of sample at relatively low protein concentration (0.1-1 mg/ml). SAXS provides information as to the folded/unfolded state of a protein, its aggregation, flexible domains, oligomeric state, shape and limited conformational data without any mass limitation (Hura et al., 2009). When combined with biochemical knowledge and/or known atomic structures of component domains, SAXS provides an overall solution structure using flexible linkers to connect the structural domains (C. D. Putnam, Hammel, Hura, & Tainer, 2007) thus delivering a first approximation of the molecular shape, protein assembly and structural dynamics of biological macromolecules in their native state (Baldon, Laliberte, & Liu, 2015; C. D. Putnam et al., 2007; D. K. Putnam, Lowe, & Meiler, 2013). The program SAXSTER (dos Reis, Aparicio, & Zhang, 2011), an on-line service of the I-TASSER server, was used to build an *ab initio* model structure using the amino acid sequence of the rat Cache2 domain and was combined with the SAXS data as a constraint. The resulting model was then assessed against the coordinates of the Cache2 domain identified in the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 EM structure. SAXS data were collected on the refolded rat Cache2 protein at protein concentrations of 3.2, 1.6, 0.8 and 0.4 mg/ml (**Fig. 2**).

The data collected at 3.2 mg /ml showed evidence of protein-protein interactions at very small angles and were thus excluded from further analysis. The Guinier plots ( $\ln I(q)$  versus  $q^2$ ) were linear for the remaining concentrations at very small scattering angle ( $q * R_g < 1.3$ ) indicative of sample monodispersity. The *ab initio* molecular envelopes of the rat Cache2 protein were reconstructed and averaged in DAMMIN (D. I. Svergun, 1999). The resulting envelope was bean-shaped and slightly asymmetrical (**Fig. 2**) with dimensions of  $71 \times 51 \times 20$  Å corresponding to the  $D_{max}$  of 70 Å obtained from the pair distance probability plot (Konarev, Volkov, Sokolova, Koch, & Svergun, 2003). The atomic coordinates of the rabbit Cache2 domain (rabbit amino acids from 448 to 651) were superimposed onto the experimental envelope using SUPCOMB program. CRY SOL was then used to calculate the solution scattering of the atomic structure of the rabbit Cache2 which was then used to fit our experimental SAXS data (D. Svergun, Barberato, & Koch, 1995). The discrepancy was evaluated with a chi-square value of 1.14 (**Fig. 3A**). The analysis was performed using a Cache2 model from SAXSTER and when superimposed onto the experimental envelope, an improved chi-square value of 1.05 as illustrated by comparing panels A and B in **Fig. 3**

The refolded rat structure is shown to superimpose well with the rabbit EM with a Root Mean Square Deviation for C-alpha carbons = 1.73 Å (**Fig. 4**). In particular, the structured N-terminal  $\beta$ -strands 1 and 2 as well as the  $\alpha$ -helix 1 and 2 located downstream display the best fits. The “cores” of the rabbit Cache2 and the rat Cache2 proteins are identical. Structural differences occur in the intervening loop between the amino acids 532 and 551 of the rabbit Cache2 and the rat Cache2 proteins presumably due to differences in the primary sequence between the two isoforms and due to seven additional amino acids in the primary sequence of the rat Cache2 a C-terminus a TEV cleavage site, and 6 histidine residues. The SAXS envelope from the rat Cache2 refolded protein was also well fitted by the molecular coordinates of the KinD/methyl-accepting chemotaxis protein and consistent with an ambiguous score of 2.3 obtained when performing the AMBIMETER calculation (Petoukhov & Svergun, 2015b).

## CONCLUSION

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is an integrin-like protein that belongs to the LTCC complex. It promotes LTCC activation and as a result it enhances heart contractility (Fuller-Bicer et al., 2009).

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 undergoes many co- and post-translational modifications that create a sizable challenge for its purification. In this short commentary, we have shown that the Cache2 domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 can be purified and refolded from bacterial cultures at a yield of 2 mg per liter. SAXS data measured for the refolded protein enabled an *ab initio* prediction of a model structural whose fold was identical to the native state. The refolded Cache2 protein conserved the overall folding of the Cache2 protein purified from rabbit skeletal muscle, even though Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 exists mostly as a large extracellular domain loosely organized around multiple  $\beta$ -sheets (Upadhyay et al., 2016). Altogether, this validates an experimental strategy based upon the purification of isolated domains of LTCC subunits in a bacterial system and paves the way for implementing a “building block” approach in studying the structural biology of complex membrane proteins.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Christian Baron, from the Department de “Biochimie et Médecine Moléculaire”, and in particular Bastien Casu, Ph.D. student. This work was supported by a “Discovery” grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to LP.

## REFERENCES

- [1] W.A. Catterall, Voltage-gated calcium channels. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3 (2011) a003947.
- [2] R.M. Shaw, H.M. Colecraft, L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. Cardiovascular research 98 (2013) 177-186.
- [3] A.J. Moss, R.S. Kass, Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. The Journal of clinical investigation 115 (2005) 2018-2024.
- [4] C. Napolitano, C. Antzelevitch, Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. Circulation research 108 (2011) 607-618.
- [5] E. Burashnikov, R. Pfeiffer, H. Barajas-Martinez, E. Delpon, D. Hu, M. Desai, M. Borggrefe, M. Haissaguerre, R. Kanter, G.D. Pollevick, A. Guerchicoff, R. Laino, M.

Marieb, K. Nademanee, G.B. Nam, R. Robles, R. Schimpf, D.D. Stapleton, S. Viskin, S. Winters, C. Wolpert, S. Zimmern, C. Veltmann, C. Antzelevitch, Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society* 7 (2010) 1872-1882.

[6] B. Bourdin, B. Shakeri, M.P. Tetreault, R. Sauve, S. Lesage, L. Parent, Functional characterization of CaV $\alpha$ 2 $\delta$  mutations associated with sudden cardiac death. *The Journal of biological chemistry* 290 (2015) 2854-2869.

[7] A. Raybaud, Y. Dodier, P. Bissonnette, M. Simoes, D.G. Bichet, R. Sauve, L. Parent, The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *The Journal of biological chemistry* 281 (2006) 39424-39436.

[8] M. Fukuyama, S. Ohno, Q. Wang, H. Kimura, T. Makiyama, H. Itoh, M. Ito, M. Horie, L-type calcium channel mutations in Japanese patients with inherited arrhythmias. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* 77 (2013) 1799-1806.

[9] B. Rosati, Q. Yan, M.S. Lee, S.R. Liou, B. Ingalls, J. Foell, T.J. Kamp, D. McKinnon, Robust L-type calcium current expression following heterozygous knockout of the Cav1.2 gene in adult mouse heart. *The Journal of physiology* 589 (2011) 3275-3288.

[10] B. Bourdin, F. Marger, S. Wall-Lacelle, T. Schneider, H. Klein, R. Sauve, L. Parent, Molecular determinants of the CaV $\beta$ -induced plasma membrane targeting of the CaV1.2 channel. *The Journal of biological chemistry* 285 (2010) 22853-22863.

[11] G.A. Fuller-Bicer, G. Varadi, S.E. Koch, M. Ishii, I. Bodi, N. Kadeer, J.N. Muth, G. Mikala, N.N. Petrashevskaya, M.A. Jordan, S.P. Zhang, N. Qin, C.M. Flores, I. Isaacsohn, M. Varadi, Y. Mori, W.K. Jones, A. Schwartz, Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha$ 2/ $\delta$ -1-subunit. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 297 (2009) H117-124.

[12] F. Van Petegem, K.A. Clark, F.C. Chatelain, D.L. Minor, Jr., Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel  $\beta$ -subunit and an  $\alpha$ -subunit domain. *Nature* 429 (2004) 671-675.

- [13] F. Van Petegem, F.C. Chatelain, D.L. Minor, Jr., Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. *Nature structural & molecular biology* 12 (2005) 1108-1115.
- [14] Y.H. Chen, M.H. Li, Y. Zhang, L.L. He, Y. Yamada, A. Fitzmaurice, Y. Shen, H. Zhang, L. Tong, J. Yang, Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 429 (2004) 675-680.
- [15] Y. Opatowsky, C.C. Chen, K.P. Campbell, J.A. Hirsch, Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron* 42 (2004) 387-399.
- [16] M.P. Tetreault, B. Bourdin, J. Briot, E. Segura, S. Lesage, C. Fiset, L. Parent, Identification of Glycosylation Sites Essential for Surface Expression of the CaValpha2delta1 Subunit and Modulation of the Cardiac CaV1.2 Channel Activity. *The Journal of biological chemistry* 291 (2016) 4826-4843.
- [17] J. Wu, Z. Yan, Z. Li, C. Yan, S. Lu, M. Dong, N. Yan, Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* 350 (2015) aad2395.
- [18] A.C. Dolphin, The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et biophysica acta* 1828 (2013) 1541-1549.
- [19] L. Douglas, A. Davies, J. Wratten, A.C. Dolphin, Do voltage-gated calcium channel alpha2delta subunits require proteolytic processing into alpha2 and delta to be functional? *Biochemical Society transactions* 34 (2006) 894-898.
- [20] A. Davies, I. Kadurin, A. Alvarez-Laviada, L. Douglas, M. Nieto-Rostro, C.S. Bauer, W.S. Pratt, A.C. Dolphin, The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010) 1654-1659.
- [21] N. Klugbauer, E. Marais, F. Hofmann, Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 35 (2003) 639-647.

- [22] W.A. Catterall, T.M. Swanson, Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Molecular pharmacology* 88 (2015) 141-150.
- [23] J. Payandeh, T. Scheuer, N. Zheng, W.A. Catterall, The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475 (2011) 353-358.
- [24] L. Tang, T.M. Gamal El-Din, J. Payandeh, G.Q. Martinez, T.M. Heard, T. Scheuer, N. Zheng, W.A. Catterall, Structural basis for Ca<sup>2+</sup> selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature* 505 (2014) 56-61.
- [25] M.C. Wang, R.F. Collins, R.C. Ford, N.S. Berrow, A.C. Dolphin, A. Kitmitto, The three-dimensional structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel: comparison with the skeletal muscle form reveals a common architectural motif. *The Journal of biological chemistry* 279 (2004) 7159-7168.
- [26] A.H. Sharp, T. Imagawa, A.T. Leung, K.P. Campbell, Identification and characterization of the dihydropyridine-binding subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *The Journal of biological chemistry* 262 (1987) 12309-12315.
- [27] J. Wu, Z. Yan, Z. Li, X. Qian, S. Lu, M. Dong, Q. Zhou, N. Yan, Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* (2016) doi:10.1038/nature19321.
- [28] S.D. Jay, S.B. Ellis, A.F. McCue, M.E. Williams, T.S. Vedvick, M.M. Harpold, K.P. Campbell, Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248 (1990) 490-492.
- [29] A. Marchler-Bauer, M.K. Derbyshire, N.R. Gonzales, S.N. Lu, F. Chitsaz, L.Y. Geer, R.C. Geer, J. He, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, C.J. Lanczycki, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, Z.X. Wang, R.A. Yamashita, D.C. Zhang, C.J. Zheng, S.H. Bryant, Cdd: Ncbi's Conserved Domain Database. *Nucleic acids research* 43 (2015) D222-D226.
- [30] J.P. Brown, V.U. Dissanayake, A.R. Briggs, M.R. Milic, N.S. Gee, Isolation of the [3H]gabapentin-binding protein/alpha 2 delta Ca<sup>2+</sup> channel subunit from porcine brain: development of a radioligand binding assay for alpha 2 delta subunits using [3H]leucine. *Analytical biochemistry* 255 (1998) 236-243.



- [31] N. Savalli, A. Pantazis, D. Sigg, J.N. Weiss, A. Neely, R. Olcese, The  $\alpha 2\delta$ -1 subunit remodels CaV1.2 voltage sensors and allows Ca<sup>2+</sup> influx at physiological membrane potentials. *The Journal of general physiology* 148 (2016) 147-159.
- [32] D.L. Minor, Jr., F. Findeisen, Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (CaV) function and modulation. *Channels* 4 (2010) 459-474.
- [33] A. Marchler-Bauer, M.K. Derbyshire, N.R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L.Y. Geer, R.C. Geer, J. He, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, C.J. Lanczycki, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R.A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, S.H. Bryant, CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research* 43 (2015) D222-226.
- [34] J.Y. Yang, R.X. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods* 12 (2015) 7-8.
- [35] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* 5 (2010) 725-738.
- [36] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* 9 (2008) 40.
- [37] R. Gaudet, Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments. *The Journal of general physiology* 133 (2009) 231-237.
- [38] L. Song, I.A. Espinoza-Fuenzalida, S. Etheridge, O.T. Jones, E.M. Fitzgerald, The R-Domain: Identification of an N-terminal Region of the  $\alpha 2\delta$ -1 Subunit Which is Necessary and Sufficient for its Effects on Cav2.2 Calcium Currents. *Current molecular pharmacology* 8 (2015) 169-179.
- [39] B.M. Baynes, D.I. Wang, B.L. Trout, Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* 44 (2005) 4919-4925.
- [40] K. Tsumoto, M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima, J.S. Philo, T. Arakawa, Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnology progress* 20 (2004) 1301-1308.
- [41] H. Nothaft, C.M. Szymanski, Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nature reviews Microbiology* 8 (2010) 765-778.

[42] M.V. Petoukhov, D.I. Svergun, Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 71 (2015) 1051-1058.

[43] G.L. Hura, A.L. Menon, M. Hammel, R.P. Rambo, F.L. Poole, 2nd, S.E. Tsutakawa, F.E. Jenney, Jr., S. Classen, K.A. Frankel, R.C. Hopkins, S.J. Yang, J.W. Scott, B.D. Dillard, M.W. Adams, J.A. Tainer, Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nature methods* 6 (2009) 606-612.

[44] C.D. Putnam, M. Hammel, G.L. Hura, J.A. Tainer, X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Quarterly reviews of biophysics* 40 (2007) 191-285.

[45] L. Boldon, F. Laliberte, L. Liu, Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano reviews* 6 (2015) 25661.

[46] D.K. Putnam, E.W. Lowe, Jr., J. Meiler, Reconstruction of SAXS Profiles from Protein Structures. *Computational and structural biotechnology journal* 8 (2013) e201308006.

[47] M.A. dos Reis, R. Aparicio, Y. Zhang, Improving Protein Template Recognition by Using Small-Angle X-Ray Scattering Profiles. *Biophysical journal* 101 (2011) 2770-2781.

[48] D.I. Svergun, Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing (vol 76, pg 2879, 1999). *Biophysical journal* 77 (1999) 2896-2896.

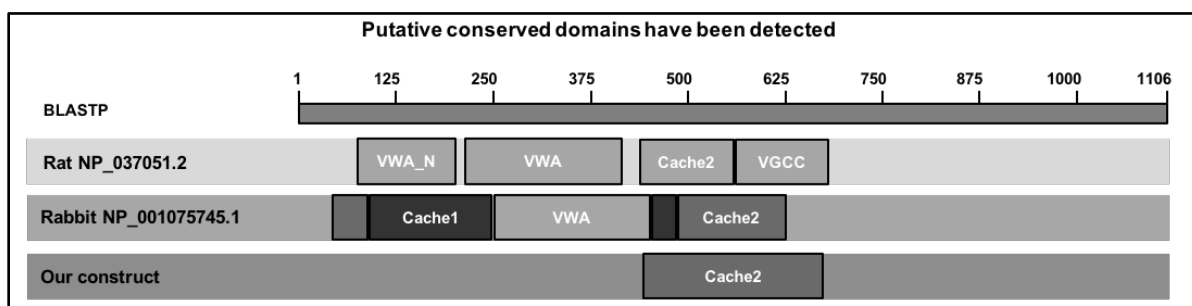
[49] P.V. Konarev, V.V. Volkov, A.V. Sokolova, M.H.J. Koch, D.I. Svergun, PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 36 (2003) 1277-1282.

[50] D. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch, CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr* 28 (1995) 768-773.

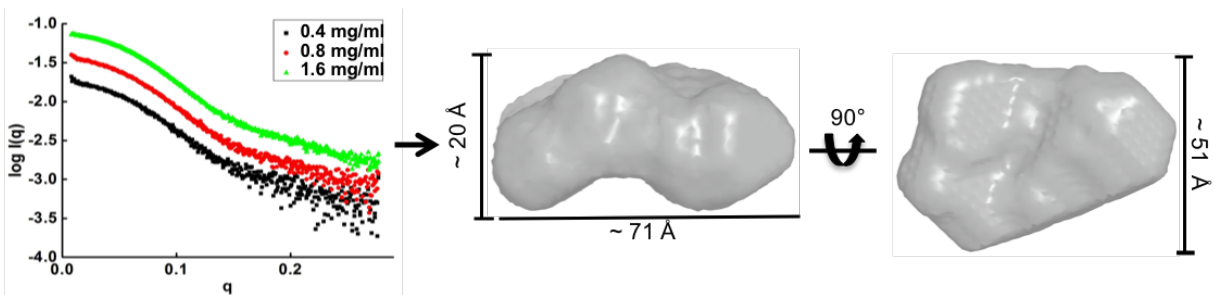
[51] M.V. Petoukhov, D.I. Svergun, Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. *Acta Crystallogr D* 71 (2015) 1051-1058.

[52] A.A. Upadhyay, A.D. Fleetwood, O. Adebali, R.D. Finn, I.B. Zhulin, Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes. *Plos Comput Biol* 12 (2016).

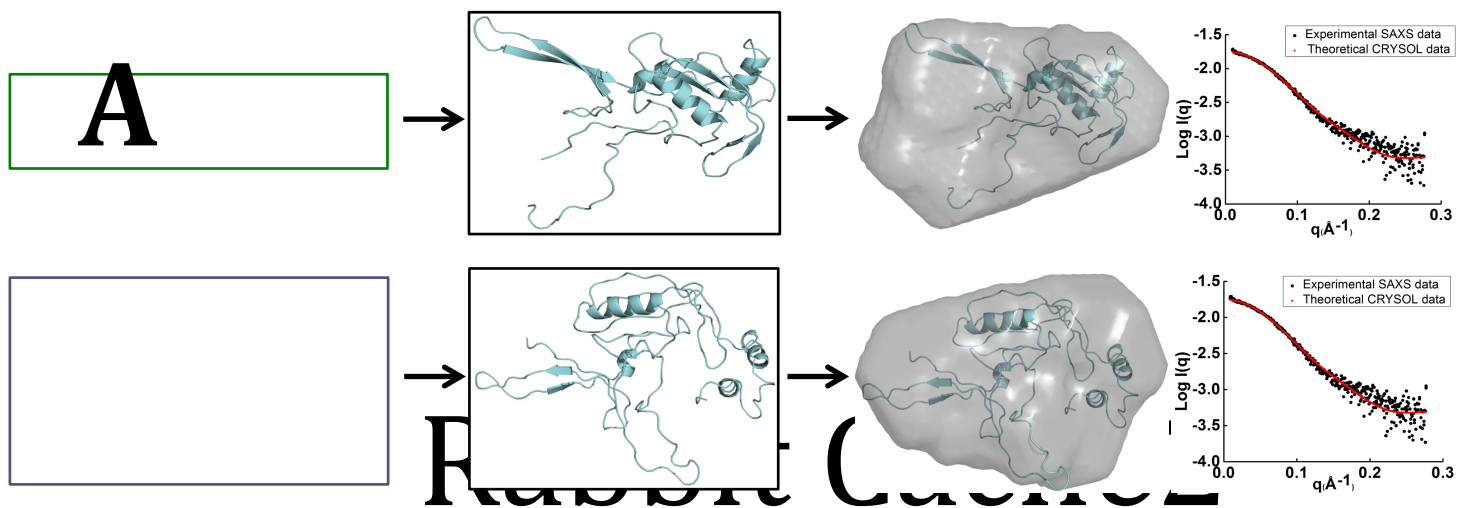
## FIGURES



**Figure 1.** Typical conserved domains of voltage-gated calcium channel  $Cav\alpha2\delta1$  subunit from *Rattus norvegicus* were identified by the NCBI Conserved Domain Search Database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). For the rat  $Cav\alpha2\delta1$  protein, the structural domains and the associated residues are: VWA\_N (104-223), VWA (239-417), Cache2 (446-531), VGCC (543-636). For the rabbit  $Cav\alpha2\delta1$  protein, the structural domains and the associated residues are: Cache1 (92-250; 444-484), VWA (251-443), Cache2 (76-91; 485-626). The overall primary sequence identity between the rat and the rabbit  $Cav\alpha2\delta1$  proteins is 93.3%. Our construct goes from residue 446 to residue 636 and is referred to herein as Cache2.



**Figure 2.** SAXS intensity profile of the rat Cache2 protein obtained for three different concentrations (0.4 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.6 mg/ml). Experimental SAXS data was used to build a low-resolution envelope of Cache2 using DAMMIN. The envelope dimensions are shown below.



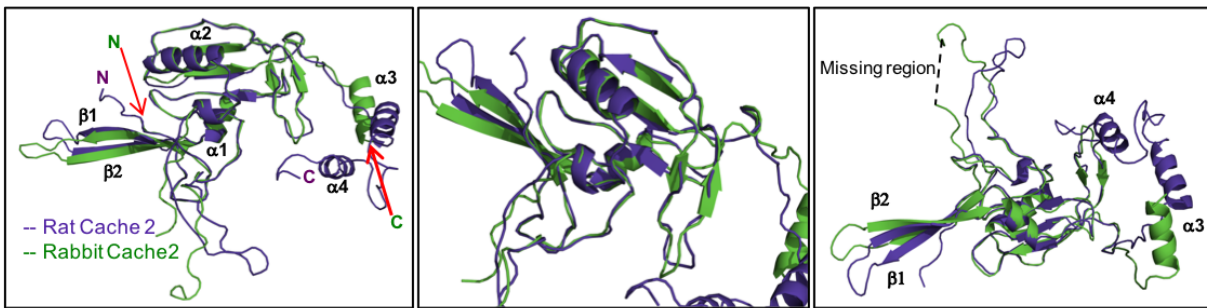
# Cryo-EM structure

**Figure 3.** (A) The Rabbit Cache2 structure obtained from the Cryo-EM structure of the voltage-gated calcium channel (pdb code: 3JBR\_F) was superimposed using SUPCOMB program with the experimental Cache2 envelope. As seen, the two curves deviated only slightly with a chi-square of 1.14. (B) The SAXTER Rat Cache2 model was superimposed with the experimental envelope of Cache2. The two curves agree with a chi-square of 1.05.

**B**

Template-based protein-structure prediction of

Rat Cache2 protein



**Figure 4.** The refolded Rat Cache2 model (colored in violet) was superposed with the atomic coordinates of the Rabbit Cache2 domain (colored in green) in PyMOL

# **Chapitre 4 - Les résidus chargés négativement sur la première boucle extracellulaire du canal de type-L Cav1.2 sont responsables de l'interaction avec la sous-unité auxiliaire Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1**

**Negatively charged residues in the first extracellular loop of the L-type Cav1.2 channel anchor the interaction with the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 auxiliary subunit \***

**Benoîte Bourdin<sup>&#</sup>, Julie Briot<sup>§&#</sup>, Marie-Philippe Tétreault<sup>&</sup>, Rémy Sauvé<sup>§</sup>, and Lucie Parent<sup>§&1</sup>**

§ Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine, & Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

# These authors have contributed equally to the manuscript

\*Running title: *Mapping the Cav1.2 - Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 interface*

To whom correspondence should be addressed: Lucie Parent, Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada; Tel: 514-343-6673; E-mail: [lucie.parent@umontreal.ca](mailto:lucie.parent@umontreal.ca)

**Keywords:** Calcium channels, Protein-protein interaction, Co-immunoprecipitation, Three-dimensional structure, Homology modeling, Cell surface expression, Gating, Electrophysiology



Cet article a été publié dans : *Journal of Biological Chemistry (J. Biol. Chem. (2017) 292(42) 17236 –17249. DOI10.1074/jbc.M117.806893)*

### **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

B.B. : Prise des mesures d'électrophysiologie et analyse des données, production des mutants, immunobuvardage

J.B. : Production des modèles par modélisation moléculaire par homologie et réalisation des expériences de co-immunoprécipitation, immunobuvardage

M.P.T. : Acquisition et analyse des données de cytométrie en flux, production des mutants, immunobuvardage

R.S. : Supervision de la modélisation moléculaire, simulations de dynamique moléculaire

L.P. : Élaboration et coordination de l'étude, interprétation des résultats et rédaction de l'article

## ABSTRACT

Voltage-gated L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels in cardiomyocytes exist as heteromeric complexes. Co-expression of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  with  $\text{Ca}_v\beta/\text{Ca}_v\alpha1$  proteins reconstitutes the functional properties of native L-type currents but the interacting domains at the  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  interface are unknown. Here, a homology-based model of  $\text{Ca}_v1.2$  identified protein interfaces between the extracellular domain of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  and the extracellular loops of the  $\text{Ca}_v\alpha1$  protein in repeats I (IS1S2, IS5S6), II (IIS5S6), and III (IIIS5S6). Insertion of a 9-residue hemagglutinin epitope in IS1S2, but not in IS5S6 or in IIS5S6, prevented the co-immunoprecipitation of  $\text{Ca}_v1.2$  and  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . IS1S2 contains a cluster of three conserved negatively charged residues Glu-179, Asp-180, and Asp-181, that could contribute to non-bonded interactions with  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ . Substitutions of  $\text{Ca}_v1.2$  Asp-181 impaired the co-immunoprecipitation of  $\text{Ca}_v\beta/\text{Ca}_v1.2$  with  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  and the  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -dependent shift in voltage-dependent activation gating. In contrast, single substitutions in  $\text{Ca}_v1.2$  in neighboring positions in the same loop (179, 180, 182, 183 and 184) did not significantly alter the functional upregulation of  $\text{Ca}_v1.2$  whole-cell currents. However, a negatively charged residue at position 180 was necessary to convey the  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -mediated shift in the activation gating. We also found a more modest contribution from the positively charged Arg-1119 in the extracellular pore region in repeat III of  $\text{Ca}_v1.2$ . We conclude that  $\text{Ca}_v1.2$  Asp-181 anchors the physical interaction that facilitates the  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$ -mediated functional modulation of  $\text{Ca}_v1.2$  currents. By stabilizing the first extracellular loop of  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  may upregulate currents by promoting conformations of the voltage sensor that are associated with the channel's open state.

## INTRODUCTION

In cardiac cells,  $\text{Ca}^{2+}$  signals control the force necessary for the myocardium to meet the physiological needs of the body (1). The primary pathway for  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the adult heart is via the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel. This  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathway is essential for triggering sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release and is the major source of  $\text{Ca}^{2+}$  load in this organelle (2). Regulation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current has profound physiological significance. Alterations in density or the activation/inactivation gating of L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels have been implicated in hypertrophic signaling (3) and in a variety of cardiovascular diseases such as hypertension (4), atrial fibrillation (5-8), heart failure (9,10), and congenital arrhythmias (11-13).

Cardiac L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channels are heteromultimeric protein complexes formed by the pore-forming  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit bound to the cytoplasmic  $\text{Ca}_v\beta$  auxiliary subunit (14) with nanomolar affinity (15) and to the extracellular  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  subunit (16-20). The  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit is formed by a single polypeptide chain of 24 transmembrane helices grouped into 4 structural homologous repeats (repeats I, II, III, and IV).  $\text{Ca}_v\beta$  promotes the cell surface trafficking of  $\text{Ca}_v1.2$  channels through a single high-affinity binding site anchored on a tryptophan residue located in an intracellular helix linking repeats I and II of  $\text{Ca}_v\alpha1$  (21).

Co-expression of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  with  $\text{Ca}_v\beta$ -bound  $\text{Ca}_v\alpha1$  increases by up to 10-fold the peak current density and promotes the activation of  $\text{Ca}_v1.2$  at physiological voltages (22-27). The molecular determinants responsible for this modulation, and whether it involves a direct or an allosteric interaction, have yet to be identified. The three-dimensional (3D) structure of the homologous skeletal muscle  $\text{Ca}_v1.1$  channel from rabbit, solved by single particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) (20,28) proposes multiple protein interfaces between the two proteins (**Fig 1**). Many clusters of residues within the extracellular Von Willebrand factor A (VWA) and the Cache1 domains of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  could form interactions with extracellular loops from repeats I, II, and III of the  $\text{Ca}_v\alpha1$  subunit of  $\text{Ca}_v1.2$ . In particular, the polar residues Asp-261, Ser-263, Ser-265, Thr-333, and Asp-365 in the rabbit  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  are forming the metal-ion-dependent adhesion site (MIDAS), that are purported to play important roles at the protein interface. These  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  residues are facing residues in the extracellular loop linking the transmembrane helices S1 and S2 in the voltage sensor domain of repeat I (IS1S2) and the extracellular regions in the pore domains of repeats II and III (respectively IIS5S6 and

IIS5S6) suggesting a broader interface than the highly localized Alpha-Interacting Domain AID identified between Cav1.2 and Cav $\beta$  (15,21,29).

In this current work, we sought to identify the “hotspot AID” at the Cav1.2/Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 interface using a combination of protein chemistry, molecular modeling, and functional characterization of channel mutants. Structural alterations in the first extracellular loop in repeat I of Cav1.2, by the insertion of the 9-residue human influenza hemagglutinin (HA = YPYDVPDYA) epitope impaired the upregulation of Cav1.2 currents by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and significantly decreased the co-immunoprecipitation of the two proteins. Single-point mutations of Asp-181 located within a conserved cluster of negatively charged residues (Glu-Asp-Asp or EDD) in the first extracellular loop of Cav1.2 prevented the modulation of whole-cell currents and the co-immunoprecipitation of the two proteins. These data contrast with the modest impact of point mutations in the extracellular loop between the 5<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> transmembrane helices in repeat III of Cav1.2. Altogether, our data are compatible with a model where negatively charged aspartate residues in IS1S2 of Cav1.2 anchor the interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.

## RESULTS

*Mapping the functional interface between Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.* Functional regulation of Cav1.2 by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 requires direct interaction between the two proteins (30). Surface mapping of the 3D structure obtained with the homologous skeletal muscle Cav1.1 suggests that the two proteins share a complex interaction network (**Fig 1**). Four hotspots are readily identifiable. Some residues in the extracellular loops IS1S2, IS5S6, and IIS5S6 of Cav1.1 are located within atomic distance of residues in the VWA structural domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 while residues in IIS5S6 of Cav1.1 are closer to residues in the Cache1 domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. From the close examination of the 3D structure, any or all of these interfaces could be involved in the functional modulation of Ca<sup>2+</sup> currents. Functional modulation of the activation gating and increase in the peak current density could arise from the low- or moderate-affinity binding to require interaction with one or more of these interfaces such that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 could alternatively associate and dissociate from Cav $\beta$ -bound Cav1.2 proteins (31). To determine whether any or all of these extracellular loops confer functional interaction, we evaluated the functional impact of inserting a HA tag from the human influenza virus, in extracellular domains of

Ca<sub>v</sub>1.2. The HA tag was inserted after Ser-182 in IS1S2 (Ca<sub>v</sub>1.2-HA S182), after Glu-331 in IS5S6 (Ca<sub>v</sub>1.2-HA E331), and after Asp-710 in IIS5S6 (Ca<sub>v</sub>1.2-HA D710). All these constructs were translated at the expected molecular mass and expressed at the cell surface as confirmed by a flow cytometry assay (25,27,32) (*results not shown*).

Whole-cell currents were recorded after recombinant expression of HA-tagged Ca<sub>v</sub>1.2 constructs with mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1 wild-type (WT) or alternatively with mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA in stable Ca<sub>v</sub>β3 cells (25,27,32) (**Fig 2A**). In all cases, co-expression of the complete set of subunits yielded high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents. Co-expression of Ca<sub>v</sub>1.2 WT with the mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1 WT construct enhanced whole-cell peak current densities by ≈ 7-10-fold from  $-2.5 \pm 0.5$  pA/pF (n = 25) (mock vector) to  $-15 \pm 2$  pA/pF (n = 23) in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> (*not shown*). Similar peak current densities of  $-18 \pm 1$  pA/pF (n = 243) were observed after co-expression with mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA (**Fig 2B and Table**). The increase in peak current density was associated with a ≈ -20 mV leftward shift in the activation potential of Ca<sub>v</sub>1.2 (25,27) (**Fig 2C**). Co-expression of mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA with Ca<sub>v</sub>1.2-HA (E331) or Ca<sub>v</sub>1.2-HA (D710) yielded similar results with activation and inactivation kinetics not significantly different than recorded for Ca<sub>v</sub>1.2 WT. The results obtained with Ca<sub>v</sub>1.2-HA (D710) were reported before (25). In contrast, introduction of the HA epitope or the bungarotoxin (BTX) epitope “WRYYESSELEPYPD” (33) after Ser182 impaired the stimulation of whole-cell Ca<sub>v</sub>1.2 currents by mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1 WT and mCherry-Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA as well as the hyperpolarizing shift in the activation potential. The patch-clamp data suggest that the modification of the primary sequence in the first extracellular loop IS1S2 in Ca<sub>v</sub>1.2 disrupts the interaction with Ca<sub>v</sub>α2δ1. To evaluate whether the insertion of the HA epitope disturbed the physical interaction between the two proteins, co-immunoprecipitation assays were carried out using c-Myc-tagged Ca<sub>v</sub>β3 on anti-c-Myc-coated beads as bait (30) (**Fig 3**). These assays were carried out with the same quantity of total proteins after solubilization of full-length proteins with the non-ionic detergent digitonin, thus minimizing as much as possible the alterations in the complex network of interactions between the three proteins (20).

The three proteins (Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>α2δ1, and Ca<sub>v</sub>β3) were detected at the expected molecular mass in the total cell lysates (“input lanes”) when either Ca<sub>v</sub>1.2 WT, Ca<sub>v</sub>1.2-HA

(S182), Cav1.2-HA (E331), or Cav1.2-HA (D710) was coexpressed with Cav $\beta$ 3 and mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA (**Fig 3A**). Disruptions of the extracellular loops in Cav1.2 did not impair the strong interaction with Cav $\beta$ 3 and immunoblotting of the proteins bound to the beads revealed robust signals for Cav1.2 even for Cav1.2-HA (S182) (**Fig 3B**). However, the signal for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 that remained hooked onto the heteromeric complex was significantly weaker in the lysates prepared with Cav1.2-HA (Ser182) than with any other Cav1.2 construct even after longer exposure times or after doubling the quantity of proteins loaded onto the anti-c-Myc coated beads (*data not shown*). Cav1.2-HA (S182) was nonetheless clearly present in the flow-through (**Fig 3C**) proteins. Altogether these data indicate that disrupting the first extracellular loop IS1S2 in Cav1.2 prevents the functional interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and suggest that the IS1S2 extracellular loop contains the elements that are important for carrying the physical interaction between the two proteins.

*A cluster of negatively charged residues is conserved in IS1S2 of Cav1.2.* The insertion of a 9-residue epitope after Ser182 in the 17-residues IS1S2 extracellular loop prevented the optimal interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 by directly modifying the interaction site or indirectly from a non-specific alteration of the secondary structure that was propagated to the actual interaction site. To narrow down the residues from Cav1.2 that are potentially interacting with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, we run the bioinformatics tool PDBePISA (34) (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) using the molecular coordinates 5GJV.pdb of the whole Cav1.1 channel complex (69% residues are conserved with Cav1.1 being shorter in the N- and the C-termini). This led to the identification of Glu-76, Asp-78, and Ser-81 in Cav1.1 as likely candidates to form salt bridges with residues in the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. This first level of analysis suggests that the equivalent residues in the IS1S2 loop of Cav1.2 could interact with Gly-262 and Ser-263 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. To refine the structural predictions, a 3D model of the 146-residue region spanning from IS1 to IS4 in the rabbit Cav1.2 was built using the molecular coordinates of Cav1.1 (**Fig 4**). A stretch of four residues 74-Pro-Glu-Asp-Asp-77 in IS1S2 of Cav1.1 is strictly conserved and is equivalent to 178-Pro-Glu-Asp-Asp-181 in Cav1.2. Ser-81 in Cav1.1 corresponds to Ala-184 in Cav1.2. The modeled interface suggests the region 179-Glu-Asp-Asp-181 in IS1S2 of Cav1.2 lies within atomic distance ( $< 5 \text{ \AA}$ ) of many residues in the rat

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. In particular, Cav1.2 Asp-181 arises as the most likely partner for residues Gly-262 and Ser-263 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.

*Cav1.2 Asp-181 in ISIS2 anchors the physical interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.* Because any of the three negatively charged residues could potentially interact with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, co-immunoprecipitation assays were carried out with single Cav1.2 mutants E179A, D180A, and D181A to identify the role of each amino-acid (**Fig 5 A-C**). Again all three proteins were detected at the expected molecular mass in the input lanes prepared from the total cell lysates. Immunoblotting of the proteins eluted from the c-Myc-coated beads revealed strong signals for Cav1.2 under all conditions even for Cav1.2 D181A. The signal for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was easily detected in the presence of Cav1.2 WT, Cav1.2 E179A, and Cav1.2 D180A. However Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 could only be detected after a 200-s exposure when co-expressed with Cav1.2 D181A. These results were repeated even after doubling the quantity of Cav1.2 D181A protein as the starting material (*results not shown*). The protein interaction appeared thus to be considerably weakened by the mutation in Cav1.2. The properties of the side-chain at position Asp-181 in Cav1.2 were further explored with a conservative substitution with a negatively charged glutamate (109 Å<sup>3</sup>) (35). The latter is expected to cause minimal changes in steric hindrance with the addition of a single -CH<sub>2</sub> group ( $\Delta$  volume  $\approx$  17-18 Å<sup>3</sup>). As seen, all three proteins were detected at the expected molecular mass in the input lanes prepared from the total cell lysates under experimental conditions where Cav1.2 WT, Cav1.2 D180A, Cav1.2 D180E, Cav1.2 D181A, and Cav1.2 D181E were coexpressed with Cav $\beta$ 3 and mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA (**Fig 5D**). Immunoblotting of the proteins bound to the anti- c-Myc-coated beads revealed strong signals for the anti-Cav1.2 under all conditions indicating that all Cav1.2 proteins (WT and mutants) were hooked onto the Cav $\beta$ 3-beads. Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was found to hang onto Cav1.2 WT, Cav1.2 D180A, and Cav1.2 D181E proteins as illustrated with bands of similar intensity detected after 1-s exposure (**Fig 5E**). Again Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 did not bind to the c-Myc-Cav $\beta$ 3-Cav1.2 D181A complex with the same intensity and could only be detected after a 200-s exposure. Note that the interaction between the two proteins was slightly decreased with Cav1.2 D181E despite the conservation of the negative charge, and the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 signal could only be revealed after a 20-s exposure. The unbound fraction was collected and immunoblotting

confirmed that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was not in rate limiting quantity. These results confirm that a negatively charged residue at position 181 in Cav1.2 is required to promote the interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 with a stronger affinity for the Aspartate than the Glutamate residue.

*Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-mediated upregulation of whole-cell currents is prevented by mutations of Cav1.2 Asp-181.* The functional importance of the negatively charged side-chain in conferring this interaction was confirmed in patch-clamp experiments performed with Cav1.2 mutants. Substitutions were carried out at position 181 with glycine (48 Å<sup>3</sup>), hydrophobic alanine (67 Å<sup>3</sup>), and arginine (148 Å<sup>3</sup>) residues (35). In the presence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, Asp-181 mutants (D181G, D181A, and D181R) produced voltage-activated inward Ca<sup>2+</sup> current currents that were indistinguishable from currents produced with Cav1.2 WT in the absence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (**Fig 6 A-C and Table**). The near-absence of voltage-activated currents with these mutants was observed despite their cell surface expression (**Fig 6D**). In contrast, whole-cell currents produced by Cav1.2 D181E were upregulated by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 indicating that the functional modulation requires a negative side-chain at this position. Nonetheless the activation of Cav1.2 D181E was slightly right-shifted when compared with Cav1.2 WT suggesting that upregulation of whole-cell currents can be achieved without a significant modification of the activation gating. Similar results were obtained with mutations at position Asp-180 as discussed in the next section.

*Cav1.2 Asp-180 influences activation gating without changing peak current density.* In contrast to most mutations at position 181, Cav1.2 Asp-180 mutants produced large high-voltage-activated inward Ca<sup>2+</sup> currents in the presence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (**Fig 7 and Table**). The stimulation of peak current densities by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 ranged from 3- to 7- fold with smaller currents with D180A  $\approx$  D180I < D180G  $\approx$  D180E  $\approx$  WT. Mutations at these positions, except for D180E, activated in a range of voltages that overlapped with Cav1.2 currents obtained in the absence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. The change in the activation potential might not be simply mediated by a change in the net electrostatic potential. While Cav1.2 D180A and D180I are likely to alter the net negative charges at the water-accessible interface, and decrease the local Ca<sup>2+</sup> concentration at the mouth of the channel pore, this effect should result in whole-cell currents



being activated at more, not less, negative voltages (36). Furthermore, both Cav1.2 D180E and D181E activated at slightly more positive voltages than Cav1.2 WT despite the conservation of the net negative charge at the site and this effect was also observed with the double mutant Cav1.2 D180E/D181E (**Table**). These observations demonstrate that physical interaction between the two proteins, as probed by the co-immunoprecipitation studies, is essential for the upregulation of whole-cell currents. Nonetheless, a negatively aspartate charged residue is needed at position 180 to promote the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-induced negative shift in the activation of Cav1.2.

Mutations at adjacent sites confirmed that Asp residues in the IS1S2 play a unique role in the interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Whole-cell currents produced by Cav1.2 single mutants at neighboring positions 179, 182, 183, and 184 were upregulated by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and activated at potentials generally associated with Cav1.2 WT (**Table**). The results obtained with Cav1.2 Glu-179 mutants (especially E179R) do not support a significant contribution of this residue in establishing an essential interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.

*Arg-1119 in IIIS5S6 of Cav1.2 contributes modestly to the functional interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.* In addition to IS1S2 loop, bioinformatics analysis based upon the 5GJV.pdb structure predicted interaction between Arg-969 and Arg-988 in the IIIS5S6 of Cav1.1 and Asp-173 and Glu-176 in the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. The reconstructed interface built from the 3D models of IIIS5S6 in Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 identifies two positively charged residues in Cav1.2 Arg-1119 and Lys-1100 that could form hydrogen bonds with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-171 and Glu-174 respectively (**Fig 8A**). Within the limits of the 3D model, Cav1.2 Arg-1119 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-171 residues emerge as the most plausible pair to enable protein interaction. Co-immunoprecipitation assays carried out with the single Cav1.2 mutants suggest that Arg-1119 may be involved in the interaction between the two proteins (**Fig 8 B-D**). Under conditions where Cav1.2 WT, R1119A, and K1100A were well expressed (**Fig 8B**), the signal for anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 probed after co-immunoprecipitation, was slightly reduced for Cav1.2 R1119A.

To evaluate whether Cav1.2 Arg-1119 contribute to the functional interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, a series of patch-clamp experiments were conducted with single mutants Cav1.2

R1119A or Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D171A (**Fig 9 and Table**). As seen, the co-expression of Cav1.2 WT with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D171A did not appreciably alter the biophysical properties of Cav1.2 currents. The whole-cell currents obtained in the presence of Cav1.2 R1119A with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT appeared to be roughly 50% lower ( $p < 0.05$ ) than currents obtained with the two WT constructs suggesting that Cav1.2 Arg-1119 contributes to the functional interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Co-expressing Cav1.2 R1119A with the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D171A mutant yielded whole-cell inward currents with biophysical properties similar to Cav1.2 R1119A with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, suggesting that the interaction may not involve the side-chain of Asp-171 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Activation gating was not altered in any of these subunit combinations and whole-cell currents were seen to activate at the same negative voltage range (**Fig 9C**). The functional properties of the Cav1.2 K1100A and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 E174A mutants were characterized. Results indicate that substituting the charged side-chain (in one or both proteins) did not significantly alter the properties of the Cav1.2 whole-cell currents (**Table**). Neighboring mutations at positions 957, 1104, 1109, and 1113 in IIS5S6 of Cav1.2 were also without effect (**Table**). These results suggest that Arg-1119 in the IIS5S6 loop of Cav1.2 is the residue the most likely to play a role in the functional interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 but its role might be more modest than Cav1.2 Asp-181.

## DISCUSSION

*Negatively charged residues in the first extracellular loop control the association with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.* Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is required to reconstitute the biophysical properties of native L-type channels in cardiomyocytes (22) and is regarded as an intrinsic subunit of Cav1.2 channels (16-20). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 undergoes a complex series of co- and post-translational modifications (27,30,37,38) and expression at the cell surface of the mature extracellular Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein is a pre-requisite for formation of the heteromeric complex and channel modulation (30).

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 produces a 5- to 10-fold increase in peak current density and promotes channel activation in a physiological range. The agonist-like properties of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 are manifested by a major impact on channel gating without significant change in the protein density at the cell surface (25,39) or in the single-channel conductance (40). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was shown to double the amount of charges moved during channel activation (41), to increase the

channel mean open time in single channel recordings (40), and to augment the effective charge moved by the voltage sensors from repeats I, II, and III (42).

One of the most perplexing questions entails whether this functional modulation requires direct or allosteric interaction of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 with the pore or the voltage sensor domains of the Cav $\alpha$ 1 subunit (31). Low-resolution cryo-EM structural data of Cav1.2 (43,44) and more recently higher resolution of the skeletal muscle Cav1.1 channel (20,28) have revealed that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 straddles the extracellular loops in repeat I, II, and III of the Cav $\alpha$ 1 protein with few interactions predicted between residues in repeat IV of Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Herein we used a combination of 3D modeling, co-immunoprecipitation data, and electrophysiological recordings, to characterize the relative contribution of the extracellular loops in repeats I, II, and III of Cav1.2. Introducing 9-residue epitopes after Ser-182 in IS1S2 prevented the co-immunoprecipitation of the two proteins and the functional modulation of Cav1.2 currents by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Our studies reveal that a negatively charged residue is required at position Cav1.2 Asp-181 to mediate physical interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and consequently channel modulation. Substitution by glycine, hydrophobic alanine, or positively charged arginine at this position prevented protein co-immunoprecipitation and functional modulation of Cav1.2 currents whereas the functional properties of Cav1.2 D181E were not significantly different than observed with the WT construct. These effects were seen to be strongly position-dependent. Whole-cell currents produced by mutating the side-chain at position Cav1.2 Asp-180 were upregulated 3-to 7-fold by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Nonetheless, most mutants activated in the positive range of voltages, typically observed in the absence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Hence, it appears that the nature of the side-chain at position 180 in Cav1.2 is critical to convey the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-mediated shift in the activation potential.

The contribution from extracellular loops connected to the pore region while not being completely ruled out, can be currently qualified as being modest. Functional modulation and co-immunoprecipitation were not significantly altered when epitopes were inserted in IS5S6 and IIS5S6 of Cav1.2. Furthermore the substitution of the positively charged Arg-1119 in IIIS5S6 of Cav1.2 decreased the peak current density but did not prevent co-immunoprecipitation of the two proteins. These results suggest that there is a smaller but not negligible interaction between IIIS5S6 of Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 as proposed previously (42).

However, we gathered little evidence for a strong role of the extracellular residues forming part of the external vestibule in the pore of repeat II (IIS5S6).

Our results are qualitatively in agreement with voltage clamp fluorometry data obtained on Cav1.2/Cav $\beta$ 3/ Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 channels showing that the four voltage sensors are not functionally equivalent (45). Experiments from the same group further demonstrated that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 enhances the charge displacement and promotes the energetic contribution from voltage sensors in repeats I, II, and III (42). Close examination of these data suggests that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 modifies more significantly the properties of the voltage sensor in repeat II but these differences may result from changes in the conformations of the specific Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 constructs. It is in fact remarkable that the dataset is such in good agreement given the intrinsically distinct experimental designs. The Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 construct we used was tagged with a mCherry fluorophore in its C-terminal and a HA epitope in its extracellular Cache2 domain and we have modified key residues in extracellular loops of Cav1.2. Voltage clamp fluorometry experiments were carried out with the unadulterated Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein after the covalent modification of the Cav1.2 protein at selected positions in the extracellular loops linking S3 and S4. Future experiments are needed to elucidate further the complex set of interactions and the complete energy landscape at the hydrophilic interface.

*What is the putative mechanism responsible for the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-mediated modulation of Cav1.2?* Molecular dynamics simulations of our 3D model suggest that Cav1.2 Asp-181 establishes electrostatic interactions with Ser-263 with minor contributions from the adjacent residues Ser-261 and Gly-262 in the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Long-range interactions contrast with the nanomolar high-affinity hydrophobic van der Waals interactions at the Cav1.2/Cav $\beta$  interface, that is anchored by a unique tryptophan residue in the pore-forming subunit (15,21,29) facing leucine residues in the guanylate domain of Cav $\beta$  (46). Polar interactions are often found at the protein interface of loosely connected protein complexes with association constants in the micromolar range (47). Although not identified in the high-resolution cryo-EM structure, it is likely possible that water molecules are present at the interface and play a role in mediating the interaction between the two proteins. The movement

of water molecules would in turn increase the number of configurations that the side-chains can adopt at the hydrophilic interface.

Within the precision of the cryo-EM structure and the 3D model of the extracellular loops of Cav1.2, we propose that the IS1S2 loop undergoes a conformational change prompted by the binding of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 which would in turn stabilize salt bridges known to be formed between positively charged S4 residues and negatively charged residues in S2 and S3 transmembrane helices (48,49). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 could be required to stabilize the secondary structure of the extracellular IS1S2 loop around Pro-178. In this scheme, negatively charged residues Asp-180 and Asp-181 play essential roles in modifying the energy landscape. First, the interaction of Asp-181 with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 could stabilize the interaction between residues forming the MIDAS that is required for the function of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (50) such that substitution of the negative charge at position 181 in Cav1.2 would destabilize MIDAS. This interpretation is congruent with molecular dynamics simulations indicating that the presence of Ca<sup>2+</sup> in the MIDAS increases the strength of the non-bonded interactions between residues Cav1.2 Asp-181 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-263. In addition, the strong interactions between Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and Cav1.2 Asp-181 could promote a long-lived conformation in Cav1.2 that would facilitate the intramolecular interaction of Cav1.2 Asp-180 with the external IS3S4 loop. This interaction could be propagated through water molecules, likely to be abundant at the hydrophilic interface. Alteration in the side-chain at Asp-180 could thus compromise its interaction with the IS3S4 loop without perturbing significantly the physical interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. In turn, the interaction between Asp-180 and the IS3S4 loop could promote a conformation that could lock the S4 voltage sensor into the open state and thus account for the improved activation gating. More experiments are needed to confirm this model and assess its universality in regard to the modulation of high-voltage activated Cav2 channels by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. In the context where the molecular properties of the extracellular S3S4 loops are critical determinants of the gating properties in L-type Cav1.1 channels (49), it is also important to note that the atomic coordinates of the IS3S4 loop are missing from the 5GJV.pdb structure and were constructed *de novo* in our virtual model. At this time, we propose that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 modulates Cav1.2 currents by indirectly exerting its effect on the voltage sensor domain in repeat I rather than on the pore region.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Recombinant DNA techniques.* The rabbit Cav1.2 (GenBank X15539) and the rat Cav $\beta$ 3 (Genbank M88751) were subcloned in commercial vectors under the control of the CMV promoter as described elsewhere (25,46). The coding sequence (1091 residues) of the rat brain Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 clone (Genbank NM\_012919) (51) was subcloned in the pmCherry-N1 vector and the hemagglutinin (HA) epitope (YPYDVPDYA) was inserted in the extracellular domain of Cav $\alpha$ 2 between Asp-676 and Arg-677, such that the HA epitope is accessible from the extracellular medium and the mCherry is translated after the C-terminal. This construct enables the detection of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins expressed at the cell surface as previously described (27,30,32). Point mutations and insertions were produced with the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (*New England Biolabs Inc., Whitby, Ontario, Canada*) in the pCMV-Cav1.2 and in the pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA (Fig 9 only) constructs according to the manufacturer's instructions as described elsewhere (25,27). The HA or the bungarotoxin (BTX) (WRYYESSELEPYPD) epitope tags were inserted between Ser-182 and Asn-183 within the S1-S2 extracytoplasmic loop in repeat I of the Cav $\alpha$ 1 subunit of Cav1.2. The HA epitope tag was also inserted in two other sites: between Gln-331 and Glu-332 (S5-S6 loop, repeat I) and between Asp-710 and Glu-711 (S5-S6 loop, repeat II). All HA- and BTX-constructs were produced with the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (*New England Biolabs, Inc., Whitby, ON, Canada*) according to the manufacturer's instructions. Briefly, large insertions (9 to 13 amino acids) were performed by incorporating half of the desired insertion into the 5' ends of both desalted primers. After PCR, a Kinase-Ligase-DpnI enzyme mix was added to the amplified DNA for circularization and template removal before transformation into high-efficiency NEB DH5- $\alpha$  competent *E. coli*. All constructs were verified by automated double-stranded sequence analysis (*Genomics Platform, IRIC, Université de Montréal, QC, Canada*).

*Immunoblotting of total cell lysates from HEKT cells.* Protein expression of all constructs was confirmed by western blotting in total cell lysates but not shown herein (21,25,27). Briefly, HEKT cells were lysed with a RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) containing a protease inhibitor cocktail including 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, aprotinin,

bestatin, E-64, leupeptin, and 1 mM EDTA (*Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada*) for 30 min at 4°C. The cell lysates were sonicated and centrifuged at 13,000 rpm for 30 minutes at 4°C. Supernatant was collected and proteins were quantified with the Pierce BCA Protein Assay Kit (*ThermoFisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada*). Immunoblotting was carried out with fresh lysates. Proteins were mixed with the Laemmli sample buffer in the presence of 0.4 mM 2-mercaptoethanol and electrophoresed on a 8% SDS-polyacrylamide gel alongside the Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (*Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada*). After electroblotting and blocking with 5% (w/v) skim milk for 30 min, the supported nitrocellulose membranes (*Bio-Rad*) were incubated with the appropriate antibodies. The Cav1.2 mutants were tested with the anti-Cav1.2 (*Alomone, Jerusalem, Israel, 1:5000*). Membranes were stripped and incubated with an anti-GAPDH as a loading control (*Sigma-Aldrich, 1:10000*) unless stated otherwise. Signals were detected with the ECL substrate. Blots were visualized with the ChemiDoc Touch system (*Bio-Rad*). Molecular weights were estimated using Image Lab™ Software v5.2 (*Bio-Rad*) by linear regression of standard molecular weight markers.

*Co-Immunoprecipitation of Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 with Cav $\beta$ 3-c-Myc.* HEKT cells were transiently transfected with pCMV-Cav $\beta$ 3-c-Myc and pCMV-Cav1.2 WT or mutants and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT. Two days after transfection, cells were homogenized in 20 mM NaMOPS (pH 7.4), 300 mM NaCl, and 1% digitonin supplemented with protease inhibitors (*ThermoFisher Scientific*). Homogenates were sonicated, incubated for 1 h at 4°C, and centrifuged at 16,000 xg for 30 min. A fraction (20  $\mu$ g) of the homogenates or starting material was set aside as the input fraction and was immunoblotted to confirm the presence of all three proteins of interest. Co-immunoprecipitation was carried out using 150  $\mu$ l of the homogenates containing  $3.8 \pm 0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (n = 48) of total proteins. This solution (containing 555-585  $\mu\text{g}$  total proteins), was diluted with an equal volume of 20 mM NaMOPS (pH 7.4), 300 mM NaCl (to 0.5% final concentration of digitonin), mixed by pipetting. The 300- $\mu$ l protein solution was incubated overnight with 50  $\mu$ l of anti-c-Myc magnetic beads (*ThermoFisher Scientific*). Beads were collected using a PureProteome magnetic rack (*Millipore*). The Flow Through fraction containing the unbound proteins was conserved and

15  $\mu$ l of this protein solution was immunoblotted to validate the presence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 in all samples. The magnetic beads were washed three times with a buffer containing 20 mM NaMOPS (pH 7.4), 300 mM NaCl, and 0.2% digitonin. The bound proteins were eluted with 20  $\mu$ l Laemmli buffer 2x at 95°C for 5 minutes, electrophoresed on an 8% SDS-polyacrylamide gel, and transferred onto a nitrocellulose membrane. Western blotting was carried out with either anti-Cav $\beta$ 3 (*Alomone, 1:10000*), anti-Cav1.2 (*Alomone, 1:5000*), or the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (*Alomone, Jerusalem, Israel, 1:1000*) with an anti-rabbit as secondary antibody (*Jackson ImmunoResearch, 1:10000*).

Signals were detected with the ECL chemiluminescent substrate (*ThermoFisher Scientific*) and blots were visualized with the ChemiDoc Touch system (*Bio-Rad*). Each series of experiments was performed a minimum of three separate times after loading the same quantity of proteins onto the beads.

*Flow cytometry assays.* Flow cytometry experiments were carried out to evaluate the cell surface expression of the mCherry-Cav1.2-HA WT and mutants studied in electrophysiology. Stably Cav $\beta$ 3 cells were transiently transfected with pCMV- Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT and pmCherry-Cav1.2-HA WT or mutants where the HA epitope was inserted after Asp-710 (32). Experiments were conducted and analyzed as published before (25,27,30) and described in greater details elsewhere (32). Briefly, the cell surface expression of the mCherry-Cav1.2-HA WT was detected with the FITC-conjugated mouse monoclonal anti-HA epitope tag antibody at 5  $\mu$ g/mL (*Sigma-Aldrich*). To determine the total quantity of both intracellular and extracellular expression of the tagged proteins, cells were fixed and permeabilized using BD Cytifix / Cytoperm™ Fixation / Permeabilization Solution Kit (*Becton Dickinson Biosciences, Mississauga, ON, Canada*). This procedure was especially important for the mutants that failed to generate significant cell surface fluorescence as a means to confirm the accessibility of the HA epitope. Roughly 10,000 cells were counted using a FACSaria III® SORP flow cytometer (*Becton Dickinson Biosciences*). The control conditions were carried out in triplicate with each series of experiments: a) untransfected Cav $\beta$ 3 cells without the anti-HA FITC conjugated antibody; b) untransfected Cav $\beta$ 3 cells with the anti-HA FITC conjugated



antibody to assess the level of background staining; c) Cav $\beta$ 3 cells transfected with pCMV-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT and pmCherry-Cav1.2-HA WT, the latter serving as a quality control of transfection. Expressing mCherry-Cav1.2 HA WT in HEKT cells produced a 1-log increase in the FITC (“x” axis) and a 3-log increase in mCherry fluorescence (“y” axis) on two-dimensional dot plots as shown in **Fig 6D**.

Although not reported in details herein, flow cytometry data were analyzed using the FlowJo software, version 10 (*TreeStar, Ashland, OR 97520*) as described (32). Relative expression of the pore-forming subunit of Cav1.2 (Cav $\alpha$ 1.2) was calculated based on  $\Delta$ Median Fluorescence Intensity ( $\Delta$ MedFI) for each fluorophore (mCherry or FITC).  $\Delta$ MedFI for FITC measured in intact non-permeabilized cells was used as a relative index of the steady-state cell surface expression of the HA-tagged Cav1.2 while the  $\Delta$ MedFI for mCherry attested that the protein was translated until the C-terminal.  $\Delta$ MedFI values were normalized to the maximum value measured the same day for mCherry-Cav1.2-HA WT expressed under the same conditions. The normalized  $\Delta$ MedFI values for mCherry measured for each mutant in intact and permeabilized cells were not significantly different from one another ( $p > 0.1$ ) (*data not shown*) suggesting that the cell permeabilization procedure did not distort significantly the relative fluorescence readout under most conditions.

*Patch-clamp experiments in HEKT cells.* Whole-cell patch-clamp experiments were carried out on isolated cells after transfection in HEKT cells in the presence of the peGFP vector coding for the Green Fluorescence Protein (GFP) (0.2  $\mu$ g) as a control for transfection efficiency. Only the GFP-positive cells were patched. Electrodes were filled with a solution containing (in mM): 140 CsCl; 0.6 NaGTP; 3 MgATP; 10 EGTA; 10 HEPES; titrated to pH 7.3 with NaOH with a resistance varying between 2.8 and 3.2 M $\Omega$  (megaOhms). Cells were bathed in a modified Earle’s saline solution (in mM): 135 NaCl; 20 TEACl; 2 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES, titrated to pH 7.3 with KOH. GFP-positive cells were selected for patching. On-line data acquisition was achieved with the Axopatch 200-B amplifier (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*) connected with the PClamp software Clampex 10.5 through the Digidata 1440A acquisition system (*Molecular Devices*) (25). A series of 450 ms-voltage pulses were applied from a holding potential of -100 mV at a frequency of 0.2 Hz, from -60 to +70 mV at 5 mV intervals. Series resistance was compensated to  $\sim$ 85% after online capacitive transient

cancellation. Unless stated otherwise, whole-cell currents were sampled at 5 kHz and filtered at 1 kHz. PClamp software Clampfit10.5 was used for data analysis. Mid-potential of activation values ( $E_{0.5,act}$ ) were estimated from the peak I-V curves obtained for each channel composition and were reported as the mean of individual measurements  $\pm$  S.E.M (25,52). The free energy of activation was calculated using the mid-activation potential:

$$\Delta G_{act} = z \cdot F \cdot E_{0.5,act} \quad (1)$$

where  $z$  is the effective charge displacement during activation, and  $F$  is the Faraday constant. The r100 ratio, defined as the ratio of peak whole-cell currents remaining after a depolarizing pulse of 100 ms ( $I_{100ms} / I_{Peak}$ ), was calculated for each mutant. As there was no significant change in the channel kinetics, these values were not reported herein. To assess for internal consistency, the experiments carried out with novel mutants always included a control experiment performed with pCMV-Cav1.2 WT (*pCMV-Cav1.2 WT + pCMV-Cav $\beta$ 3 + pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT*) thus explaining the larger sample size for Cav1.2 WT. Previous experiments confirmed that mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT sustains the functional modulation of Cav1.2 currents (25). Experiments performed under the same conditions yielded peak current densities that could vary by as much as  $\pm$  35% between each series of transfections. This variation appeared to be essentially linked to minor changes in the cell density at the time of transfection. Data from all experiments performed under the same conditions over a period of 15 months were pooled and biophysical properties are reported in the Table. Experiments were performed at room temperature (22°C).

*3D Homology Modeling.* The atomic coordinates of the Cav $\alpha$ 1 protein from Cav1.1 (Protein Data Bank 5GJV) were used to explore the 3D structure of Cav1.2. The rabbit Cav1.1 (1873 amino acids) and rabbit Cav1.2 (2171 amino acids) share 69.3% identity (86.3% similarity) in the 1714 residue overlap between 107-1806 (Cav1.1 numbering) with major differences found in the N and C-termini. Attempts of modeling the four repeats of the Cav $\alpha$ 1 protein from Cav1.2 using the cryo-EM coordinates of Cav1.1 failed to yield 3D models with small root mean square deviations due in large part to the gaps in the atomic coordinates of the Cav $\alpha$ 1 protein of Cav1.1, namely for amino acids 139-161 in IS3-S4, 343-357 and 372-425 in IS6-IIS1, 669-798 in IIS6-IIIS1, 1076-1103 in IIIS6-IVS1, 1204-1229 in IVS3S4, and 1396-

1671 after IVS6. The atomic coordinates of the extracellular loops IS1S4 and IIIS5S6 predicted to interact with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were used to build 3D models of these two regions.

The primary sequence between helix S1 and helix S4, in the repeat I of the rabbit Cav1.2 (Genbank X15539), shares 69.6% identity with the same region of the rabbit Cav1.1. The primary sequence of the VWA domain of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (our construct, Genbank NM\_012919) between amino acids 249 to 439 is perfectly conserved between both species. Amino acids 135 to 281 in Cav1.2 and amino acids 249 to 439 of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were simultaneously aligned to the atomic coordinates of Protein Data Bank 5GJV using the align2D algorithm in Modeller9.17 (53). Modeller 9.17 was used to generate one hundred 3D models and the models with the lowest values for the molpdf parameters and DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) score (54) as reported in the log file, were selected. The DOPE parameter is a statistical potential used to assess the energy of the protein model generated through many iterations by Modeller, which produces homology models by the satisfaction of spatial restraints. The gaps of the cryo-EM structure in the extracellular loop linking helix S3 and helix S4 were filled in using PHENIX (phenix.refine) (55) and further refined using the “Automatic loop refinement” tool in Modeller. Modeller was used to generate one hundred 3D models and the models with the lowest values for the molpdf parameters and DOPE score (54) were selected for this study.

The 3D model of the extracellular loop between transmembrane segments 5 and 6 in repeat III (IIIS5S6) in Cav1.2 was built using Modeller9.17 (53) using a similar strategy. This 145-residue gapless stretch in Cav1.2 (residues 1059-1204) shares 74% identity with Cav1.1. The best model with the lowest value of DOPE score and an average root mean square deviation of 0.4 Å was selected. The protein-protein interfaces were reconstructed in PyMOL. The 3D model of IIIS5S6 in Cav1.2 and the 3D model of the cache1 domain (104-233) of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were superimposed with the cryo-EM structure of the Cav1.1 protein complex (5GJV). The reconstructed interface shows that residues Lys-1100 and Arg-1119 could form hydrogen bonds with respectively Glu-174 and Asp-171 in the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.

Molecular dynamics simulations were performed using CHARMM-CGENFF with explicit solvent water molecules. The system comprises the external loops IS1S2 and IS3S4 of Cav1.2 extending from Ala-172 to Glu-190 and Glu-243 to Val-263 respectively, plus the

VWA domain of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 extending from Ala-249 to Ala-441. Identification of the water-exposed external loops was based on the PPM server calculations which determines the rotational and translational positions of transmembrane and peripheral proteins in membranes using their 3D structure (PDB coordinate file) as input as seen in <http://opm.phar.umich.edu/server.php>. The system was solvated in a 84.5 Å side cubic cell containing 19 938 TIP3P model water molecules. Altogether the system consisted of 63 938 atoms including 60 K<sup>+</sup> and 56 Cl<sup>-</sup> ions to insure electroneutrality at near physiological concentration. Cut-on and cut-off parameters needed to define non-bounded interactions were set to 10 Å and 12 Å respectively, and SHAKE constrains were used to determine the lengths of bonds involving hydrogen atoms. Constraints with a force of 10 were applied to the end residues of IS1S2 of Cav1.2 (Ala-172, and Glu-190), IS3S4 (Glu-243, and Val-263) and the VWA domain (Ala-249 and Ala-441) to account for the anchoring of the IS1S2 and IS3S4 loops to their respective transmembrane segments, and the folding of the VWA domain between the Cache 1 and the Cache 2 domains. Trajectories were generated for 6 ns and 25 ns (in the presence and in the absence of Ca<sup>2+</sup> respectively) using a time step of 2 fs, and electrostatic and van der Waals interaction energies computed from trajectories sampled at 0.01 ns. Molecular dynamics simulations were performed for a system at constant pressure (1 atm) and constant temperature (303 °K).

*Statistics.* Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Tests of significance were carried out using the unpaired ANOVA with the Tukey Test embedded in the Origin 7.0 analysis software (*OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*). Data were considered statistically significant at \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.001$ .

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

B.B. conducted and analyzed the patch-clamp experiments. J.B. was responsible for the homology modeling and carried out the co-immunoprecipitation assays. M.P.T. performed and analyzed flow-cytometry experiments. B.B. and M.P.T. produced the mutants. B.B., J.B., and M.P.T. performed standard immunoblotting assays. R.S. supervised the homology modeling and performed molecular dynamics simulations. L.P. coordinated the study, interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors contributed to the design of the experiments, reviewed the results, and approved the final version of this manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Armelle LeCampion and Dr. Jacques Thibodeau for sharing their expertise and granting us access to their flow cytometry and cell sorting platform; and Behzad Shakeri for preliminary electrophysiological experiments. This work was completed with the operating grant 130256 from the Canadian Institutes of Health Research and grant G-15-0009329 from the Canadian Heart and Stroke Foundation to L.P.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they do not have any conflict of interest with the contents of this manuscript.

## FOOTNOTES

The abbreviations used are: 3D: Three-dimensional; AID: Alpha-interacting domain; BTX: Bungarotoxin; Cryo-EM: Cryo-electron microscopy; FITC: Fluorescein Isothiocyanate;  $\Delta G_{act}$ : Free energy of activation; HA: Hemagglutinin; HEKT: Human Embryonic Kidney 293 cells stably expressing an SV40 temperature-sensitive T antigen; MIDAS: metal-ion-dependent adhesion site;  $\Delta MedFI$ : Relative Median Fluorescent Intensity; VWA: von Willebrand-A; WT: Wild-Type.

## REFERENCES

1. Bers, D. M. (2000). Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circ Res* **87**, 275-281
2. Jaleel, N., Nakayama, H., Chen, X., Kubo, H., MacDonnell, S., Zhang, H., Berretta, R., Robbins, J., Cribbs, L., Molkentin, J. D., and Houser, S. R. (2008). Calcium Influx Through T- and L-Type Calcium Channels Have Different Effects on Myocyte Contractility and Induce Unique Cardiac Phenotypes. *Circ Res* **103**, 1109
3. Gao, H., Wang, F., Wang, W., Makarewich, C. A., Zhang, H., Kubo, H., Berretta, R. M., Barr, L. A., Molkentin, J. D., and Houser, S. R. (2012). Calcium influx through L-type Calcium channels and transient receptor potential channels activates pathological hypertrophy signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **53**, 657-667

4. Bannister, J. P., Bulley, S., Narayanan, D., Thomas-Gatewood, C., Luzny, P., Pachuau, J., and Jaggar, J. H. (2012). Transcriptional Upregulation of  $\alpha_2\delta_1$  Elevates Arterial Smooth Muscle Cell Voltage-Dependent  $Ca^{2+}$  Channel Surface Expression and Cerebrovascular Constriction in Genetic Hypertension. *Hypertension* **60**, 1006-1015
5. Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z., and Nattel, S. (1997). Ionic Remodeling Underlying Action Potential Changes in a Canine Model of Atrial Fibrillation. *Circ Res* **81**, 512-525
6. Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., Lamorgese, M., Rossie, S. S., McCarthy, P. M., and Nerbonne, J. M. (1999). Atrial L-Type Calcium Currents and Human Atrial Fibrillation. *Circ Res* **85**, 428-436
7. Aschar-Sobbi, R., Izaddoustdar, F., Korogyi, A. S., Wang, Q., Farman, G. P., Yang, F., Yang, W., Dorian, D., Simpson, J. A., Tuomi, J. M., Jones, D. L., Nanthakumar, K., Cox, B., Wehrens, X. H. T., Dorian, P., and Backx, P. H. (2015). Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNF $\alpha$ . *Nat. Commun.* **6**, 6018
8. Lugenbiel, P., Wenz, F., Govorov, K., Schweizer, P. A., Katus, H. A., and Thomas, D. (2015). Atrial Fibrillation Complicated by Heart Failure Induces Distinct Remodeling of Calcium Cycling Proteins. *PLoS ONE* **10**, e0116395
9. Richard, S., Leclercq, F., Lemaire, S., Piot, C., and Nargeot, J. (1998). Calcium currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* **37**, 300-311
10. Mukherjee, R. and Spinale, F. G. (1998). L-type Calcium Channel Abundance and Function with Cardiac Hypertrophy and Failure: A Review. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 1899-1916
11. Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (2004). Ca(V) $1.2$  calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.* **119**, 19-31
12. Splawski, I., Timothy, K. W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F. B., Beggs, A. H., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **102**, 8089-8096
13. Napolitano, C. and Antzelevitch, C. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. *Circ. Res.* **108**, 607-618
14. Colecraft, H. M., Alseikhan, B., Takahashi, S. X., Chaudhuri, D., Mittman, S., Yegnasubramanian, V., Alvania, R. S., Johns, D. C., Marban, E., and Yue, D. T. (2002).

- Novel functional properties of Ca<sup>2+</sup> channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J. Physiol.* **541**, 435-452
15. Van Petegem, F., Duderstadt, K. E., Clark, K. A., Wang, M., and Minor, J. (2008). Alanine-Scanning Mutagenesis Defines a Conserved Energetic Hotspot in the Cav $\alpha$ 1 AID-Cav $\beta$  Interaction Site that Is Critical for Channel Modulation. *Structure* **16**, 280-294
  16. Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 521-555
  17. Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., and Yue, D. T. (1999). Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* **22**, 549-558
  18. Dolphin, A. C. (2009). Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 237-244
  19. Gao, T., Puri, T. S., Gerhardstein, B. L., Chien, A. J., Green, R. D., and Hosey, M. M. (1997). Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 19401-19407
  20. Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., and Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*. **537**, 191-196
  21. Bourdin, B., Marger, F., Wall-Lacelle, S., Schneider, T., Klein, H., Sauve, R., and Parent, L. (2010). Molecular Determinants of the Cav $\beta$ -induced Plasma Membrane Targeting of the Cav1.2 Channel. *J. Biol. Chem.* **285**, 22853-22863
  22. Fuller-Bicer, G. A., Varadi, G., Koch, S. E., Ishii, M., Bodi, I., Kadeer, N., Muth, J. N., Mikala, G., Petrashevskaya, N. N., Jordan, M. A., Zhang, S. P., Qin, N., Flores, C. M., Isaacsohn, I., Varadi, M., Mori, Y., Jones, W. K., and Schwartz, A. (2009). Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha$ 2/ $\delta$ 1 subunit. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **297**, H117-H124
  23. Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., and Dascal, N. (1991). The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*. **253**, 1553-1557
  24. Parent, L., Schneider, T., Moore, C. P., and Talwar, D. (1997). Subunit regulation of the human brain  $\alpha$ <sub>1E</sub> calcium channel. *J. Membr. Biol.* **160**, 127-140
  25. Bourdin, B., Shakeri, B., Tetreault, M. P., Sauve, R., Lesage, S., and Parent, L. (2015). Functional Characterization of CaVa2d Mutations Associated with Sudden Cardiac Death. *J. Biol. Chem.* **290**, 2854-2869

26. Yasuda, T., Chen, L., Barr, W., McRory, J. E., Lewis, R. J., Adams, D. J., and Zamponi, G. W. (2004). Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur. J Neurosci.* **20**, 1-13
27. Tetreault, M. P., Bourdin, B., Briot, J., Segura, E., Lesage, S., Fiset, C., and Parent, L. (2016). Identification of glycosylation sites essential for surface expression of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 subunit and modulation of the cardiac Cav1.2 channel activity. *J. Biol. Chem.* **291**(9), 4826-4843
28. Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., and Yan, N. (2015). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science.* **350** (6267), aad2395
29. Van Petegem, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., and Minor, D. L., Jr. (2004). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature.* **429**, 671-675
30. Segura, E., Bourdin, B., Tetreault, M. P., Briot, J., Allen, B. G., Mayer, G., and Parent, L. (2017). Proteolytic Cleavage of the Hydrophobic Domain in the CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Subunit improves assembly and activity of cardiac CaV1.2 Channels. *J Biol. Chem.* **292** (26), 11109-11124
31. Voigt, A., Freund, R., Heck, J., Missler, M., Obermair, G. J., Thomas, U., and Heine, M. (2016). Dynamic association of calcium channel subunits at the cellular membrane. *Neurophotonics.* **3**, 041809
32. Bourdin, B., Segura, E., T etreault, M.-P., Lesage, S., and Parent, L. (2016). Determination of the relative cell surface and total expression of recombinant ion channels using flow cytometry. *J. Vis. Exp.* e54732-doi:10.3791/54732
33. Sekine-Aizawa, Y. and Haganir, R. L. (2004). Imaging of receptor trafficking by using alpha-bungarotoxin-binding-site-tagged receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 17114-17119
34. Paxman, J. J. and Heras, B. (2017). Bioinformatics Tools and Resources for Analyzing Protein Structures. *Methods Mol Biol.* **1549**, 209-220
35. Creighton, T. E. (1993) Chapter 4: Physical interactions that determine the properties of proteins, Table 4.3, p. 141, in *Proteins, structure and molecular properties*, W.H. Freeman and Co., New-York
36. Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes.*, Sinauer Ed., Sunderland MA
37. Dolphin, A. C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J. Physiol* **594**, 5369-5390
38. Dolphin, A. C. (2013). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**, 1541-1549



39. Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., Tedford, H. W., Hermosilla, T., and Zamponi, G. W. (2011). The Cav $\beta$  subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci* **14**, 173-180
40. Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M., and Dascal, N. (1995). Calcium current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol* **489**, 55-62
41. Bangalore, R., Mehrke, G., Gingrich, K., Hofmann, F., and Kass, R. S. (1996). Influence of L-type Ca channel  $\alpha 2/\delta$  subunit on ionic and gating current in transiently transfected HEK 293 cells. *Am. J. Physiol.* **270**, H1521-H1528
42. Savalli, N., Pantazis, A., Sigg, D., Weiss, J. N., Neely, A., and Olcese, R. (2016). The alpha2delta1 subunit remodels CaV1.2 voltage sensors and allows Ca<sup>2+</sup> influx at physiological membrane potentials. *J. Gen. Physiol.* **148**, 147-159
43. Wolf, M., Eberhart, A., Glossmann, H., Striessnig, J., and Grigorieff, N. (2003). Visualization of the domain structure of an L-type Ca channel using electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **332**, 171-182
44. Walsh, C. P., Davies, A., Butcher, A. J., Dolphin, A. C., and Kitmitto, A. (2009). Three-dimensional Structure of CaV3.1. *J. Biol. Chem.* **284**, 22310-22321
45. Pantazis, A., Savalli, N., Sigg, D., Neely, A., and Olcese, R. (2014). Functional heterogeneity of the four voltage sensors of a human L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **111**, 18381-18386
46. Shakeri, B., Bourdin, B., Demers-Giroux, P. O., Sauve, R., and Parent, L. (2012). A quartet of Leucine residues in the Guanylate Kinase domain of Cav $\beta$  determines the plasma membrane density of the Cav2.3 channel. *J Biol Chem* **287**, 32835-32847
47. Dey, S., Pal, A., Chakrabarti, P., and Janin, J. I. (2010). The Subunit Interfaces of Weakly Associated Homodimeric Proteins. *Journal of Molecular Biology* **398**, 146-160
48. Gonzalez, C., Contreras, G. F., Peyser, A., Larsson, P., Neely, A., and Latorre, R. (2012). Voltage sensor of ion channels and enzymes. *Biophysical Reviews* **4**, 1-15
49. Tuluc, P., Yarov-Yarovoy, V., Benedetti, B., and Flucher, B. (2016). Molecular Interactions in the Voltage Sensor Controlling Gating Properties of CaV Calcium Channels. *Structure* **24**, 261-271
50. Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Hebllich, F., Wratten, J., Richards, M. W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K. M., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2005). The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of  $\alpha 2\delta$  subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11230-11235

51. Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (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
52. Wall-Lacelle, S., Hossain, M. I., Sauve, R., Blunck, R., and Parent, L. (2011). Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in IIS4-S5 linker for the activation of the Cav2.3 calcium channel. *J Biol Chem.* **286**, 27197-27205
53. Webb, B. and Sali, A. (2014). Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* **1137**, 1-15
54. Shen, M. Y. and Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* **15**, 2507-2524
55. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H., and Adams, P. D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica. Section. D.* **68**, 352-367
56. Briot, J., D'Avanzo, N., Sygusch, J., and Parent, L. (2016). Three-Dimensional Architecture of the L-Type Calcium Channel: Structural Insights into the Cav $\alpha_2\delta_1$  Auxiliary Protein. *Biochem Mol Biol J* **2:3**, DOI: 10.21767/2471-8084.100025

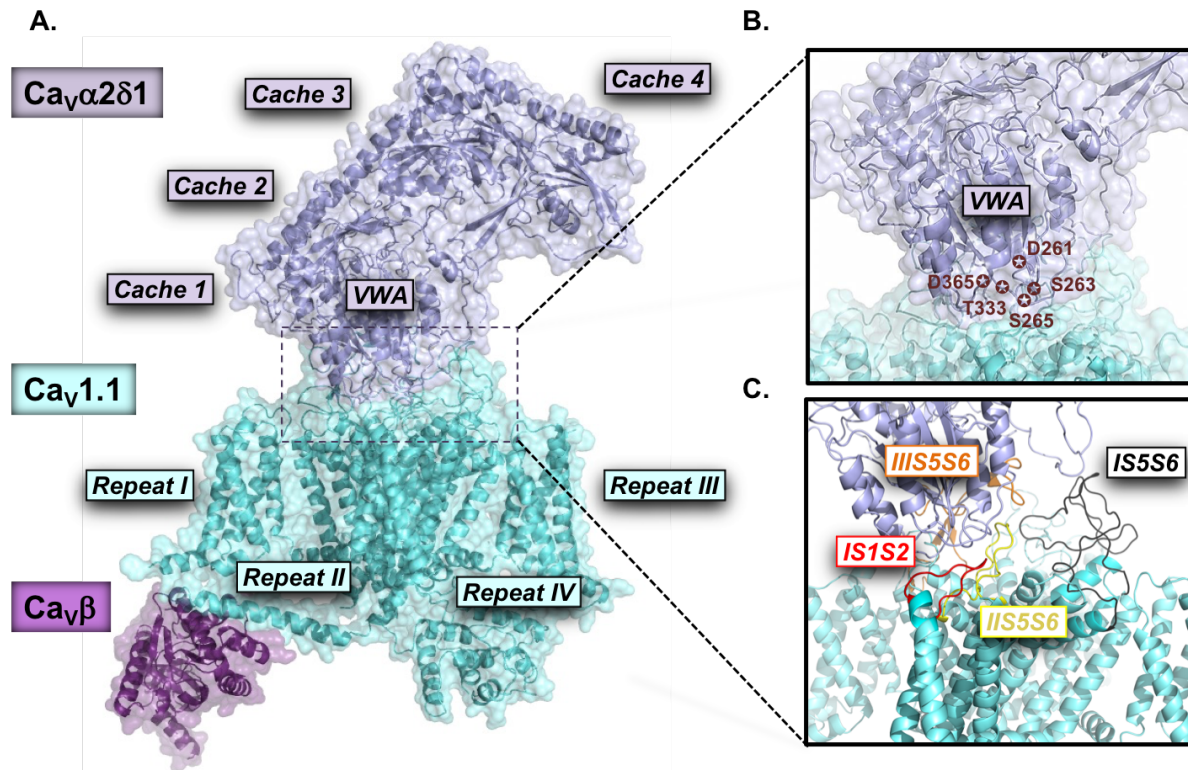
Cav1.2 WT or mutants with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and Cav $\beta$ 3 in HEKT cells	Electrophysiological Properties in 2 mM Ca <sup>2+</sup>		
	Peak current density (pA/pF)	E <sub>0.5,act</sub> (mV)	$\Delta$ Gact (kcal mol <sup>-1</sup> )
mCherry mock vector	-2.5 ± 0.3 (25)	+8 ± 2	+0.5 ± 0.1
Cav1.2 WT	-18 ± 1 (243) **	-8.3 ± 0.2 **	-0.78 ± 0.03 **
Cav1.2-BTX (S182)	-2 ± 1 (18)	+6 ± 1	+0.4 ± 0.1
Cav1.2-HA (S182)	-5 ± 2 (10)	+7 ± 1	+0.5 ± 0.1
Cav1.2-HA (E331)	-17 ± 4 (10) **	-8.8 ± 0.5 **	-0.8 ± 0.1 **
Cav1.2-HA (D710)	-16 ± 2 (19) **	-8.8 ± 0.3 **	-0.80 ± 0.04 **
Cav1.2 E179G	-27 ± 2 (8) **	-11 ± 1 **	-1 ± 0.1 **
Cav1.2 E179A	-21 ± 3 (16) **	-5 ± 2 **	-0.5 ± 0.1 **
Cav1.2 E179I	-20 ± 3 (9) **	-7 ± 1 **	-0.6 ± 0.1 **
Cav1.2 E179R	-16 ± 3 (13) **	-6 ± 1 **	-0.6 ± 0.1 **
Cav1.2 D180G	-18 ± 2 (18) **	-2 ± 1 *	-0.04 ± 0.08 *
Cav1.2 D180I	-8 ± 1 (12) **	+3 ± 1	+0.24 ± 0.07
Cav1.2 D180A	-9 ± 1 (14) **	+3 ± 1	+0.2 ± 0.1
Cav1.2 D180E	-18 ± 3 (15) **	-3 ± 1 *	-0.2 ± 0.1 *
Cav1.2 D181G	-3 ± 2 (3)	+7 ± 4	+0.4 ± 0.3
Cav1.2 D181A	-4 ± 1 (8) *	+11 ± 6	+0.4 ± 0.2
Cav1.2 D181R	-1 ± 1 (2)	6 ± 1	+0.4 ± 0.1
Cav1.2 D181E	-14 ± 3 (14) **	-4 ± 1 *	-0.2 ± 0.1 *
Cav1.2 D180E/D181E	-24 ± 8 (8) **	+5 ± 2	+0.3 ± 0.2
Cav1.2 S182G	-9 ± 2 (20) **	-7 ± 1 **	-0.5 ± 0.1 **
Cav1.2 S182A	-23 ± 7 (9) **	-8 ± 2 **	-0.8 ± 0.2 **

<b>Cav1.2 S182R</b>	-23 ± 7 (9) **	-7 ± 2 **	-0.6 ± 0.1 **
<b>Cav1.2 N183G</b>	-11 ± 2 (9) **	-7 ± 2 **	-0.7 ± 0.1 **
<b>Cav1.2 N183A</b>	-24 ± 6 (7) **	-11 ± 1 **	-1 ± 0.1 **
<b>Cav1.2 N183R</b>	-13 ± 3 (7) **	-6 ± 1 **	-0.5 ± 0.1 **
<b>Cav1.2 N183Q</b>	-7 ± 1 (7) **	-3 ± 2 *	-0.3 ± 0.1 *
<b>Cav1.2 A184G</b>	-28 ± 7 (9) **	-11 ± 1 **	-1.2 ± 0.2 **
<b>Cav1.2 A184D</b>	-22 ± 4 (9) **	-7 ± 2 **	-0.8 ± 0.2 **
<b>Cav1.2 A184R</b>	-12 ± 3 (17) **	-7 ± 1 **	-0.6 ± 0.1 **
<b>Cav1.2 S957G</b>	-26 ± 4 (6) **	-12 ± 1 **	-1.3 ± 0.2 **
<b>Cav1.2 K1100A</b>	-19 ± 4 (9) **	-9 ± 1 **	-0.9 ± 0.1 **
<b>Cav1.2 K1100A + Cav<math>\alpha</math>2<math>\delta</math>1-HA E174A</b>	-14 ± 4 (9) **	-7 ± 1 **	-0.6 ± 0.1 **
<b>Cav1.2 I1104G</b>	-21 ± 5 (10) **	-12 ± 2 **	-1.1 ± 0.2 **
<b>Cav1.2 G1109A</b>	-14 ± 4 (10) **	-7 ± 1 **	-0.7 ± 0.2 **
<b>Cav1.2 H1113G</b>	-26 ± 7 (8) **	-8 ± 2	-0.8 ± 0.2
<b>Cav1.2 R1119A</b>	-12 ± 2 (31) **	-10 ± 1 **	-0.9 ± 0.1 **
<b>Cav1.2 R1119A + Cav<math>\alpha</math>2<math>\delta</math>1-HA D171A</b>	-10 ± 2 (9) **	-8 ± 1 **	-0.7 ± 0.1 **

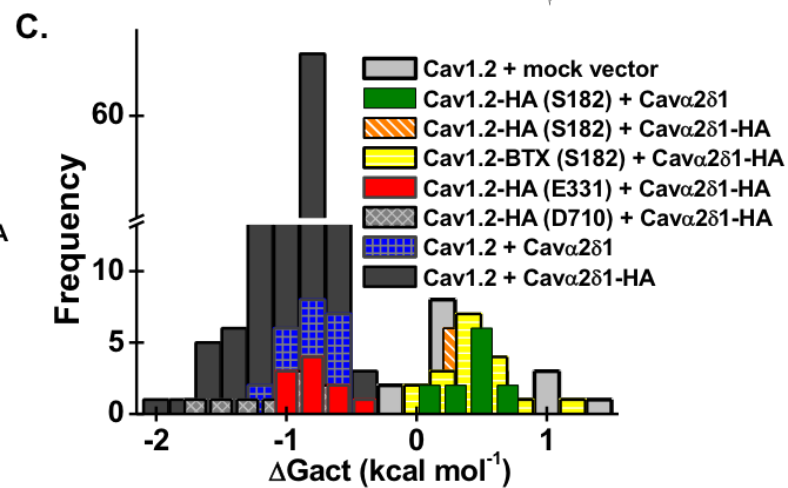
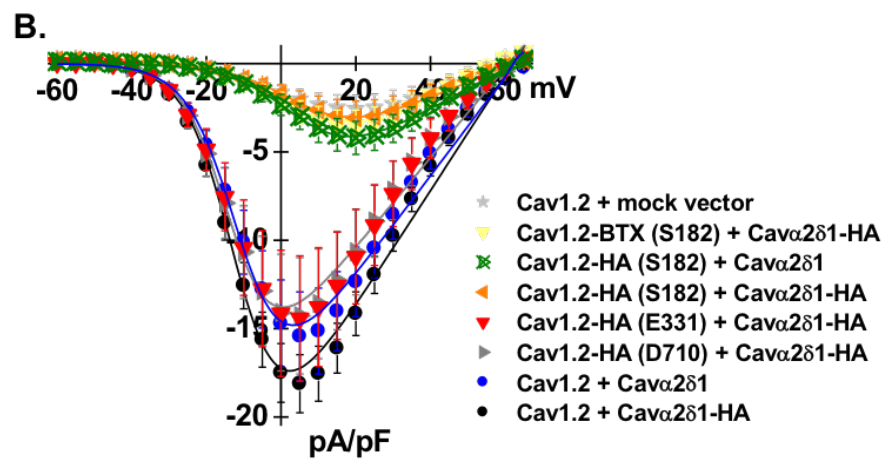
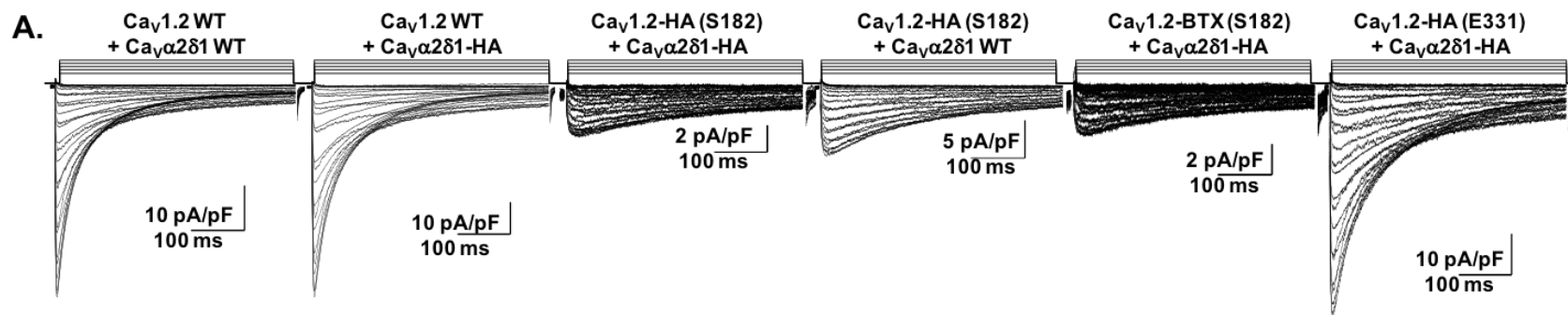
**TABLE: Biophysical properties of Cav1.2 mutants.** Cav1.2 WT or mutant was co-expressed with Cav $\beta$ 3 and either pmCherry-mock vector or pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants using a 4  $\mu$ g: 4  $\mu$ g: 4  $\mu$ g ratio. Biophysical parameters were measured in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> as described elsewhere (25,27). Activation properties ( $E_{0.5,act}$  and  $\Delta G_{act}$ ) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation. Only the GFP-positive cells with voltage-activated currents were kept for further analysis. Null-current cells outnumbered the cells with inward currents for Cav1.2 D181R (12 null cells) and D181G (8 null cells). The data are shown as the mean  $\pm$  S.E.M. of the number of cells (1 cell per

experiment) and the total number of experiments carried over several months appears in parentheses. Statistical analysis was carried out against the values obtained in the presence of the mock pmCherry-N1 vector. N/E: no inward current; \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

## FIGURES

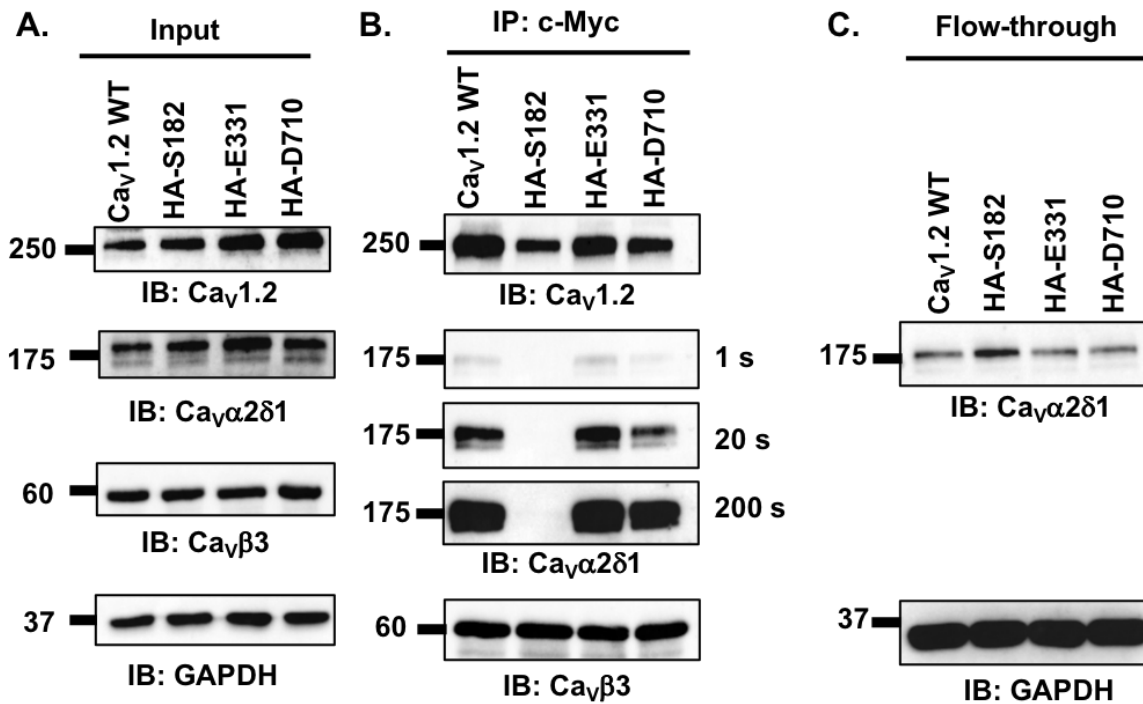


**FIGURE 1: A. Three-Dimensional cryo-electron microscopy structure of the Cav1.1 channel.** Surface representation of the rabbit Cav1.1 channel (cyan) in complex with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (deep blue) and Cav $\beta$ 2 (violet) (PDB: 5GJV). The structural domains of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and the relative orientation of repeats I to IV in the pore-forming Cav $\alpha$ 1 subunit of Cav1.1 are identified. For the correlation between the primary sequence and the structural domains of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, see Fig 2 of (56). The extensive interface between the two proteins is surrounded by a black dot square and this region is shown enlarged in Panels B and C. **B.** The structural details of the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 are emphasized and the residues forming the MIDAS are identified by stars. **C.** The extracellular loops of Cav1.1 forming the interface with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 are shown. Only the main chains are being shown. The S1S2 loop in repeat I (IS1S2, residues 71-82) is in red, the turret and external pore region S5S6 in repeat I (IS5S6, residues 219-278) is in black, the turret and external pore region S5S6 in repeat II (IIS5S6, residues 581-600) is in yellow, and the turret and external pore region S5S6 in repeat III (IIIS5S6, residues 950-998) is in orange. Images were produced with PyMOL (Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).



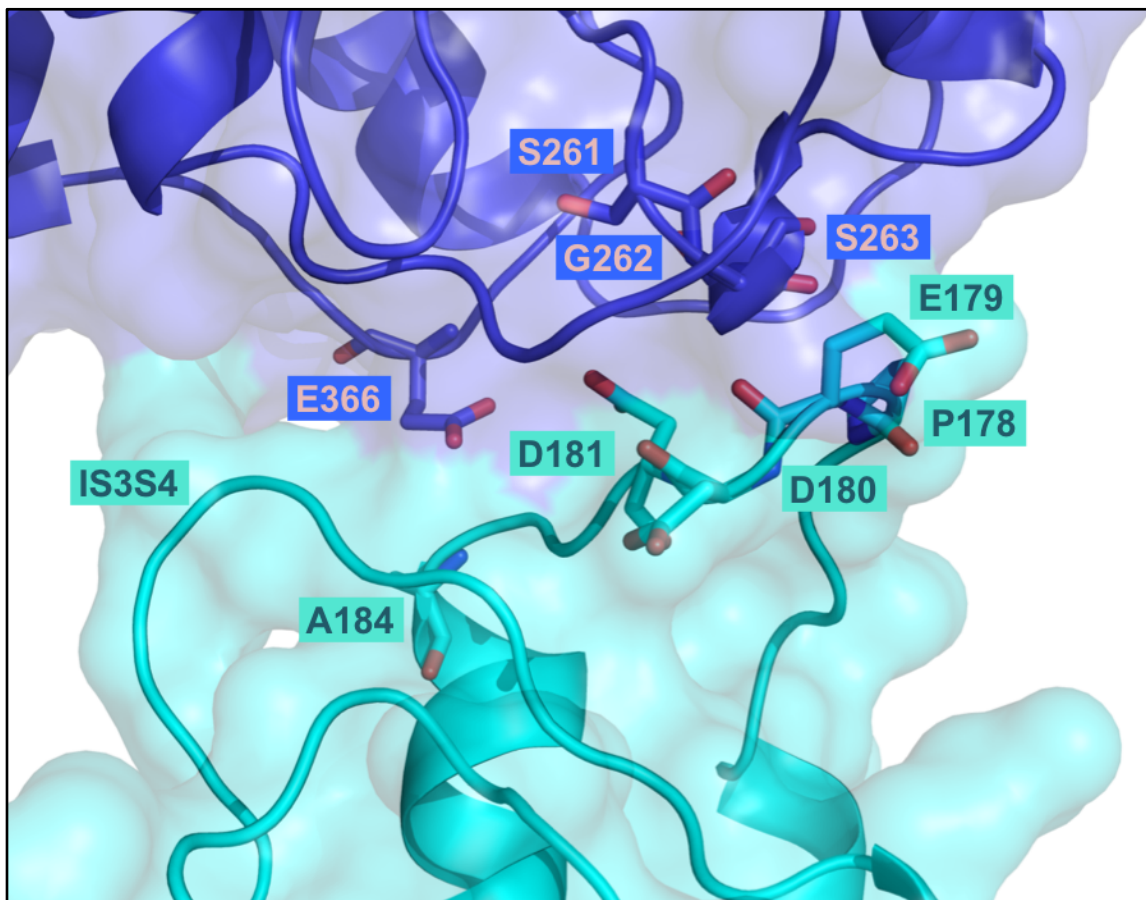
**FIGURE 2: Inserting epitopes within the first extracellular loop of Cav1.2 prevents functional modulation of whole-cell current by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.** A stable recombinant HEKT cell expressing Cav $\beta$ 3 was transiently transfected simultaneously with pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT (or pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT) and pCMV-Cav1.2 WT or mutants as indicated over each current traces. In all cases, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was tagged in the C-terminal by a mCherry epitope. The epitopes HA or BTX were inserted after the identified residues without altering the primary sequence on each side of the insertion site. **A. Representative whole-cell Ca<sup>2+</sup> current traces** obtained after recombinant expression of Cav1.2 WT + Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT, Cav1.2 WT + Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, Cav1.2-HA (Ser-182) + Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, Cav1.2-HA (Ser-182) + Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT, Cav1.2-BTX (Ser-182) + Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, and Cav1.2-HA (Glu-331) + Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT (from left to right). Cav1.2 currents were modulated to the same extent in the presence of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT. Furthermore, similar results were obtained with Cav1.2-HA (Glu-331). Currents were recorded in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> from a holding potential of -100 mV. Time scale is 100 ms throughout. The current density scale ranged from 2 pA/pF to 10 pA/pF, as indicated. **B. Averaged current–voltage relationships.** The absolute peak currents densities measured with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT varied from -4 to -46 pA/pF over the 12-month recording period with a mean of  $-18 \pm 1$  pA/pF (n = 243). Averaged peak current densities obtained with the mock mCherry vector are shown. Co-expression with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 left-shifted the voltage-dependence of activation of Cav1.2 WT/ Cav $\beta$ 3 from  $E_{0.5,act} = +8 \pm 2$  mV (n = 25) to  $E_{0.5,act} = -8.3 \pm 0.2$  mV (n = 243) for Cav1.2 WT/ Cav $\beta$ 3 with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT. Statistical analyses were performed with a one-way ANOVA test: \* p < 0.01 and \*\* p < 0.001 against the mock vector. See Table for details. **C. Distribution of the free energies of activation.** The free energies of activation ( $\Delta G_{act}$ ) measured in the presence of the mock vector and in the presence of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT are centered at  $0.5 \pm 0.1$  kcal mol<sup>-1</sup> and at  $-0.78 \pm 0.03$  kcal mol<sup>-1</sup>, respectively. The distribution of the  $\Delta G_{act}$  values for the following combinations Cav1.2-HA (Ser-182) with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, Cav1.2-HA (Ser-182) with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT, and Cav1.2-BTX (Ser-182) with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT-HA overlapped with the  $\Delta G_{act}$  values measured in the presence of the mock vector (no Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1).



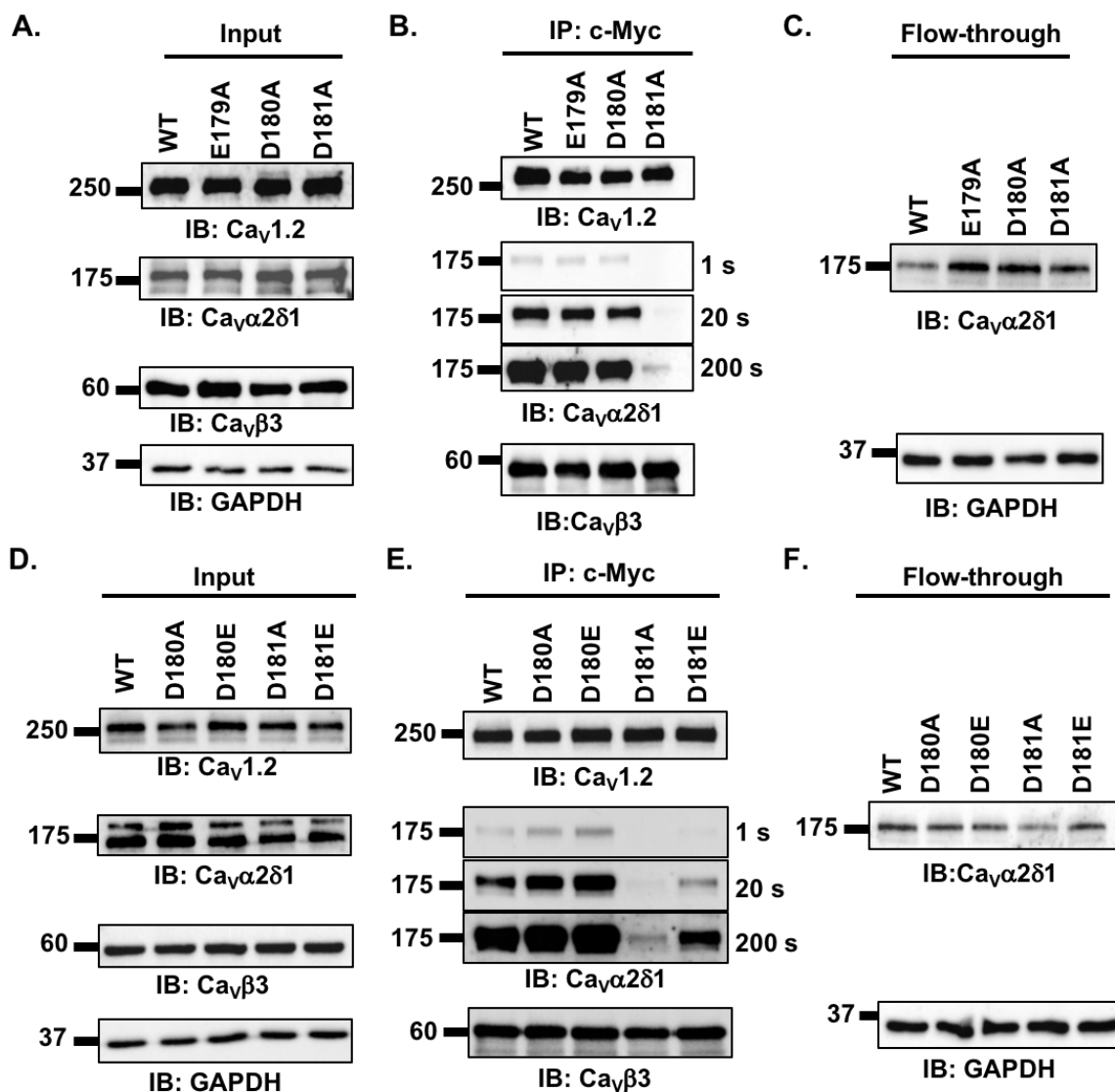


**FIGURE 3: Epitope insertion in the first extracellular loop of Cav1.2 impairs the co-immunoprecipitation of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 with Cav1.2/Cav $\beta$ 3 proteins.** HEKT cells were transiently transfected with pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and pCMV-Cav $\beta$ 3-c-Myc and either pCMV-Cav1.2 WT, pCMV-Cav1.2-HA (Ser-182), pCMV-Cav1.2-HA (Glu-331), or pCMV-Cav1.2-HA (Asp-710). Cell lysates were immunoprecipitated overnight with anti-c-Myc magnetic beads to capture Cav $\beta$ 3, eluted in a Laemmli buffer 2X, and fractionated by SDS-PAGE using 8% gels. **A.** Immunoblotting was carried out on total proteins (20  $\mu$ g) collected from the cell lysates for each of the three proteins (Cav1.2, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, and Cav $\beta$ 3) before the immunoprecipitation assay (**Input**) to confirm that each protein was translated at the expected molecular mass. Each experimental condition is identified by the specific Cav1.2 construct. The signal for the housekeeping protein GAPDH is shown below each blot. **B.** Immunoblotting was carried out after eluting the protein complexes from the anti-c-Myc beads with anti-Cav1.2, anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, and anti-Cav $\beta$ 3 antibodies (from top to bottom, as indicated). Images for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were captured after short (1 s) or longer exposure times (20 s and 200 s). Cav $\beta$ 3 and Cav1.2 proteins migrated respectively at 60 kDa and 250 kDa. All Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins migrated at  $\approx$  175 kDa which is consistent with the molecular mass of the mCherry-

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT in previous studies (30). All immunoblots were carried out in parallel under the same transfection and extraction conditions. **C.** Proteins that did not bind to the antibody-bead complex (referred to as the **Flow-through** fraction) were collected, diluted in a Laemmli buffer, and fractionated by SDS-PAGE using an 8% gel and revealed with the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. As seen, mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA is present in the flow-through fraction at the expected molecular mass (175 kDa) confirming that the proteins were appropriately translated and were present in the preparation in detectable quantities throughout. These experiments were carried out three times with the mutants and ten times for the WT construct over a period of 5 months and yielded qualitatively similar results.

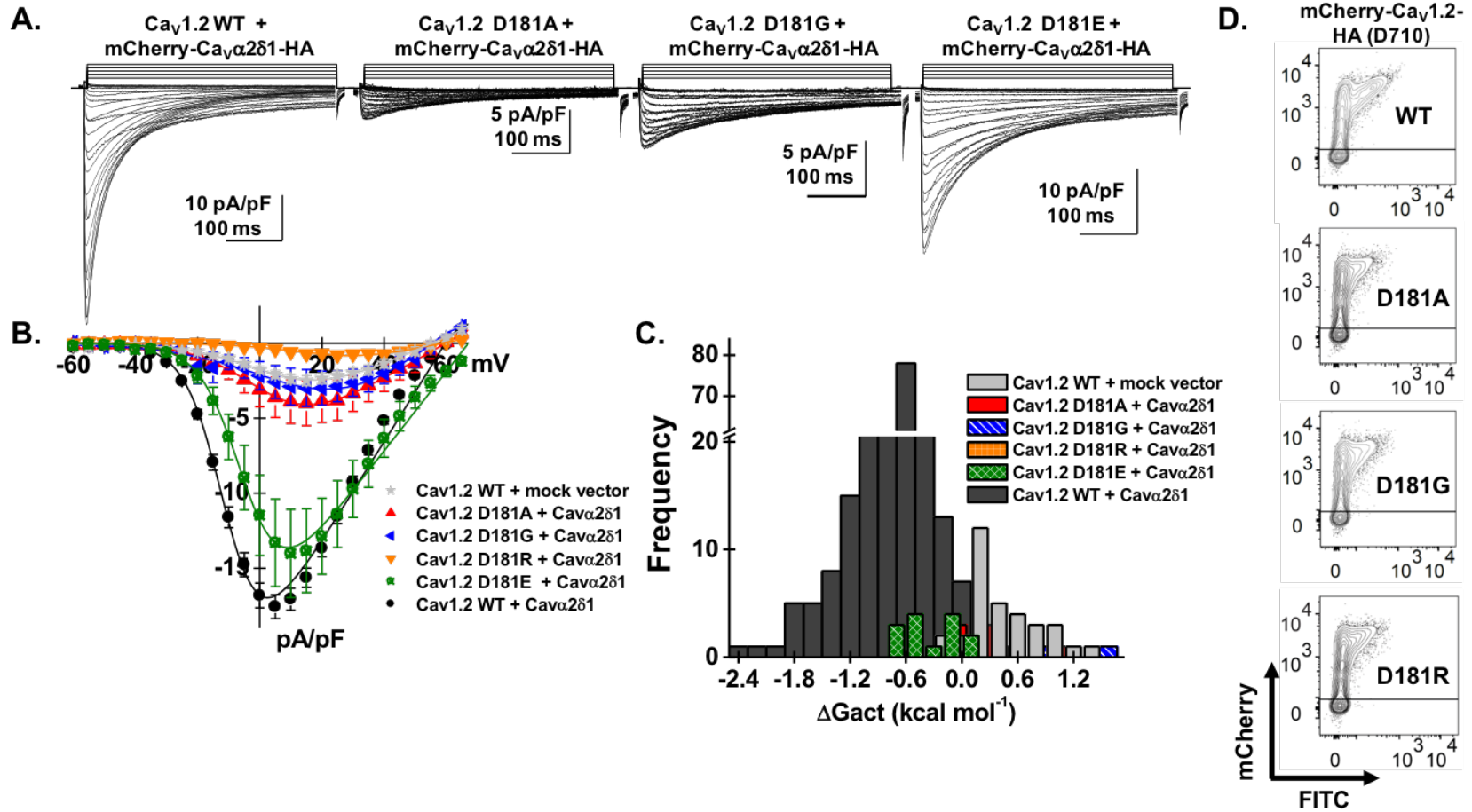


**FIGURE 4: Three-Dimensional model of the extracellular loops of the rabbit Cav1.2 in complex with the VWA domain of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein.** The 3D model of the region spanning the first transmembrane helix S1 to the fourth transmembrane helix S4 in the first repeat in Cav<sub>v</sub>1.2 (IS1S4) is shown in cyan while the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is shown in deep blue. Residues Pro-178, Glu-179, Asp-180, Asp-181, and Ala-184 of Cav<sub>v</sub>1.2 and residues Ser-261, Gly-262, Ser-263, and Glu-366 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (four out of the five residues in the MIDAS) are shown in stick representation with oxygen and nitrogen atoms colored in red and in blue, respectively. The model does not predict strong electrostatic interactions between Cav<sub>v</sub>1.2 Asp-180 and residues in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Intramolecular interactions with residues in the extracellular IS3S4 loop are not ruled out. Cav<sub>v</sub>1.2 Asp-181 appears to be appropriately oriented to form electrostatic interactions with Gly-262 and Ser-263 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Modelling was achieved with Modeller 9.17. The figure was produced using PyMOL.



**FIGURE 5: Mutations of the aspartate residue at position 181 impair the co-immunoprecipitation of *Cavα2δ1* with *Cav1.2/Cavβ3* proteins.** A-C. HEKT cells were transiently transfected with pmCherry-*Cavα2δ1*-HA WT and pCMV-*Cavβ3*-c-Myc and either pCMV- *Cav1.2* WT, pCMV-*Cav1.2* E179A, pCMV-*Cav1.2* D180A, or pCMV-*Cav1.2* D181A. Cell lysates were immunoprecipitated overnight with anti-c-Myc magnetic beads to capture *Cavβ3*, eluted in a Laemmli buffer 2X, and fractionated by SDS-PAGE using 8% gels. A. Immunoblotting was carried out on total proteins (20 μg) collected from the cell lysates for each of the three proteins (*Cav1.2*, *Cavα2δ1*, and *Cavβ3*) before the immunoprecipitation

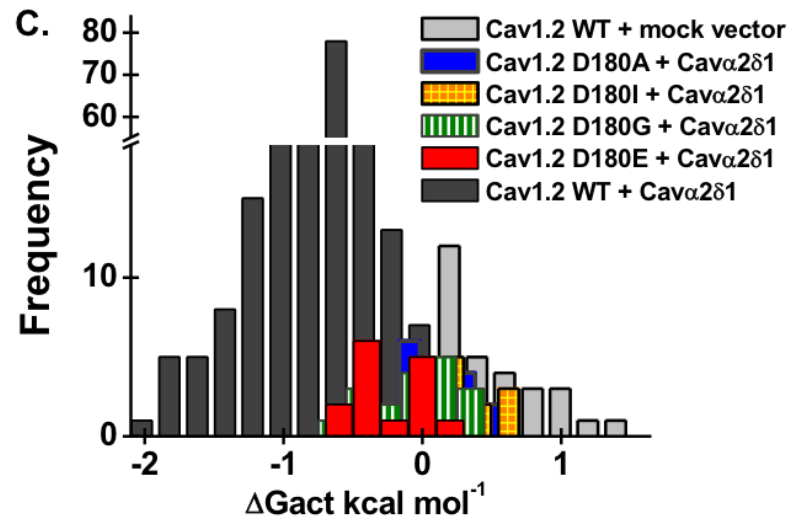
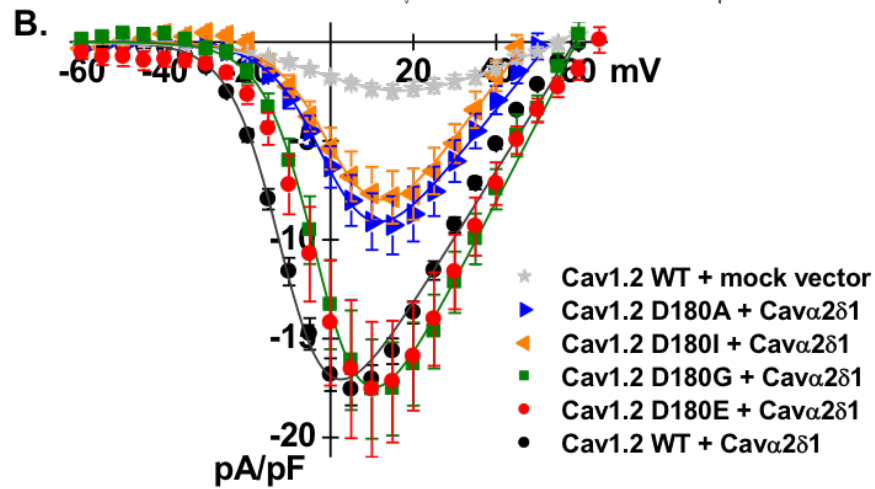
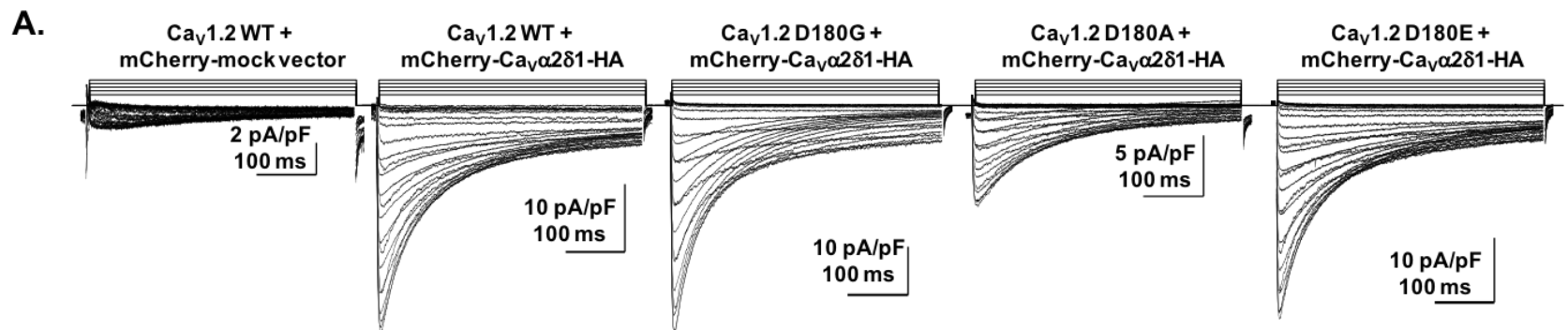
assay (**Input**) to confirm that each protein was translated at the expected molecular mass. Each experimental condition is identified by the specific Cav1.2 construct. The signal for the housekeeping protein GAPDH is shown below each blot. **B.** Immunoblotting was carried out after eluting the protein complexes from the beads with anti-Cav1.2, anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, and anti-Cav $\beta$ 3 antibodies (from top to bottom, as indicated). Images for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were captured after short (1 s) or longer exposure times (20 s and 200 s). All immunoblots were carried out in parallel under the same transfection and extraction conditions. **C.** Proteins that did not bind to the antibody-bead complex (**Flow-through** fraction) were collected, diluted in a Laemmli buffer, and fractionated by SDS-PAGE using an 8% gel and revealed with the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. **D-F.** HEKT cells were transiently transfected with pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and pCMV-Cav $\beta$ 3-c-Myc and either pCMV- Cav1.2 WT, pCMV-Cav1.2 D180A, pCMV-Cav1.2 D180E, pCMV-Cav1.2 D181A, or pCMV-Cav1.2 D181E. Cell lysates were immunoprecipitated overnight with anti-c-Myc magnetic beads to capture Cav $\beta$ 3, eluted in a Laemmli buffer 2X, and fractionated by SDS-PAGE using 8% gels. **D.** Immunoblotting was carried out on total proteins (20  $\mu$ g) collected from the cell lysates for each of the three proteins (Cav1.2, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, and Cav $\beta$ 3) before the immunoprecipitation assay (**Input**) to confirm that each protein was translated at the expected molecular mass. Each experimental condition is identified by the specific Cav1.2 construct. The signal for the housekeeping protein GAPDH is shown below each blot. **E.** Immunoblotting was carried out with anti-Cav1.2, anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, and anti-Cav $\beta$ 3 antibodies (from top to bottom, as indicated) after eluting the protein complexes from the beads. Images for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were captured after short (1 s) or longer exposure times (20 s and 200 s). All immunoblots were carried out in parallel under the same transfection and extraction conditions. **F.** Proteins that did not bind to the antibody-bead complex (**Flow-through** fraction) were collected, diluted in a Laemmli buffer, and fractionated by SDS-PAGE using an 8% gel and revealed with the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. As seen, mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA is present in the flow-through fraction at the expected molecular mass (175 kDa) confirming that the proteins were appropriately translated and were present in the preparation in detectable quantities throughout. These experiments were carried out four times with the mutants and ten times for the WT construct over a period of 5 months and yielded reproducible result.



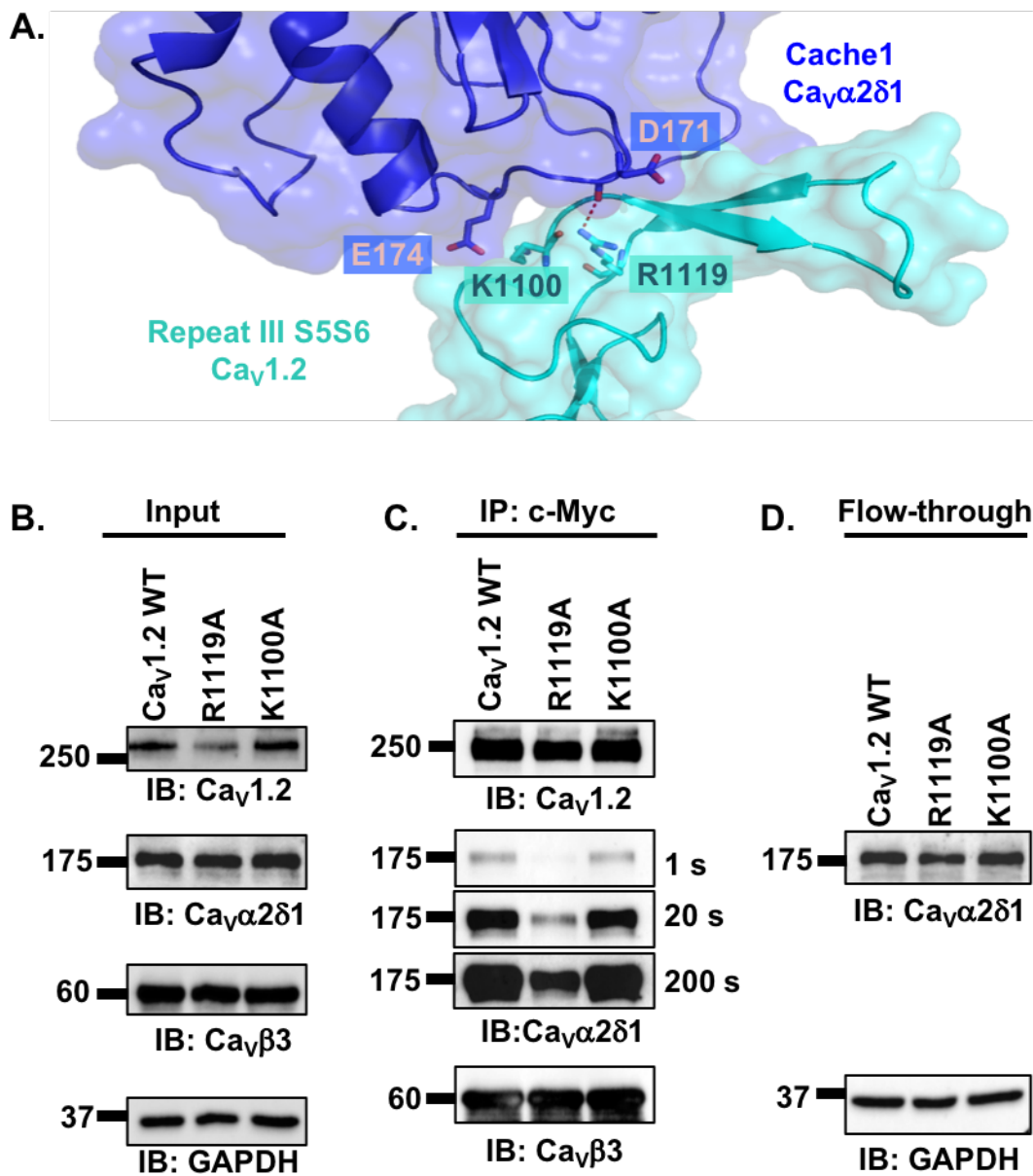
**FIGURE 6: Mutations at Asp-181 prevent upregulation of Cav1.2 currents.** HEKT cells were transiently transfected with pCMV-Cav $\beta$ 3 and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT with the Cav1.2 constructs (D181A, D181G, D181R, and D181E). **A. Whole-cell Ca<sup>2+</sup> current traces** were recorded in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> from a holding potential of -100 mV for the constructs as identified. The current traces with the largest currents are shown for Cav1.2 constructs D181G and D181E. Time scale is 100 ms throughout. The current density scale is either 5 pA/pF or 10 pA/pF as indicated. **B. Averaged current–voltage relationships.** Peak current densities versus voltage relationships were measured for Cav1.2 WT and Cav1.2 mutants (as shown). Currents traces obtained with the empty mCherry (mock) vector are also shown. Cav1.2 constructs D181A, D181G, and D181R generated currents that were not significantly upregulated by mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT. Statistical analyses were performed with a one-way ANOVA test: \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.001$  against the mock vector. See Table for details. **C. Distribution of the free energies of activation.** The values for the free energy of activation ( $\Delta G_{act}$ ) measured for Cav1.2 constructs (D181A, D181G, D181E, and D181R) overlapped with the values measured for the mock vector. **D. Representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence.** The cell surface expression of the Cav1.2 mutants was evaluated by introducing the mutation in the mCherry-Cav1.2-HA construct. The surface fluorescence was estimated from the relative intensity of the fluorescence emitted by the Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-HA as measured using a flow cytometry assay (10 000 intact cells). The construct allows for detection of intracellular and extracellular fluorescence using respectively a Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-HA (“**x-axis**”) and an anti-mCherry (“**y-axis**”). The robust mCherry signal (“**y-axis**”) confirms that the proteins were translated up to the end of the coding sequence. The cell surface fluorescence for FITC, calculated as  $\Delta MedFI$  as explained in Experimental protocols, was slightly lower for the Cav1.2 mutants (D181A, D181G, and D181R) than for the WT construct. Nonetheless, all constructs significantly fluoresced at the cell surface supporting the view that the absence of function did not result from a complete absence of trafficking to the cell membrane. Furthermore, the  $\Delta MedFI$  signal for the total protein was similar for all WT and mutant constructs demonstrating that proteins

were appropriately translated, an observation also obtained from carrying out routine western blotting.



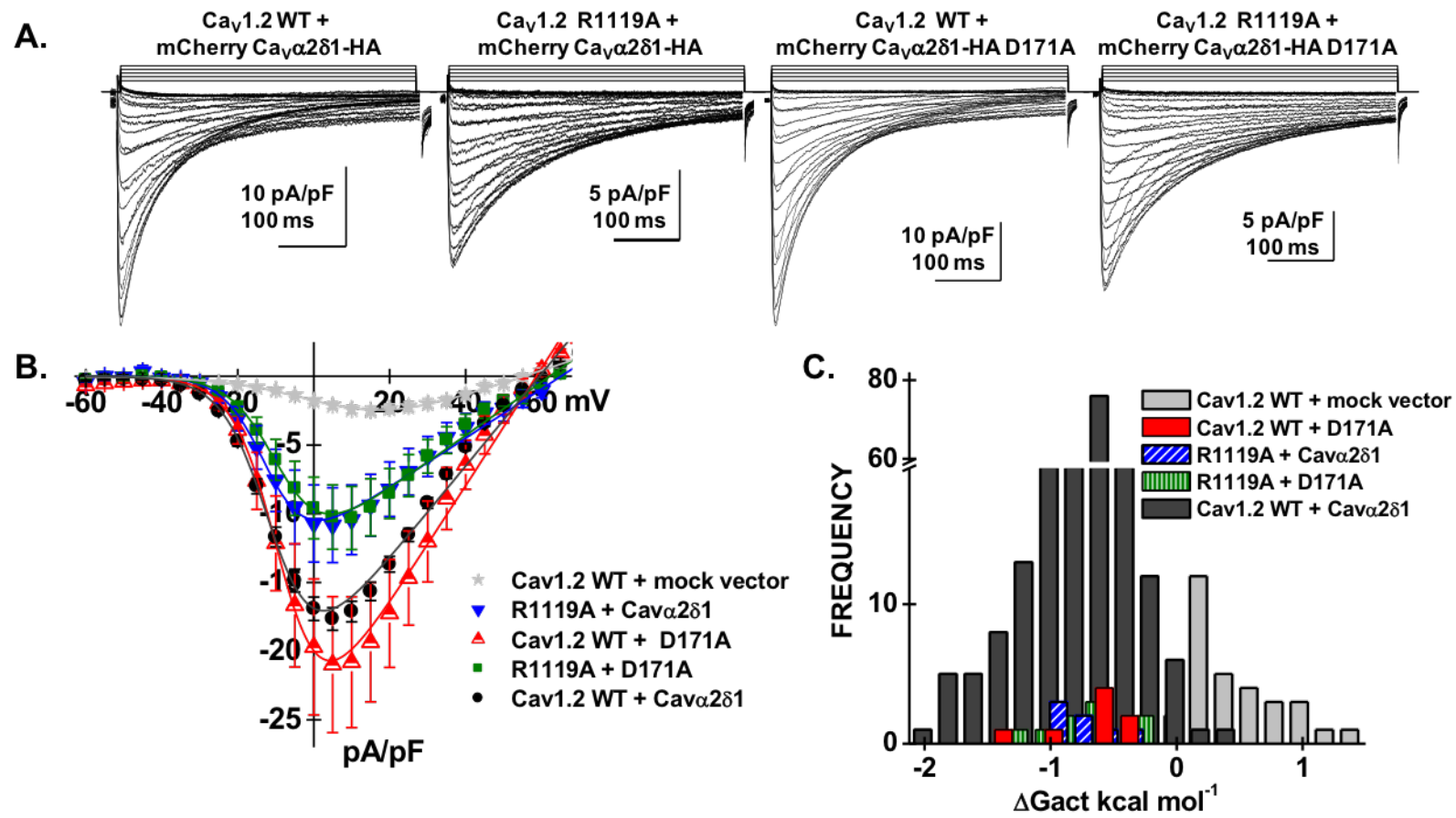


**FIGURE 7: Asp -180 in Cav1.2 controls the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-induced shift in voltage-dependent gating of Cav1.2 currents.** **A. Representative whole-cell Ca<sup>2+</sup> current traces** obtained after the transient expression of pCMV-Cav $\beta$ 3 and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT with the Cav1.2 constructs (D180I, D180A, D180G, and D180E) in HEKT cells. Note that the leftmost current trace was obtained in the presence of Cav1.2 WT and the mock mCherry vector. Recordings were made in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> from a holding potential of -100 mV. Time scale is 100 ms throughout. The current density scale ranged from 2 pA/pF to 10 pA/pF as indicated. **B. Averaged current–voltage relationships.** Peak current densities versus voltage relationships were measured for Cav1.2 WT and Cav1.2 mutants (as shown). Averaged peak current densities obtained with the mock mCherry vector are shown in light gray stars. All Cav1.2 constructs (D180I, D180A, D180G, and D180E) were upregulated by mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ -HA WT albeit to variable extent. Statistical analyses were performed with a one-way ANOVA test: \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.001$  against the mock mCherry vector. Nonetheless the current-voltage relationships measured with the Cav1.2 mutants were clearly shifted to the right when compared with Cav1.2 WT. See Table for details. **C. Distribution of the free energies of activation.** The free energies of activation ( $\Delta G_{act}$ ) for Cav1.2 D180E, D180I, D180A, and D180G did not overlap with the values measured with Cav1.2 WT.  $\Delta G_{act}$  for Cav1.2 D180A and D180I were not significantly different from  $\Delta G_{act}$  values measured for the mock vector while  $\Delta G_{act}$  for Cav1.2 D180G and D180E were significantly different at  $p < 0.01$ .



**FIGURE 8: The extracellular loop S5S6 in repeat III has a modest impact on the interaction between Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and Cav1.2/Cav $\beta$ 3 proteins. A.** The 3D model of IIIS5S6 in Cav1.2 (residues 1059 to 1204) is shown in cyan while the Cache1 domain (residues 104 to 223) in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is shown in deep blue. The carboxyl group on the side-chain of Arg-1119 in Cav1.2 is located close enough ( $< 3 \text{ \AA}$ ) of the main-chain atoms of Glu-171 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 to potentially contribute to the formation of hydrogen bonds. In contrast, the 3D model does not predict a favorable interaction between Lys-1100 in Cav1.2 and Glu-174 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 with a

minimum distance estimated to be at 4.6 Å. Modelling was achieved with Modeller 9.17. The figure was produced using PyMOL. **B-D.** HEKT cells were transiently transfected with pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and pCMV-Cav $\beta$ 3-c-Myc and either pCMV-Cav1.2 WT, pCMV-Cav1.2 R1119A or pCMV-Cav1.2 K1100A. Cell lysates were immunoprecipitated overnight with anti-c-Myc magnetic beads to capture Cav $\beta$ 3, eluted in a Laemmli buffer 2X, and fractionated by SDS-PAGE using 8% gels. **B.** Immunoblotting was carried out on total proteins (20  $\mu$ g) collected from the cell lysates for each of the three proteins (Cav1.2, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, and Cav $\beta$ 3) before the immunoprecipitation assay (**Input**) to confirm that each protein was translated at the expected molecular mass. Each experimental condition is identified by the specific Cav1.2 construct. **C.** Immunoblotting was carried out as detailed earlier. Images for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were captured after 1s, 20s, and 200s exposure. The signal for the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was detected only after a 200s-exposure when probed in the presence of Cav1.2 R1119A/ Cav $\beta$ 3. **C.** Protein lysates that ran through without binding to the antibody-bead complex (**Flow-through** fraction) were collected, diluted in a Laemmli buffer, and fractionated by SDS-PAGE using an 8% gel and revealed with the anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. As seen, mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA is present in all flow-through fractions at the expected molecular mass (175 kDa) confirming that the proteins were appropriately translated and were present in the preparation in detectable quantities throughout.



**FIGURE 9: Double mutant analysis of charged residues in repeat III in Cav1.2.** HEKT cells were transiently transfected with Cav $\beta$ 3, pCMV-Cav1.2 WT or mutant, and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutant. **A. Representative whole-cell Ca<sup>2+</sup> current traces** were recorded in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> from a holding potential of -100 mV. From left to right: Cav1.2 WT with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT; Cav1.2 R1119A with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT; Cav1.2 WT with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D171A, and Cav1.2 R1119A with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D171A. Time scale is 100 ms throughout. The current density scale is either 5 pA/pF or 10 pA/pF as indicated. **B. Averaged current–voltage relationships.** Peak current densities versus voltage relationships were measured for the WT construct and the mutants (as shown). Currents traces obtained with the empty mCherry vector (mock vector) are also shown. Statistical analyses were performed with a one-way ANOVA test: \* p < 0.01 and \*\* p < 0.001 against the mock vector. See Table for details. **C. Distribution of the free energies of activation.** The values of the free energy of activation ( $\Delta G_{act}$ ) for all conditions were significantly different than the values measured with the mock vector.

# Chapitre 5 – Les interactions intermoléculaires au sein de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 sont nécessaires pour promouvoir sa liaison avec Cav1.2 et la modulation des courants calciques

## A three-way inter-molecular network accounts for the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-induced functional modulation of the pore-forming Cav1.2 subunit

Julie Briot<sup>§&</sup>, Olivier Mailhot<sup>§¶</sup>, Benoîte Bourdin<sup>&</sup>, Marie-Philippe Tétreault<sup>&</sup>,  
Rafael Najmanovich<sup>§</sup> and Lucie Parent<sup>§&1</sup>

§ Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine; ¶ Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine; & Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

Running title: *MIDAS mutations in Cav1.2 channels*

1. To whom correspondence should be addressed: Lucie Parent, Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 Bélanger, Montréal, QC H1T 1C8, Canada; Tel: 514-343-6673; E-mail: [lucie.parent@umontreal.ca](mailto:lucie.parent@umontreal.ca)

**Keywords:** Protein-protein interaction, Electrophysiology, Co-immunoprecipitation, Molecular dynamics simulations, Von Willebrand factor type A domain, calcium channel

Cet article a été publié dans : Journal of Biological Chemistry (2018 May 11;293(19):7176-7188. doi: 10.1074/jbc.RA118.001902. Epub 2018 Mar 27)

**CONTRIBUTION DES AUTEURS :**

J.B. : Production des modèles par modélisation moléculaire par homologie et réalisation des expériences de co-immunoprécipitation, production des mutants et rédaction de l'article

O.M. : Production des modèles par modélisation moléculaire par homologie et des simulations de dynamiques moléculaires

B.B. : Prise des mesures d'électrophysiologie et analyse des données, production des mutants

M.P.T. : Acquisition et analyse des données de cytométrie en flux, production des mutants

R.N. : Supervision des simulations de dynamiques moléculaires

L.P. : Élaboration et coordination de l'étude, interprétation des résultats et rédaction de l'article



## ABSTRACT

L-type Cav1.2 channels are essential for the excitation–contraction coupling in cardiomyocytes and are hetero-oligomers of a pore-forming Cav $\alpha$ 1C assembled with Cav $\beta$  and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 subunits. A direct interaction between Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and Asp-181 in the first extracellular loop of Cav $\alpha$ 1 reproduces the native properties of the channel. A 3-D model of the von Willebrand factor type A (VWA) domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 complexed with the voltage sensor domain of Cav $\alpha$ 1C suggests that Ser-261 and Ser-263 residues in the metal ion–dependent adhesion site (MIDAS) motif are determinant in this interaction, but this hypothesis is untested. Here, coimmunoprecipitation assays and patch-clamp experiments of single-substitution variants revealed that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259 and Ser-261 are the two most important residues in regard to protein interaction and modulation of Cav1.2 currents. In contrast, mutating the side chains of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-263, Thr-331, and Asp-363 with alanine did not completely prevent channel function. Molecular dynamics simulations indicated that the carboxylate side chain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259 coordinates the divalent cation that is further stabilized by the oxygen atoms from the hydroxyl side chain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 and the carboxylate group of Cav $\alpha$ 1C Asp-181. In return, the hydrogen atoms contributed by the side chain of Ser-261 and the main chain of Ser-263 bonded the oxygen atoms of Cav1.2 Asp-181. We propose that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259 promotes Ca<sup>2+</sup> binding necessary to produce the conformation of the VWA domain that locks Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 and Ser-263 within atomic distance of Cav $\alpha$ 1C Asp-181. This three-way network appears to account for the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-induced modulation of Cav1.2 currents.

## INTRODUCTION

The von Willebrand factor type A (VWA) domain is found in more than 40,000 eukaryotic proteins (Letunic, Doerks, & Bork, 2015) where it mediates protein-protein interaction (Whittaker & Hynes, 2002). VWA superfamily is characterized by a “beta-alpha-beta” fold consisting of alternating sequence of six-stranded  $\beta$ -sheets wrapped around six  $\alpha$ -helical segments (Edwards & Perkins, 1995; Lacy, Wigelsworth, Scobie, Young, & Collier, 2004; Pihlajamaa et al., 2013). Binding of a divalent cation (either  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ ) is usually necessary for controlling its protein-ligand properties (Craig, Gao, Schulten, & Vogel, 2004). Cations are coordinated by a maximum of five non-contiguous residues forming the metal ion-dependant adhesion site (MIDAS) motif characteristic by the conserved primary sequence in the first loop Asp-Xaa-Ser-Xaa-Ser (DXSXS) followed by a threonine residue in the second loop and an aspartate residue in the third loop (Springer, 2006).

Human VWA-containing proteins include extracellular matrix proteins (e.g. collagens, cochlin, and matrilin) and integral membrane proteins (e.g. integrin and anthrax receptors) (Colombatti & Bonaldo, 1991; Lacy et al., 2004; Tuckwell, 1999). Through the capture of a divalent ion, the MIDAS motif adopts a unique conformation that facilitates ligand association (Shimaoka, Takagi, & Springer, 2002). Structural studies carried out in integrin receptors have shown that the nature of the ion coordinating the MIDAS motif influences the folding conformation of the protein and thus its ligand binding properties (J. O. Lee, Bankston, Arnaout, & Liddington, 1995; Valdramidou, Humphries, & Mould, 2008).

L-type  $Ca_v1.2$  channels are hetero-oligomeric protein complexes consisting of a main pore-forming  $Ca_v\alpha1C$  (thereafter referred to simply  $Ca_v1.2$  for conciseness) assembled with  $Ca_v\beta$  and  $Ca_v\alpha2\delta1$  auxiliary subunits (Davies et al., 2007; Van Petegem et al., 2004a; J. Wu et al., 2016a; J. Wu et al., 2015). Like many integrin proteins,  $Ca_v\alpha2\delta1$  is glycosylated at multiple asparagine residues and is retained at the plasma membrane by a relatively short glycosylphosphatidylinositol anchor following the cleavage of its unique transmembrane domain (Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016). Although  $Ca_v\alpha1C$  in  $Ca_v1.2$  is responsible for the passage of  $Ca^{2+}$  through the pore, its association with  $Ca_v\alpha2\delta1$  is necessary to reproduce the biophysical properties of the native channel (Segura et al., 2017; Tetreault et al.,

2016), in particular the channel activation at negative membrane potentials. We have recently shown that two adjacent negatively charged residues Asp-180 and Asp-181 in the S1S2 loop in the repeat I of Cav1.2 are required to recapitulate the complex characteristics of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-induced modulation of Cav1.2 currents (Bourdin, Briot, Tetreault, Sauve, & Parent, 2017). Whereas Asp-180 confers the voltage-dependent shift in channel activation, Cav1.2 Asp-181 anchors the physical interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, a necessary step to exert its function.

Based on the recent cryo-electron microscopy (cryo-EM) structure of the homologous Cav1.1 channel complex (Cav $\alpha$ 1S with auxiliary subunits) (J. Wu et al., 2016a), we have built a three-dimensional (3-D) model of the VWA domain of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 in complex with the first voltage sensor (IS1S4) of Cav $\alpha$ 1C in Cav1.2 (Bourdin et al., 2017). Within the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 lies a so-called “perfect” MIDAS motif with the typical Asp-Xaa-Ser-Xaa-Asp signature (Dolphin, 2013). As seen in **Fig. 1A**, a single divalent cation is coordinated by the multiple oxygen atoms contributed by the clockwise arrangement of Asp-259, Asp-363, Ser-263, Ser-261, and Thr-331 (rat numbering). In the model, MIDAS residues Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 and Ser-263 are predicted to be within sufficient distance of Cav1.2 Asp-181 to form a salt bridge, and anchoring the proteins’ interface. Herein, we aimed to identify the molecular determinants in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 responsible for the protein and functional interaction with Cav1.2, using a multi-pronged experimental strategy combining site-directed mutagenesis, co-immunoprecipitation assays, patch-clamp experiments, and molecular dynamics (MD) simulations. We are currently reporting that mutating simultaneously the N-terminal residues Asp-259, Ser-261, and Ser-263 to the hydrophobic alanine residues within the MIDAS motif prevented the expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 at the cell surface and consequently the increase of Ca<sup>2+</sup> currents through Cav1.2. Single-point mutations D259A and S261A impaired the ability of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 to co-immunoprecipitate with Cav1.2 and failed to up-regulate the channel activity. Using MD simulations, we propose that the side-chain at position Asp-259 and the oxygen atom of the side-chain of Ser-261 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 foster the folding of the MIDAS site by clasping the divalent cation within its binding site. In turn, this conformation is essential for promoting the optimal electrostatic interaction between Cav1.2 Asp-181 and the hydrogen atoms of the hydroxyl groups of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261.

## RESULTS

### *Electrostatic interactions are mediated by MIDAS residues at the Cav1.2- Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 interface*

We recently identified the negatively charged Asp-181 in the first extracellular loop of Cav1.2 as an essential determinant for the interaction with the extracellular Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein (Bourdin et al., 2017). To identify the molecular determinants of the interface, we had produced a 3-D model of the IS1S4 region using the molecular coordinates of the cryo-EM structure of the homologous Cav1.1 channel complex (PDB: 5GJV) (J. Wu et al., 2016a). The sequence identity between IS1S4 in Cav1.1 and Cav1.2 is 69.6% whereas VWA is perfectly conserved. Nonetheless, the molecular coordinates of the IS3S4 loop were not reported in the cryo-EM structure, and were reconstructed using Modeller (*see details in Materials and Methods*). The 3-D model was selected using a DOPE score of -37032 (between -37100 and -35578) and a molpdf score of 2147 (between 2144 and 3085). MD simulations suggest that Gly-262 and/or Ser-263 in the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were the most likely residues to interact with Asp-181 in the first extracellular loop of Cav1.2. Along with Asp-259, Ser-261, Thr-331, and Asp-363, Ser-263 is one of the 5 polar residues that form a perfect MIDAS motif in the rat isoform of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (**Fig. 1A**). X-ray crystallography structures of integrin proteins positions a single Mg<sup>2+</sup> enclosed within MIDAS residues although Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> could also occupy the binding site (San Sebastian et al., 2006). Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> are both plausible candidates to occupy the MIDAS at the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-Cav1.2 interface given the concentration of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions is roughly equivalent (in the mM range) in the extracellular medium of eukaryotic cells. We chose herein to perform the MD simulations in the presence of a Ca<sup>2+</sup> ion, mostly because the ion was included in the coordinates of the published cryo-EM structure (J. Wu et al., 2016a). The Ca<sup>2+</sup> ion was virtually inserted in the geometric center of the motif and its average position was adjusted by MD simulations.

MD simulations were carried out after the transmembrane helices of Cav1.2 (membrane protein) were embedded in a model dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) lipid bilayer containing 128 DPPC molecules (**Fig. 1B**). The hydrophobic tails of the lipid molecules in the plasma membrane appear to stabilize hydrophobic residues Ala-253, Leu-254, Gly-255 and

Gly-256 of the IS3S4 region within the plasma membrane. The protein-membrane system was solvated with water in the presence of 143 mM NaCl, 2 mM of MgCl<sub>2</sub> and 2 mM CaCl<sub>2</sub>. This 3-D model reached a steady-state after 1.1 ns equilibration with RMSD variations around 4.5 Å for simulations up to 25 ns, and this observation stood for 3 distinct trajectories. As seen, the negatively charged side chain of Cav1.2 Asp-181 is predicted in this model to face the hydrogen atoms from the hydroxyl groups of Ser-261 at a distance of 1.7 Å thus suggesting a key role for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 in enabling the interaction with Cav1.2.

***Multiple mutations of the MIDAS residues prevent cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and physical interaction with Cav1.2***

Co-immunoprecipitation assays were carried out to explore the contribution of MIDAS residues in promoting the interaction between Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. The importance of the polar side-chains was examined after substitution with the hydrophobic alanine residue at multiple MIDAS positions with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A/S261A/S263A (DSS/A), D259A/S261A/S263A/T331A (DSST/A), and D259A/S261A/S263A/D363A (DSSD/A). Assays were performed with untagged Cav1.2, mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA, and Cav $\beta$ 3-c-Myc using anti-c-Myc coated beads to bait the channel complex. For conciseness, the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct will be thereafter referred to as Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA. Under this protocol Cav $\beta$ 3-c-Myc binds to the magnetic beads and pulls down the Cav1.2-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 complex (**Fig. 2A**). As seen in the “input lane” in **Fig. 2B**, Cav1.2, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and mutants, and Cav $\beta$ 3 proteins were translated at the expected molecular weight of 250 kDa, 175 kDa and 60 kDa respectively, after recombinant expression in HEKT cells. Cav $\beta$ 3-c-Myc was captured by the beads under all experimental conditions and Cav1.2 successfully pulled down Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT (**Fig. 2C**). The ablation of the negative or polar side-chain in the MIDAS residues prevented the co-immunoprecipitation of any of the multiple mutants in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, even after a 200-s exposure. Two-color flow-cytometry assays (Bourdin et al., 2017; Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016) were performed to determine whether disrupting MIDAS also altered the cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. As detailed elsewhere (Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016), the cell surface expression of the constructs, relative to mCherry- Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, is assessed using the fluorescence intensity of an anti- hemagglutinin tag conjugated to

fluorescein isothiocyanate (anti-HA FITC) antibody directed against the extracellular HA tag inserted after the position Arg-676 in mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (**Fig. 2D**). Fluorescence intensity of the anti-HA FITC antibody measured in intact non-permeabilized cells provides an estimation of the cell surface expression of the construct while the fluorescence intensity measured after cell permeabilization is used as a marker of total protein expression. As seen, multiple mutations of the MIDAS residues significantly reduced the cell surface expression of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA to  $\approx$  10 % for the mutants (**Fig. 2E**). More importantly, multiple mutations were also seen to reduce the protein stability with a sharp decrease in the relative fluorescence for FITC measured in permeabilized cells (**Table 1**). This observation is in agreement with previous reports showing that co-expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 increases the total protein stability of Cav $\beta$ 3-bound Cav1.2 proteins and conversely co-expression of Cav1.2 increases the total protein stability of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 in the presence of Cav $\beta$ 3 (Bourdin et al., 2015). Altogether, these results indicate that the polar or negatively charged side-chains of the MIDAS residues contribute to the stability of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, its cell surface expression and its interaction with the pore-forming subunit of Cav1.2.

#### ***Functional modulation is intact with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 V260R***

Individual contributions from the side-chains of MIDAS residues were analyzed after substitutions to the positively charged Arginine (**Figs 3-4**) and to the neutral Alanine residue (**Figs 5-6**). This two-step strategy was meant to exclude residues that would remain functional following a non-conserved substitution that is predicted to alter the local electrical field. MIDAS residues as well as the intervening Val-260 and Gly-262 residues were sequentially mutated. All mcherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA single mutants expressed the mCherry tag and were trafficked at the plasma membrane (**Table 1**). Co-immunoprecipitation assays were carried out with c-Myc-coated beads to bait the channel complex. As seen in the “input lane” in **Fig. 3A**, Cav1.2, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and mutants, and Cav $\beta$ 3 proteins were translated at the expected molecular weight of 250 kDa, 175 kDa and 60 kDa respectively, after recombinant expression in HEKT cells. Cav $\beta$ 3 was captured by the beads under all experimental conditions and Cav1.2 successfully pulled down Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT (**Fig. 3B**). Not too surprisingly, the mutation to an arginine residue significantly impaired the ability for most Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 mutants,

save for V260R, to interact with Cav1.2. Longer exposure times allowed us to detect a small interaction with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262R and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S263R but no interaction was ever detected with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259R and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S261R. A separate series of experiments demonstrated that protein interaction was also somewhat conserved with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA T331R and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D363R in a fashion reminiscent of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262R and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S263R (*data not shown*). These results indicate that the side-chain at position Val-260 is not directly involved with the coordination of Ca<sup>2+</sup> binding while the side-chains at Asp-259 and Ser-261 play a critical role in this process. Examination of the 3-D model concurs that the main-chain atoms of Val-260 are facing Ca<sup>2+</sup> and that side-chain substitution does not alter that preferred configuration.

To establish a correlation between physical interaction and functional modulation, the impact of these mutations on channel function was examined after their recombinant expression in the presence of Cav1.2 and Cav $\beta$ 3 in HEKT cells (**Fig. 4A**). As previously published (Bourdin et al., 2017; Bourdin et al., 2015; Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016), co-expression of Cav1.2 and Cav $\beta$ 3 with the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT construct increases the peak current density by 7- to 10-fold from -2.5 pA/pF  $\pm$  0.3 (25) (no insert in the pmCherry vector) to -18  $\pm$  1 pA/pF (n = 359) (**Fig. 4B**). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA also caused a  $\approx$  -15 mV leftward shift in the activation potential of Cav1.2 from  $E_{0.5, act} = +8 \pm 2$  mV (n = 25) in the absence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 to  $E_{0.5, act} = -8.7 \pm 0.4$  kcal mol<sup>-1</sup> (n = 359) in the presence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA. While the negative shift was significant in our sample size, we observed some overlap between the two conditions with the corresponding  $\Delta G_{act}$  ranging from -1.5 to +0.2 kcal mol<sup>-1</sup> (33% peak at -0.6 kcal mol<sup>-1</sup>) for the WT channel combination while  $\Delta G_{act}$  ranged from -0.2 to +1.4 kcal mol<sup>-1</sup> (40% peak at +0.2 kcal mol<sup>-1</sup>) in the absence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (**Fig. 4C**). Upregulation of Cav1.2 currents was severely disrupted with all arginine mutants save for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V260R. Peak current density measured with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259R, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S261R, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262R, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S263R, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA T331R, and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D363R was significantly different from whole-cell currents measured with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT (p < 0.05). Furthermore, modulation by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S261R, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262R, and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D363R was indistinguishable from the current density obtained with the mock vector (**Table 2**).

Altogether, these results rule out a significant role for the side-chain at position 260. The addition of the long arginine side-chain at position 262 could locally impair flexibility in a region that plays a role in the interaction with the IS1S2 loop of Cav1.2.

### ***Functional modulation of Cav1.2 currents requires Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259 and Ser-261***

Mutant proteins of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were produced to investigate the molecular requirements for the protein interaction and functional modulation of Cav1.2 currents. Co-expression of Cav1.2/Cav $\beta$ 3 with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A, S261A, and G262A/S263A mutants produced whole-cell currents that were not significantly different than obtained in the presence of the mcherry mock vector (**Fig. 5A**) although these mutants were confirmed to form bona fide proteins that were detected at the cell surface (**Table 1**). In contrast, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262A, S263A, T331A, and D363A stimulated whole-cell currents without any alteration in the voltage-dependence of activation (**Fig. 5B-C**). In fact, there was a strong association between peak current density and the negative voltage-dependence of activation ( $\Delta G_{act}$ ) (**Fig. 5C and Table 2**) such that mutants yielding large whole-cell currents activated at negative membrane potentials. We did not identify any Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 mutant that simply disrupted the voltage-dependence of activation.

Peak current densities ranged from near-background whole-cell currents measured with the mock vector in the following sequence: Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 mock vector  $\approx$  D259A  $\approx$  G262A/S263A < S261A < G262A  $\approx$  D363A < S263A < T331A  $\approx$  Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT. It should be noted that conservative substitutions Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259E and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S261T produced Cav1.2 whole-cell currents that were similar to Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT (**Table 2**) indicating that the side-chains at Asp-259 and Ser-261 contribute significantly to channel modulation.

The structural requirements at position Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Gly-262 were further investigated (**Table 2**). A significant decrease in the channel function was also observed with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262T whereas co-expression with the negatively charged Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262D, predicted to project a negatively charged side-chain, failed to stimulate Cav1.2 currents suggesting that a polar or a



negative side-chain cannot compensate for the decreased flexibility of the residue at this position.

Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA S263A, S263G, S263R, and S263T were all associated with whole-cell currents that activated in a range of negative voltages associated with Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT (**Table 2**). The peak current densities, significantly higher than those recorded with the mock vector, suggest that the side-chain at this position does not contribute appreciably to the functional interaction with Ca<sub>v</sub>1.2 Asp-181.

Although Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA T331R modestly stimulated whole-cell currents, Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA T331G behaved as Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT (**Table 2**). This position is not always conserved in MIDAS hence residues adjacent to Thr-331 were also explored with Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA I330A and D332A. Both mutant proteins stimulated whole-cell currents with average peak current densities that were not significantly smaller than whole-cell currents obtained with Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT with  $p = 0.14$  ( $p > 0.05$ ). In addition, mutations of the negatively charged Glu-366 and Glu-367, located 3 and 4 amino acids away from Asp-363, with Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA E366A, Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA E366G, and Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA E366A/E367A failed to reveal additional contribution from negatively charged residues outside MIDAS (**Table 2**).

Channel function was also characterized by combining mutations from residues in Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA and Ca<sub>v</sub>1.2 that could come into atomic proximity in the virtual model of the protein interface with Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA T331A + Ca<sub>v</sub>1.2 S182A, Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA T331A + Ca<sub>v</sub>1.2 K257A, and Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA E363A + Ca<sub>v</sub>1.2 K257A in the presence of Ca<sub>v</sub>β3. These three pairs of mutant produced depolarization-activated whole-cell currents that were not significantly different than currents produced by Ca<sub>v</sub>α2δ1-HA WT + Ca<sub>v</sub>1.2 WT when recorded under the same conditions (**Table 2**). Altogether, charged mutations of MIDAS residues Ca<sub>v</sub>α2δ1 Asp-259 and Ca<sub>v</sub>α2δ1 Ser-261 were seen to impact more significantly on channel function than any other position herein tested.

*Mutations of MIDAS residues impair co-immunoprecipitation of Ca<sub>v</sub>α2δ1 with Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>2.3*

To investigate whether functional modulation requires high-affinity interaction between the two proteins at specific sites, co-immunoprecipitation assays were carried out with the single alanine mutants. Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA was used to bait the Cav1.2/Cav $\beta$ 3 complex using anti-HA coated magnetic beads (**Fig. 6A-B**). As seen, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, V260A, and T331A successfully pulled down Cav1.2 and Cav $\beta$ 3 (**Fig. 6B**). In contrast, co-immunoprecipitation of Cav1.2-Cav $\beta$ 3 complex was abolished with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A and S261A and significantly reduced, but not eliminated with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S263A and D363A. It is important to stress that the pull-down assays remain a tool largely qualitative. We have thus carried out co-immunoprecipitation assays using alternatively anti-c-Myc-coated beads to bait the Cav1.2/Cav $\beta$ 3 complex and obtained similar results.

Combining the G262A with the S263A mutation in the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262A/S263A mutant, completely eradicated co-immunoprecipitation suggesting that local conformation plays a role in these processes (*data not shown*). In contrast, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA E366A/E367A, situated just outside MIDAS, was easily pulled-down by Cav1.2 (*data not shown*) in agreement with the patch-clamp data. The signal for the Cav1.2 protein obtained in the presence of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA T331A remained remarkably strong confirming that the nature of the side-chain at this position does not contribute directly or indirectly to protein interaction.

The importance of MIDAS residues in mediating protein interaction was further established by carrying similar experiments with the neuronal Cav2.3 channel (Cav $\alpha$ 1E with auxiliary subunits) (Shakeri et al., 2012). Cav $\beta$ 3-c-Myc was used to bait the Cav2.3/Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA complex using anti-c-Myc coated magnetic beads (**Fig. 6C-D**). As seen, Cav $\beta$ 3 successfully pulled down Cav2.3/Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and Cav2.3/Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA T331A (**Fig. 6D**). In contrast, co-immunoprecipitation was abolished with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A, S261A, S263A, and D363A. Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259 and Ser-261 were herein shown to contribute to the interaction with Cav1.2 and Cav2.3. Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-263 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-363 play a more prominent role in the interaction with Cav2.3 than with Cav1.2 suggesting that the interface could be slightly different. In both channels however, substitution of the residue Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA Thr-331 does not impair protein interaction. Hence, four MIDAS residues contribute to different degrees to protein interaction in high-voltage- activated Ca<sup>2+</sup> channels.

## DISCUSSION

The GPI-anchored Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 protein is an intrinsic subunit of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels of the Cav1 and Cav2 families. It is an extracellular protein that comprises several structural domains including four CACHE domains in tandem with a single VWA domain. VWA-containing domains mediate protein-protein interaction in a wide variety of proteins located at the cell surface including integrins, collagens and complement factor (Whittaker & Hynes, 2002) and cartilage matrix proteins (Becker, Mikolajek, Werner, Paulsson, & Wagener, 2015). The VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 bears high sequence identity with the domain I of integrin (Canti et al., 2005; J. Wu et al., 2016a; J. Wu et al., 2015). This biological function is usually mediated via a conserved MIDAS motif that coordinates divalent cations at the protein-ligand interface (Shimaoka et al., 2002). The recently published high-resolution cryo-EM structure of the homologous Cav1.1 heteromeric complex supports a close interaction between residues of the VWA domain in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and extracellular loops from repeats I, II, and III of the pore-forming Cav $\alpha$ 1 subunit (J. Wu et al., 2016a). It also shows that the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 adopts a classic alpha/beta Rossmann fold (Rossmann, Moras, & Olsen, 1974) and contains a “perfect” MIDAS motif formed by residues Asp-259, Ser-261, Ser-263, Thr-331 and Asp-363 (rat numbering) (J. Wu et al., 2016a). Multiple primary sequence alignments carried out with the four isoforms of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-4) in human, rabbit, and rat species, revealed that four out of five MIDAS residues (Asp-259, Ser-261, Ser-263, Asp-363) are strictly conserved with the 4<sup>th</sup> position occupied by threonine being infrequent.

### *N-terminal residues in MIDAS mediate interaction with Cav1.2*

As we have previously shown, the interaction between Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 requires a negatively charged Aspartate or Glutamate residue at position Asp-181 in the first extracellular loop in the voltage sensor domain in repeat I of Cav1.2 (Bourdin et al., 2017). A single point mutation at this position is sufficient to prevent Ca<sup>2+</sup> influx above background levels. In contrast, we are currently demonstrating that many residues in the VWA domain of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 play a role in the protein interaction and functional modulation of whole-cell Ca<sup>2+</sup> currents by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. One of the most intriguing observations is the role played by Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1

Asp-259 in mediating protein interaction with Cav1.2. MD simulations carried out with our 3-D model of the WT complex (Cav1.2 IS1S4 - Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 VWA) indicate that the minimal distance between the two alpha carbon (C $\alpha$ ) of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259 and Cav1.2 Asp-181 is never smaller than 10.5 Å during the complete course of 25-ns simulations carried out with 3 trajectories. Within the limitations of simulations performed with a virtual 3-D model, such distance suggests that a direct interaction between the two proteins is not very likely.

In contrast to Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 is freely exposed at the cell surface and positioned to mediate the interaction with Cav1.2 Asp-181. MD simulations show that Ser-261 adopts many conformations over the 25-ns period. The oxygen atom of the side-chain hydroxyl group of Ser-261 interacts with the Ca<sup>2+</sup> ion while its hydrogen atom is seen to stabilize alternatively the carboxylate groups in the side-chains of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-259 and Cav1.2 Asp-181. The hydroxyl group is a stringent structural requirement as illustrated by the observation that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S261T mutant behaved essentially like Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT in patch-clamp experiments. Interactions are also possible between Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-263 and Cav1.2 Asp-181. MD simulations however show that the backbone of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-263 undergoes a high degree of fluctuations, which may account for the observation that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S263A and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S263R somewhat modulated Cav1.2 currents.

Without being part of the signature sequence of MIDAS, glycine residues often play essential structural role in the formation of loops (Kwasigroch, Chomilier, & Mornon, 1996). Mutations of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Gly-262 to hydrophobic or hydrophilic residues reduced the modulation of whole-cell currents. The analysis of MD simulations suggests that the carboxylate side-chain from Asp-181 interacts only occasionally with the main-chain hydrogen of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Gly-262. Nonetheless altering simultaneously the chemical properties of the side-chains at positions Gly-262 and Ser-263 disrupts the functional modulation of Cav1.2 currents.

Interaction between Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was also shown to mutually improve the stability of both proteins. The interaction needs to be sufficiently strong to withstand the pull-down assays. However, in order to determine the strength of this interaction using isothermal calorimetric and/or surface plasmon resonance assays would require purifying large quantities

of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 which were shown to be unstable when produced in regular bacterial systems (Briot, D'Avanzo, Sygusch, & Parent, 2016).

*Thr-331 plays a minor role in the interface in Cav1.2 and Cav2.3 channels*

The polar residue Thr-331 is also predicted to participate to Ca<sup>2+</sup> binding even though the fourth position in MIDAS is not strictly conserved, being often substituted by a flexible glycine residue (Yan & Sun, 1997). Mutations of Thr-331 to the hydrophobic residue with T331A produced only minor changes in protein/protein interaction in Cav1.2 and Cav2.3 channels and produced modest alterations, if any, in the functional modulation of Cav1.2 currents. MD simulations of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 T331A showed that the mutation induced a large structural reorganization of the MIDAS motif that preserved however the interaction of Ser-261 with Cav1.2 Asp-181. A role for Thr-331 cannot be completely excluded since functional modulation of Cav1.2 currents was decreased with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 T331R.

These results contrast with recent data published on the integrin-like regulatory subunit CLCA1. CLCA1 upregulates TMEM16A currents through a Mg<sup>2+</sup> - and MIDAS- dependent mechanism (Patel, Brett, & Holtzman, 2009) that stabilizes TMEM16A at the cell surface by preventing its internalisation (Sala-Rabanal, Yurtsever, Nichols, & Brett, 2015). Although the CLCA1 VWA domain contains also a five-residue MIDAS motif (Asp-312, Ser-314, Ser-316, Thr-383, and Asp-412) similar to Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, the molecular determinants of modulation might be slightly different between the two families of ion channels. Disruption of the MIDAS motif, in particular mutation of Ser-316 or Thr-383 to Ala (equivalent to Ser-263 and Thr-331), reduced the ability of CLCA1 VWA to modulate surface protein levels and activity of TMEM16A (Sala-Rabanal, Yurtsever, Berry, Nichols, & Brett, 2017). It is suggested that the molecular determinants responsible for the modulation of channel function by MIDAS residues in integrin-like proteins might command different parameters.

Whereas mutations in the N-terminal region of MIDAS disrupted protein interaction and modulation, mutations of the structurally similar Asp-363 were seen to produce a modest impact by decreasing but not abolishing interaction with the Cav1.2 protein and functional modulation of Cav1.2 currents. MD simulations suggest that this may result from the relatively

high exposure of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-363 to the solvent providing some additional degree of freedom to the side-chain.

***Divalent cation binding within MIDAS could stabilize protein/protein interaction***

By analogy with integrin I proteins, cation binding within the MIDAS motif of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 could play a role in strengthening the interaction with the pore-forming subunit of Cav1.2 (Kamata, Liddington, & Takada, 1999). Mutations of the MIDAS motif have been shown to prevent the binding of  $\alpha$ 2 I domain of integrin with collagen ligand (Bergelson & Hemler, 1995; Kamata et al., 1999). High-resolution structures of the  $\alpha$ L I domain of integrin in complex with the domain 1 of the intracellular adhesion molecules ICAM-1 and ICAM-3 have shown that the divalent cation within the MIDAS motif is mostly stabilized by five local residues with an additional contribution from the aspartate residue of the ligand (Luo, Carman, & Springer, 2007; Shimaoka et al., 2003). In the absence of the ligand, this site is filled in with a water molecule (Mahalingam et al., 2011). In order to gain additional mechanistic insight, we performed 25-ns MD simulations with the minimal 3-D model after virtually inserting the mutation Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A (**Fig. 7**). Comparison of the minimum-energy conformations in panels **A** (Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT) and **B** (Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A) shows that the substitution of Asp-259 by an alanine residue is associated with a change in the conformation of the MIDAS residues around the Ca<sup>2+</sup> ion. The hydrogen atom from the hydroxyl group contributed by the side-chain from Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 switches from mostly coordinating the Ca<sup>2+</sup> ion to forming a hydrogen bond with the carboxyl group of the side-chain from Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-363. As a result, the Ca<sup>2+</sup> ion is seen as being pushed away from MIDAS and away from Cav1.2 Asp-181 toward the extracellular aqueous medium. This structural rearrangement could account for the large adverse impact of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A on the co-immunoprecipitation and modulation of Cav1.2 currents. Hence the binding of the divalent cation within MIDAS could be an essential component in the three-part network that stabilizes the interaction between Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and Cav1.2. This proposition is congruent with structural studies showing that the transition between the open and the close conformations of integrins is mostly driven by the interaction with a divalent ion within the MIDAS motif (K. Zhang & Chen, 2012). We remain acutely aware that this working hypothesis is contingent to our virtual 3-D model and the parameters

we used for the MD simulations. As mentioned earlier, the 3-D model of the pore-forming subunit Cav $\alpha$ 1C was built from the atomic determinants of Cav $\alpha$ 1S with an adequate but far from perfect identity at the primary structure level (69%). In addition, the template failed to provide electronic density in some regions, notably the extracellular IS3S4 loop that was fully reconstructed. It thus remains to be seen whether longer MD simulations carried out with a virtual 3-D model of the two complete proteins (>500,000 atoms) would provide a similar picture.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Recombinant DNA techniques.* The rabbit Cav1.2 (GenBank X15539) and the rat Cav $\beta$ 3 (Genbank M88751) were subcloned in commercial vectors under the control of the CMV promoter as described elsewhere (Bourdin et al., 2016; Shakeri et al., 2012). The human Cav2.3 (GenBank L27745) was a generous gift from Dr Toni Schneider (Pereverzev et al., 2002). The coding sequence (1091 residues) of the rat brain Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 clone (Genbank NM\_012919) (Williams et al., 1992) was subcloned in the pmCherry-N1 vector and the hemagglutinin (HA) epitope (YPYDVPDYA) was inserted in the extracellular domain of Cav $\alpha$ 2 between Asp-676 and Arg-677, such that the HA epitope is accessible from the extracellular compartment and the mCherry is translated after the C-terminal. This construct enables the detection of the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins expressed at the cell surface as previously described (Bourdin et al., 2017; Bourdin et al., 2016; Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016). Point mutations were produced with the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (*New England Biolabs Inc., Whitby, Ontario, Canada*) in the pmCherry- Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct (or in a few rare instances in the pCMV-Cav1.2 construct) according to the manufacturer's instructions as described elsewhere (Bourdin et al., 2015; Tetreault et al., 2016). Briefly, substitutions were created by incorporating the desired mutation in the center of the forward primer, and the reverse primer is designed so that the 5' ends of the two primers anneal back-to-back. Following the PCR, a kinase-ligase-DpnI enzyme mixture was added to the amplified DNA for circularization and template removal before transformation into high-efficiency NEB DH5- $\alpha$  competent *E. coli*. All constructs were verified by automated double-stranded

sequence analysis (*Genomics Platform, IRIC, Université de Montréal, QC, Canada*). The protein expression at the correct molecular weight was confirmed by standard western-blot analysis for each construct as described below (Bourdin et al., 2017; Bourdin et al., 2015; Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016).

*Co-immunoprecipitation assay and western-blot analysis.* HEKT cells were transiently transfected with 4  $\mu\text{g}$  of pCMV-Cav $\beta$ 3-c-Myc and pCMV-Cav1.2 and pmCherry- Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants. One series of experiments was carried out (**Fig. 6C-D**) with pCMV-Cav $\beta$ 3-c-Myc and pCDNA3-Cav2.3 and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants. Two days after transfection, cells were homogenized in 20 mM NaMOPS (pH 7.4), 300 mM NaCl, and 1% digitonin supplemented with protease inhibitors (*ThermoFisher Scientific*). Homogenates were sonicated, incubated for 1 h at 4°C, and centrifuged at 16,000  $\times g$  for 30 min. The supernatant was kept and cell pellet was discarded. The protein concentration in the supernatant was determined using BCA protein assay (*ThermoFisher Scientific*). A small fraction (20  $\mu\text{g}$ ) of the supernatant was kept as the “input fraction”. The remaining  $\approx 600$   $\mu\text{g}$  of proteins were diluted with an equal volume of 20 mM NaMOPS (pH 7.4), 300 mM NaCl to have a final concentration of digitonin of 0.5%. Two different protocols were used for the co-immunoprecipitation assays using either Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA or Cav $\beta$ 3-c-Myc as the bait. In some cases (**Fig. 6A-B**), Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA was used as the bait to immunoprecipitate the Cav1.2/Cav $\beta$ 3 complex. Appropriate control experiments carried out with the three constructs confirmed that Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA was the only protein pulled out by the anti-HA coated beads (*data not shown*). The supernatant was then incubated overnight with 50  $\mu\text{l}$  of anti-HA magnetic beads (*ThermoFisher Scientific*) previously washed according to manufacturer’s instructions. In some other experiments (**Fig. 2B-C, Fig. 3, Fig. 6C-D**), Cav $\beta$ 3-c-Myc was used as the bait to immunoprecipitate the Cav1.2/Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 or the Cav2.3/ Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 complex. In these experiments, the supernatant was incubated overnight with 50  $\mu\text{l}$  of anti-c-Myc magnetic beads (*ThermoFisher Scientific*) previously washed according to manufacturer’s instructions. We have performed both assays with similar success although the signal for the pore-forming subunit Cav $\alpha$ 1 of Cav1.2 and Cav2.3 was larger in the presence of the anti-c-Myc beads.



Beads were collected using a PureProteome magnetic rack (*Millipore*). Magnetic beads were washed three times with 300  $\mu$ l of buffer containing 20 mM NaMOPS (pH 7.4), 300 mM NaCl, and 0.2% digitonin. The bound proteins were eluted with 20  $\mu$ l Laemmli buffer 2x at 95°C for 5 minutes, electrophoresed on an 8% SDS-polyacrylamide gel, and transferred onto a nitrocellulose membrane. Western blotting was carried out with anti-Cav $\beta$ 3 (*Alomone, 1:10000*), anti-Cav1.2 (*Alomone, 1:5000*), anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (*Alomone, Jerusalem, Israel, 1:1000*) and anti-GAPDH (*Sigma, 1:10000*) and then incubated with an anti-rabbit as secondary antibody (*Jackson ImmunoResearch, 1:10000*). Signals were detected with the ECL chemiluminescent substrate (*ThermoFisher Scientific*) and blots were visualized with the ChemiDoc Touch system (*Bio-Rad*).

*Flow cytometry assays.* Flow cytometry experiments were carried out to evaluate the cell surface expression of the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and mutants. Stably Cav $\beta$ 3 cells were transiently transfected with 4  $\mu$ g of pCMV-Cav1.2 WT and 4  $\mu$ g of pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants. Experiments were conducted and analyzed as published before (Bourdin et al., 2017; Bourdin et al., 2015; Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016) and described in greater details elsewhere (Bourdin et al., 2016). Briefly, the cell surface expression of the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT was detected with the FITC-conjugated mouse monoclonal anti-HA epitope tag antibody at 5  $\mu$ g/mL (*Sigma-Aldrich*). To determine the total quantity of both intracellular and extracellular expression of the tagged proteins, cells were fixed and permeabilized using BD Cytofix / Cytoperm™ Fixation / Permeabilization Solution Kit (*Becton Dickinson Biosciences, Mississauga, ON, Canada*). Roughly 10,000 cells were counted using a FACS Aria III® SORP flow cytometer (*Becton Dickinson Biosciences*). The control conditions were carried out in triplicate with each series of experiments: a) untransfected Cav $\beta$ 3 cells without the anti-HA FITC antibody; b) untransfected Cav $\beta$ 3 cells with the anti-HA FITC antibody to assess the level of background staining; c) Cav $\beta$ 3 cells transfected with pCMV-Cav1.2 WT and pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, the latter serving as a quality control of transfection. Expressing mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT in HEKT cells

produced a 1-log increase in the FITC (“x” axis) and a 3-log increase in mCherry fluorescence (“y” axis) on two-dimensional dot plots.

Flow cytometry data were analyzed using the FlowJo software, version 10 (*TreeStar, Ashland, OR 97520*) as described in (Bourdin et al., 2016). Relative expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was calculated based on  $\Delta$ Median Fluorescence Intensity ( $\Delta$ MedFI) for each fluorophore (mCherry or FITC).  $\Delta$ MedFI for FITC measured in intact non-permeabilized cells was used as a relative index of the steady-state cell surface expression of the HA-tagged Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 while the  $\Delta$ MedFI for mCherry attested that the protein was translated until the C-terminal.  $\Delta$ MedFI values were normalized to the maximum value measured the same day for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT expressed under the same conditions. The normalized  $\Delta$ MedFI values for mCherry measured for each mutant in intact and permeabilized cells were not significantly different from one another ( $p > 0.1$ ) (*data not shown*) suggesting that the cell permeabilization procedure did not distort significantly the relative fluorescence readout under most conditions.

*Patch-clamp experiments in HEKT cells.* Whole-cell patch-clamp experiments were carried out on isolated cells after transfection in HEKT cells in the presence of the peGFP vector coding for the Green Fluorescence Protein (GFP) (0.2  $\mu$ g) as a control for transfection efficiency. Only the GFP-positive cells were patched. Electrodes were filled with a solution containing (in mM): 140 CsCl; 0.6 NaGTP; 3 MgATP; 10 EGTA; 10 HEPES; titrated to pH 7.3 with NaOH with a resistance varying between 2.8 and 3.2 M $\Omega$  (megaOhms). Cells were bathed in a modified Earle’s saline solution (in mM): 135 NaCl; 20 TEACl; 2 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES, titrated to pH 7.3 with KOH. On-line data acquisition was achieved with the Axopatch 200-B amplifier (*Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*) connected with the PClamp software Clampex 10.5 through the Digidata 1440A acquisition system (*Molecular Devices*) (Bourdin et al., 2017). A series of 450 ms-voltage pulses were applied from a holding potential of -100 mV at a frequency of 0.2 Hz, from -60 to +70 mV at 5 mV intervals. Series resistance was compensated to ~85% after online capacitive transient cancellation. Unless stated otherwise, whole-cell currents were sampled at 5 kHz and filtered at 1 kHz. PClamp software Clampfit 10.4 was used for data analysis. Mid-potential of activation values ( $E_{0.5,act}$ )

were estimated from the peak I-V curves obtained for each channel composition and were reported as the mean of individual measurements  $\pm$  S.E.M (Bourdin et al., 2015). The free energy of activation was calculated using the mid-activation potential:

$$\Delta G_{act} = z \cdot F \cdot E_{0.5,act} \quad (1)$$

where  $z$  is the effective charge displacement during activation, and  $F$  is the Faraday constant. The r100 ratio, defined as the ratio of peak whole-cell currents remaining after a depolarizing pulse of 100 ms ( $I_{100ms} / I_{Peak}$ ), was calculated for each mutant. As there was no significant change in the channel kinetics, these values were not reported herein. To assess for internal consistency, the experiments carried out with novel mutants systematically included a control experiment performed with pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT (*pCMV-Cav1.2 WT + pCMV-Cav $\beta$ 3 + pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT*) thus explaining the larger sample size for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT. Previous experiments confirmed that mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT sustains the functional modulation of Cav1.2 currents (Bourdin et al., 2015; Wall-Lacelle et al., 2011). Experiments performed under the same conditions yielded peak current densities that could vary by as much as  $\pm$  45% between each series of transfections. This variation appeared to be essentially linked to minor changes in the cell density at the time of transfection. Data from all experiments performed under the same conditions were pooled and biophysical properties are reported in **Table 2**. Experiments were performed at room temperature (22°C).

*3-D Homology Modeling.* The atomic coordinates of the Cav $\alpha$ 1 protein from Cav1.1 (Protein Data Bank 5GJV.pdb) were used to explore the 3-D structure of Cav1.2. The primary sequence of the transmembrane segment S1 to S4 in repeat I (residues 32-179) of the rabbit Cav1.2 (Genbank X15539) shares 69.6% identity with the same region of the rabbit Cav1.1. The primary sequence of the VWA domain of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (our construct, Genbank NM\_012919) between amino acids 249 to 439 is perfectly conserved between both species. Amino acids 135 to 281 in Cav1.2 and amino acids 249 to 439 of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 were simultaneously aligned to the atomic coordinates of PDB 5GJV using the align2D algorithm in Modeller9.17 (Webb & Sali, 2017). Modeller 9.17 was used to generate one hundred 3-D models and the models with the lowest values for the molpdf parameters and DOPE (Discrete

Optimized Protein Energy) score (M. Y. Shen & Sali, 2006) were selected. The DOPE parameter is a statistical potential used to assess the energy of the protein model generated through many iterations by Modeller, which produces homology models by the satisfaction of spatial restraints.

The extracellular loop linking helix S3 and helix S4 was missing in the cryo-EM structure and was reconstructed using the “Automatic loop refinement” protocol in Modeller with slow refinement level parameter. More than hundred 3-D models generated that contain the S3-S4 loop, we selected the “best model” with the lowest DOPE score and molpdf parameters to conduct MD simulations.

*Molecular dynamics simulations.* MD simulations of the Cav1.2-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 interface were conducted using GROMACS version 2016.3, single-precision (Mark James Abraham, 2015). We used the 3-D model (Fig. 1) as the input structure and a Ca<sup>2+</sup> ion was virtually inserted into the MIDAS site. The ion was initially positioned at the geometric center of the negatively polarized/charged groups of the five MIDAS residues. The side-chain oxygen position was used for the serine and threonine amino acids, and the midpoint of the two side-chain oxygen atoms was used for the two aspartic acid residues. This crude positioning was deemed sufficient since the ion was not constrained during energy minimization and could thus adopt a more favorable position.

The transmembrane regions S1 to S4 from the repeat I of Cav1.2 (IS1S4) were inserted in a membrane bilayer consisting of 128 DPPC molecules. The bilayer model was also obtained from Dr Peter Tieleman's website (<http://wcm.ucalgary.ca/tieleman/downloads>) in accordance with the protocol developed by Berger, Edholm and Jähnig (O. Berger, Edholm, & Jahnig, 1997). The insertion in the membrane was done by hand by looking at aligning hydrophobic residues in the bilayer and comparing the result with the cryo-EM electron density map to optimize the protein positioning. The membrane was then packed around the proteins using the InflateGRO protocol (Schmidt & Kandt, 2012).

*Minimization, equilibration, and production.* The GROMOS53A6 force field (Oostenbrink et al., 2004) was used for the simulations, with the parameters for the DPPC molecules obtained from Dr. Peter Tieleman's website as described above. Solvation was done using the InflateGRO protocol with temporarily enlarged Van de Waals radii for carbon atoms to prevent water molecules from being inserted in the membrane (1.5 Å is the standard value, 3.75 Å was used). A saline solution containing the following physiological concentrations: 143 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 2 mM MgCl<sub>2</sub> was used and the protein charge was neutralized with Cl<sup>-</sup> ions. The equilibration phases and production simulations were conducted at 323K, a value slightly above the phase transition of DPPC which was measured to be at 315 °K (Nagle, 1993). This ensured proper fluidity as opposed to gel-like behavior under the phase transition temperature.

Energy minimization was conducted with a target maximal force (F<sub>max</sub>) of no more than 100 kJ•mol<sup>-1</sup>•nm<sup>-1</sup>, a maximal number of steps of 50000 and a step size of 0.1 Å. F<sub>max</sub> converged to the desired value in less than 750 steps for all the trajectories presented in this work. Equilibration was first conducted using an NVT ensemble (constant Number of particles, Volume, and Temperature) for 100 ps, followed by a second phase using an NPT ensemble (constant Number of particles, Pressure, and Temperature) for 1 ns. Production runs of 25 ns were then computed with a 2 fs timestep, saving coordinates, energy and velocities every 25 ps.

For the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A models of the Cav1.2-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 interface, the above steps were repeated for five replicates. Since large regions of the Cav1.2 protein are missing in our 3-D model, we kept for each form of the complex the three trajectories that showed the least structural divergence across the duration of the 25-ns trajectory as determined by their RMSD values compared with the initial structure (*data not shown*).

*Statistics.* Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Tests of significance were carried out using the unpaired on-way ANOVA with the Tukey Test embedded in the Origin 7.0 analysis software (*OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA*). Unless stated otherwise, data were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr Rémy Sauvé for critical reading of the manuscript and the Bevan lab for their tutorial on membrane protein simulations which can be found at ([http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx-tutorials/membrane\\_protein/index.html](http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx-tutorials/membrane_protein/index.html)). This work was completed with the operating grant 130256 from the Canadian Institutes of Health Research and grant G-15-0009329 from the Canadian Heart and Stroke Foundation to L.P. R.N is a Junior 2 scholar from “Fonds de la recherche du Québec en santé”. O.M. is a recipient of a Ph.D. award from “Fonds de la recherche du Québec en nature et technologie”.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they do not have any conflict of interest with the contents of this manuscript.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.B. was co-responsible for the homology modeling and carried out the co-immunoprecipitation assays. O.M. was co-responsible for the homology modeling and carried out the molecular dynamics stimulation. B.B. conducted and analyzed the patch-clamp experiments. M.P.T. performed and analyzed flow-cytometry experiments. B.B., J.B., and M.P.T. produced the mutants. R.M. supervised molecular dynamics simulations. L.P. coordinated the study and interpreted the data. J.B. and L.P wrote the manuscript. All authors contributed to the design of the experiments, reviewed the results, and approved the final version of this manuscript.

## REFERENCES

1. Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015) SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic acids research* **43**, D257-260

2. Whittaker, C. A., and Hynes, R. O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Molecular biology of the cell* **13**, 3369-3387
3. Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A., and Collier, R. J. (2004) Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6367-6372
4. Pihlajamaa, T., Kajander, T., Knuuti, J., Horkka, K., Sharma, A., and Permi, P. (2013) Structure of Plasmodium falciparum TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von Willebrand factor A homologues. *The Biochemical journal* **450**, 469-476
5. Edwards, Y. J., and Perkins, S. J. (1995) The protein fold of the von Willebrand factor type A domain is predicted to be similar to the open twisted beta-sheet flanked by alpha-helices found in human ras-p21. *Febs Lett* **358**, 283-286
6. Craig, D., Gao, M., Schulten, K., and Vogel, V. (2004) Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. *Structure* **12**, 2049-2058
7. Springer, T. A. (2006) Complement and the multifaceted functions of VWA and integrin I domains. *Structure* **14**, 1611-1616
8. Colombatti, A., and Bonaldo, P. (1991) The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* **77**, 2305-2315
9. Tuckwell, D. (1999) Evolution of von Willebrand factor A (VWA) domains. *Biochemical Society transactions* **27**, 835-840
10. Shimaoka, M., Takagi, J., and Springer, T. A. (2002) Conformational regulation of integrin structure and function. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **31**, 485-516

11. Lee, J. O., Bankston, L. A., Arnaout, M. A., and Liddington, R. C. (1995) Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* **3**, 1333-1340
12. Valdramidou, D., Humphries, M. J., and Mould, A. P. (2008) Distinct roles of beta1 metal ion-dependent adhesion site (MIDAS), adjacent to MIDAS (ADMIDAS), and ligand-associated metal-binding site (LIMBS) cation-binding sites in ligand recognition by integrin alpha2beta1. *The Journal of biological chemistry* **283**, 32704-32714
13. Van Petegem, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., and Minor, D. L. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* **429**, 671-675
14. Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A. T., Wratten, J., Douglas, L., and Dolphin, A. C. (2007) Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends in pharmacological sciences* **28**, 220-228
15. Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., and Yan, N. (2015) Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* **350**, aad2395
16. Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., and Yan, N. (2016) Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* **537**, 191-196
17. Tetreault, M. P., Bourdin, B., Briot, J., Segura, E., Lesage, S., Fiset, C., and Parent, L. (2016) Identification of Glycosylation Sites Essential for Surface Expression of the CaValpha2delta1 Subunit and Modulation of the Cardiac CaV1.2 Channel Activity. *The Journal of biological chemistry* **291**, 4826-4843
18. Segura, E., Bourdin, B., Tetreault, M. P., Briot, J., Allen, B. G., Mayer, G., and Parent, L. (2017) Proteolytic cleavage of the hydrophobic domain in the CaValpha2delta1 subunit improves assembly and activity of cardiac CaV1.2 channels. *The Journal of biological chemistry* **292**, 11109-11124
19. Bourdin, B., Briot, J., Tetreault, M. P., Sauve, R., and Parent, L. (2017) Negatively charged residues in the first extracellular loop of the L-type CaV1.2 channel anchor the



interaction with the CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 auxiliary subunit. *The Journal of biological chemistry* **292**, 17236-17249

20. Dolphin, A. C. (2013) The  $\alpha$ 2 $\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et biophysica acta* **1828**, 1541-1549

21. San Sebastian, E., Mercero, J. M., Stote, R. H., Dejaegere, A., Cossio, F. P., and Lopez, X. (2006) On the affinity regulation of the metal-ion-dependent adhesion sites in integrins. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 3554-3563

22. Bourdin, B., Shakeri, B., Tetreault, M. P., Sauve, R., Lesage, S., and Parent, L. (2015) Functional characterization of CaV $\alpha$ 2 $\delta$  mutations associated with sudden cardiac death. *The Journal of biological chemistry* **290**, 2854-2869

23. Shakeri, B., Bourdin, B., Demers-Giroux, P. O., Sauve, R., and Parent, L. (2012) A quartet of leucine residues in the guanylate kinase domain of CaV $\beta$  determines the plasma membrane density of the CaV2.3 channel. *The Journal of biological chemistry* **287**, 32835-32847

24. Becker, A. K., Mikolajek, H., Werner, J. M., Paulsson, M., and Wagener, R. (2015) Characterization of recombinantly expressed matrilin VWA domains. *Protein expression and purification* **107**, 20-28

25. Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Hebllich, F., Wratten, J., Richards, M. W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K. M., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of  $\alpha$ 2 $\delta$  subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11230-11235

26. Rossmann, M. G., Moras, D., and Olsen, K. W. (1974) Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194-199

27. Kwasigroch, J. M., Chomilier, J., and Mornon, J. P. (1996) A global taxonomy of loops in globular proteins. *J Mol Biol* **259**, 855-872

28. Briot, J., D'Avanzo, N., Sygusch, J., and Parent, L. (2016) Three-Dimensional Architecture of the L-Type Calcium Channel: Structural Insights into the CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Auxiliary Protein. *Biochemistry & Molecular Biology Journal* **Vol. 2**. 10.21767/2471-8084.100025.
29. Yan, B. X., and Sun, Y. Q. (1997) Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *The Journal of biological chemistry* **272**, 3190-3194
30. Patel, A. C., Brett, T. J., and Holtzman, M. J. (2009) The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. *Annu Rev Physiol* **71**, 425-449
31. Sala-Rabanal, M., Yurtsever, Z., Nichols, C. G., and Brett, T. J. (2015) Secreted CLCA1 modulates TMEM16A to activate Ca(2+)-dependent chloride currents in human cells. *eLife* **4**
32. Sala-Rabanal, M., Yurtsever, Z., Berry, K. N., Nichols, C. G., and Brett, T. J. (2017) Modulation of TMEM16A channel activity by the von Willebrand factor type A (VWA) domain of the calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1). *The Journal of biological chemistry* **292**, 9164-9174
33. Kamata, T., Liddington, R. C., and Takada, Y. (1999) Interaction between collagen and the alpha(2) I-domain of integrin alpha(2)beta(1). Critical role of conserved residues in the metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) region. *The Journal of biological chemistry* **274**, 32108-32111
34. Bergelson, J. M., and Hemler, M. E. (1995) Integrin-ligand binding. Do integrins use a 'MIDAS touch' to grasp an Asp? *Current biology : CB* **5**, 615-617
35. Luo, B. H., Carman, C. V., and Springer, T. A. (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology* **25**, 619-647
36. Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J. H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C. D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J. H., and Springer, T. A. (2003) Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* **112**, 99-111
37. Mahalingam, B., Ajroud, K., Alonso, J. L., Anand, S., Adair, B. D., Horenstein, A. L., Malavasi, F., Xiong, J. P., and Arnaout, M. A. (2011) Stable coordination of the inhibitory

Ca<sup>2+</sup> ion at the metal ion-dependent adhesion site in integrin CD11b/CD18 by an antibody-derived ligand aspartate: implications for integrin regulation and structure-based drug design. *Journal of immunology* **187**, 6393-6401

38. Zhang, K., and Chen, J. (2012) The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell adhesion & migration* **6**, 20-29

39. Bourdin, B., Segura, E., Tetreault, M. P., Lesage, S., and Parent, L. (2016) Determination of the Relative Cell Surface and Total Expression of Recombinant Ion Channels Using Flow Cytometry. *Journal of visualized experiments : JoVE*. doi: 10.3791/54732.

40. Pereverzev, A., Leroy, J., Krieger, A., Malecot, C. O., Hescheler, J., Pfitzer, G., Klockner, U., and Schneider, T. (2002) Alternate splicing in the cytosolic II-III loop and the carboxy terminus of human E-type voltage-gated Ca(2+) channels: electrophysiological characterization of isoforms. *Molecular and cellular neurosciences* **21**, 352-365

41. Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (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

42. Wall-Lacelle, S., Hossain, M. I., Sauve, R., Blunck, R., and Parent, L. (2011) Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)2.3 calcium channel. *The Journal of biological chemistry* **286**, 27197-27205

43. Webb, B., and Sali, A. (2017) Protein Structure Modeling with MODELLER. *Methods in molecular biology* **1654**, 39-54

44. Shen, M. Y., and Sali, A. (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein science : a publication of the Protein Society* **15**, 2507-2524

45. Mark James Abraham, T. M., Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, Erik Lindahl. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1-2**, 19-25

46. Berger, O., Edholm, O., and Jahnig, F. (1997) Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys J* **72**, 2002-2013
47. Schmidt, T. H., and Kandt, C. (2012) LAMBADA and InflateGRO2: efficient membrane alignment and insertion of membrane proteins for molecular dynamics simulations. *Journal of chemical information and modeling* **52**, 2657-2669
48. Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., and van Gunsteren, W. F. (2004) A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of computational chemistry* **25**, 1656-1676
49. Nagle, J. F. (1993) Area/lipid of bilayers from NMR. *Biophys J* **64**, 1476-1481

## FOOTNOTES

The abbreviations used are: 3-D: Three-dimensional; Cryo-EM: Cryo-electron microscopy; DPPC: Dipalmitoylphosphatidylcholine; FITC: fluorescein isothiocyanate;  $\Delta G_{act}$ : Free energy of activation; HA: Hemagglutinin;  $\Delta MedFI$ :  $\Delta$ Median Fluorescence Intensity; MD simulations: Molecular Dynamics simulations, MIDAS: Metal Ion-Dependent Adhesion Site, RMSD: Root Mean Square Deviation; VWA: Von Willebrand factor type A; WT: Wild-Type.

Cav1.2 + Cavβ3	Relative ΔMedian fluorescence intensity (%) FITC-conjugated anti-HA	
	Cell surface - Intact cells	Total - Permeabilized cells
+ mCherry-Cavα2δ1-HA WT	92 ± 3 (12)	97 ± 0.9 (12)
D259A/S261A/S263A	10 ± 0.05 (3)**	36 ± 0.3 (3)**
D259A/S261A/S263A/D363A	6 ± 0.09 (3)**	31 ± 0.3 (3)**
D259A/S261A/S263A/T331A	11 ± 0.1 (3)**	33 ± 0.5 (3)**
D259A	55 ± 4 (3)**	81 ± 3 (3)**
D259R	20 ± 0.8 (3)**	73 ± 1 (3)**
V260A	77 ± 7 (3)*	99 ± 1 (3)
V260R	48 ± 3 (3)**	97 ± 1 (3)
S261A	36 ± 2 (3)**	72 ± 2 (3)**
S261R	39 ± 0.1 (3)**	66 ± 1 (3)**
G262A	110 ± 8 (3)*	95 ± 4 (3)
G262R	92 ± 0.5 (3)	87 ± 2 (3)**
S263A	97 ± 4 (3)	94 ± 0.3 (3)
S263R	105 ± 2 (3)*	86 ± 0.7 (3)**
T331A	133 ± 5 (3)**	106 ± 2 (3)*
T331G	103 ± 7 (3)	98 ± 2 (3)
T331R	108 ± 8 (3)	88 ± 2 (3)**
D363A	113 ± 9 (3)	89 ± 1 (3)*
D363G	92 ± 5 (3)	85 ± 1 (3)**
D363R	43 ± 3 (3)**	66 ± 1 (3)**

**TABLE 1: Cell surface expression of Cavα2δ1.** Stable HEKT Cavβ3 cells were transiently transfected simultaneously with 4 μg of pCMV-Cav1.2 and 4 μg of pmCherry-Cavα2δ1 HA WT or mutants. Flow cytometry was used to determine the proportion of Cavα2δ1 protein expressed at the cell surface as reported in the “intact cells” column whereas “permeabilized cells” column represent the total expression level of the protein. Fluorescence intensity was estimated using FlowJo software® as detailed elsewhere (Bourdin et al., 2016). The relative cell surface expression of Cavα2δ1-HA constructs was estimated by calculating the ratio of the ΔMedian Fluorescence Intensity (ΔMedFI) for the FITC fluorophore over ΔMedFI values quantified for the FITC fluorophore for the WT construct (ΔMedFI mutant / ΔMedFI WT) in

intact non-permeabilized cells for experiments carried out the same day under the same conditions. The relative total expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 constructs was estimated by calculating the ratio of the  $\Delta$ MedFI values quantified for the FITC fluorophore over  $\Delta$ MedFI values quantified for the FITC fluorophore for the WT construct after cell permeabilization. These ratios are expressed herein as a percentage. The total number of experiments is provided in parentheses, with each experiment being the result of a different transfection in a separate cell dish (>10,000 cells). Statistical analysis was carried out against the  $\Delta$ MedFI for FITC measured with pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT. \* p < 0.05 and \*\* p < 0.001.

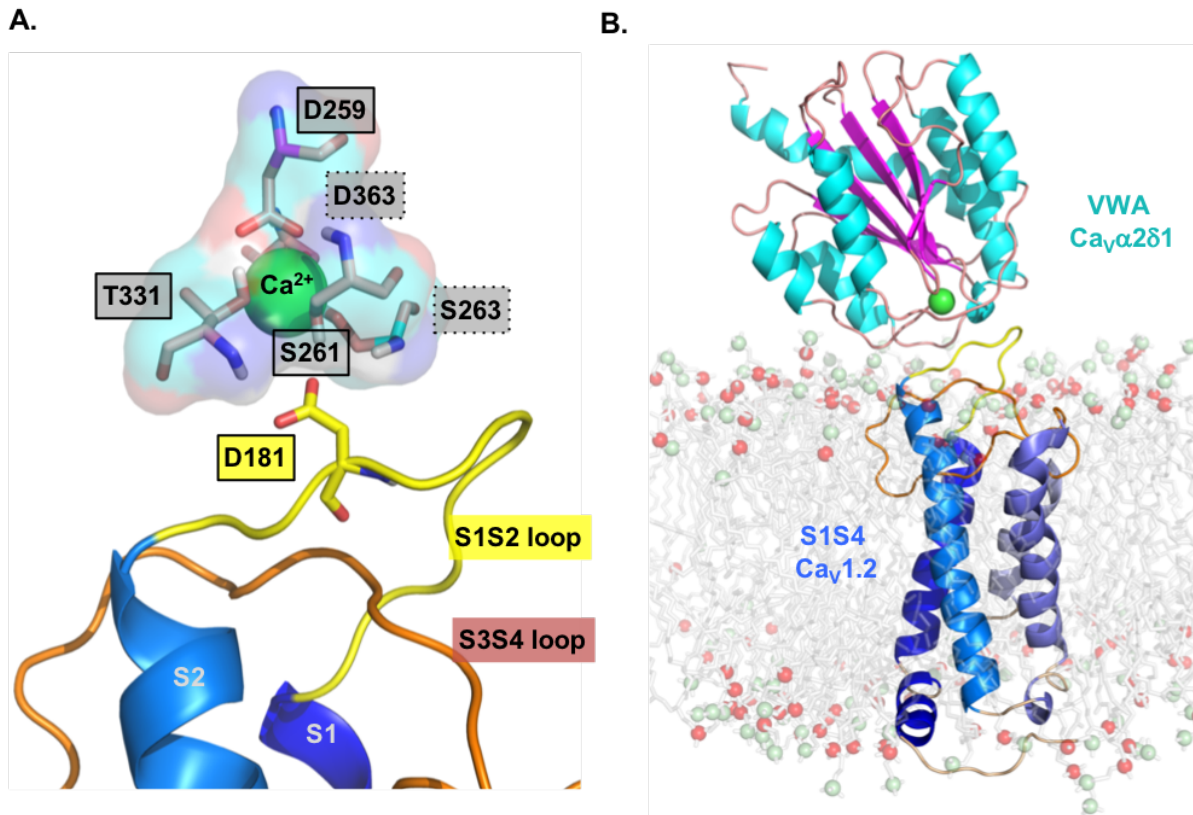
mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants with Cav1.2 WT + Cav $\beta$ 3 in HEKT cells	Electrophysiological Properties in 2 mM Ca $^{2+}$		
	Peak current density (pA/pF)	E $_{0.5,act}$ (mV)	$\Delta$ Gact (kcal mol $^{-1}$ )
mCherry mock vector	-2.5 $\pm$ 0.3 (25) <sup>2</sup>	+8 $\pm$ 2	+0.5 $\pm$ 0.1
Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT	-18 $\pm$ 1 (359) <sup>1</sup>	-8.7 $\pm$ 0.4	-0.77 $\pm$ 0.04
D259A/S261A/S263A/ T331A	-1.7 $\pm$ 0.3 (8) <sup>2</sup>	+19 $\pm$ 5	+0.6 $\pm$ 0.2
D259A/S261A/S263A/ D363A	-1.6 $\pm$ 0.2 (8) <sup>2</sup>	+24 $\pm$ 5	+1 $\pm$ 0.2
D259A/S261A/S263A	-1.9 $\pm$ 0.4 (8) <sup>2</sup>	+24 $\pm$ 3	+1.1 $\pm$ 0.1
S261A/G262A/S263A	-1.9 $\pm$ 0.4 (7) <sup>2</sup>	+9 $\pm$ 8	+0.2 $\pm$ 0.2
G262A/S263A	-2 $\pm$ 1 (8) <sup>2</sup>	+12 $\pm$ 5	+0.9 $\pm$ 0.2
D259A	-3.7 $\pm$ 0.9 (14) <sup>2</sup>	+3 $\pm$ 2	+0.1 $\pm$ 0.1
D259E	-21 $\pm$ 5 (8) <sup>1</sup>	-11 $\pm$ 1	-1.1 $\pm$ 0.2
D259R	-5 $\pm$ 2 (8) <sup>2</sup>	-1 $\pm$ 2	-0.1 $\pm$ 0.2
V260A	-10 $\pm$ 2 (26) <sup>1</sup>	-5 $\pm$ 1	-0.5 $\pm$ 0.1
V260G	-14 $\pm$ 4 (8) <sup>1</sup>	-10 $\pm$ 1	-0.9 $\pm$ 0.1
V260R	-16 $\pm$ 2 (30) <sup>1</sup>	-7 $\pm$ 1	-0.63 $\pm$ 0.08
S261A	-5 $\pm$ 2 (19) <sup>2</sup>	+2 $\pm$ 2	+0.1 $\pm$ 0.1
S261G	-1.5 $\pm$ 0.7 (6) <sup>2</sup>	+15 $\pm$ 6	+0.5 $\pm$ 0.4
S261R	-3 $\pm$ 1 (7) <sup>2</sup>	+4 $\pm$ 2	+0.2 $\pm$ 0.1
S261T	-33 $\pm$ 6 (8) <sup>1</sup>	-1 $\pm$ 2	-0.1 $\pm$ 0.1
G262A	-8 $\pm$ 1 (42) <sup>1,2</sup>	-3 $\pm$ 1	-0.4 $\pm$ 0.1
G262D	-2.9 $\pm$ 0.5 (8) <sup>2</sup>	+4 $\pm$ 5	+0.1 $\pm$ 0.2
G262R	-2.2 $\pm$ 0.4 (9) <sup>2</sup>	+6 $\pm$ 4	+0.1 $\pm$ 0.1
G262T	-6 $\pm$ 1 (13) <sup>1,2</sup>	-1 $\pm$ 2	-0.2 $\pm$ 0.1
S263A	-13 $\pm$ 2 (26) <sup>1</sup>	-4 $\pm$ 2	-0.5 $\pm$ 0.1
S263G	-15 $\pm$ 4 (11) <sup>1</sup>	-9 $\pm$ 1	-0.9 $\pm$ 0.2
S263R	-6 $\pm$ 2 (8) <sup>2</sup>	-4 $\pm$ 1	-0.3 $\pm$ 0.1
S263T	-12 $\pm$ 6 (11) <sup>1</sup>	-8 $\pm$ 1	-0.7 $\pm$ 0.1
I330A	-14 $\pm$ 4 (8) <sup>1</sup>	-4 $\pm$ 1	-0.4 $\pm$ 0.1
T331A	-22 $\pm$ 3 (27) <sup>1</sup>	-12 $\pm$ 1	-1.1 $\pm$ 0.1
T331G	-30 $\pm$ 7 (9) <sup>1</sup>	-9 $\pm$ 2	-0.9 $\pm$ 0.2
T331R	-7 $\pm$ 3 (8) <sup>2</sup>	-5 $\pm$ 3	-0.4 $\pm$ 0.2
D332A	-8 $\pm$ 2 (8) <sup>1,2</sup>	-4 $\pm$ 1	-0.4 $\pm$ 0.1
D363A	-8 $\pm$ 3 (18) <sup>1,2</sup>	-2 $\pm$ 2	-0.2 $\pm$ 0.1

<b>D363G</b>	$-13 \pm 3$ (9) <sup>1</sup>	$-7 \pm 1$	$-0.6 \pm 0.1$
<b>D363R</b>	$-2 \pm 1$ (8) <sup>2</sup>	$+2 \pm 2$	$+0.1 \pm 0.1$
<b>E366A</b>	$-38 \pm 8$ (11) <sup>1</sup>	$-3.4 \pm 2.6$	$-0.4 \pm 0.2$
<b>E366G</b>	$-28 \pm 5$ (9) <sup>1</sup>	$-2 \pm 2$	$-0.1 \pm 0.2$
<b>E366A/E367A</b>	$-13 \pm 2$ (14) <sup>1</sup>	$-6 \pm 1$	$-0.5 \pm 0.1$
<b>T331A + Cav1.2 S182A</b>	$-33 \pm 8$ (8) <sup>1</sup>	$-9 \pm 2$	$-1 \pm 0.3$
<b>T331A + Cav1.2 K257A</b>	$-22 \pm 4$ (9) <sup>1</sup>	$-13 \pm 1$	$-1.2 \pm 0.1$
<b>E363A + Cav1.2 K257A</b>	$-28 \pm 6$ (7) <sup>1</sup>	$-9 \pm 3$	$-1 \pm 0.3$

**TABLE 2: Biophysical properties of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and mutants.** Cav1.2 WT (or mutant in a few cases) was co-expressed with Cav $\beta$ 3 and either pmCherry-mock vector or pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants using a 4  $\mu$ g: 4  $\mu$ g: 4  $\mu$ g ratio. Biophysical parameters were measured in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> as described elsewhere (Bourdin et al., 2017; Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016). Activation properties ( $E_{0.5,act}$  and  $\Delta G_{act}$ ) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation. Only the GFP-positive cells with voltage-activated currents were kept for further analysis. Null-current cells outnumbered the cells with inward currents for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A/ S261A/ S263A/ T331A, mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A/ S261A/ S263A/ D363A, mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A/ S261A/ S263A, mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA S261A/ G262A/ S263A, and mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA G262A/ S263A. The data are shown as the mean  $\pm$  S.E.M. of the number of cells (1 cell per experiment) and the total number of experiments carried over several months appears in parentheses. Statistical analysis was carried out against the values obtained in the presence of the mock pmCherry-N1 vector with 1 =  $p < 0.01$  and against mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT with 2 =  $p < 0.05$ .

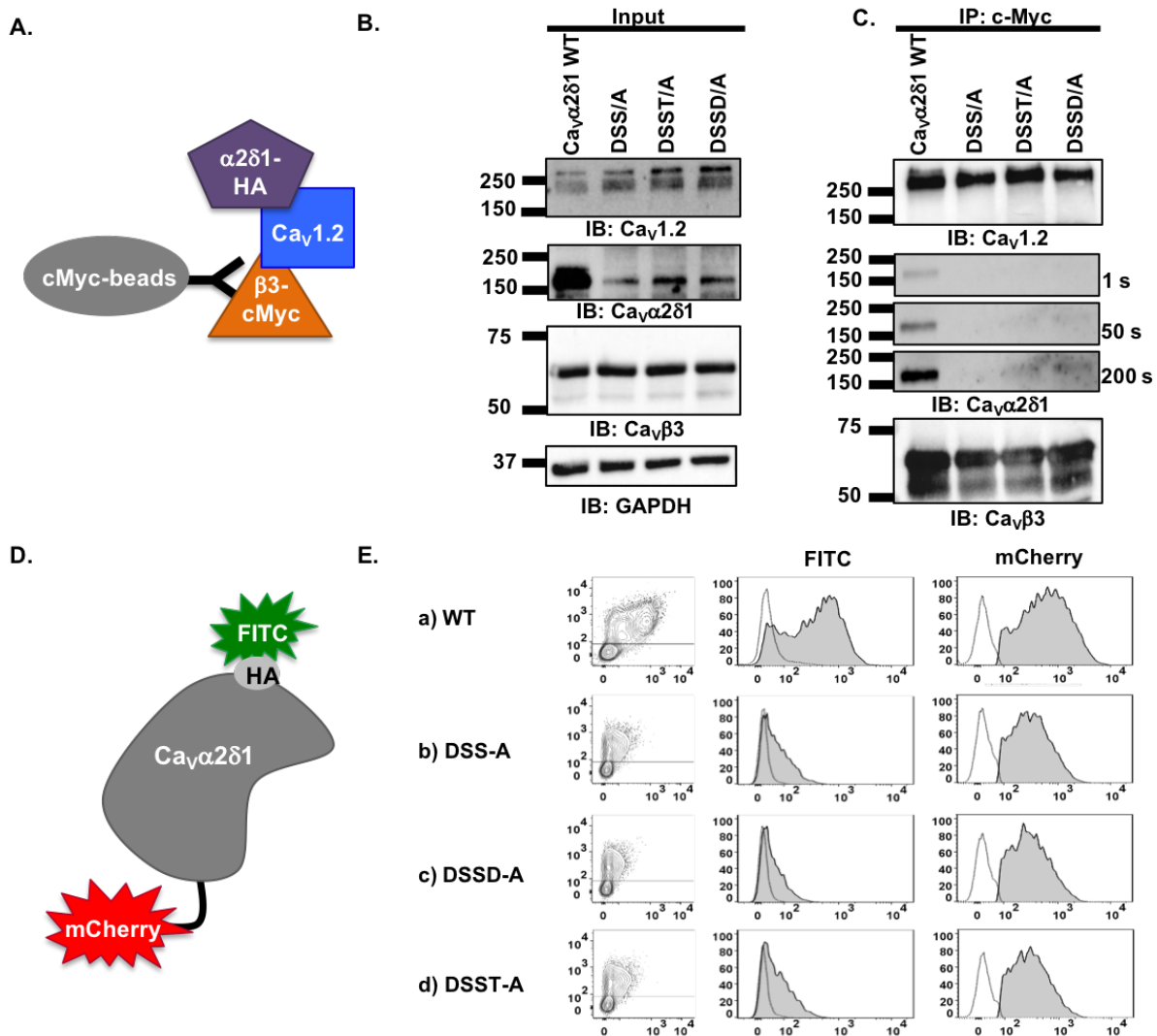


## FIGURES



**FIGURE 1: 3-D homology model of the S1 to S4 region from domain I of Cav<sub>v</sub>1.2 in complex with the VWA domain of Cav<sub>α</sub>2 $\delta$ 1.** A homology model of the Cav<sub>v</sub>1.2-Cav<sub>α</sub>2 $\delta$ 1 interface was built based using the molecular coordinates of the cryo-EM structure of the skeletal muscle Cav<sub>v</sub>1.1 complex (PDB: 5GJV). This model differs slightly from the 3-D model of the same region published previously (Bourdin et al., 2017) in regard to the orientation of the IS3S4 extracellular loop. **A.** The residues forming the protein interface are zoomed in with emphasis on the MIDAS motif. The main-chain groups of amino acids forming the MIDAS motif (Asp-259, Ser-261, Ser-263, Thr-331 and Asp-363) are shown in pale rose sticks with carboxyl groups in red, amine groups are in blue and hydrogen atoms are in white. Residues Asp-259, Ser-261, and Thr-331 identified within full-lined black boxes are in the foreground while Ser-263 and Asp-363 identified within dot-lined boxes are in the background. MIDAS residues are facing the IS1S2 loop in Cav<sub>v</sub>1.2. Cav<sub>v</sub>1.2 Asp-181 is shown in stick representation.

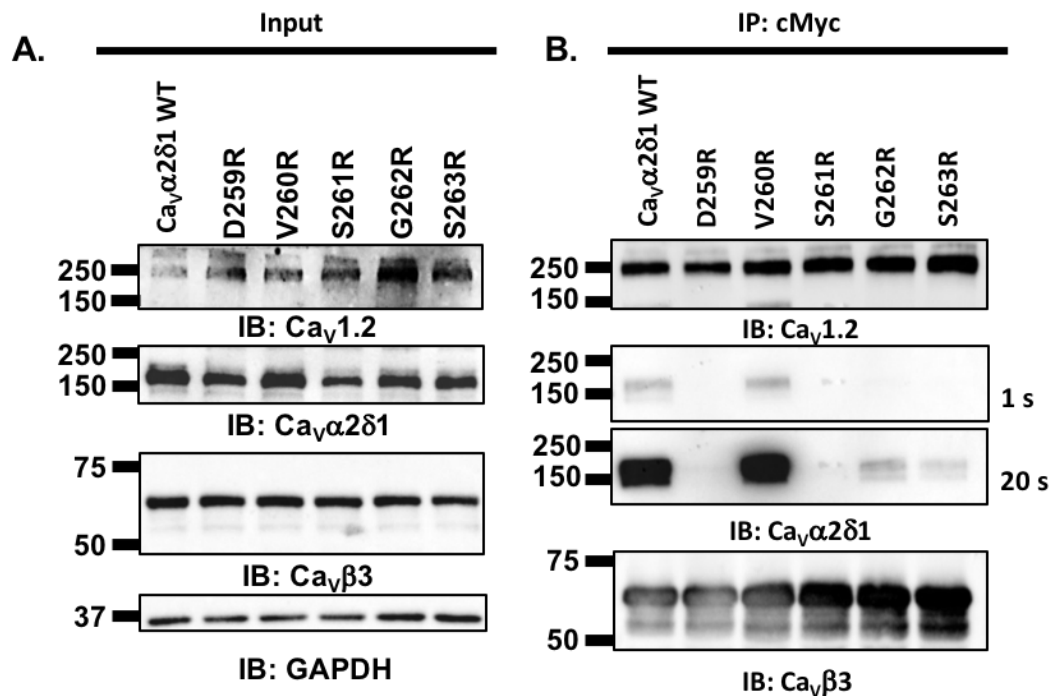
**B.** The VWA domain of the rat Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is shown in cartoon representation in which  $\alpha$ -helices appear in cyan and  $\beta$ -strands are shown in pink. A single Ca<sup>2+</sup> ion (green) is shown as being coordinated by the MIDAS residues. The region spanning from the S1 to the S4 segments in repeat I (IS1S4) of Cav1.2 is shown in cartoon representation and the transmembrane helices S1 to S4 are colored from the darker (S1) to the paler shade of blue (S4). Modelled DPPC lipids are shown in stick representation with carbon, oxygen, and phosphorus atoms being shown in grey, red, and pale green respectively. Modelling was achieved with Modeller 9.17. The figure was produced using PyMOL (DeLano Scientific).



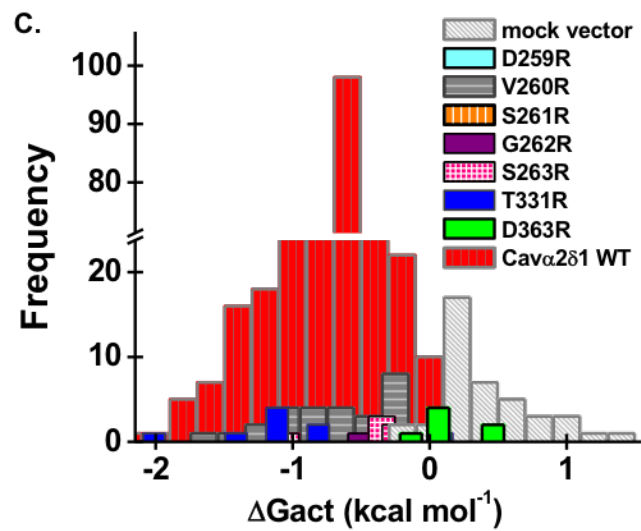
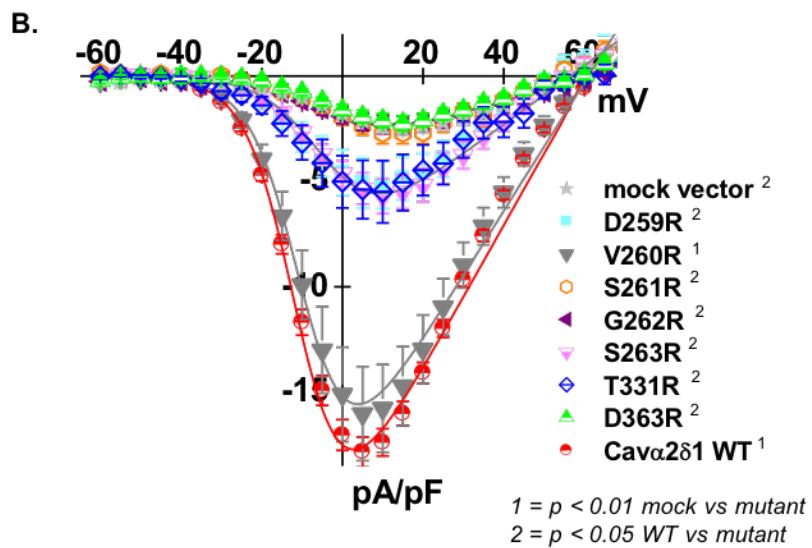
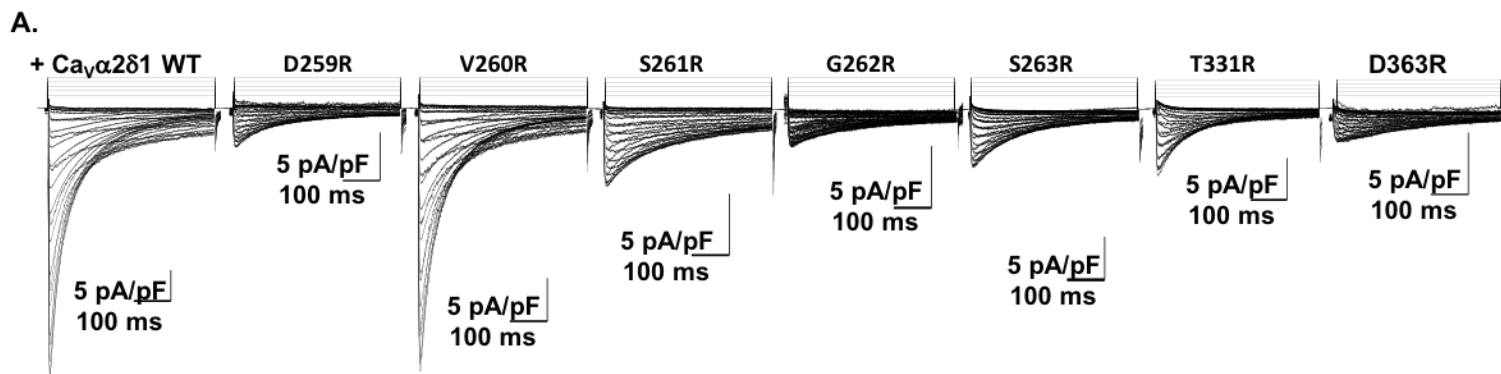
**FIGURE 2: Multiple mutations of MIDAS residues abolish the co-immunoprecipitation of  $\text{Ca}_v 1.2$  with  $\text{Ca}_v \alpha 2\delta 1$ .** **A.** Cartoon demonstrating the co-immunoprecipitation assay using  $\text{Ca}_v \beta 3$ -c-Myc as the bait. **B.** HEKT cells were transiently transfected with pCMV- $\text{Ca}_v 1.2$  and pCMV- $\text{Ca}_v \beta 3$ -c-Myc and pmCherry- $\text{Ca}_v \alpha 2\delta 1$ -HA WT or mutants as shown. Cell lysates were immunoprecipitated overnight with anti-c-Myc magnetic beads to capture  $\text{Ca}_v \beta 3$ , eluted in a Laemmli buffer 2X, and fractionated by SDS-PAGE using 8% gels. **B.** Immunoblotting was carried out on total proteins (20  $\mu\text{g}$ ) before co-immunoprecipitation assay (**input lane**) to confirm that all proteins have been correctly translated. Constructs includes from left to right:

mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA DSS/A (D259A/S261A/S263A), mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA DSST/A (D259A/S261A/S263A/T331A), and mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA DSSD/A (D259A/S261A/S263A/D363A). The signal for the housekeeping protein GAPDH is shown below each blot. **C.** Immunoblotting was carried out after eluting the protein complexes (**IP-c-Myc lane**) from the beads with anti-Cav1.2, anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, and anti-Cav $\beta$ 3 antibody (from top to bottom, as indicated). All immunoblots were carried out in parallel under the same transfection and extraction conditions. The signal for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was revealed after 3 exposures times (1, 50 and 200s). Cav $\beta$ 3 and Cav1.2 proteins migrated respectively at 60 kDa and 250 kDa. All Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins migrated at  $\approx$  175 kDa which is consistent with the molecular mass of the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT in previous studies (Bourdin et al., 2017). These assays were repeated three times over the course of 6 months with different cell preparations and assays carried out with anti-HA coated beads to pull down the channel complex with Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA as the bait (as seen in Fig 6) yielded similar results. **D.** Cartoon illustrating the relative position of the extracellular HA epitope and the intracellular mCherry translated after the C-terminal on the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct used to carry the flow cytometry assays. The construct allows for detection of intracellular and extracellular fluorescence using respectively a FITC-conjugated anti-HA and the constitutive fluorescence of mCherry. **E. Representative two-dimensional plots of mCherry versus FITC fluorescence.** The cell surface expression of the mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA construct WT and mutants from the surface fluorescence emitted by the FITC-conjugated anti-HA as measured using a flow cytometry assay (10000 intact cells). From top to bottom, the constructs that were tested are a) mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT, b) mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA DSS/A (D259A/S261A/S263A), c) mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA DSSD/A (D259A/S261A/S263A/D363A), and d) mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA DSST/A (D259A/S261A/S263A/T331A). **Left panel:** The relative intensity of the fluorescence signal produced by the FITC-conjugated anti-HA (“**x-axis**”) and produced by the mCherry (“**y-axis**”) yields an estimate of the cell surface and intracellular expression respectively. The robust mCherry signal (“**y-axis**”) confirms that the proteins were translated up to the end of the coding sequence, an observation also obtained from carrying out routine western blotting. **Middle panel:** Histogram of the relative fluorescence intensity for the FITC-conjugated anti-HA. **Right panel:** Histogram of the

relative fluorescence intensity for the constitutive mCherry signal. The cell surface fluorescence for FITC, calculated as  $\Delta\text{MedFI}$  as explained in Materials and Methods, was significantly smaller for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA mutants than for the WT construct (**see Table 1 for numerical values**). Furthermore, the mCherry signal which reflects the total protein density was also decreased suggesting that these mutations impaired protein stability.

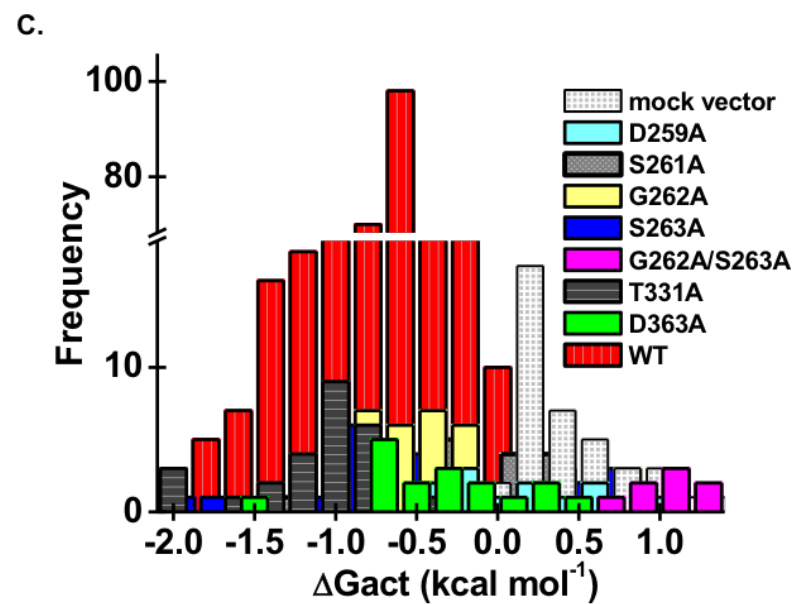
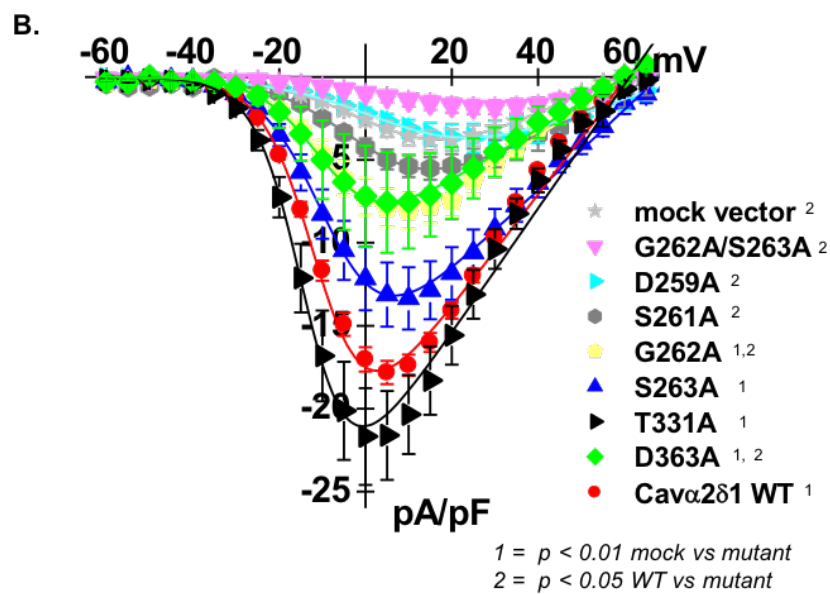
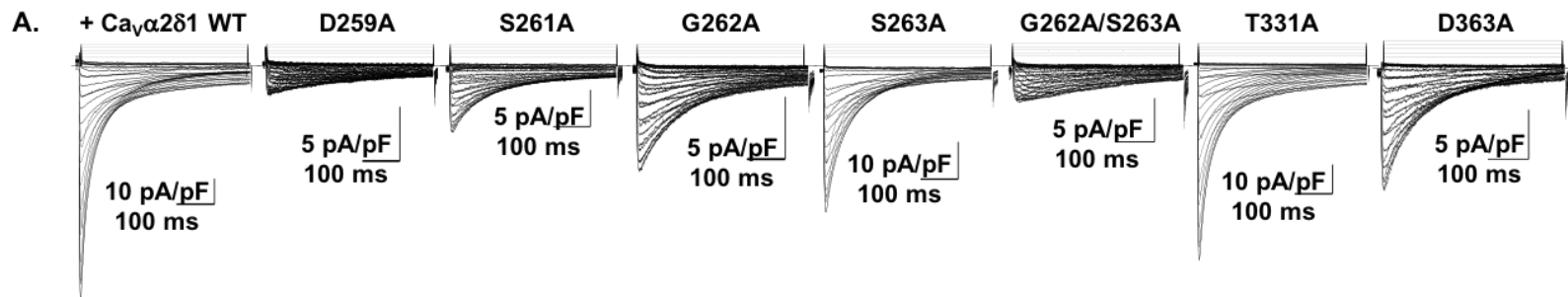


**FIGURE 3:  $\text{Ca}_v\beta 3/\text{Ca}_v 1.2$  protein complex co-immunoprecipitated with  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  V260R.** HEKT cells were transiently transfected with pCMV- $\text{Ca}_v 1.2$  and pCMV- $\text{Ca}_v\beta 3$ -c-Myc and either pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT, or pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA D259R, or pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA V260R, or pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA S261R, or pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA G262R, or pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA S263R. Cell lysates were immunoprecipitated overnight with anti-c-Myc magnetic beads to capture  $\text{Ca}_v\beta 3$ , eluted in a Laemmli buffer 2X, and fractionated by SDS-PAGE using 8% gels. **A.** Immunoblotting was carried out on total proteins (20  $\mu\text{g}$ ) before the immunoprecipitation assay (**input lane**) to confirm that constructs were expressed at the expected molecular weight. The signal for the housekeeping protein GAPDH is shown below each blot. **B.** Immunoblotting was carried out after eluting the protein complexes from the beads with anti- $\text{Ca}_v 1.2$ , anti- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , and anti- $\text{Ca}_v\beta 3$  antibody (from top to bottom, as indicated). Images for  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  were captured after short (1 s) or longer exposure times until signal was saturated (20 s). All immunoblots were carried out in parallel under the same transfection and extraction conditions. These assays were successfully repeated three times with similar results.

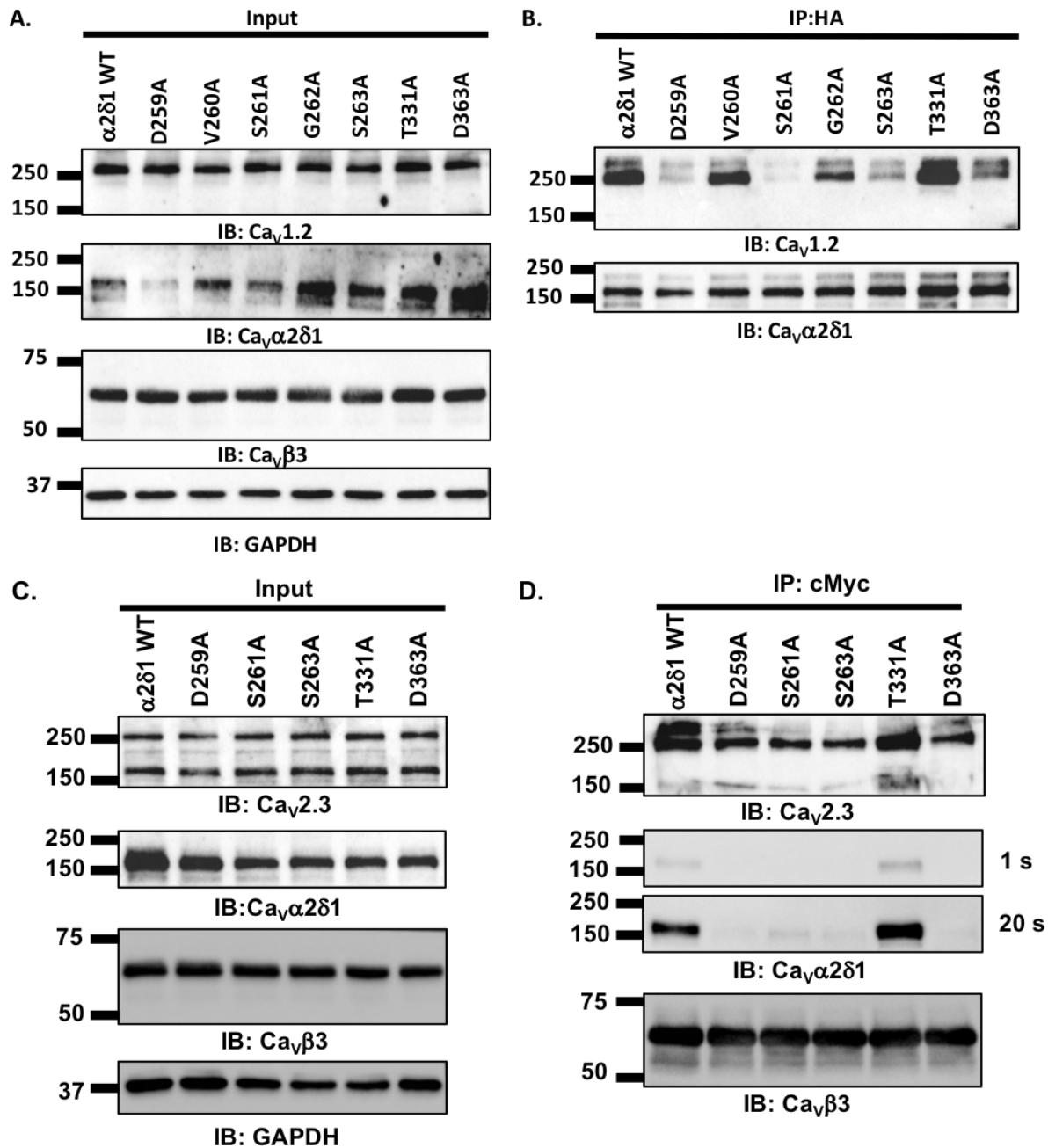


**FIGURE 4: Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 V260R stimulates Cav1.2 whole cell currents.** **A.** Representative whole-cell Ca<sup>2+</sup> current traces recorded after recombinant expression of Cav1.2 + Cav $\beta$ 3 and either pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or mutants D259R, V260R, S261R, G262R, S263R, T331R, and D363R (from left to right). Currents were recorded in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> from a holding potential of -100 mV. Time scale was 100 ms throughout. The current density scale is 5 pA/pF, as indicated. **B.** Averaged current–voltage relationships. Co-expression with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA V260R produced whole-cell Cav1.2 currents with properties similar to currents measured in the presence of mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT. Co-expression with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259R, S261R, G262R, S263R, T331R, and D363R impaired current upregulation to different degrees. Statistical analyses were carried out with a one-way ANOVA test. The number “1” indicates that the mutant Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins are significantly different from the mock vector at  $p < 0.01$  whereas the number “2” indicates that indicates that the mutant Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 proteins are significantly different from mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT at  $p < 0.05$ . Complete set of values is shown in Table 2. **C.** Bar graph reporting the distribution of the free energies of activation ( $\Delta G_{act}$ ) measured with each Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 mutant. The distribution of the  $\Delta G_{act}$  values for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259R, S261R, G262R, and D363R was right-shifted as compared with mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT and overlapped with the  $\Delta G_{act}$  values measured in the presence of mock vector (pmCherry-no Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1).



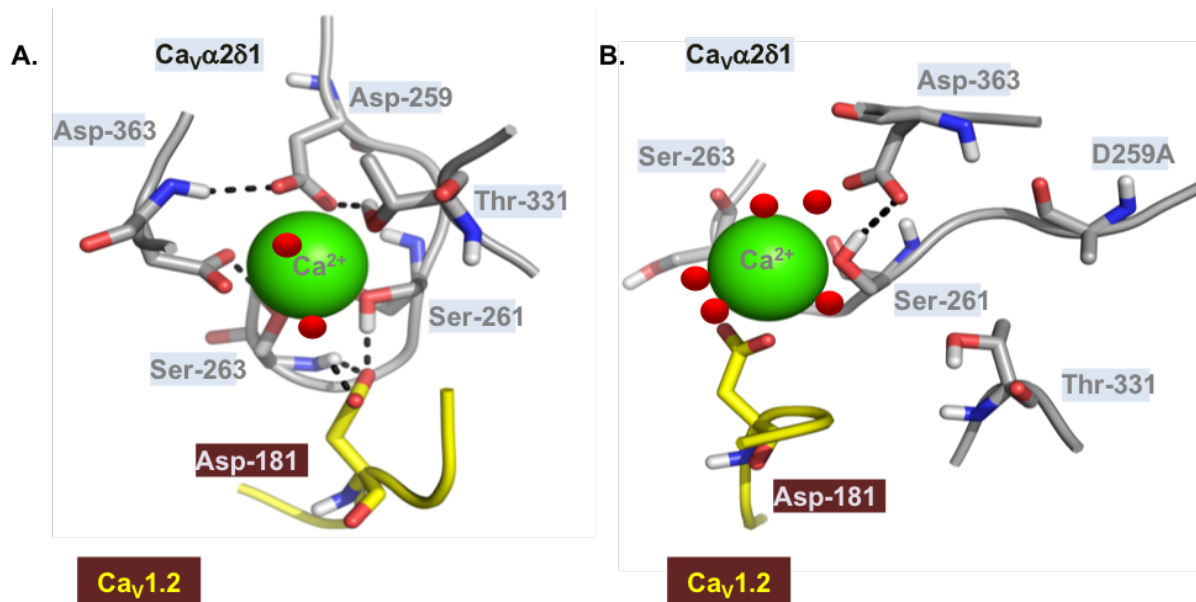


**FIGURE 5:  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  S263A and T331A stimulate  $\text{Ca}_v 1.2$  whole-cell currents.** **A.** Representative whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  current traces recorded after recombinant expression of  $\text{Ca}_v 1.2$  +  $\text{Ca}_v\beta 3$  and either pmCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT, D259A, S261A, G262A, S263A, G262A/S263A, T331A, or D363A (from left to right). Currents were recorded in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  from a holding potential of -100 mV. Time scale is 100 ms throughout. The current density scale ranged from 5 to 10 pA/pF, as indicated. **B.** Averaged current–voltage relationships. Co-expression with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA S263A or T331A produced whole-cell  $\text{Ca}_v 1.2$  currents with properties similar to currents measured in the presence of mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT. Co-expression with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA D259A, S261A, G262A, G262A/S263A, and D363A impaired current upregulation to different degrees. Statistical analyses were carried out with a one-way ANOVA test. The number “1” indicates that the mutant  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins are significantly different from the mock vector at  $p < 0.01$  whereas the number “2” indicates that indicates that the mutant  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  proteins are significantly different from mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA WT at  $p < 0.05$ . Complete set of values is shown in Table 2. **C.** Bar graph reporting the distribution of the free energies of activation ( $\Delta G_{\text{act}}$ ) measured with each  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  mutant. The distribution of the  $\Delta G_{\text{act}}$  values for mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA D259A, S261A, G262A, and G262A/S263A was right-shifted as compared with  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  WT and overlapped with the  $\Delta G_{\text{act}}$  values measured in the presence of mock vector (pmCherry-no  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ ). Note that the distribution for the  $\Delta G_{\text{act}}$  obtained with mCherry- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ -HA S263A was very wide and may reflect different conformations of the mutant.



**FIGURE 6: Single alanine substitutions of Asp-259, Ser-261, and Ser-263 in Cavα2δ1 impair co-immunoprecipitation of Cav1.2 and Cav2.3 proteins.** A-B. HEKT cells were transiently transfected with pCMV-Cav1.2 and pCMV-Cavβ3-c-Myc and either pmCherry-Cavα2δ1-HA WT or pmCherry-Cavα2δ1-HA D259A, V260A, S261A, G262A, S263A, T331A, or D363A. Cell lysates were immunoprecipitated overnight with anti-HA magnetic beads to capture Cavα2δ1-HA, eluted in a Laemmli buffer 2X, and fractionated by SDS-

PAGE using 8% gels. **A.** Immunoblotting was carried out on total proteins (20  $\mu$ g) before the immunoprecipitation assay to confirm protein expression in all samples (**input lane**). The signal for the housekeeping protein GAPDH is shown below. **B.** Immunoblotting was carried out after eluting the protein complexes from the beads with anti-Cav1.2 and anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (from top to bottom, as indicated). All immunoblots were carried out in parallel under the same transfection and extraction conditions. In these experiments, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA is bound to the beads such that the interaction is probed by investigating the signal for its Cav1.2 partner. The image was obtained using the automatic mode of the ChemiDoc Touch system which optimizes the signal. As seen, the signal for Cav1.2 was significantly reduced for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A, S261A, and S263A. **C-D.** HEKT cells were transiently transfected with pcDNA3-Cav2.3 and pCMV-Cav $\beta$ 3-c-Myc and either pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA WT or pmCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A, S261A, S263A, T331A, or D363A. Cell lysates were immunoprecipitated overnight with anti-c-Myc magnetic beads to capture Cav $\beta$ 3-c-Myc, eluted in a Laemmli buffer 2X, and fractionated by SDS-PAGE using 8% gels. **C.** Immunoblotting was carried out on total proteins (20  $\mu$ g) before the immunoprecipitation assay (**input lane**). The signal for the housekeeping protein GAPDH is shown below. **D.** Immunoblotting was carried out after eluting the protein complexes from the beads with anti-Cav2.3, anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, and anti-Cav $\beta$ 3 antibody (from top to bottom, as indicated). In these experiments, Cav $\beta$ 3/Cav2.3 is bound to the beads such that the interaction is probed by investigating the signal for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. As seen, the signal for Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 was significantly reduced for mCherry-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-HA D259A, S261A, S263A, and D363A. All immunoblots were carried out in parallel under the same transfection and extraction conditions.



**FIGURE 7: Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A could destabilize Ca $^{2+}$  binding within MIDAS.** Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 MIDAS residues are shown in the lowest energy conformations obtained from three 25-ns MD trajectories produced with the 3-D virtual models of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 WT (**A**) and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A (**B**). Asp-181 in Cav1.2 and Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 MIDAS residues are shown in stick representation and colored in yellow and grey respectively. The Ca $^{2+}$  ion is shown as a green sphere and water molecules are visualized as red dots. Within residues, oxygen atoms are in red, nitrogen atoms are in blue, and hydrogen atoms are in white. Potential interactions between atoms are indicated by black dash lines. The 3-D model was relatively stable with little fluctuations in the backbone atoms over the 25-ns simulation. In particular, the RMSD of the C $\alpha$  for the whole complex (calculated after equilibration and between each time point of the 25-ns simulation) fluctuated in average  $2.52 \pm 0.59$  Å (mean  $\pm$  SD) and  $\approx 80\%$  of the data points deviate less than 3 Å when compared with the structure shown in panel A. As seen, the oxygen atoms from Cav1.2 Asp-181 are within a few Å of the side-chain hydrogen atom of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 and the main-chain hydrogen atom of Ser-263. Elimination of the negatively charged side-chain at position 259 in Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A (**B**) produced a substantial alteration in the conformation of MIDAS whereby the hydrogen atom from the hydroxyl group of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Ser-261 switches from coordinating the Ca $^{2+}$  ion and Cav1.2 Asp-181 to

facing the carboxyl group in the side-chain from Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Asp-363. In the Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D259A mutant, the Ca<sup>2+</sup> ion is being more freely exposed to the solvent and becomes coordinated by five water molecules (**B**) instead of two water molecules in the wild-type protein complex (**A**). This conformational change disrupts the network of stabilizing interactions between Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and Cav1.2 Asp-181. PDB files are available upon request.

## Chapitre 6 – Discussion et conclusion

Le début des années 1950 marque un nouveau tournant pour la compréhension des mécanismes de propagation des signaux électriques le long des cellules excitables grâce à la publication d'un certain nombre d'articles pionniers dans le domaine. Les travaux des électrophysiologistes Hodgkin et Huxley ont montrés pour la première fois par « voltage-clamp » que l'activité électrique de l'axone géant du calmar est contrôlée par le mouvement spécifique et indépendant des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  de part et d'autre de la membrane (Hodgkin & Huxley, 1952; Hodgkin, Huxley, & Katz, 1952). Peu de temps après, les propriétés électriques des fibres musculaires de crustacés sont également mises en évidence par Fatt et Katz (Fatt & Katz, 1953). Toutefois, les concepts de « membrane » et de « perméabilité sélective » ne sont pas encore clairement établis et il faudra attendre les années 1970 pour que ces notions voient le jour grâce notamment aux travaux de Harold Lecar et Bertil Hille qui fournissent les premières évidences de la présence de canaux ioniques distincts pouvant être régulés de façon indépendante (Binstock & Lecar, 1969; Hille, 1971, 1973). Une dizaine d'années plus tard, les canaux calciques de type-L sont purifiés pour la première fois à l'aide d'un ligand radiomarqué (dihydropyridine) à partir d'extraits de cerveau de rat (Curtis & Catterall, 1983) et de tubules transverses de muscle squelettique de lapin (Curtis & Catterall, 1984). L'analyse biochimique de ces canaux a permis l'identification de 3 à 5 sous-unités ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) (M. Takahashi, M. J. Seagar, J. F. Jones, B. F. Reber, & W. A. Catterall, 1987a). Depuis le clonage moléculaire et le séquençage de la sous-unité principale  $\text{Cav}\alpha 1$ , d'abord dans le muscle squelettique (Tanabe et al., 1987) puis dans le muscle cardiaque (Mikami et al., 1989), et des sous-unités auxiliaires ( $\alpha 2\delta$  (Ellis et al., 1988),  $\beta$  (Ruth et al., 1989),  $\gamma$  (Jay et al., 1990a)) des canaux calciques, la compréhension de la fonction et des mécanismes de régulation de ces canaux a considérablement évoluée. Les canaux calciques sont formés d'un complexe multiprotéique constitué de la sous-unité  $\text{Cav}\alpha 1$  (~250 kDa) à 24 segments transmembranaires organisés autour d'un pore central responsable de l'influx d'ions calciques et de l'association de plusieurs sous-unités auxiliaires régulatrices  $\text{Cav}\beta 1-4$  (60 kDa),  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1-4$  (175 kDa), la calmoduline (17 kDa) et  $\text{Cav}\gamma 1$  (30 kDa) qui est uniquement présente dans le muscle squelettique. Plusieurs structures à haute résolution de fragments du canal calcique de type-L

ont été élucidées au milieu des années 2000 par cristallographie aux rayons X incluant le site d'interaction de  $\text{Ca}_v\alpha 1$  ( $\text{Ca}_v1$  et  $\text{Ca}_v2$ ) avec la sous-unité auxiliaire  $\text{Ca}_v\beta$  (Y. H. Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegem et al., 2004a) et le domaine IQ de la région C-terminale de  $\text{Ca}_v\alpha 1\text{C}$  en complexe avec la calmoduline (Van Petegem et al., 2005b). Ces travaux, couplés à des études fonctionnelles, ont permis de déterminer que l'interaction du domaine GK de  $\text{Ca}_v\beta$  avec le domaine AID de  $\text{Ca}_v\alpha 1\text{C}$  favorise l'adressage membranaire du canal  $\text{Ca}_v\alpha 1\text{C}$  (Bourdin et al., 2010) tandis que la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la calmoduline, présente de façon constitutive sur le domaine C-terminal de  $\text{Ca}_v\alpha 1\text{C}$ , contrôle l'inactivation du canal dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Peterson et al., 1999). Par opposition, le site d'interaction de  $\text{Ca}_v\alpha 1\text{C}$  avec la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  était inconnu.

La structure à basse résolution du canal calcique cardiaque obtenue en 2004 par l'équipe du Pr. Kitmitto à une résolution de 25 Å n'a pas permis de définir les détails structuraux des protéines mais révéla de façon grossière la position relative des différentes sous-unités au sein du complexe (M. C. Wang et al., 2004). Seule une structure 3D à haute résolution permet de déterminer les sites de liaisons. Dans le but de mieux comprendre le rôle de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  au sein des canaux calciques, nous nous sommes intéressés à la détermination de sa structure 3D. Ce projet s'est avéré irréalisable en raison de la complexité de la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , son poids moléculaire élevé, ses nombreuses modifications post-traductionnelles (multiple sites de glycosylation, ancre GPI, pont disulfures inter- et intra-moléculaires) qui ont été confirmés par notre groupe de recherche pendant mes études (Segura et al., 2017; Tetreault et al., 2016). Ces éléments représentent un véritable challenge pour l'expression d'une protéine eucaryote dans un système bactérien qui possède qu'une machinerie cellulaire limitée pour les modifications post-traductionnelles (Tokmakov et al., 2012). Dans le but de surmonter les difficultés de solubilité et de stabilité de la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , la stratégie que nous avons choisi a été de séparer  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  en domaines fonctionnels, tel que cela avait été proposé pour le canal TRP (*transient receptor potential*) (Gaudet, 2009), afin de déterminer la structure 3D des différents fragments. Ces données auraient été ensuite intégrées pour faire progresser notre compréhension de l'architecture 3D de la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ .



La publication des structure cryo-ME du complexe calcique homologue Cav1.1 à haute résolution (4.2 Å en décembre 2015 et 3.6 Å en septembre 2016) a donné une nouvelle perspective à l'étude des canaux calciques (J. Wu et al., 2016a; J. Wu et al., 2015). Cette structure fournit pour la première fois une architecture détaillée de l'organisation spatiale du complexe des canaux calciques en présence des quatre sous-unités distinctes (Cav $\alpha$ 1, Cav $\beta$ 1a, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, Cav $\gamma$ 1). Le travail le plus remarquable porte sur la détermination d'une première structure 3D de la sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 à une résolution suffisante pour permettre de définir l'agencement, le positionnement et l'organisation inter-domaines de la sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 par rapport au canal Cav $\alpha$ 1. Dans la structure à 3.6 Å de résolution, la majeure partie des éléments structuraux (hélices- $\alpha$ , brins et feuillettes- $\beta$ ) des domaines Cache1, Cache2, Cache3, Cache4 et VWA de la protéine Cav $\alpha$ 2 et de Cav $\delta$ 1 ont été déterminés. En mettant à profit l'expérience que j'avais acquise au début de mon doctorat, la deuxième partie de mon projet de recherche s'est alors orientée vers l'étude des déterminants moléculaires responsables de l'interaction entre les sous-unités Cav $\alpha$ 1C et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 afin de comprendre par quels mécanismes cette protéine exerce sa fonction.

## **6.1 « *Divide-and-conquer* », vers une architecture des domaines structuraux de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1**

Au début de mes études de doctorat en 2013, les analyses bio-informatiques (NCBI *conserved domain search database*) de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 prédisait deux domaines structuraux principaux VWA et Cache2 (Anantharaman & Aravind, 2000; Canti et al., 2005). Le domaine VWA est principalement retrouvé dans les protéines d'adhésion cellulaire ou de la matrice extracellulaire et semble jouer un rôle dans l'interaction protéine-protéine (Whittaker & Hynes, 2002) tandis que le domaine Cache est homologue au domaine extracellulaire des récepteurs chimiotactiques bactériens et pourrait jouer un rôle dans la perception des molécules environnantes (Hazelbauer, Falke, & Parkinson, 2008). Plusieurs structures 3D du domaine VWA des intégrines (Springer, 2006) et du domaine Cache (R. Wu et al., 2013) des protéines kinases activés par l'histidine ont été résolus par cristallographie aux rayons X. Compte tenu que ces protéines présentent une homologie suffisante (entre 25 et 29 % au

niveau de la séquence primaire) avec les domaines structuraux de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, ces travaux antérieurs ont représenté une ressource importante pour établir les conditions expérimentales d'expression, purification et de cristallisation de notre protéine d'intérêt.

### **6.1.1 Les protéines recombinantes VWA et Cache2 s'accumulent dans les corps d'inclusion**

Lorsqu'on travaille sur les domaines structuraux d'une protéine, il est très important de correctement définir la région à étudier pour que le « domaine » ait la capacité de se replier spontanément et de façon autonome sans avoir besoin du reste de la protéine (Wetlaufer, 1973). Les séquences codantes pour les domaines VWA et Cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, déterminés à partir de la banque de données de NCBI, ont été clonés dans un vecteur d'expression pET28 et pET30 respectivement. Ces vecteurs possèdent une séquence codante pour une étiquette histidine du côté C-terminal et sont utilisés pour l'expression de protéines recombinantes dans les bactéries *E. coli*. Le système d'expression bactérien est le plus utilisé pour des études de biologie structurale en raison de ses propriétés de croissance rapide, de faible coût et de rendement protéique élevé (Stevens, 2000) mais présente l'inconvénient de ne pas synthétiser toutes les modifications post-traductionnelles des protéines eucaryotes (Tokmakov et al., 2012). Un nombre important de conditions d'expression des protéines VWA et Cache2 ont été testées en faisant varier notamment la concentrations d'IPTG, la souche bactérienne *E. coli*, la température et le temps de croissance. Ces tests ont montré que les deux protéines s'accumulent majoritairement dans les corps d'inclusion. Les corps d'inclusion sont des vésicules formées dans le cytoplasme de la bactérie qui contiennent la protéine recombinante agrégée ce qui prévient l'accumulation toxique de la protéine (Singh, Upadhyay, Upadhyay, Singh, & Panda, 2015). L'absence de chaperonnes adéquates lors du repliement ou l'absence des modifications post-traductionnelles lors de la synthèse des protéines recombinantes eucaryotes peuvent conduire à la formation des corps d'inclusion (Carrio, Cubarsi, & Villaverde, 2000). Au sein des canaux calciques activés par la dépolarisation de la membrane, le domaine GK des sous-unités Cav $\beta$ 2a et Cav $\beta$ 1a a également été purifié à partir des corps d'inclusion (Gonzalez-Gutierrez et al., 2008). Avec les données actuelles que l'on possède sur Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, nous savons maintenant que les multiples sites de glycosylation contribuent à sa

stabilité (Tetreault et al., 2016) et que l'absence de ces modifications post-traductionnelles est pourrait contribuer à la dégradation rapide des protéines VWA et Cache2. L'utilisation d'un système d'expression eucaryote chez la levure pour favoriser le repliement optimal des protéines VWA et Cache2 grâce à la synthèse des modifications post-traductionnelles a été envisagée (Mattanovich et al., 2012). Cet organisme présente l'avantage de permettre la synthèse des glycosylations de type-N simples mais souvent abondantes en résidus mannoses ce qui peut différer des profils de glycosylation de mammifères (H. Tang et al., 2016). Nos résultats préliminaires chez *Saccharomyces Cerevisiae* ont montré que les deux protéines s'exprimaient mais étaient seulement détectables à l'aide d'un western-blot ce qui indique des rendements d'expression protéique bas. Nous avons alors décidé de continuer à travailler avec les corps d'inclusion qui possèdent l'avantage d'empêcher la dégradation de la protéine surexprimée par les protéases et de contenir presque exclusivement une grande quantité de la protéine d'intérêt, ce qui facilitent les étapes de purification et augmentent les rendements de protéines (Ramon, Senorale-Pose, & Marin, 2014).

### **6.1.2 Le domaine Cache2 est replié dans sa conformation « native »**

Afin de solubiliser les protéines stockées dans les corps d'inclusion, les protéines VWA et Cache2 ont été extraites en conditions dénaturantes en présence d'urée 8 M. La dénaturation, qui rompt les ponts hydrogènes et liaisons hydrophobes, présente l'avantage d'engendrer une meilleure exposition de l'étiquette histidine et de réduire les interactions non spécifiques entre la protéine d'intérêt et les protéines bactériennes ce qui facilite les étapes de purification (Wingfield, 2015). L'étape limitante dans ce processus est la renaturation de la protéine dans sa conformation native en éliminant l'agent dénaturant tout en prévenant l'agrégation protéique (Yamaguchi & Miyazaki, 2014). De nombreux protocoles de repliement des protéines ont été publiés mais leurs efficacités sont entièrement dépendantes de la conformation native de la protéine d'intérêt. La protéine Cache2 a été repliée suite à l'élimination progressive de l'agent dénaturant au moyen de la dialyse. Le processus de repliement a été mené en présence de L-arginine. Des études ont rapporté que cet acide aminé joue un rôle dans la réduction des agrégats protéiques en ralentissant le repliement et en augmentant la stabilité des états intermédiaires (J. Chen, Liu, Wang, Ding, & Su, 2008). Par contraste, il a été impossible d'obtenir une protéine VWA stable en utilisant les méthodes

conventionnelles d'élimination de l'agent dénaturant par dialyse ou par dilution rapide. Une autre méthode a été utilisée dans laquelle la protéine a été repliée lors de la première étape de purification sur chromatographie d'affinité (Roussel, Tinti, Perpete, & Michaux, 2013). Une fois la protéine liée à la résine de nickel, l'agent dénaturant est progressivement remplacé par un tampon contenant du SDS additionné à un co-solvant (« *2-methyl-2,4-pentanediol* »). Cette méthode présente l'avantage de réduire l'agrégation protéique puisque les protéines sont physiquement séparées les unes des autres. Compte tenu qu'aucun des deux domaines ne possède une activité fonctionnelle spécifique et mesurable, le repliement de VWA et Cache2 dans une conformation « active » a été évalué par dichroïsme circulaire couplé à une chromatographie analytique (Clarke, 2011). La chromatographie analytique permet de confirmer la structure tertiaire de la protéine grâce aux informations fournies par le poids moléculaire apparent (Batas, Jones, & Chaudhuri, 1997). Nos résultats ont montré que Cache2 avait un poids moléculaire apparent de 21 kDa proche du poids moléculaire attendu (24.9 kDa) et contenait 8 % d'hélice- $\alpha$ , 41 % de feuillets- $\beta$ . En revanche, la protéine VWA s'est avérée ne pas être stable dans le temps, possiblement à cause d'un repliement non optimal de la protéine. Le domaine VWA contient deux sites de glycosylations (Asn-324 et Asn-348) dont le site Asn-348 est particulièrement important pour la stabilité de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Tetreault et al., 2016). Nous avons donc choisi de concentrer nos efforts sur la protéine Cache2 pour les études structurales. Les résultats de purification satisfaisants (pureté > 90%, homogénéité de l'échantillon, quantité de l'ordre du mg/ml) et de repliement obtenu pour la protéine Cache2 ont permis de passer à l'étape des essais de cristallisation.

### **6.1.3 La structure du domaine Cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 révèle de nombreuses régions flexibles et un repliement en feuillets- $\beta$**

Les essais de cristallisation ont été réalisés « en goutte assise (*sitting drop*) » qui est la technique la plus couramment utilisée (McPherson & Gavira, 2014). Un criblage des conditions de cristallisation à petit volume (400 nl) a été réalisé sur des boîtes à 96 puits à l'aide de quatre trousse commerciales MCSG1-4 (*MCSG crystallization suite, Anatrace*) dans le but de couvrir le maximum de conditions possibles (Dessau & Modis, 2011). Parmi les 384 conditions de cristallisation testées, 31 conditions ont permis d'obtenir des cristaux. L'analyse

de ces cristaux au laboratoire de diffraction des rayons X au Département de Chimie de l'Université de Montréal a montré que les jeux de données obtenus étaient caractéristiques des cristaux de sel. Un très grand nombre de paramètres peuvent affecter la formation d'un cristal de protéine tel que le pH, la température de croissance des cristaux, le tampon, l'ajout d'additif, les détergents (Russo Krauss, Merlino, Vergara, & Sica, 2013). Malgré l'optimisation des conditions de cristallisation en faisant varier une partie des paramètres mentionnés précédemment, les essais de cristallisation de la protéine Cache2 n'ont pas été concluants. Nous nous sommes donc tournés vers des techniques alternatives (résonance magnétique nucléaire (RMN), SAXS). La RMN est une technique qui nécessite la production de protéine marquée avec un isotope stable ( carbone  $^{13}\text{C}$ , azote  $^{15}\text{N}$ ) ce qui peut modifier les conditions d'expression de la protéine et nécessite de ré-optimiser les paramètres expérimentaux (Barrett et al., 2013). En revanche, nos conditions expérimentales étaient compatibles avec l'étude de la protéine Cache2 par SAXS. Cette technique permet d'obtenir des informations structurales à basse résolution sur les protéines en solution (Skou, Gillilan, & Ando, 2014). Les données de SAXS ont montré que Cache2 est une protéine globulaire qui possède des régions partiellement flexibles. La reconstruction d'un modèle de la structure 3D de Cache2 à partir de l'enveloppe SAXS a révélé que la protéine est majoritairement repliée en feuillets- $\beta$ , ce qui est en accord avec les données de dichroïsme circulaire. Nos résultats ont été obtenus presque simultanément avec la publication de la structure du canal calcique Cav1.1 par cryo-EM à la résolution de 4.2 Å (J. Wu et al., 2015). Une comparaison du modèle de cache2 avec la structure 3D du domaine Cache2 résolu par cryo-EM a confirmé que la conformation des deux protéines est très proche (RMSD de 1.73 Å) et que les variations observées proviennent de différences dans la séquence primaire entre les deux isoformes (rat et lapin).

#### **6.1.4 Est ce que le domaine cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est régulé par un ligand ?**

L'étude de la structure de Cache2 par SAXS a montré que ce domaine est majoritairement replié en feuillets- $\beta$  et qu'il contient de nombreuses régions flexibles non structurées. Il a été rapporté que des régions déstructurées chez les protéines eucaryotes correspondent souvent à des domaines régulateurs qui peuvent devenir structurées localement

suite à la liaison avec un ligand (Pancsa & Fuxreiter, 2012). Dans la littérature, le domaine extracellulaire Cache joue un rôle dans la reconnaissance de petites molécules (Anantharaman & Aravind, 2000). Un nombre important de ligands (> 30) se liant aux domaines Cache issus d'organismes procaryotes a été identifié tel que les acides aminés (principalement histidine, proline lysine), des acides organiques (pyruvate, lactate, malate, citrate) ou des hormones (épinéphrine) (Upadhyay et al., 2016). De façon intéressante, aucun sucre n'a été identifié à ce jour comme ligand de ce domaine. Le protocole de purification du domaine Cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 a été optimisé et des quantités de l'ordre de 1-10 mg/ml peuvent être obtenues signifiant que des études d'interaction avec ces ligands pourraient être envisager. Pour cette étude, la méthode thermodynamique de fluorimétrie à balayage différentiel (DSF) apparaît être adaptée puisque cette technique permet de cribler l'interaction ligand-protéine d'un grand nombre d'échantillons en même temps (boîte de 96 puits) à l'aide d'une réaction de PCR quantitative (Vivoli, Novak, Littlechild, & Harmer, 2014). Brièvement, la DSF permet de suivre la dénaturation d'une protéine par fluorescence (sypro orange). Lorsque la protéine est dénaturée, le fluorophore se lie aux régions hydrophobes de la protéine et émet un signal de fluorescence qui est recueilli par l'appareil de PCR puis analysé. Toutefois, l'interaction avec un ligand est quantifiable seulement si la liaison avec le ligand modifie la température de dénaturation de la protéine. Le domaine Cache2 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 présente 25 % d'identité au niveau de la séquence primaire avec le domaine de reconnaissance du ligand de la kinase KinD activé par l'histidine de *Bacillus subtilis* qui est principalement régulé par le pyruvate (R. Wu et al., 2013). L'affinité entre le pyruvate et la protéine KinD n'a pas été déterminée mais les études par DSF ont montré que des concentrations entre 1-10 mM de pyruvate augmentent la température de dénaturation de la protéine KinD de 3 à 4°C. Le pyruvate, le butyrate et le propionate stabilise la protéine KinD selon un processus dépendant de la concentration. Le rôle potentiel d'une interaction de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 avec un acide organique n'a jamais été reporté dans la littérature. Par ailleurs, il est intéressant de noter que bien que la structure du pyruvate (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) et la gabapentine (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>) soit différentes, ces deux molécules contiennent un groupement COOH en commun. Dans la structure 3D (PDB 4JGP), la molécule de pyruvate interagit à travers son groupement COO avec l'Arg-131 de la kinase KinD. Il a été montré que le site de liaison de la gabapentine ferait intervenir l'Arg-243 situé

sur le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, or la structure 3D a montré que ce résidu est situé à proximité ( $\sim 4$  Å) de l'hélice  $\alpha$ 2 et la boucle reliant l'hélice  $\alpha$ 2 à  $\beta$ 1 du domaine Cache2. On peut alors suggérer que le domaine Cache2 pourrait intervenir dans l'interaction et ou la stabilisation de la gabapentine sur son site de liaison.

La publication en 2016 de la structure du complexe calcique Cav1.1 à une résolution de 3.6 Å par cryo-ME a révélé la majorité des détails structuraux et l'agencement dans l'espace des domaines de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (J. Wu et al., 2016a). Cette structure a montré que le domaine Cache2 interagit étroitement avec le domaine Cache1 et Cache3 pouvant expliquer en partie la présence des régions flexibles dans le modèle de Cache2. La structure a également mis en évidence que le domaine VWA est situé à une distance atomique de plusieurs boucles extracellulaires de la sous-unité Cav $\alpha$ 1. On peut alors supposer que les interactions entre VWA et Cav $\alpha$ 1 peuvent participer à la stabilité conformationnelle du domaine VWA expliquant ainsi les limitations de l'étude de ce domaine de façon isolée. Dans le but de comprendre comment l'interaction entre la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 permet de réguler la fonction de Cav $\alpha$ 1C, nous avons entrepris l'étude des déterminants moléculaires responsables de l'interaction entre le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et la sous-unité Cav1.2.

## **6.2 Progrès dans la compréhension des mécanismes moléculaires de régulation de Cav1.2 par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1**

### **6.2.1 L'interface d'interaction entre la boucle extracellulaire S1S2 du domaine I de Cav1.2 a été modélisée avec le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1**

Pour les besoins de cette étude, nous avons construit un modèle par homologie du canal Cav1.2 en complexe avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. La modélisation par homologie requiert que les séquences primaires de la protéine à modéliser et du modèle aient une identité d'au moins 25% et qu'elles partagent un repliement similaire (Fiser, 2010).

Au niveau de la séquence primaire, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est très conservée ( $> 90\%$ ) chez les espèces de souris, rat, lapin et homme. Parmi ces trois espèces, la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 de rat est la plus proche de la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 humaine avec qui elle partage une identité de séquence

de 96.3%. De plus, un alignement du domaine VWA de la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  montre que ce domaine est entièrement conservé chez les espèces citées. Un niveau d'identité aussi élevé semble indiquer que les différentes espèces partagent une même organisation des domaines, une structure 3D et une fonction similaire. La sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 1$  des canaux  $\text{Ca}_v 1.1$  (isoforme retrouvé dans le muscle squelettique) et  $\text{Ca}_v 1.2$  (isoforme retrouvé dans le muscle cardiaque) de lapin partagent une identité de 69.3 % sur la totalité de la séquence en acides aminés. Les principales divergences sont observées sur les extrémités N- et C-terminale de la protéine. Au niveau des régions étudiées plus particulièrement dans cette étude, les segments IS1S4 et IIS5S6 présentent une identité de 69.6 et 74 % entre les canaux  $\text{Ca}_v 1.1$  et  $\text{Ca}_v 1.2$  respectivement. La protéine  $\text{Ca}_v 1.2$  de lapin partagent une identité au niveau de la séquence primaire de 92 % avec le canal  $\text{Ca}_v 1.2$  humain tandis que la boucle extracellulaire IS1S2, responsable de l'interaction avec  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ , est strictement identique. Ces données semblent suggérer que les protéines  $\text{Ca}_v 1.2$  de lapin et humaine possèdent le même mécanisme de régulation médiée par la boucle IS1S2.

Des études ont montré que des protéines homologues partagent généralement les mêmes interfaces de liaison (Aloy, Ceulemans, Stark, & Russell, 2003). Compte tenu de la forte homologie entre ces deux canaux, nous avons émis l'hypothèse que les interactions protéine-protéine entre les sous-unités sont conservées. À partir des coordonnées atomiques de la structure cryo-ME du canal calcique  $\text{Ca}_v 1.1$  de lapin obtenu à 3.6 Å de résolution (PDB 5GJV) pour les sous-unités  $\text{Ca}_v\alpha 1$  et  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (J. Wu et al., 2016a), nous avons d'abord tenté de construire un modèle par homologie du canal  $\text{Ca}_v 1.2$  complet (lapin) en complexe avec la protéine  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  (rat) à l'aide de Modeller (Webb & Sali, 2017). Le modèle 3D de  $\text{Ca}_v 1.2$ - $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  obtenu contenait de nombreuses aberrations provoquées par les régions extracellulaires et intracellulaires non résolues structurellement dans la structure 3D (1-32 IS1, 139-161 IS3S3, 343-357 et 372-425 I26-IIS1, 669-798 IIS6-IIIS1, 1076-1103 IIIS6-IVS1, 1204-1229 IVS3S4, 1515-1873 C-terminal) diminuant les paramètres DOPE et MOLPDF, qui valident la qualité de notre modèle.

Afin de s'affranchir de ces régions manquantes dans la structure 3D et en vue d'obtenir un modèle plus précis, nous avons décidé de modéliser les interfaces minimales prédites dans l'interaction entre  $\text{Ca}_v 1.1$  et  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . La structure de cryo-ME (PDB 5GJV) montre que la



protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 était principalement localisée au-dessus des boucles extracellulaires S1S2 et S5S6 du domaine I, S5S6 des domaines II et III de Cav $\alpha$ 1 tandis qu'aucune interaction est prédite avec le domaine IV. L'analyse de la structure à l'aide du logiciel bio-informatique d'exploration des interfaces d'interaction PiSa (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) a prédit des interactions entre la boucle S1S2 du domaine I (IS1S2) et la boucle S5S6 du domaine III (IIS5S6) de Cav $\alpha$ 1 et le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. A travers nos études fonctionnelle, nous savons désormais que la liaison de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 permet l'activation du canal Cav1.2 à des potentiels plus physiologiques (Bourdin et al., 2015). Des résultats précédents avaient montré que l'insertion d'un épitope HA sur la boucle extracellulaire IS1S2 empêche la modulation des courants par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, suggérant un rôle dans l'interaction protéine-protéine pour cette région. Une étude fonctionnelle par spectrométrie de fluorescence en voltage imposé a montré que la présence de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 facilite l'activation du canal Cav1.2 en augmentant la sensibilité au voltage des domaines I à III (Savalli et al., 2016). Les mêmes auteurs ont également observé un réarrangement structural plus important des domaines I et III de Cav1.2 en présence de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Ces résultats suggèrent que Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 interagit physiquement avec les domaines I et III de Cav $\alpha$ 1C ce qui modifie la conformation locale du domaine senseur de voltage en rendant les charges positives « plus accessible » à la dépolarisation et augmente la probabilité d'ouverture du canal. Cette hypothèse est compatible avec un autre étude qui a montré, à l'aide d'un canal Cav1.2 chimérique, que tous les senseurs de voltage (sur le segment S4) n'étaient pas équivalents, et qu'il y avait une contribution plus importante des segments S4 des domaines I et III lors de l'ouverture du canal Cav1.2 (Beyl, Hohaus, Andranovits, Timin, & Hering, 2016; Garcia, Nakai, Imoto, & Beam, 1997). À partir de l'ensemble de ces données, nous avons émis l'hypothèse que les interactions prédites entre Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et les boucles extracellulaires des domaines I et III de Cav $\alpha$ 1C étaient responsables des effets fonctionnels observés.

Les régions IS1S4 et IIS5S6 de Cav1.2 en complexe avec le domaine VWA de Cav $\alpha$ 1 ont été modélisées. Un total de 100 modèles pour chacune des deux interfaces ont été générés à l'aide de Modeller et les modèles de IS1S2-VWA et IIS5S6-VWA avec les critères (DOPE score, MOLPDF) de qualité les plus élevées ont été sélectionnés (M. Y. Shen & Sali, 2006). Une des principales limites de cette méthode est que la modélisation par homologie est

entièrement dépendante de la qualité et de la fiabilité de la structure d'origine. Ces modèles ont été donc utilisés pour « guider » notre étude par mutagenèse dirigée couplée aux expériences d'analyse des mutants par co-immunoprécipitation et patch-clamp dans le but de déterminer les acides aminés impliqués dans l'interaction entre Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.

## **6.2.2 Les deux aspartates (Asp-181 et Asp-180) dans Cav1.2 contrôlent la modulation du canal par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1**

Les travaux présentés dans le chapitre 5 porte sur l'étude des déterminants moléculaires de Cav1.2 responsable de l'interaction avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Un criblage mutationnel des résidus sur les boucles IS1S2 et IIS5S6 de Cav1.2 prédit par le modèle pour interagir avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 a montré que l'Asp-181 dans la boucle S1S2 du domaine I de Cav1.2 est le principal résidu responsable de l'interaction avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. La mutation de ce résidu en alanine entraîne la perte totale de l'interaction et de la modulation de Cav1.2 par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. On observe également une variation des paramètres d'activation ( $E_{0.5,act}$  et  $\Delta G_{act}$ ) pour ce mutant par rapport au canal sauvage indiquant que ce résidu joue un rôle majeur dans le mécanisme d'activation du canal par la protéine Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Nous avons également mis en évidence que la substitution de l'Asp-181 par un résidu glutamate (un groupement CH<sub>2</sub> supplémentaire) rétablit la modulation des courants indiquant que la liaison entre Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 nécessite, à cette position, une chaîne latérale ayant une charge négative portée par le groupement carboxylate mais que la distance n'est pas critique. La contribution des résidus chargés négativement dans les interfaces entre les protéines a été bien documenté et jouerait un rôle déterminant dans la spécificité de liaison (Zhao, Pang, Shyu, & Korkin, 2011). En effet, les liaisons électrostatiques contribuent au mécanisme de longue portée par lequel les forces électrostatiques peuvent diriger le recrutement des ligands sur le site de liaison des protéines (Wade, Gabdoulline, Ludemann, & Lounnas, 1998; Z. Zhang, Witham, & Alexov, 2011). À travers un ou plusieurs ponts hydrogènes au niveau de l'interface entre la chaîne latérale de l'Asp-181 et le domaine VWA, le complexe formé entre le ligand (Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1) et la protéine (Cav1.2) serait stabilisé. Outre l'interaction majeure entre la boucle IS1S2 de Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, il existe également une contribution moins importante, mais non négligeable, du résidu Arg-1119 dans la boucle S5S6 du domaine III puisque la mutation de ce résidu en

alanine conserve l'interaction et diminue de moitié la modulation des courants par Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. L'ensemble de ces résultats montrent que Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 interagit avec deux domaines sur Cav1.2. Le criblage mutationnel de la boucle IS1S2 a également mis en évidence que la mutation de l'Asp-180 par un résidu non chargé ne modifie pas l'interaction avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, ni les densités de courants calciques mais déplace le potentiel d'activation vers des valeurs plus physiologiques.

Sur le domaine I, tandis que les segments transmembranaires S1-S4 sont responsables de la dépendance au voltage (senseur de voltage) et les segments S5-S6 de la sélectivité des ions Ca<sup>2+</sup> (filtre de sélectivité) et de la formation du pore, notre étude démontre pour la première fois l'importance de la boucle extracellulaire S1-S2 dans la modulation du canal Cav1.2 par la sous-unité auxiliaire Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Plusieurs questions intéressantes émergent de ces travaux dont le mécanisme moléculaire par lequel la sous-unité Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 influence l'ouverture du canal et les densités de courant suite à sa liaison avec Cav1.2.

Dans le but de répondre à cette question, nous nous sommes intéressés aux interactions intramoléculaires au sein des domaines IS1S4 de Cav1.2. L'étude de la trajectoire des acides aminés constituant notre modèle par dynamique moléculaire a montré que le groupement carboxyle de la chaîne latérale de l'Asp-181 interagit avec des résidus sur le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Par comparaison, la chaîne latérale de l'Asp-180 est orientée complètement à l'opposé de celle de l'Asp-181 et se dirige vers la membrane à une distance atomique de la boucle IS3S4 (**Figure 31**). Ainsi, notre hypothèse est que l'Asp-180 pourrait interagir avec un ou plusieurs résidus sur la boucle IS3S4. Les structures protéiques sont souvent stabilisées par des interactions non covalentes de type liaisons hydrogènes, hydrophobes, ioniques ou cation- $\pi$ . Un des mécanismes envisageables est que le groupement carboxylate de l'Asp-180 pourrait faire un pont hydrogène avec le groupement amine de la chaîne latérale d'un des résidus lysines (Lys-247, Lys-257, Lys-264) situés sur la boucle IS3S4. On peut aussi proposer une interaction de type cation- $\pi$  entre l'Asp-180 et la Phe-261 compte tenu de leur proximité dans la structure 3D (Philip et al., 2011). Il est également possible que les effets observés soient la conséquence d'un réseau complexe d'interactions au sein même du domaine I de Cav1.2. Ainsi, la ou les interactions entre les résidus de la boucle IS1S2 et IS3S4 pourrait changer la

position du segment S4 et rendre les résidus positifs formant le senseur de voltage plus accessibles au champ électrique. Le changement de conformation du segment S4 faciliterait le déplacement du segment S6 et favoriserait l'ouverture du canal. Il a déjà été mis en évidence qu'en réponse à la dépolarisation, le segment S4 est projeté du côté extracellulaire de la membrane induisant un changement conformationnel des segments S4 et S5 qui conduit à l'ouverture du pore (Ahern & Horn, 2004; Catterall & Yarov-Yarovoy, 2010). Pour faciliter le mouvement du segment S4, plusieurs études ont mis en évidence la contribution d'interactions électrostatiques entre des résidus chargés négativement et des résidus polaires sur les segments transmembranaires S1-S3 avec le segment S4 dans les canaux potassiques et sodiques (Lacroix, Hyde, Campos, & Bezanilla, 2014; Pless et al., 2014). Dans les canaux calciques de type-L, il a été mis en évidence que la composition en acide-aminés du segment S3 et la boucle S3S4 du domaine I étaient responsables des différences observées dans les cinétiques d'activation (rapide ou lente) entre les canaux squelettiques (Cav1.1) ou cardiaques (Cav1.2) (Nakai, Adams, Imoto, & Beam, 1994).

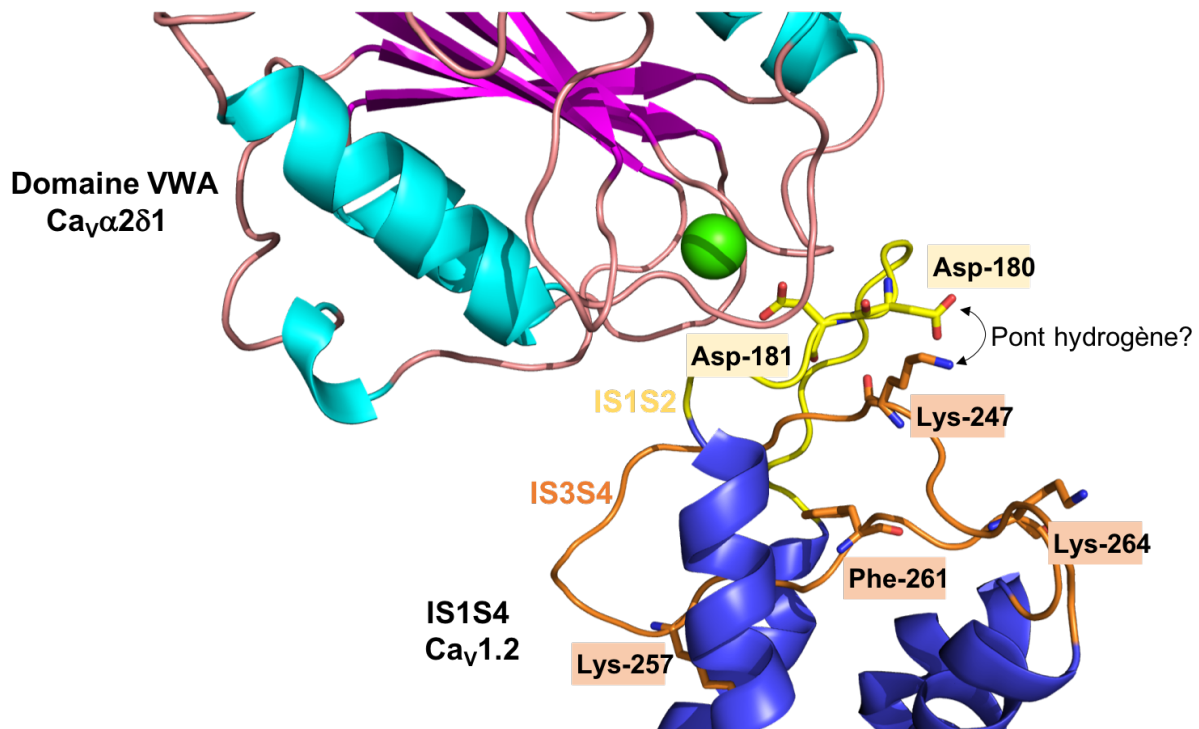


Figure 31. **Modèle de l'interface d'interaction entre Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1.** Le modèle correspondant à la conformation de plus basse énergie après 25 ns de simulation. Les

structures secondaires du domaine VWA sont colorées en bleu cyan (hélice- $\alpha$ ), rose (feuillet- $\beta$ ) et les régions flexibles en rose pale. Les hélices- $\alpha$  sur le domaine I de Cav1.2 sont en violet, la boucle extracellulaire S1S2 est en jaune et S3S4 en orange. Les chaînes latérales des résidus Asp-180, Asp-181, Lys-247, Lys-257, Phe-261 et Lys-264 sont représentées. Le cation divalent est indiqué par une sphère verte.

Cette hypothèse semble compatible avec nos données de dynamique moléculaire recueillies avec le mutant D259A de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 dont l'interaction avec Cav1.2 est perturbée, qui montre que les segments transmembranaires S3 à S4 ont tendance à se déstructurer ce qui éloigne l'Asp-180 de la boucle S3S4 (**Figure 32**). Il est toutefois important de mentionner que notre modèle a été construit à partir des coordonnées de la structure du canal Cav1.1 obtenue dans un état fermé. Lors de l'activation du canal, il est possible que de nouveaux réarrangements structuraux (non observable dans notre modèle) se produisent dans cette région (S3-S4). Afin de vérifier le mécanisme proposé, il serait intéressant de déterminer le rôle des résidus (Lys-247, Lys-257, Phe-261 et Lys-264) sur la boucle S3S4 du domaine de Cav1.2 à l'aide d'une approche similaire à celle réalisée dans l'article du chapitre 4, en utilisant une analyse mutationnelle combinée à l'analyse de ces mutants en électrophysiologie, co-immunoprécipitation et dynamique moléculaire. La nature des mutations dépend de l'acide aminé à tester mais les résidus lysine pourraient être remplacés par un acide aminé de petit volume tel que l'alanine ( $67 \text{ \AA}^3$ ) ou par un acide aminé de charge opposé (aspartate ou glutamate) tandis que la phénylalanine pourrait être remplacé par une alanine ou un acide aminé ayant un volume équivalent tel que la tyrosine ( $141 \text{ \AA}^3$ ).

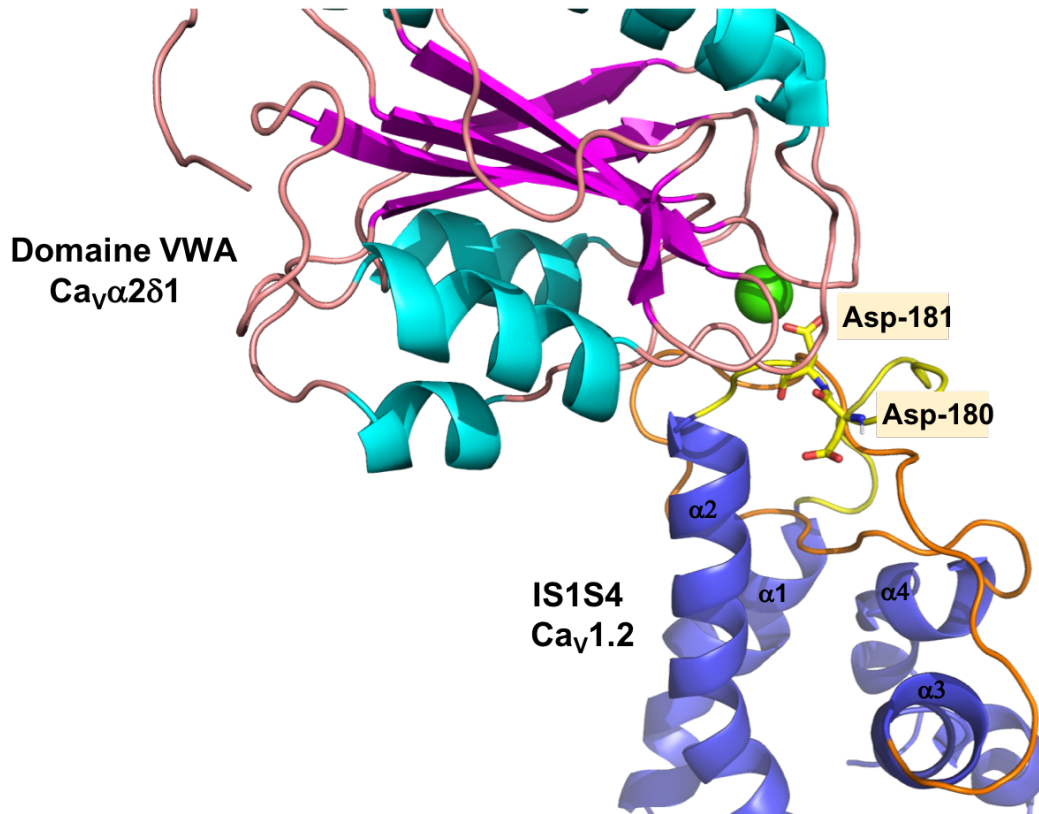


Figure 32. **Modèle de l'interface entre les segments S1S4 du domaine I de Cav1.2 et le mutant D259A de Cavα2δ1.** Le modèle correspondant à la conformation de plus basse énergie après 25 ns de simulation. Les structures secondaires du domaine VWA sont colorées en bleu cyan (hélice- $\alpha$ ), rose (feuillet- $\beta$ ) et les régions flexibles en rose pale. Les hélices- $\alpha$  sur le domaine I de Cav1.2 sont en violet, la boucle extracellulaire S1S2 est en jaune et S3S4 en orange. Les chaînes latérales des résidus Asp-180 et Asp-181 sont représentées. Le cation divalent est indiqué par une sphère verte.

### 6.2.3 Les résidus Asp-259 et Ser-261 du motif MIDAS dans Cavα2δ1 sont importants pour l'interaction et la modulation des courants de Cav1.2

Les travaux présentés dans le chapitre 5 portent sur l'exploration du rôle structural et fonctionnel des résidus situés à l'interface du domaine VWA de Cavα2δ1 qui sont responsable de l'interaction physique avec Cav1.2. A l'aide de l'approche décrite dans le chapitre 4, les acides aminés de Cavα2δ1 importants pour la liaison avec l'Asp-181 de Cav1.2 ont été déterminés par co-immunoprécipitation et leurs impacts sur la fonction du canal ont été évalués par la méthode du patch-clamp. Le modèle de l'interface d'interaction de la boucle

S1S2 du domaine I de Cav1.2 prédit une interaction directe avec la Ser-263 faisant partie du motif MIDAS, avec quatre autres résidus (Asp-259, Ser-261, Thr-331, Asp-363), localisée sur le domaine VWA de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Figure 1, chapitre 5, page 173). Dans la littérature, il est connu que les chaînes latérales des résidus formant le motif MIDAS coordonnent la liaison d'un cation divalent (K. Zhang & Chen, 2012) et participe à l'interaction protéine-protéine (Whittaker & Hynes, 2002). La contribution de chaque résidu MIDAS et des acides aminés adjacents (Val-260, Gly-262) a été étudiée par un criblage mutationnel en arginine et alanine. Nos résultats ont montré que l'Asp-259 et la Ser-261 de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 étaient importants pour la co-immunoprécipitation de Cav1.2 et pour la régulation du canal tandis que la mutation en alanine de la Gly-262, Ser-263 et Asp-363 conservent en partie la fonction de la protéine et l'interaction avec Cav1.2. Les mutants des résidus Val-260 et Thr-331 en alanine se comportent comme la protéine sauvage ce qui suggère que ces résidus ne participent pas directement à la liaison avec Cav1.2. Selon notre modèle, la Ser-261 est exposée à la surface de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, dans le milieu extracellulaire, ce qui suggère que ce résidu est une cible potentielle pour ancrer l'interaction en faisant un pont hydrogène avec l'Asp-181 de Cav1.2. L'implication de ce résidu dans l'interaction protéine-protéine expliquerait les effets fonctionnels observés chez les mutants. En revanche, la contribution de l'Asp-259 dans l'interaction protéine-protéine est surprenante compte tenu que notre modèle prédit que le carbone- $\alpha$  de ce résidu est situé à environ 10 Å du carbone- $\alpha$  de l'Asp-181 de Cav1.2 excluant une liaison directe entre ces deux résidus. Pour expliquer le rôle de ce résidu, nos travaux se sont appuyés sur des simulations de dynamique moléculaire. À partir de notre modèle de l'interface d'interaction entre Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, un modèle pour le mutant D259A a été construit et nous avons suivi son comportement dans le temps. Les trajectoires de simulations sur un temps de 25 ns ont révélé que la mutation D259A de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 déstabilise la conformation du site MIDAS. Dans le modèle mutant, on observe un important réarrangement structural des chaînes principales et latérales des résidus MIDAS donnant plus de mobilité à l'ion Ca<sup>2+</sup>, qui se déplace et devient alors stabilisé directement par la chaîne latérale de l'Asp-181, la chaîne latérale de la Ser-261 et la chaîne principale de la Ser-263. Les résidus Asp-259 et Thr-331 sont projetés à l'extérieur du site MIDAS et ne participent plus à la stabilisation de l'ion Ca<sup>2+</sup>. L'Asp-363 n'interagit plus avec l'ion Ca<sup>2+</sup> mais établit une liaison électrostatique

avec l'hydroxyle de la chaîne latérale de la Ser-261. L'ion  $\text{Ca}^{2+}$ , qui n'est plus coordonné que par deux résidus du motif MIDAS est hydraté par 5 molécules d'eau contrairement au modèle WT où il est stabilisé par seulement 2 molécules d'eau (Figure 7B, chapitre 5, page 188). Cette sphère d'hydratation supplémentaire résulte d'une plus grande accessibilité de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  aux molécules du milieu extracellulaire. Une analyse supplémentaire par dynamique moléculaire du domaine VWA isolé WT ou triple mutant (D259A/S261A/S263A) dans un système mimant les concentrations physiologiques d'ions du milieu extracellulaire a montré que le triple mutant n'était pas capable de retenir l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le site MIDAS contrairement au modèle VWA WT où il reste stable dans le site pendant toute la durée de la simulation (5 ns). L'étude du RMSF (*root-mean-square fluctuation*) à partir du modèle WT a également révélée que le résidu Ser-263 fluctué beaucoup ( $2.8 \pm 0.67\text{\AA}$ ) par comparaison aux autres résidus du motif MIDAS ( $1.35 \pm 0.44\text{\AA}$ ) indiquant que la Ser-263 peut adopter plusieurs conformations dans le temps. Ces données suggèrent que l'interface d'interaction est dynamique et que dans certaines conformations la Ser-263 pourrait interagir directement avec l'Asp-181. Nos résultats expérimentaux montrent aussi que la flexibilité apportée par la Gly-262 joue un rôle déterminant dans le positionnement des deux résidus adjacents (Ser-261 et Ser-263). En prenant en compte l'ensemble de nos données, nous proposons un mécanisme dans lequel le groupement carboxylique de la chaîne latérale de l'Asp-259 capture l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  tandis que la chaîne latérale Ser-261 positionne correctement l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le site MIDAS, deux étapes essentielles au repliement optimal de la protéine  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$ . Dans cette conformation, la Ser-261 ou Ser-263 de  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  peuvent établir alternativement une liaison électrostatique avec l'Asp-181 de  $\text{Cav}1.2$ , ce qui vient stabiliser l'interface grâce à une charge négative supplémentaire portée par sa chaîne latérale permettant ainsi d'emprisonner l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le site MIDAS et permettre la régulation de la fonction du canal par  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  (**Figure 33**). Le domaine WVA de  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  et la boucle IS1S2 de  $\text{Cav}1.2$  sont strictement conservés entre les espèces utilisées dans l'étude et l'humain. Ces données semblent indiquer que les protéines  $\text{Cav}1.2$ - $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  humaines sont régulées selon un mécanisme moléculaire similaire à celui que venons d'identifier.



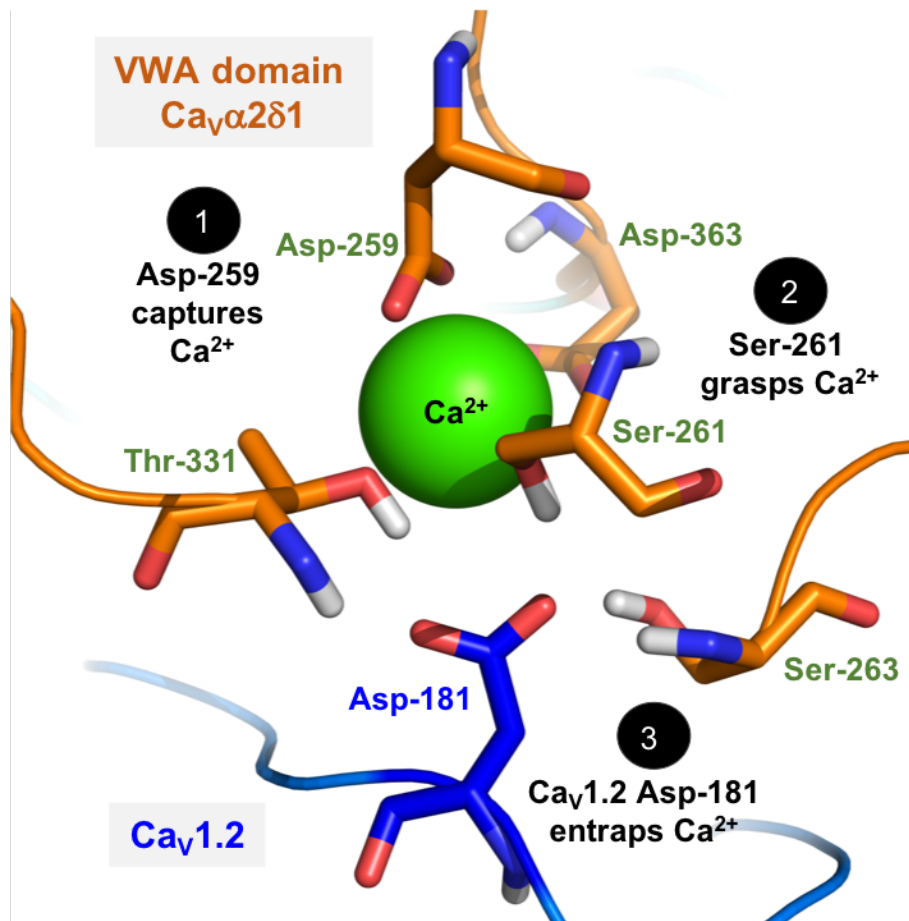


Figure 33. Mécanisme moléculaire proposé pour l'interface d'interaction entre le domaine VWA de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  et l'Asp-181 de  $\text{Ca}_v 1.2$ . Aperçu du centroïde, qui correspond à la conformation la plus représentative de la trajectoire sur 25 ns de simulation. Les chaînes latérales des résidus MIDAS de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  sont en orange et celle du résidu de  $\text{Ca}_v 1.2$  est en bleu. Les groupements oxygènes, amines et hydrogènes sont en rouge, bleu et blanc respectivement.

#### 6.2.4 Méthodes expérimentales d'investigation de la liaison $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ - $\text{Ca}_v 1.2$

L'interaction physique directe entre  $\text{Ca}_v 1.2$  et  $\text{Ca}_v 2\delta 1$  a été étudiée par co-immunoprécipitation en utilisant des billes magnétiques recouvertes soit d'anticorps anti-HA ou anti-c-Myc pour isoler le complexe calcique. L'anticorps anti-HA est dirigée contre la sous-unité  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  et l'anticorps anti-cMyc reconnaît la protéine  $\text{Ca}_v\beta 3$ . Nous avons montré que les deux types d'anticorps pouvaient évaluer l'interaction entre les différentes protéines du complexe calcique et que la liaison de l'anticorps avec sa protéine cible ne modifiée pas le profil d'interaction entre  $\text{Ca}_v\beta 3$ ,  $\text{Ca}_v 1.2$  et  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ . Nous avons toutefois remarqué que, dans certaines circonstances, les signaux de chimiluminescence des membranes de western-blot

obtenus après la co-immunoprécipitation avec l'anticorps anti-HA permettaient de déceler des interactions plus faibles qui n'étaient pas visible avec l'anticorps anti-c-Myc. En effet, cette observation a été faite pour des mutants de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Gly-262, Ser-263, Asp-363) dont la mutation en alanine diminuée l'affinité d'interaction avec Cav1.2. L'utilisation de l'anticorps anti-HA a permis de capturer les états intermédiaires de liaison et de « classer » ces résidus selon leurs degrés d'importance dans l'interaction protéine-protéine tandis que les résultats obtenus avec l'anticorps anti-cMyc montraient une forte diminution de l'interaction pour les trois acides aminés et le signal ne permettait pas de discriminer la contribution de chaque résidu. L'argument le plus plausible pour expliquer les différences d'intensités des signaux observés provient de la sensibilité de l'anticorps anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et anti-Cav1.2 lors de la révélation. Avec l'anti-HA, ce sont les quantités de Cav1.2 qui varient en fonction de l'interaction avec Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (alors qu'avec l'anti-cMyc on mesure les variations de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1), et dans nos conditions expérimentales l'anticorps anti-Cav1.2 détecte de plus petite quantité de protéines contrairement à l'anticorps anti-Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 qui nécessite des temps d'incubation et d'exposition de la membrane plus longs.

Par co-immunoprécipitation, le canal calcique Cav1.2 a été étudié après surexpression dans les cellules HEK et solubilisation dans des micelles de digitonine (Smith & Pickels, 1940). Les micelles ont un potentiel de membrane proche de 0 mV (H. Chen et al., 2008), ce qui signifie que le canal calcique Cav1.2 est probablement retrouvé dans un état fermé durant le processus de co-immunoprécipitation. En patch-clamp, on enregistre les courants ioniques à travers le canal Cav1.2 dans l'état ouvert. Dans les chapitres 4 et 5 nous avons montré que tous les résidus qui jouaient un rôle important dans la modulation fonctionnelle des courants étaient importants pour permettre la co-immunoprécipitation. À partir de ces observations, nous pouvons proposer que l'interface d'interaction locale comprenant le site MIDAS de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et la boucle IS1S2 de Cav1.2 n'est pas perturbée par les différents états conformationnels du canal (fermé, ouvert). D'autre part, on peut émettre l'hypothèse que les principaux réarrangements structuraux, dans cette région, se produisent lors de la liaison de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 avec Cav1.2, et ce indépendamment de l'état d'activation du canal.

### 6.2.5 Vers un mécanisme d'action commun aux « *integrin-like proteins* »

Le mécanisme de liaison proposé entre Cav1.2 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est similaire à celui identifié entre les intégrines et leurs ligands (Bergelson & Hemler, 1995). Les structures 3D des complexes intégrine-ligand ont montré que le motif MIDAS des intégrines ayant en son centre un cation divalent (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) se situent à l'interface d'interaction avec le ligand (J. O. Lee, Rieu, Arnaout, & Liddington, 1995). On peut également observer qu'à travers le groupement carboxyle de d'un aspartate ou glutamate, le ligand fournit un 6<sup>ème</sup> résidu pour coordonner l'ion divalent et ancrer l'interaction avec l'intégrine. Des études par cristallographie aux rayons X ont montrés que le domaine I de l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  en complexe avec le ligand ICAM (*intercellular adhesion molecule*) pouvaient se trouver dans 3 états conformationnels distincts (ouvert, intermédiaire, fermé) (J. O. Lee, Bankston, et al., 1995). Dans chacune de ces conformations, des réarrangements structuraux locaux autour du site MIDAS de l'intégrine et du résidu chargé négativement fourni par le ligand sont observés et modifient l'affinité entre les deux protéines (Shimaoka et al., 2003). Tel que mentionné précédemment, nos résultats semblent indiquer que les différents états conformationnels du canal (ouvert, fermé, inactivé) n'engendrent pas de réarrangements conformationnels majeurs au niveau de l'interface d'interaction entre Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et Cav1.2. En revanche, ces changements pourraient affecter d'autres résidus sur le domaine senseur de voltage qui sont localisés à l'extérieur de l'interface de Cav1.2 (IS1-3, boucle IS3S4) et notamment le segment transmembranaire S4 dont le mouvement vertical entraine l'ouverture du pore (Andranovits et al., 2017; Beyl et al., 2016).

Par cryo-ME, la structure du complexe calcique Cav1.1 a été capturée dans un état fermé, identifiable par la proximité (<1 Å) des quatre résidus hydrophobes (Val-329/Phe-656/Phe-1060/Phe-1376) situés sur la portion distale du S6 des domaines I-IV respectivement qui obstrue le vestibule du côté cytoplasmique empêchant le passage des ions Ca<sup>2+</sup> vers l'intérieur de la cellule (J. Wu et al., 2016a). La comparaison de la position des segments transmembranaires S4 de Cav1.1 avec ceux des canaux NavAb (Payandeh et al., 2011) et NavPaS (H. Shen et al., 2017) a montré que le canal Cav1.1 serait dans un état fermé potentiellement inactivé. Les modèles 3D et les trajectoires de l'interface d'interaction entre Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et Cav1.2 obtenues par modélisation par homologie et dynamique moléculaire ont

été construits à partir d'une seule conformation (fermé inactivé) de la protéine Cav1.1. Ainsi, obtenir des données structurales du canal dans un état ouvert ou fermé pourraient fournir des informations complémentaires importantes concernant le positionnement de la boucle IS3S4 dont nous pensons que les interactions avec les éléments structuraux voisins (boucle IS1S2) contribuent en partie à l'activation du canal Cav1.2 à des potentiels plus physiologiques.

Au sein de la famille des canaux ioniques, il a été reporté que l'activité du canal chlorure activé par le  $Ca^{2+}$  (TMEM16A) est régulé par une protéine extracellulaire CLCA1 (*Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel regulator 1*) en se liant physiquement avec le canal présent à la surface de la membrane (Sala-Rabanal et al., 2015). CLCA1 possède un domaine VWA contenant un motif MIDAS « parfait ». L'équipe dirigée par Pr. Brett a montré par mutagenèse dirigée, patch clamp et immunofluorescence que les résidus MIDAS (Ser-316 et Thr-383) interviennent dans l'interaction entre TMEM16A et CLCA1 et que cette interaction nécessite la présence d'ions  $Mg^{2+}$  (Sala-Rabanal et al., 2017). La liaison de CLCA1 a pour rôle de stabiliser le canal à la membrane en empêchant son internalisation. Le mécanisme de régulation présente des similarités avec celui décrit pour Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et Cav1.2. CLCA1 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 ont des caractéristiques en commun tel qu'un clivage post-traductionnel en deux fragments (N-CLCA1 et C-CLCA1) et la modulation des densités de courants d'un canal ionique. Toutefois, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 présentent des propriétés distinctes avec l'ajout d'une ancre GPI. CLCA1 est sécrété dans le milieu extracellulaire et interagit directement avec le canal TMEM16A présent à la surface membranaire. De façon similaire à CLCA1, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 possède du côté N-terminal de sa séquence un peptide signal permettant son propre adressage membranaire tandis qu'il a été montré que le canal Cav1.2 est stabilisé à la membrane par la sous unité Cav $\beta$  (Bourdin et al., 2010).

Des travaux dans le laboratoire ont montré que le clivage du domaine transmembranaire de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 et l'ajout d'une ancre GPI à la position Cys-1059 sont deux étapes nécessaires pour l'interaction avec Cav1.2 et la modulation de la fonction du canal (Segura et al., 2017). Cette modification post-traductionnelle a lieu au cours de la synthèse au niveau du réticulum endoplasmique. Une des questions intéressantes encore non résolue est à quel moment dans le processus d'exportation des protéines membranaires Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 interagit

avec le canal Cav1.2? Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 pourrait interagir avec le canal à partir du réticulum endoplasmique et le complexe calcique serait alors adresser à la membrane plasmique sous forme mature ou bien être exporté seul et lier directement le canal à la membrane.

La dynamique d'association entre Cav $\alpha$ 1 et Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 a été étudié par la méthode de suivi de particule unique à l'aide d'un épitope HA et d'un fluorophore GFP (*Green Fluorescent Protein*) inséré dans sur la boucle extracellulaire entre les segments transmembranaires IS5S6 et IVS5S6 de Cav $\alpha$ 1 respectivement et un épitope FLAG inséré après le peptide signal du côté N-terminal dans Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1. Cette étude a montré que Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 est plus mobile que Cav $\alpha$ 1 à la surface membranaire, ce qui suggère une interaction transitoire entre les deux protéines. De plus, l'affinité d'interaction entre les deux protéines serait dépendante de l'isoforme de Cav $\alpha$ 1 et il a été proposé que l'affinité de liaison de Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 serait plus grande avec le canal Cav1.2 que Cav2.2, Cav2.1 et Cav3.2 (Voigt et al., 2016). Ces résultats indiquent que les dynamiques d'assemblage et de dissociation du complexe protéique Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1-Cav $\alpha$ 1 jouent un rôle majeur dans le mécanisme de régulation des canaux calciques. Dans ce cas, il serait intéressant de déterminer si ces dynamiques d'assemblage peuvent être influencées par les différents états conformationnels de Cav1.2.

### **6.2.6 Importance de cette étude dans un contexte physiologique**

Les canaux calciques Cav1.2 jouent un rôle primordial dans le couplage excitation-contraction du muscle cardiaque en promouvant l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans les cardiomyocytes ventriculaires. Suite à la dépolarisation de la membrane, le Ca<sup>2+</sup> pénètre dans les cellules en passant à travers le pore central du canal formé par les 24 segments transmembranaires de la sous-unité Cav $\alpha$ 1. L'interaction directe de Cav $\alpha$ 1 avec plusieurs sous-unités auxiliaires (Cav $\beta$ , Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1, calmoduline) permet la régulation des propriétés biophysiques du canal. Au cours des 15 dernières années, les études structurales et fonctionnelles ont révélés les mécanismes moléculaires de l'interaction Cav $\beta$ -Cav $\alpha$ 1 responsable de l'adressage membranaire du canal et de l'inactivation dépendante du Ca<sup>2+</sup> via la liaison constitutive du complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline sur le domaine C-terminal de Cav $\alpha$ 1 (Minor & Findeisen, 2010). Nos travaux ont révélé, pour la première fois, le mécanisme de liaison du domaine VWA de

$\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  avec la boucle extracellulaire IS1S2 de  $\text{Ca}_v\alpha 1$ , étape essentielle qui engendre une augmentation des courants calciques d'un facteur 5-10 et l'activation du canal  $\text{Ca}_v 1.2$  à des potentiels plus physiologiques. Il avait été émis l'hypothèse que  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  pouvait augmenter les courants calciques à travers  $\text{Ca}_v\alpha 1$  en concentrant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  à l'entrée du pore du canal (Canti et al., 2005). Or, la structure 3D a montré que  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  n'est pas localisé au-dessus du pore mais plutôt au-dessus du domaine I de  $\text{Ca}_v\alpha 1$ . Nos travaux suggèrent qu'à travers un réseau complexe d'interactions moléculaires mettant en jeu les segments transmembranaires du senseur de voltage du domaine I de  $\text{Ca}_v 1.2$ ,  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  exerce sa fonction sur le canal. Nous avons également montré que les résidus impliqués dans l'interaction entre  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ - $\text{Ca}_v 1.2$  étaient les mêmes dans l'interaction entre  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ - $\text{Ca}_v 2.3$  indiquant que cette sous-famille de canaux calciques est régulée par  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  selon un mécanisme similaire à celui identifié dans les canaux  $\text{Ca}_v 1$ . Notre étude a contribué à élucider l'étape initiale (interaction directe entre  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ - $\text{Ca}_v\alpha 1\text{C}$ ) du processus de régulation du canal  $\text{Ca}_v 1.2$  par la sous-unité auxiliaire  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  et fournit ainsi une première avancée dans la caractérisation de l'ensemble des mécanismes moléculaires reliant la liaison de  $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$  à l'ouverture du pore du canal  $\text{Ca}_v\alpha 1$ . Des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre l'ensemble des remaniement structuraux de  $\text{Ca}_v\alpha 1$  aboutissant au passage des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . A long terme, ces données participeront à une meilleure compréhension de la manière dont les mutations sur les différentes sous-unités perturbent la fonction des canaux calciques. Ces connaissances présentent des enjeux fondamentaux mais sont surtout indispensables pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des canalopathies calciques.

## 6.3 Conclusion

Dans l'ensemble, ce travail a contribué à une meilleure compréhension des caractéristiques structurales et fonctionnelle de la sous-unité  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  des canaux calciques. En 2013, les données que nous avons sur la protéine  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  étaient limitées. Nous savons maintenant que  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  est sujette à plusieurs modifications post-traductionnelle dont la présence de 16 sites de glycosylation nécessaire à sa stabilité et le clivage de son domaine C-terminal transmembranaire avec l'ajout d'une ancre GPI essentiel pour sa fonction. La publication de la structure du canal calcique  $\text{Cav}1.1$  a finalement résolu la majorité des détails architecturaux de  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  et le positionnement de cette protéine par rapport à la sous-unité  $\text{Cav}\alpha 1$ . Dans ce contexte, nos résultats complètent les données actuelles en fournissant, pour la première fois, un mécanisme moléculaire d'assemblage de  $\text{Cav}1.2$  et  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  nécessitant un réseau complexe d'interactions intra- et intermoléculaires centré autour d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$ . L'interaction physique entre ces deux protéines est directement responsable de la régulation de la fonction du canal calcique cardiaque  $\text{Cav}1.2$  par  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$ . Ces travaux pourront être utilisés par la suite pour étudier les mécanismes de régulation de  $\text{Cav}\alpha 2\delta 1$  par d'autres protéines partenaires (thrombospondines) ou des ligands (gabapentine).

## Chapitre 7 - Bibliographie

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*, 1833(11), 2430-2437. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.04.001
- Ahern, C. A., & Horn, R. (2004). Stirring up controversy with a voltage sensor paddle. *Trends Neurosci*, 27(6), 303-307. doi:10.1016/j.tins.2004.03.008
- Aloy, P., Ceulemans, H., Stark, A., & Russell, R. B. (2003). The relationship between sequence and interaction divergence in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 332(5), 989-998.
- Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., . . . Zamponi, G. W. (2011). The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci*, 14(2), 173-180. doi:10.1038/nn.2712
- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2000). Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem Sci*, 25(11), 535-537.
- Andrade, A., Sandoval, A., Oviedo, N., De Waard, M., Elias, D., & Felix, R. (2007). Proteolytic cleavage of the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta subunit: structural and functional features. *Eur J Neurosci*, 25(6), 1705-1710. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05454.x
- Andronache, Z., Ursu, D., Lehnert, S., Freichel, M., Flockerzi, V., & Melzer, W. (2007). The auxiliary subunit gamma 1 of the skeletal muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channel is an endogenous Ca<sup>2+</sup> antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(45), 17885-17890. doi:10.1073/pnas.0704340104
- Antzelevitch, C., Pollevick, G. D., Cordeiro, J. M., Casis, O., Sanguinetti, M. C., Aizawa, Y., . . . Wolpert, C. (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*, 115(4), 442-449. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.668392
- Armstrong, C. M., & Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol*, 70(5), 567-590.
- Bai, X. C., McMullan, G., & Scheres, S. H. (2015). How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem Sci*, 40(1), 49-57. doi:10.1016/j.tibs.2014.10.005
- Barrett, P. J., Chen, J., Cho, M. K., Kim, J. H., Lu, Z., Mathew, S., . . . Sanders, C. R. (2013). The quiet renaissance of protein nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 52(8), 1303-1320. doi:10.1021/bi4000436
- Batas, B., Jones, H. R., & Chaudhuri, J. B. (1997). Studies of the hydrodynamic volume changes that occur during refolding of lysozyme using size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A*, 766(1-2), 109-119.
- Baynes, B. M., Wang, D. I., & Trout, B. L. (2005). Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry*, 44(12), 4919-4925. doi:10.1021/bi047528r
- Becker, A. K., Mikolajek, H., Werner, J. M., Paulsson, M., & Wagener, R. (2015). Characterization of recombinantly expressed matrilin VWA domains. *Protein Expr Purif*, 107, 20-28. doi:10.1016/j.pep.2014.11.005



- Bergelson, J. M., & Hemler, M. E. (1995). Integrin-ligand binding. Do integrins use a 'MIDAS touch' to grasp an Asp? *Curr Biol*, *5*(6), 615-617.
- Berger, O., Edholm, O., & Jahnig, F. (1997). Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal*, *72*(5), 2002-2013. doi:10.1016/S0006-3495(97)78845-3
- Berrou, L., Bernatchez, G., & Parent, L. (2001). Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of alpha1E (CaV2.3) calcium channels. *Biophysical Journal*, *80*(1), 215-228. doi:10.1016/S0006-3495(01)76008-0
- Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Tousignant, A., Dafi, O., Pelletier, J. N., & Parent, L. (2005). The C-terminal residues in the alpha-interacting domain (AID) helix anchor CaV beta subunit interaction and modulation of CaV2.3 channels. *J Biol Chem*, *280*(1), 494-505. doi:10.1074/jbc.M410859200
- Berrou, L., Klein, H., Bernatchez, G., & Parent, L. (2002). A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels. *Biophysical Journal*, *83*(3), 1429-1442. doi:10.1016/S0006-3495(02)73914-3
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198-205. doi:10.1038/415198a
- Beto, J. A. (2015). The role of calcium in human aging. *Clin Nutr Res*, *4*(1), 1-8. doi:10.7762/cnr.2015.4.1.1
- Betzenhauser, M. J., Pitt, G. S., & Antzelevitch, C. (2015). Calcium Channel Mutations in Cardiac Arrhythmia Syndromes. *Curr Mol Pharmacol*, *8*(2), 133-142.
- Beyl, S., Hohaus, A., Andranovits, S., Timin, E., & Hering, S. (2016). Upward movement of IS4 and IIS4 is a rate-limiting stage in Cav1.2 activation. *Pflugers Arch*, *468*(11-12), 1895-1907. doi:10.1007/s00424-016-1895-5
- Bezanilla, F., & Perozo, E. (2003). The voltage sensor and the gate in ion channels. *Adv Protein Chem*, *63*, 211-241.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., . . . De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*, *25*(1), 177-190.
- Boczek, N. J., Best, J. M., Tester, D. J., Giudicessi, J. R., Middha, S., Evans, J. M., . . . Ackerman, M. J. (2013). Exome sequencing and systems biology converge to identify novel mutations in the L-type calcium channel, CACNA1C, linked to autosomal dominant long QT syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*, *6*(3), 279-289. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000138
- Boczek, N. J., Miller, E. M., Ye, D., Nesterenko, V. V., Tester, D. J., Antzelevitch, C., . . . Ware, S. M. (2015). Novel Timothy syndrome mutation leading to increase in CACNA1C window current. *Heart Rhythm*, *12*(1), 211-219. doi:10.1016/j.hrthm.2014.09.051
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., Akhter, S. A., & Schwartz, A. (2005). The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest*, *115*(12), 3306-3317. doi:10.1172/JCI27167
- Boldon, L., Laliberte, F., & Liu, L. (2015). Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano Rev*, *6*, 25661. doi:10.3402/nano.v6.25661

- Bootman, M. D. (2012). Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(7), a011171. doi:10.1101/cshperspect.a011171
- Borchard, U., & Hafner, D. (2000). [Ion channels and arrhythmias]. *Z Kardiol*, 89 Suppl 3, 6-12.
- Bork, P., & Rohde, K. (1991). More von Willebrand factor type A domains? Sequence similarities with malaria thrombospondin-related anonymous protein, dihydropyridine-sensitive calcium channel and inter-alpha-trypsin inhibitor. *Biochem J*, 279 ( Pt 3), 908-910.
- Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M., & Lazdunski, M. (1985). The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Purification and subunit composition. *J Biol Chem*, 260(26), 14255-14263.
- Boukens, B. J., Christoffels, V. M., Coronel, R., & Moorman, A. F. (2009). Developmental basis for electrophysiological heterogeneity in the ventricular and outflow tract myocardium as a substrate for life-threatening ventricular arrhythmias. *Circ Res*, 104(1), 19-31. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.188698
- Bourdin, B., Briot, J., Tetreault, M. P., Sauve, R., & Parent, L. (2017). Negatively charged residues in the first extracellular loop of the L-type CaV1.2 channel anchor the interaction with the CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 auxiliary subunit. *J Biol Chem*, 292(42), 17236-17249. doi:10.1074/jbc.M117.806893
- Bourdin, B., Marger, F., Wall-Lacelle, S., Schneider, T., Klein, H., Sauve, R., & Parent, L. (2010). Molecular determinants of the CaV $\beta$ -induced plasma membrane targeting of the CaV1.2 channel. *J Biol Chem*, 285(30), 22853-22863. doi:10.1074/jbc.M110.111062
- Bourdin, B., Segura, E., Tetreault, M. P., Lesage, S., & Parent, L. (2016). Determination of the Relative Cell Surface and Total Expression of Recombinant Ion Channels Using Flow Cytometry. *J Vis Exp*(115). doi:10.3791/54732
- Bourdin, B., Shakeri, B., Tetreault, M. P., Sauve, R., Lesage, S., & Parent, L. (2015). Functional characterization of CaV $\alpha$ 2 $\delta$  mutations associated with sudden cardiac death. *J Biol Chem*, 290(5), 2854-2869. doi:10.1074/jbc.M114.597930
- Briot, J., D'Avanzo, N., Sygusch, J., & Parent, L. (2016). Three-Dimensional Architecture of the L-Type Calcium Channel: Structural Insights into the CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Auxiliary Protein. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*, Vol. 2(Issue 3). doi:10.21767/2471-8084.100025
- Briot, J., Tetreault, M. P., Bourdin, B., & Parent, L. (2017). Inherited Ventricular Arrhythmias: The Role of the Multi-Subunit Structure of the L-Type Calcium Channel Complex. *Adv Exp Med Biol*, 966, 55-64. doi:10.1007/5584\_2016\_186
- Bronner, F. (2001). Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal*, 1, 919-925. doi:10.1100/tsw.2001.489
- Brown, J. P., Dissanayake, V. U., Briggs, A. R., Milic, M. R., & Gee, N. S. (1998). Isolation of the [3H]gabapentin-binding protein/alpha 2 delta Ca<sup>2+</sup> channel subunit from porcine brain: development of a radioligand binding assay for alpha 2 delta subunits using [3H]leucine. *Anal Biochem*, 255(2), 236-243. doi:10.1006/abio.1997.2447
- Budde, T., Meuth, S., & Pape, H. C. (2002). Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci*, 3(11), 873-883. doi:10.1038/nrn959
- Bulheller, B. M., Rodger, A., & Hirst, J. D. (2007). Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys*, 9(17), 2020-2035. doi:10.1039/b615870f

- Buraei, Z., & Yang, J. (2010). The ss subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiol Rev*, 90(4), 1461-1506. doi:10.1152/physrev.00057.2009
- Buraei, Z., & Yang, J. (2013). Structure and function of the beta subunit of voltage-gated Ca(2)(+) channels. *Biochim Biophys Acta*, 1828(7), 1530-1540. doi:10.1016/j.bbamem.2012.08.028
- Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpon, E., Hu, D., Desai, M., . . . Antzelevitch, C. (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm*, 7(12), 1872-1882. doi:10.1016/j.hrthm.2010.08.026
- Calderon-Rivera, A., Andrade, A., Hernandez-Hernandez, O., Gonzalez-Ramirez, R., Sandoval, A., Rivera, M., . . . Felix, R. (2012a). Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel alpha(2)delta-1 auxiliary subunit. *Cell Calcium*, 51(1), 22-30. doi:10.1016/j.ceca.2011.10.002
- Calderon-Rivera, A., Andrade, A., Hernandez-Hernandez, O., Gonzalez-Ramirez, R., Sandoval, A., Rivera, M., . . . Felix, R. (2012b). Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca(2+) channel alpha(2)delta-1 auxiliary subunit. *Cell Calcium*, 51(1), 22-30. doi:10.1016/j.ceca.2011.10.002
- Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Heblich, F., Wratten, J., Richards, M. W., . . . Dolphin, A. C. (2005). The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(32), 11230-11235. doi:10.1073/pnas.0504183102
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., & Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 36(2), 107-260. doi:10.1080/20014091074183
- Carrio, M. M., Cubarsi, R., & Villaverde, A. (2000). Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *Febs Letters*, 471(1), 7-11.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(8), a003947. doi:10.1101/cshperspect.a003947
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 411-425. doi:10.1124/pr.57.4.5
- Catterall, W. A., & Swanson, T. M. (2015). Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol Pharmacol*, 88(1), 141-150. doi:10.1124/mol.114.097659
- Catterall, W. A., & Yarov-Yarovoy, V. (2010). Helical motion of an S4 voltage sensor revealed by gating pore currents. *Channels (Austin)*, 4(2), 75-77.
- Catterall, W. A., & Zheng, N. (2015). Deciphering voltage-gated Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels by studying prokaryotic ancestors. *Trends Biochem Sci*, 40(9), 526-534. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.002
- Chen, J., Liu, Y., Wang, Y., Ding, H., & Su, Z. (2008). Different effects of L-arginine on protein refolding: suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding. *Biotechnol Prog*, 24(6), 1365-1372. doi:10.1002/btpr.93
- Chen, Y. H., Li, M. H., Zhang, Y., He, L. L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., . . . Yang, J. (2004). Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature*, 429(6992), 675-680. doi:10.1038/nature02641

- Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A., & Walz, T. (2015). A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell*, *161*(3), 438-449. doi:10.1016/j.cell.2015.03.050
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, *131*(6), 1047-1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
- Clarke, D. T. (2011). Circular dichroism and its use in protein-folding studies. *Methods Mol Biol*, *752*, 59-72. doi:10.1007/978-1-60327-223-0\_5
- Colecraft, H. M., Alseikhan, B., Takahashi, S. X., Chaudhuri, D., Mittman, S., Yegnashubramanian, V., . . . Yue, D. T. (2002). Novel functional properties of Ca(2+) channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J Physiol*, *541*(Pt 2), 435-452.
- Colombatti, A., & Bonaldo, P. (1991). The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood*, *77*(11), 2305-2315.
- Cordeiro, J. M., Marieb, M., Pfeiffer, R., Calloe, K., Burashnikov, E., & Antzelevitch, C. (2009). Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, *46*(5), 695-703.
- Craig, D., Gao, M., Schulten, K., & Vogel, V. (2004). Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. *Structure*, *12*(11), 2049-2058. doi:10.1016/j.str.2004.09.009
- Crotti, L., Johnson, C. N., Graf, E., De Ferrari, G. M., Cuneo, B. F., Ovadia, M., . . . George, A. L., Jr. (2013). Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. *Circulation*, *127*(9), 1009-1017. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001216
- Curtis, B. M., & Catterall, W. A. (1983). Solubilization of the calcium antagonist receptor from rat brain. *J Biol Chem*, *258*(12), 7280-7283.
- Curtis, B. M., & Catterall, W. A. (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*, *23*(10), 2113-2118.
- Dafi, O., Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Sauve, R., & Parent, L. (2004). Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to CaV1.2. *Biophysical Journal*, *87*(5), 3181-3192. doi:10.1529/biophysj.104.045559
- Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A. T., Wratten, J., Douglas, L., & Dolphin, A. C. (2007). Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci*, *28*(5), 220-228. doi:10.1016/j.tips.2007.03.005
- Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C. S., . . . Dolphin, A. C. (2010). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(4), 1654-1659. doi:10.1073/pnas.0908735107
- de Leon, M., Wang, Y., Jones, L., Perez-Reyes, E., Wei, X., Soong, T. W., . . . Yue, D. T. (1995). Essential Ca(2+)-binding motif for Ca(2+)-sensitive inactivation of L-type Ca2+ channels. *Science*, *270*(5241), 1502-1506.
- Deller, M. C., Kong, L., & Rupp, B. (2016). Protein stability: a crystallographer's perspective. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, *72*(Pt 2), 72-95. doi:10.1107/S2053230X15024619

- Demo, S. D., & Yellen, G. (1991). The inactivation gate of the Shaker K<sup>+</sup> channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron*, 7(5), 743-753.
- Depil, K., Beyl, S., Stary-Weinzinger, A., Hohaus, A., Timin, E., & Hering, S. (2011). Timothy mutation disrupts the link between activation and inactivation in Ca(V)1.2 protein. *J Biol Chem*, 286(36), 31557-31564. doi:10.1074/jbc.M111.255273
- Dessau, M. A., & Modis, Y. (2011). Protein crystallization for X-ray crystallography. *J Vis Exp*(47). doi:10.3791/2285
- Doerr, A. (2015). Cryo-Em Goes High-Resolution. *Nat Methods*, 12(7), 598-599.
- Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S56-62. doi:10.1038/sj.bjp.0706442
- Dolphin, A. C. (2013). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta*, 1828(7), 1541-1549. doi:10.1016/j.bbamem.2012.11.019
- dos Reis, M. A., Aparicio, R., & Zhang, Y. (2011). Improving Protein Template Recognition by Using Small-Angle X-Ray Scattering Profiles. *Biophys J*, 101(11), 2770-2781. doi:10.1016/j.bpj.2011.10.046
- Douglas, L., Davies, A., Wratten, J., & Dolphin, A. C. (2006). Do voltage-gated calcium channel alpha2delta subunits require proteolytic processing into alpha2 and delta to be functional? *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), 894-898. doi:10.1042/BST0340894
- Dragicevic, E., Poetschke, C., Duda, J., Schlaudraff, F., Lammel, S., Schiemann, J., . . . Liss, B. (2014). Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in substantia nigra dopamine neurons. *Brain*, 137(Pt 8), 2287-2302. doi:10.1093/brain/awu131
- Ebashi, S. (1961). Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J Chir (Paris)*, 82, 236-244.
- Ebashi, S., & Kodama, A. (1965). A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J Biochem*, 58(1), 107-108.
- Edwards, Y. J., & Perkins, S. J. (1995). The protein fold of the von Willebrand factor type A domain is predicted to be similar to the open twisted beta-sheet flanked by alpha-helices found in human ras-p21. *Febs Letters*, 358(3), 283-286.
- Elgendi, M., Eskofier, B., Dokos, S., & Abbott, D. (2014). Revisiting QRS detection methodologies for portable, wearable, battery-operated, and wireless ECG systems. *PLoS One*, 9(1), e84018. doi:10.1371/journal.pone.0084018
- Ellis, S. B., Williams, M. E., Ways, N. R., Brenner, R., Sharp, A. H., Leung, A. T., . . . Harpold, M. M. (1988). Sequence and Expression of Messenger-Rnas Encoding the Alpha-1-Subunit and Alpha-2-Subunit of a Dhp-Sensitive Calcium-Channel. *Science*, 241(4873), 1661-1664. doi:Doi 10.1126/Science.2458626
- Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J., & Liddington, R. C. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell*, 101(1), 47-56. doi:10.1016/S0092-8674(00)80622-4
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., . . . Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), 533-535.
- Fatt, P., & Katz, B. (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol*, 120(1-2), 171-204.
- Ferguson, M. A. J., Hart, G. W., & Kinoshita, T. (2015). Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi,

- A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, & P. H. Seeberger (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (3rd ed.). Cold Spring Harbor (NY).
- Fernandez-Leiro, R., & Scheres, S. H. (2016). Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature*, *537*(7620), 339-346. doi:10.1038/nature19948
- Field, M. J., Cox, P. J., Stott, E., Melrose, H., Offord, J., Su, T. Z., . . . Williams, D. (2006). Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(46), 17537-17542. doi:10.1073/pnas.0409066103
- Fiser, A. (2010). Template-based protein structure modeling. *Methods Mol Biol*, *673*, 73-94. doi:10.1007/978-1-60761-842-3\_6
- Flockerzi, V., Oeken, H. J., & Hofmann, F. (1986). Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur J Biochem*, *161*(1), 217-224.
- Flockerzi, V., Oeken, H. J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalie, A., & Trautwein, W. (1986). Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature*, *323*(6083), 66-68. doi:10.1038/323066a0
- Fukuyama, M., Ohno, S., Wang, Q., Kimura, H., Makiyama, T., Itoh, H., . . . Horie, M. (2013). L-type calcium channel mutations in Japanese patients with inherited arrhythmias. *Circ J*, *77*(7), 1799-1806.
- Fukuyama, M., Wang, Q., Kato, K., Ohno, S., Ding, W. G., Toyoda, F., . . . Horie, M. (2014). Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes. *Europace*, *16*(12), 1828-1837. doi:10.1093/europace/euu063
- Fuller-Bicer, G. A., Varadi, G., Koch, S. E., Ishii, M., Bodi, I., Kadeer, N., . . . Schwartz, A. (2009). Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel alpha2/delta-1-subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *297*(1), H117-124. doi:10.1152/ajpheart.00122.2009
- Gaborit, N., Steenman, M., Lamirault, G., Le Meur, N., Le Bouter, S., Lande, G., . . . Demolombe, S. (2005). Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation*, *112*(4), 471-481. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.506857
- Galinska-Rakoczy, A., Engel, P., Xu, C., Jung, H., Craig, R., Tobacman, L. S., & Lehman, W. (2008). Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *Journal of Molecular Biology*, *379*(5), 929-935. doi:10.1016/j.jmb.2008.04.062
- Gandhi, C. S., & Olcese, R. (2008). The voltage-clamp fluorometry technique. *Methods Mol Biol*, *491*, 213-231. doi:10.1007/978-1-59745-526-8\_17
- Garcia, J., Nakai, J., Imoto, K., & Beam, K. G. (1997). Role of S4 segments and the leucine heptad motif in the activation of an L-type calcium channel. *Biophysical Journal*, *72*(6), 2515-2523. doi:10.1016/S0006-3495(97)78896-9
- Gaudet, R. (2009). Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments. *J Gen Physiol*, *133*(3), 231-237. doi:10.1085/jgp.200810137
- Gillis, J., Burashnikov, E., Antzelevitch, C., Blaser, S., Gross, G., Turner, L., . . . Chitayat, D. (2012). Long QT, syndactyly, joint contractures, stroke and novel CACNA1C mutation: expanding the spectrum of Timothy syndrome. *Am J Med Genet A*, *158A*(1), 182-187. doi:10.1002/ajmg.a.34355

- Gonzalez-Gutierrez, G., Miranda-Laferte, E., Nothmann, D., Schmidt, S., Neely, A., & Hidalgo, P. (2008). The guanylate kinase domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels suffices to modulate gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(37), 14198-14203. doi:10.1073/pnas.0806558105
- Halling, D. B., Georgiou, D. K., Black, D. J., Yang, G., Fallon, J. L., Quijoco, F. A., . . . Hamilton, S. L. (2009a). Determinants in CaV1 channels that regulate the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of bound calmodulin. *J Biol Chem*, *284*(30), 20041-20051. doi:10.1074/jbc.M109.013326
- Halling, D. B., Georgiou, D. K., Black, D. J., Yang, G. J., Fallon, J. L., Quijoco, F. A., . . . Hamilton, S. L. (2009b). Determinants in Ca(V)1 Channels That Regulate the Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of Bound Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(30), 20041-20051. doi:10.1074/jbc.M109.013326
- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., & Parkinson, J. S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci*, *33*(1), 9-19. doi:10.1016/j.tibs.2007.09.014
- Hebert, T. E., Gales, C., & Rebois, R. V. (2006). Detecting and imaging protein-protein interactions during G protein-mediated signal transduction in vivo and in situ by using fluorescence-based techniques. *Cell Biochem Biophys*, *45*(1), 85-109. doi:10.1385/CBB:45:1:85
- Heinemann, S. H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K., & Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, *356*(6368), 441-443. doi:10.1038/356441a0
- Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Warner, C., Ahljianian, M. K., Prystay, W., Gilbert, M. M., . . . Catterall, W. A. (1993). Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol*, *123*(4), 949-962.
- Herlitze, S., Hockerman, G. H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1997). Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel alpha1A subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(4), 1512-1516.
- Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., & Wegener, J. W. (2014). L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev*, *94*(1), 303-326. doi:10.1152/physrev.00016.2013
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, *250*(4980), 533-538.
- Hullin, R., Khan, I. F., Wirtz, S., Mohacsi, P., Varadi, G., Schwartz, A., & Herzig, S. (2003). Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J Biol Chem*, *278*(24), 21623-21630. doi:10.1074/jbc.M211164200
- Hulme, J. T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T. W., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2006). Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol*, *576*(Pt 1), 87-102. doi:10.1113/jphysiol.2006.111799
- Hura, G. L., Menon, A. L., Hammel, M., Rambo, R. P., Poole, F. L., 2nd, Tsutakawa, S. E., . . . Tainer, J. A. (2009). Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nat Methods*, *6*(8), 606-612. doi:10.1038/nmeth.1353

- Jay, S. D., Ellis, S. B., McCue, A. F., Williams, M. E., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1990a). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, *248*(4954), 490-492.
- Jay, S. D., Ellis, S. B., Mccue, A. F., Williams, M. E., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1990b). Primary Structure of the Gamma-Subunit of the Dhp-Sensitive Calcium-Channel from Skeletal-Muscle. *Science*, *248*(4954), 490-492. doi:Doi 10.1126/Science.2158672
- Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1991a). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *J Biol Chem*, *266*(5), 3287-3293.
- Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1991b). Structural Characterization of the Dihydropyridine-Sensitive Calcium-Channel Alpha-2-Subunit and the Associated Delta-Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(5), 3287-3293.
- Johnson, J. N., & Ackerman, M. J. (2009). QTc: how long is too long? *Br J Sports Med*, *43*(9), 657-662. doi:10.1136/bjism.2008.054734
- Joshi, I., & Taylor, C. P. (2006). Pregabalin action at a model synapse: binding to presynaptic calcium channel alpha2-delta subunit reduces neurotransmission in mice. *Eur J Pharmacol*, *553*(1-3), 82-88. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.019
- Kamata, T., Liddington, R. C., & Takada, Y. (1999). Interaction between collagen and the alpha(2) I-domain of integrin alpha(2)beta(1). Critical role of conserved residues in the metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) region. *J Biol Chem*, *274*(45), 32108-32111.
- Kikhney, A. G., & Svergun, D. I. (2015). A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *Febs Letters*, *589*(19 Pt A), 2570-2577. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.027
- Kim, E. Y., Rumpf, C. H., Fujiwara, Y., Cooley, E. S., Van Petegem, F., & Minor, D. L., Jr. (2008). Structures of CaV2 Ca<sup>2+</sup>/CaM-IQ domain complexes reveal binding modes that underlie calcium-dependent inactivation and facilitation. *Structure*, *16*(10), 1455-1467. doi:10.1016/j.str.2008.07.010
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., & Hofmann, F. (1999). Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci*, *19*(2), 684-691.
- Klugbauer, N., Marais, E., & Hofmann, F. (2003). Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr*, *35*(6), 639-647.
- Kneuper, H., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Bock, V., Griesinger, C., & Unden, G. (2005). The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of Escherichia coli. *J Biol Chem*, *280*(21), 20596-20603. doi:10.1074/jbc.M502015200
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., & Svergun, D. I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, *36*, 1277-1282. doi:10.1107/S0021889803012779
- Kopecky, B. J., Liang, R., & Bao, J. (2014). T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents. *Pflugers Arch*, *466*(4), 757-765. doi:10.1007/s00424-014-1454-x



- Krause, U., Gravenhorst, V., Kriebel, T., Ruschewski, W., & Paul, T. (2011). A rare association of long QT syndrome and syndactyly: Timothy syndrome (LQT 8). *Clin Res Cardiol*, *100*(12), 1123-1127. doi:10.1007/s00392-011-0358-4
- Kryshtal, D. O., Hwang, H. S., Johnson, C. N., Chazin, W. J., George, A. L., & Knollmann, B. C. (2015). Divergent Regulation of Cardiomyocyte Cav1.2 Currents by Calmodulin Mutants Associated with Human Sudden Death Syndromes. *Biophysical Journal*, *108*(2), 580A-580A.
- Kwasigroch, J. M., Chomilier, J., & Mornon, J. P. (1996). A global taxonomy of loops in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, *259*(4), 855-872. doi:10.1006/jmbi.1996.0363
- Lacinova, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys*, *24 Suppl 1*, 1-78.
- Lacroix, J. J., Hyde, H. C., Campos, F. V., & Bezanilla, F. (2014). Moving gating charges through the gating pore in a Kv channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(19), E1950-1959. doi:10.1073/pnas.1406161111
- Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A., & Collier, R. J. (2004). Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(17), 6367-6372. doi:10.1073/pnas.0401506101
- Lana, B., Page, K. M., Kadurin, I., Ho, S., Nieto-Rostro, M., & Dolphin, A. C. (2016). Thrombospondin-4 reduces binding affinity of [(3)H]-gabapentin to calcium-channel alpha2delta-1-subunit but does not interact with alpha2delta-1 on the cell-surface when co-expressed. *Sci Rep*, *6*, 24531. doi:10.1038/srep24531
- Lazniewska, J., & Weiss, N. (2017). Glycosylation of voltage-gated calcium channels in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, *1859*(5), 662-668. doi:10.1016/j.bbame.2017.01.018
- Lee, J. O., Bankston, L. A., Arnaout, M. A., & Liddington, R. C. (1995). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure*, *3*(12), 1333-1340.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A., & Liddington, R. (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, *80*(4), 631-638.
- Lee, K. S., Marban, E., & Tsien, R. W. (1985). Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol*, *364*, 395-411.
- Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res*, *43*(Database issue), D257-260. doi:10.1093/nar/gku949
- Leung, A. T., Imagawa, T., & Campbell, K. P. (1987). Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem*, *262*(17), 7943-7946.
- Limpitikul, W. B., Dick, I. E., Joshi-Mukherjee, R., Overgaard, M. T., George, A. L., Jr., & Yue, D. T. (2014). Calmodulin mutations associated with long QT syndrome prevent inactivation of cardiac L-type Ca(2+) currents and promote proarrhythmic behavior in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, *74*, 115-124. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.04.022

- Liu, N., Liu, Y., Yang, Y., & Liu, X. (2017). Linker flexibility of IVS3-S4 loops modulates voltage-dependent activation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Channels (Austin)*, *11*(1), 34-45. doi:10.1080/19336950.2016.1207023
- Lodish H, e. a. (2000). *Intracellular ion environment and membrane electric potential*. (Vol. Section 15.4).
- Long, S. B., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*, *309*(5736), 897-903. doi:10.1126/science.1116269
- Luo, B. H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, *25*, 619-647. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618
- Mahalingam, B., Ajroud, K., Alonso, J. L., Anand, S., Adair, B. D., Horenstein, A. L., . . . Arnaout, M. A. (2011). Stable coordination of the inhibitory Ca<sup>2+</sup> ion at the metal ion-dependent adhesion site in integrin CD11b/CD18 by an antibody-derived ligand aspartate: implications for integrin regulation and structure-based drug design. *J Immunol*, *187*(12), 6393-6401. doi:10.4049/jimmunol.1102394
- Mallet, R. T., & Sun, J. (1999). Mitochondrial metabolism of pyruvate is required for its enhancement of cardiac function and energetics. *Cardiovasc Res*, *42*(1), 149-161.
- Mallet, R. T., Sun, J., Knott, E. M., Sharma, A. B., & Olivencia-Yurvati, A. H. (2005). Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp Biol Med (Maywood)*, *230*(7), 435-443.
- Mangoni, M. E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J., & Nargeot, J. (2003). Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(9), 5543-5548. doi:10.1073/pnas.0935295100
- Marais, E., Klugbauer, N., & Hofmann, F. (2001). Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol*, *59*(5), 1243-1248.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., . . . Bryant, S. H. (2015a). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, *43*(Database issue), D222-226. doi:10.1093/nar/gku1221
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S. N., Chitsaz, F., Geer, L. Y., . . . Bryant, S. H. (2015b). Cdd: Ncbi's Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*, *43*(D1), D222-D226. doi:10.1093/nar/gku1221
- Mark James Abraham, T. M., Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, Erik Lindahl. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, *1-2*, 19-25. doi:doi:10.1016/j.softx.2015.06.001
- Matsudaira, P. T. (2000). *Molecular Cell Biology 4.0* (pp. 1 CD-ROM).
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol*, *824*, 329-358. doi:10.1007/978-1-61779-433-9\_17
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, *70*(Pt 1), 2-20. doi:10.1107/S2053230X13033141
- Meier, V. M., Muschler, P., & Scharf, B. E. (2007). Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, *189*(5), 1816-1826. doi:10.1128/JB.00883-06

- Meshik, X., Choi, M., Baker, A., Malchow, R. P., Covnot, L., Doan, S., . . . Stroschio, M. A. (2017). Modulation of voltage-gated conductances of retinal horizontal cells by UV-excited TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanomedicine*, *13*(3), 1031-1040. doi:10.1016/j.nano.2016.11.008
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., . . . Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, *340*(6230), 230-233. doi:10.1038/340230a0
- Milne, J. L., Borgnia, M. J., Bartesaghi, A., Tran, E. E., Earl, L. A., Schauder, D. M., . . . Subramaniam, S. (2013). Cryo-electron microscopy--a primer for the non-microscopist. *FEBS J*, *280*(1), 28-45. doi:10.1111/febs.12078
- Minor, D. L., Jr., & Findeisen, F. (2010). Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (CaV) function and modulation. *Channels (Austin)*, *4*(6), 459-474. doi:10.4161/chan.4.6.12867
- Moss, A. J., & Kass, R. S. (2005). Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. *J Clin Invest*, *115*(8), 2018-2024. doi:10.1172/JCI25537
- Murata, K., & Wolf, M. (2017). Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbagen.2017.07.020
- Nagle, J. F. (1993). Area/lipid of bilayers from NMR. *Biophysical Journal*, *64*(5), 1476-1481. doi:10.1016/S0006-3495(93)81514-5
- Nakai, J., Adams, B. A., Imoto, K., & Beam, K. G. (1994). Critical roles of the S3 segment and S3-S4 linker of repeat I in activation of L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*(3), 1014-1018.
- Napolitano, C., & Antzelevitch, C. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. *Circ Res*, *108*(5), 607-618. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.224279
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, *85*(4), 1205-1253. doi:10.1152/physrev.00002.2005
- Nothhaft, H., & Szymanski, C. M. (2010). Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat Rev Microbiol*, *8*(11), 765-778. doi:10.1038/nrmicro2383
- O'Dell, B. L., & Sunde, R. A. (1997). *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. New York: Marcel Dekker.
- O'Donnell-Tormey, J., Nathan, C. F., Lanks, K., DeBoer, C. J., & de la Harpe, J. (1987). Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med*, *165*(2), 500-514.
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., & van Gunsteren, W. F. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem*, *25*(13), 1656-1676. doi:10.1002/jcc.20090
- Opatowsky, Y., Chen, C. C., Campbell, K. P., & Hirsch, J. A. (2004). Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron*, *42*(3), 387-399.
- Ortner, N. J., & Striessnig, J. (2016). L-type calcium channels as drug targets in CNS disorders. *Channels (Austin)*, *10*(1), 7-13. doi:10.1080/19336950.2015.1048936
- Panca, R., & Fuxreiter, M. (2012). Interactions via intrinsically disordered regions: what kind of motifs? *IUBMB Life*, *64*(6), 513-520. doi:10.1002/iub.1034

- Pantazis, A., Savalli, N., Sigg, D., Neely, A., & Olcese, R. (2014). Functional heterogeneity of the four voltage sensors of a human L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(51), 18381-18386. doi:10.1073/pnas.1411127112
- Parent, L., & Gopalakrishnan, M. (1995a). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophysical Journal*, *69*(5), 1801-1813. doi:10.1016/S0006-3495(95)80050-0
- Parent, L., & Gopalakrishnan, M. (1995b). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophysical Journal*, *69*(5), 1801-1813.
- Parent, L., Gopalakrishnan, M., Lacerda, A. E., Wei, X., & Perez-Reyes, E. (1995). Voltage-dependent inactivation in a cardiac-skeletal chimeric calcium channel. *Febs Letters*, *360*(2), 144-150.
- Park, H. J., Min, S. H., Won, Y. J., & Lee, J. H. (2015). Asn-Linked Glycosylation Contributes to Surface Expression and Voltage-Dependent Gating of Cav1.2 Ca<sup>2+</sup>(+) Channel. *J Microbiol Biotechnol*, *25*(8), 1371-1379. doi:10.4014/jmb.1501.01066
- Patel, A. C., Brett, T. J., & Holtzman, M. J. (2009). The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. *Annual Review of Physiology*, *71*, 425-449. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163253
- Paulick, M. G., & Bertozzi, C. R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*, *47*(27), 6991-7000. doi:10.1021/bi8006324
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, *475*(7356), 353-358. doi:10.1038/nature10238
- Peracchia, C. (1994). *Handbook of membrane channels : molecular and cellular physiology*. San Diego: Academic Press.
- Pereverzev, A., Leroy, J., Krieger, A., Malecot, C. O., Hescheler, J., Pfitzer, G., . . . Schneider, T. (2002). Alternate splicing in the cytosolic II-III loop and the carboxy terminus of human E-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels: electrophysiological characterization of isoforms. *Mol Cell Neurosci*, *21*(2), 352-365.
- Perez-Reyes, E., Kim, H. S., Lacerda, A. E., Horne, W., Wei, X. Y., Rampe, D., . . . Birnbaumer, L. (1989). Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature*, *340*(6230), 233-236. doi:10.1038/340233a0
- Periasamy, M., & Huke, S. (2001). SERCA pump level is a critical determinant of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol*, *33*(6), 1053-1063. doi:10.1006/jmcc.2001.1366
- Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., & Yue, D. T. (1999). Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup> -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*, *22*(3), 549-558.
- Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I. (2015a). Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, *71*(Pt 5), 1051-1058. doi:10.1107/S1399004715002576
- Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I. (2015b). Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, *71*, 1051-1058. doi:10.1107/S1399004715002576

- Philip, V., Harris, J., Adams, R., Nguyen, D., Spiers, J., Baudry, J., . . . Hinde, R. J. (2011). A survey of aspartate-phenylalanine and glutamate-phenylalanine interactions in the protein data bank: searching for anion-pi pairs. *Biochemistry*, *50*(14), 2939-2950. doi:10.1021/bi200066k
- Pihlajamaa, T., Kajander, T., Knuuti, J., Horkka, K., Sharma, A., & Permi, P. (2013). Structure of Plasmodium falciparum TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von Willebrand factor A homologues. *Biochem J*, *450*(3), 469-476. doi:10.1042/BJ20121058
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., . . . Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell*, *102*(1), 89-97.
- Pless, S. A., Elstone, F. D., Niciforovic, A. P., Galpin, J. D., Yang, R., Kurata, H. T., & Ahern, C. A. (2014). Asymmetric functional contributions of acidic and aromatic side chains in sodium channel voltage-sensor domains. *J Gen Physiol*, *143*(5), 645-656. doi:10.1085/jgp.201311036
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., & Smith, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, *275*(29), 21785-21788. doi:10.1074/jbc.R000003200
- Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L., & Tainer, J. A. (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys*, *40*(3), 191-285. doi:10.1017/S0033583507004635
- Putnam, D. K., Lowe, E. W., Jr., & Meiler, J. (2013). Reconstruction of SAXS Profiles from Protein Structures. *Comput Struct Biotechnol J*, *8*, e201308006. doi:10.5936/csbj.201308006
- Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Cabello, O. A., Birnbaumer, L., & Stefani, E. (1996). Identification of a second region of the beta-subunit involved in regulation of calcium channel inactivation. *Am J Physiol*, *271*(5 Pt 1), C1539-1545.
- Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M. L., Codd, E. E., & D'Andrea, M. R. (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol*, *62*(3), 485-496.
- Ramon, A., Senorale-Pose, M., & Marin, M. (2014). Inclusion bodies: not that bad. *Front Microbiol*, *5*, 56. doi:10.3389/fmicb.2014.00056
- Raybaud, A., Dodier, Y., Bissonnette, P., Simoes, M., Bichet, D. G., Sauve, R., & Parent, L. (2006). The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem*, *281*(51), 39424-39436. doi:10.1074/jbc.M607405200
- Ringer, S. (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol*, *4*(1), 29-42 23.
- Rogawski, M. A., & Taylor, C. P. (2006). Calcium Channel  $\alpha_2$ - $\delta$  Subunit, A New Antiepileptic Drug Target. *Epilepsy Res*, *69*(3), 183-272. doi:http://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.03.014
- Rosati, B., Yan, Q., Lee, M. S., Liou, S. R., Ingalls, B., Foell, J., . . . McKinnon, D. (2011). Robust L-type calcium current expression following heterozygous knockout of the Cav1.2 gene in adult mouse heart. *J Physiol*, *589*(Pt 13), 3275-3288. doi:10.1113/jphysiol.2011.210237
- Rossmann, M. G., Moras, D., & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, *250*(463), 194-199.

- Roussel, G., Tinti, E., Perpete, E., & Michaux, C. (2013). Refolding of SDS-denatured proteins using amphipathic cosolvents and osmolytes. *Curr Protoc Protein Sci, Chapter 28, Unit 28 25*. doi:10.1002/0471140864.ps2805s72
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc, 5*(4), 725-738. doi:10.1038/nprot.2010.5
- Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. *Int J Mol Sci, 14*(6), 11643-11691. doi:10.3390/ijms140611643
- Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H. E., . . . Hofmann, F. (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science, 245*(4922), 1115-1118.
- Sala-Rabanal, M., Yurtsever, Z., Berry, K. N., Nichols, C. G., & Brett, T. J. (2017). Modulation of TMEM16A channel activity by the von Willebrand factor type A (VWA) domain of the calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1). *J Biol Chem, 292*(22), 9164-9174. doi:10.1074/jbc.M117.788232
- Sala-Rabanal, M., Yurtsever, Z., Nichols, C. G., & Brett, T. J. (2015). Secreted CLCA1 modulates TMEM16A to activate Ca(2+)-dependent chloride currents in human cells. *Elife, 4*. doi:10.7554/eLife.05875
- Salkoff, L., Wei, A. D., Baban, B., Butler, A., Fawcett, G., Ferreira, G., & Santi, C. M. (2005). Potassium channels in *C. elegans*. *WormBook*, 1-15. doi:10.1895/wormbook.1.42.1
- San Sebastian, E., Mercero, J. M., Stote, R. H., Dejaegere, A., Cossio, F. P., & Lopez, X. (2006). On the affinity regulation of the metal-ion-dependent adhesion sites in integrins. *J Am Chem Soc, 128*(11), 3554-3563. doi:10.1021/ja054142a
- Sather, W. A., & McCleskey, E. W. (2003). Permeation and selectivity in calcium channels. *Annual Review of Physiology, 65*, 133-159. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142345
- Savalli, N., Pantazis, A., Sigg, D., Weiss, J. N., Neely, A., & Olcese, R. (2016). The alpha2delta-1 subunit remodels CaV1.2 voltage sensors and allows Ca<sup>2+</sup> influx at physiological membrane potentials. *J Gen Physiol, 148*(2), 147-159. doi:10.1085/jgp.201611586
- Schmidt, T. H., & Kandt, C. (2012). LAMBADA and InflateGRO2: efficient membrane alignment and insertion of membrane proteins for molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model, 52*(10), 2657-2669. doi:10.1021/ci3000453
- Scoote, M., & Williams, A. J. (2004). Myocardial calcium signalling and arrhythmia pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun, 322*(4), 1286-1309. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.034
- Segura, E., Bourdin, B., Tetreault, M. P., Briot, J., Allen, B. G., Mayer, G., & Parent, L. (2017). Proteolytic cleavage of the hydrophobic domain in the CaValpha2delta1 subunit improves assembly and activity of cardiac CaV1.2 channels. *J Biol Chem, 292*(26), 11109-11124. doi:10.1074/jbc.M117.784355
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., . . . Hofmann, F. (2000). Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem, 275*(50), 39193-39199. doi:10.1074/jbc.M006467200

- Shakeri, B., Bourdin, B., Demers-Giroux, P. O., Sauve, R., & Parent, L. (2012). A quartet of leucine residues in the guanylate kinase domain of CaVbeta determines the plasma membrane density of the CaV2.3 channel. *J Biol Chem*, *287*(39), 32835-32847. doi:10.1074/jbc.M112.387233
- Sharp, A. H., & Campbell, K. P. (1989a). Characterization of the 1,4-Dihydropyridine Receptor Using Subunit-Specific Polyclonal Antibodies - Evidence for a 32,000-Da Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(5), 2816-2825.
- Sharp, A. H., & Campbell, K. P. (1989b). Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *J Biol Chem*, *264*(5), 2816-2825.
- Sharp, A. H., Imagawa, T., Leung, A. T., & Campbell, K. P. (1987). Identification and characterization of the dihydropyridine-binding subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem*, *262*(25), 12309-12315.
- Shattock, M. J., Ottolia, M., Bers, D. M., Blaustein, M. P., Boguslavskyi, A., Bossuyt, J., . . . Xie, Z. J. (2015). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the heart. *J Physiol*, *593*(6), 1361-1382. doi:10.1113/jphysiol.2014.282319
- Shaw, R. M., & Colecraft, H. M. (2013). L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*, *98*(2), 177-186. doi:10.1093/cvr/cvt021
- Shen, M. Y., & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci*, *15*(11), 2507-2524. doi:10.1110/ps.062416606
- Shimaoka, M., Takagi, J., & Springer, T. A. (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, *31*, 485-516. doi:10.1146/annurev.biophys.31.101101.140922
- Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J. H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C. D., . . . Springer, T. A. (2003). Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*, *112*(1), 99-111.
- Simms, B. A., Souza, I. A., & Zamponi, G. W. (2014). Effect of the Brugada syndrome mutation A39V on calmodulin regulation of Cav1.2 channels. *Mol Brain*, *7*, 34. doi:10.1186/1756-6606-7-34
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2012a). The Brugada syndrome mutation A39V does not affect surface expression of neuronal rat Cav1.2 channels. *Mol Brain*, *5*, 9. doi:10.1186/1756-6606-5-9
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2012b). Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cell Mol Life Sci*, *69*(6), 843-856. doi:10.1007/s00018-011-0843-y
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, *82*(1), 24-45. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.016
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*, *14*, 41. doi:10.1186/s12934-015-0222-8
- Sinnegger-Brauns, M. J., Huber, I. G., Koschak, A., Wild, C., Obermair, G. J., Einzinger, U., . . . Striessnig, J. (2009). Expression and 1,4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms. *Mol Pharmacol*, *75*(2), 407-414. doi:10.1124/mol.108.049981
- Sivagangabalan, G., Nazzari, H., Bignolais, O., Maguy, A., Naud, P., Farid, T., . . . Nanthakumar, K. (2014). Regional ion channel gene expression heterogeneity and

- ventricular fibrillation dynamics in human hearts. *PLoS One*, 9(1), e82179. doi:10.1371/journal.pone.0082179
- Skou, S., Gillilan, R. E., & Ando, N. (2014). Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nat Protoc*, 9(7), 1727-1739. doi:10.1038/nprot.2014.116
- Snutch, T. P., & Reiner, P. B. (1992). Ca<sup>2+</sup> channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol*, 2(3), 247-253.
- Soldatov, N. M. (2012). Molecular Determinants of Cav1.2 Calcium Channel Inactivation. *ISRN Mol Biol*, 2012, 691341. doi:10.5402/2012/691341
- Song, L., Espinoza-Fuenzalida, I. A., Etheridge, S., Jones, O. T., & Fitzgerald, E. M. (2015). The R-Domain: Identification of an N-terminal Region of the alpha2delta-1 Subunit Which is Necessary and Sufficient for its Effects on Cav2.2 Calcium Currents. *Curr Mol Pharmacol*, 8(2), 169-179.
- Splawski, I., Timothy, K. W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F. B., Beggs, A. H., . . . Keating, M. T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(23), 8089-8096; discussion 8086-8088. doi:10.1073/pnas.0502506102
- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., . . . Keating, M. T. (2004). Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, 119(1), 19-31. doi:10.1016/j.cell.2004.09.011
- Springer, T. A. (2006). Complement and the multifaceted functions of VWA and integrin I domains. *Structure*, 14(11), 1611-1616. doi:10.1016/j.str.2006.10.001
- Stevens, R. C. (2000). Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*, 8(9), R177-185.
- Stotz, S. C., Hamid, J., Spaetgens, R. L., Jarvis, S. E., & Zamponi, G. W. (2000). Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem*, 275(32), 24575-24582. doi:10.1074/jbc.M000399200
- Stotz, S. C., & Zamponi, G. W. (2001). Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels. *Trends Neurosci*, 24(3), 176-181.
- Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., & Tuluc, P. (2014). L-type Ca<sup>2+</sup> channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, 3(2), 15-38. doi:10.1002/wmts.102
- Svergun, D., Barberato, C., & Koch, M. H. J. (1995). CRYSOLO - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, 28, 768-773. doi:Doi 10.1107/S0021889895007047
- Svergun, D. I. (1999). Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing (vol 76, pg 2879, 1999). *Biophys J*, 77(5), 2896-2896.
- Takahashi, M., & Catterall, W. A. (1987). Identification of an alpha subunit of dihydropyridine-sensitive brain calcium channels. *Science*, 236(4797), 88-91.
- Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F., & Catterall, W. A. (1987a). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 5478-5482.
- Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F. X., & Catterall, W. A. (1987b). Subunit Structure of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels from Skeletal-Muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 5478-5482. doi:Doi 10.1073/Pnas.84.15.5478



- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., . . . Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, *328*(6128), 313-318. doi:10.1038/328313a0
- Tang, H., Wang, S., Wang, J., Song, M., Xu, M., Zhang, M., . . . Bao, X. (2016). N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*, *6*, 25654. doi:10.1038/srep25654
- Tang, L., El-Din, T. M., Swanson, T. M., Pryde, D. C., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2016). Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel by Ca<sup>2+</sup> antagonist drugs. *Nature*. doi:10.1038/nature19102
- Tang, L., Gamal El-Din, T. M., Payandeh, J., Martinez, G. Q., Heard, T. M., Scheuer, T., . . . Catterall, W. A. (2014). Structural basis for Ca<sup>2+</sup> selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature*, *505*(7481), 56-61. doi:10.1038/nature12775
- Taylor, C. P. (2004). The biology and pharmacology of calcium channel alpha2-delta proteins Pfizer Satellite Symposium to the 2003 Society for Neuroscience Meeting. Sheraton New Orleans Hotel, New Orleans, LA November 10, 2003. *CNS Drug Rev*, *10*(2), 183-188.
- Templin, C., Ghadri, J. R., Rougier, J. S., Baumer, A., Kaplan, V., Albesa, M., . . . Duru, F. (2011). Identification of a novel loss-of-function calcium channel gene mutation in short QT syndrome (SQTS6). *Eur Heart J*, *32*(9), 1077-1088. doi:10.1093/eurheartj/ehr076
- Tetreault, M. P., Bourdin, B., Briot, J., Segura, E., Lesage, S., Fiset, C., & Parent, L. (2016). Identification of Glycosylation Sites Essential for Surface Expression of the CaValpha2delta1 Subunit and Modulation of the Cardiac CaV1.2 Channel Activity. *J Biol Chem*, *291*(9), 4826-4843. doi:10.1074/jbc.M115.692178
- Tokmakov, A. A., Kurotani, A., Takagi, T., Toyama, M., Shirouzu, M., Fukami, Y., & Yokoyama, S. (2012). Multiple post-translational modifications affect heterologous protein synthesis. *J Biol Chem*, *287*(32), 27106-27116. doi:10.1074/jbc.M112.366351
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., & Arakawa, T. (2004). Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog*, *20*(5), 1301-1308. doi:10.1021/bp0498793
- Tuckwell, D. (1999). Evolution of von Willebrand factor A (VWA) domains. *Biochem Soc Trans*, *27*(6), 835-840.
- Upadhyay, A. A., Fleetwood, A. D., Adebali, O., Finn, R. D., & Zhulin, I. B. (2016b). Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes. *Plos Computational Biology*, *12*(4), e1004862. doi:10.1371/journal.pcbi.1004862
- Valdramidou, D., Humphries, M. J., & Mould, A. P. (2008). Distinct roles of beta1 metal ion-dependent adhesion site (MIDAS), adjacent to MIDAS (ADMIDAS), and ligand-associated metal-binding site (LIMBS) cation-binding sites in ligand recognition by integrin alpha2beta1. *J Biol Chem*, *283*(47), 32704-32714. doi:10.1074/jbc.M802066200
- Van Petegem, F., Chatelain, F. C., & Minor, D. L. (2005a). Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the Ca(V)1.2 IQ domain-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, *12*(12), 1108-1115. doi:10.1038/nsmb1027

- Van Petegem, F., Chatelain, F. C., & Minor, D. L., Jr. (2005b). Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol*, *12*(12), 1108-1115. doi:10.1038/nsmb1027
- Van Petegem, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., & Minor, D. L. (2004a). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*, *429*(6992), 671-675. doi:10.1038/nature02588
- Van Petegem, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., & Minor, D. L., Jr. (2004b). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*, *429*(6992), 671-675. doi:10.1038/nature02588
- Van Petegem, F., Duderstadt, K. E., Clark, K. A., Wang, M., & Minor, D. L., Jr. (2008). Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaV $\alpha$ 1 AID-CaV $\beta$  interaction site that is critical for channel modulation. *Structure*, *16*(2), 280-294. doi:10.1016/j.str.2007.11.010
- Venien-Bryan, C., Li, Z., Vuillard, L., & Boutin, J. A. (2017). Cryo-electron microscopy and X-ray crystallography: complementary approaches to structural biology and drug discovery. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, *73*(Pt 4), 174-183. doi:10.1107/S2053230X17003740
- Vivoli, M., Novak, H. R., Littlechild, J. A., & Harmer, N. J. (2014). Determination of protein-ligand interactions using differential scanning fluorimetry. *J Vis Exp*(91), 51809. doi:10.3791/51809
- Voigt, A., Freund, R., Heck, J., Missler, M., Obermair, G. J., Thomas, U., & Heine, M. (2016). Dynamic association of calcium channel subunits at the cellular membrane. *Neurophotonics*, *3*(4), 041809. doi:10.1117/1.NPh.3.4.041809
- Wade, R. C., Gabdouliline, R. R., Ludemann, S. K., & Lounnas, V. (1998). Electrostatic steering and ionic tethering in enzyme-ligand binding: insights from simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(11), 5942-5949.
- Wall-Lacelle, S., Hossain, M. I., Sauve, R., Blunck, R., & Parent, L. (2011). Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)<sub>2.3</sub> calcium channel. *J Biol Chem*, *286*(31), 27197-27205. doi:10.1074/jbc.M111.237412
- Walsh, C. P., Davies, A., Butcher, A. J., Dolphin, A. C., & Kitmitto, A. (2009). Three-dimensional structure of CaV3.1: comparison with the cardiac L-type voltage-gated calcium channel monomer architecture. *J Biol Chem*, *284*(33), 22310-22321. doi:10.1074/jbc.M109.017152
- Walsh, C. P., Davies, A., Nieto-Rostro, M., Dolphin, A. C., & Kitmitto, A. (2009). Labelling of the 3D structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel. *Channels (Austin)*, *3*(6), 387-392.
- Wang, M., Offord, J., Oxender, D. L., & Su, T. Z. (1999). Structural requirement of the calcium-channel subunit  $\alpha$ 2 $\delta$  for gabapentin binding. *Biochem J*, *342* ( Pt 2), 313-320.
- Wang, M. C., Collins, R. F., Ford, R. C., Berrow, N. S., Dolphin, A. C., & Kitmitto, A. (2004). The three-dimensional structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel: comparison with the skeletal muscle form reveals a common architectural motif. *J Biol Chem*, *279*(8), 7159-7168. doi:10.1074/jbc.M308057200

- Webb, B., & Sali, A. (2017). Protein Structure Modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol*, 1654, 39-54. doi:10.1007/978-1-4939-7231-9\_4
- Weber, A. (1959). On the role of calcium in the activity of adenosine 5'-triphosphate hydrolysis by actomyosin. *J Biol Chem*, 234, 2764-2769.
- Wemhoner, K., Friedrich, C., Stallmeyer, B., Coffey, A. J., Grace, A., Zumhagen, S., . . . Decher, N. (2015). Gain-of-function mutations in the calcium channel CACNA1C (Cav1.2) cause non-syndromic long-QT but not Timothy syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, 80, 186-195. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.01.002
- Wetlaufer, D. B. (1973). Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(3), 697-701.
- Whittaker, C. A., & Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*, 13(10), 3369-3387. doi:10.1091/mbc.E02-05-0259
- Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., & Harpold, M. M. (1992). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron*, 8(1), 71-84.
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci*, 80, 6 1 1-35. doi:10.1002/0471140864.ps0601s80
- Witcher, D. R., De Waard, M., Liu, H., Pragnell, M., & Campbell, K. P. (1995). Association of native Ca<sup>2+</sup> channel beta subunits with the alpha 1 subunit interaction domain. *J Biol Chem*, 270(30), 18088-18093.
- Wormuth, C., Lundt, A., Henseler, C., Muller, R., Broich, K., Papazoglou, A., & Weiergraber, M. (2016). Review: Cav2.3 R-type Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels - Functional Implications in Convulsive and Non-convulsive Seizure Activity. *Open Neurol J*, 10, 99-126. doi:10.2174/1874205X01610010099
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., . . . Yan, N. (2016a). Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*, 537(7619), 191-196. doi:10.1038/nature19321
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., . . . Yan, N. (2016b). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*. doi:10.1038/nature19321
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., & Yan, N. (2015). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science*, 350(6267), aad2395. doi:10.1126/science.aad2395
- Wu, R., Gu, M., Wilton, R., Babnigg, G., Kim, Y., Pokkuluri, P. R., . . . Schiffer, M. (2013). Insight into the sporulation phosphorelay: crystal structure of the sensor domain of *Bacillus subtilis* histidine kinase, KinD. *Protein Sci*, 22(5), 564-576. doi:10.1002/pro.2237
- Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., . . . Adelman, J. P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395(6701), 503-507. doi:10.1038/26758
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, 4(1), 235-251. doi:10.3390/biom4010235

- Yamakage, M., & Namiki, A. (2002). Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth*, *49*(2), 151-164. doi:10.1007/BF03020488
- Yan, B. X., & Sun, Y. Q. (1997). Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *J Biol Chem*, *272*(6), 3190-3194.
- Yang, J., Ellinor, P. T., Sather, W. A., Zhang, J. F., & Tsien, R. W. (1993). Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> selectivity and ion permeation in L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature*, *366*(6451), 158-161. doi:10.1038/366158a0
- Yang, J. Y., Yan, R. X., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*, *12*(1), 7-8. doi:10.1038/nmeth.3213
- Yang, T., & Colecraft, H. M. (2013). Regulation of voltage-dependent calcium channels by RGK proteins. *Biochim Biophys Acta*, *1828*(7), 1644-1654. doi:10.1016/j.bbamem.2012.10.005
- Yazawa, M., Hsueh, B., Jia, X., Pasca, A. M., Bernstein, J. A., Hallmayer, J., & Dolmetsch, R. E. (2011). Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*, *471*(7337), 230-234. doi:10.1038/nature09855
- Yunker, A. M., & McEnery, M. W. (2003). Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J Bioenerg Biomembr*, *35*(6), 533-575.
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev*, *67*(4), 821-870. doi:10.1124/pr.114.009654
- Zhang, J. F., Ellinor, P. T., Aldrich, R. W., & Tsien, R. W. (1994). Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature*, *372*(6501), 97-100. doi:10.1038/372097a0
- Zhang, K., & Chen, J. (2012). The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr*, *6*(1), 20-29. doi:10.4161/cam.18702
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, *9*, 40. doi:10.1186/1471-2105-9-40
- Zhang, Z., Witham, S., & Alexov, E. (2011). On the role of electrostatics in protein-protein interactions. *Phys Biol*, *8*(3), 035001. doi:10.1088/1478-3975/8/3/035001
- Zhao, N., Pang, B., Shyu, C. R., & Korkin, D. (2011). Charged residues at protein interaction interfaces: unexpected conservation and orchestrated divergence. *Protein Sci*, *20*(7), 1275-1284. doi:10.1002/pro.655
- Zhulin, I. B., Nikolskaya, A. N., & Galperin, M. Y. (2003). Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J Bacteriol*, *185*(1), 285-294.
- Zhulin, I. B., Taylor, B. L., & Dixon, R. (1997). PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci*, *22*(9), 331-333.

# **Annexe 1 : Publication d'un article de revue**

## **Inherited ventricular arrhythmias: The role of the multi-subunit structure of the L-type Calcium Channel complex**

**Julie Briot, Marie-Philippe Tétreault, Benoîte Bourdin, and Lucie Parent<sup>1</sup>**

Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine, Institut de Cardiologie de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada

1. To whom correspondence should be addressed: Lucie Parent, Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Institut Cardiologie de Montréal, 5000 Bélanger, Montréal, QC H1T 1C8, Canada; E-mail: [lucie.parent@umontreal.ca](mailto:lucie.parent@umontreal.ca)

**Keywords:** Structural biology, Cardiac arrhythmias, posttranslational modifications, *CACNA2D1*

## **ABSTRACT**

The normal heartbeat is conditioned by transient increases in the intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.  $\text{Ca}^{2+}$  influx in cardiomyocytes is regulated by the activity of the heteromeric L-type voltage-activated  $\text{Cav}1.2$  channel. A complex network of interactions between the different proteins forming the ion channel supports the kinetics and the activation gating of the  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Alterations in the biophysical and biochemical properties or in the biogenesis in any of these proteins can lead to serious disturbances in the cardiac rhythm. The multi-subunit nature of the channel complex is better comprehended by examining the high-resolution three-dimensional structure of the closely related  $\text{Cav}1.1$  channel. The architectural map identifies precise interaction loci between the different subunits and paves the way for elucidating the mechanistic basis for the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  balance in cardiac myocytes under physiological and pathological conditions.

## **1. Introduction**

Voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels convert electrical signals to stimulate selective  $\text{Ca}^{2+}$  influx which in turn prompts various biological responses such as cardiac contraction and neurotransmitter release (Catterall, 2011). There are three gene families coding for voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels: L-type  $\text{Cav}1.1$  -  $\text{Cav}1.4$ ; Neuronal P/Q, N and R-type  $\text{Cav}2.1$  -  $\text{Cav}2.3$ ; and T-type  $\text{Cav}3.1$ - $\text{Cav}3.3$  (Snutch & Reiner, 1992). The L-type  $\text{Cav}1.2$  is the major  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathway in ventricular cardiomyocytes. It is a hetero-oligomers complex comprising the main transmembrane pore-forming  $\text{Cav}\alpha1$  associated with tissue-specific  $\text{Cav}\beta1$ -4 and  $\text{Cav}\alpha2\delta1$ -4 auxiliary subunits. The full complement of subunits is required to reproduce in vitro the properties of the native channel. Deletion of the *CACNA2D1* gene decreased L-type currents and impaired myocardial contractility (Fuller-Bicer et al., 2009) and  $\text{Cav}\alpha2\delta1$  transcripts were reduced in patients suffering from atrial (Gaborit et al., 2005) and ventricular fibrillation (Sivagangabalan et al., 2014). Due to the complex network of protein-protein interactions within the L-type  $\text{Cav}1.2$  complex, from phosphorylation by multiple kinases to regulation by auxiliary proteins ( $\text{Cav}\beta$ ,  $\text{Cav}\alpha2\delta$ , and calmodulin (CaM)), the slightest modification in this delicate balance, could impact the heart rhythm (Bodi, Mikala,

Koch, Akhter, & Schwartz, 2005; Dragicevic et al., 2014; Hell et al., 1993; Mangoni et al., 2003; Platzer et al., 2000) and triggers a chain reaction ultimately causing cardiac sudden death (Borchard & Hafner, 2000). Cardiac arrhythmias might originate from (1) external substances (cigarette, stress, and stimulant drugs); (2) a pathological state (thyroid disorder, diabetes); or more rarely from (3) genetic-based disorders (the long QT syndrome (LQTS) (Krause, Gravenhorst, Kriebel, Ruschewski, & Paul, 2011), the short QT syndrome (SQTS), or the Brugada syndrome (BrS)) (Betzenhauser et al., 2015; Burashnikov et al., 2010). The quest for the identification of the structural determinants of  $\text{Ca}^{2+}$  channels started with the purification and cloning of  $\text{Cav}1.1$  from the skeletal muscle (Sharp & Campbell, 1989a; M. Takahashi, M. J. Seagar, J. F. Jones, B. F. X. Reber, & W. A. Catterall, 1987b) and has reached a pinnacle with the elucidation of its three-dimensional (3-D) structure at a resolution of 4.2 Å and 3.6 Å (J. Wu et al., 2016b; J. Wu et al., 2015). This short review brushes up an overview of the structural characterization of the multi-subunit complex referred to as the L-type  $\text{Cav}1.2$  channel with a special emphasis on  $\text{Cav}\alpha2\delta1$  to establish the contribution of this channel to cardiac sudden death.

## **2. Molecular makeup of the L-type $\text{Cav}1.2$ channel**

The L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel was first purified from rat brain membranes (Curtis & Catterall, 1983) and rabbit skeletal muscle transverse tubules (Curtis & Catterall, 1984) using radiolabeled ligands. The pioneering work led to the biochemical determination of four distinct subunits at 175 kDa, 170 kDa, 52 kDa, and 32 kDa (Borsotto, Barhanin, Fosset, & Lazdunski, 1985; Leung et al., 1987; Sharp & Campbell, 1989b; Sharp et al., 1987) followed by the cloning and sequencing of the cDNAs encoding  $\text{Cav}\alpha1$  and ancillary subunits (Tanabe et al., 1987).  $\text{Cav}\alpha1$  is a single polypeptide chain composed of  $\approx 2000$  amino acids organized in four homologous repeats (I, II, III and IV) of six transmembrane segments (Takahashi et al., 1987a). The first 3-D structures of  $\text{Cav}\alpha1$  were obtained through the crystallization of a bacterial homologue, the homotetrameric  $\text{NavAb}$ -derived  $\text{CavAb}$  protein (Catterall & Zheng, 2015; L. Tang et al., 2016; Tang et al., 2014). The crystal structure of the subunit-less  $\text{CavAb}$  provided the first high-resolution depiction of multi-ion permeation, highlighted the electrostatic interactions between hydrated  $\text{Ca}^{2+}$  ions and the carboxylate side-chains of the

aspartate residues (Parent & Gopalakrishnan, 1995a) and confirmed that Cav $\alpha$ 1 and Kv1.2 share a similar fold (Long et al., 2005).

Protein interactions within the L-type channel were teased out from the co-purification of auxiliary subunits and intracellular fragments of mammalian Cav $\alpha$ 1. At least three high-resolution X-ray structures (resolution < 2Å) of Cav $\beta$  in complex with its intracellular high-affinity binding site on Cav $\alpha$ 1 were reported (Buraei & Yang, 2013). Cav $\beta$  subunits are organized around a guanylate kinase domain connected by a HOOK region to the src-homology 3 domain. Cav $\beta$  modulates channel kinetics (Berrou et al., 2005; Berrou et al., 2002; Dafi et al., 2004; Raybaud et al., 2006) and increases total and cell surface protein expression of Cav1.2 (Bourdin et al., 2010; Shakeri et al., 2012) through binding to a single site anchored around the conserved tryptophan residue located in the first intracellular linker of Cav $\alpha$ 1 (Van Petegem et al., 2008).

CaM mediates a crucial negative feedback mechanism referred to as Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation whereby incoming Ca<sup>2+</sup> decreases ion fluxes. High-resolution structural data highlighted the role of van der Waals interactions between Ca<sup>2+</sup>-free CaM and the isoleucine-glutamine “IQ” domain located in the C-terminus of Cav $\alpha$ 1 (Halling et al., 2009b; Kim et al., 2008; Van Petegem et al., 2005a). The  $\alpha$ -helix formed by the “IQ” domain is surrounded by Ca<sup>2+</sup>/CaM that bind to aromatic residues on opposite faces of the IQ  $\alpha$ -helix. Ca<sup>2+</sup>/CaM was also found to bind to the pre-IQ region suggesting that additional binding sites might confer different modes of channel regulation (Minor & Findeisen, 2010).

Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 improves peak current density by promoting channel activation with smaller depolarization (Bourdin et al., 2015; Tetreault et al., 2016). Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is characterized by numerous post-translational modifications (Andrade et al., 2007; Davies et al., 2010; Jay et al., 1991b; Tetreault et al., 2016). In particular, complex Asn-linked glycans confer a great degree of conformational freedom to the protein, while at the same time shielding polar residues required for intermolecular crystal contact formation (Deller, Kong, & Rupp, 2016) and as a result, Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 is a poor candidate for crystallization studies.



### 3. Genetic mutations of the Cav1.2 channel associated with ventricular arrhythmias

The kinetics of activation of L-type Cav1.2 channel are determined by its primary structure and its network of interactions with auxiliary subunits. Alterations in the primary structure of any of the proteins forming the channel through congenital mutations could impact the delicate balance between the “off” and “on” state of the Cav1.2 channel and significantly impair the heart normal rhythm ultimately leading to lethal ventricular tachyarrhythmias (Napolitano & Antzelevitch, 2011; Scoote & Williams, 2004). Genetic variants of the Cav1.2 channel are associated with electric abnormalities causing a variety of clinical phenotypes from the Brugada-like syndromes to the Timothy (LQT8) syndrome. LQT8 is a monogenic channelopathy resulting from *de novo* missense mutations in the *CACNA1C* gene for all 17 reported cases. It is characterized by extreme QT-prolongation (Gillis et al., 2012; Splawski et al., 2005; Splawski et al., 2004) causing delayed afterdepolarizations (Splawski et al., 2004) and severe ventricular tachycardia. The initial cardiac rhythm disturbances often occur early on in life with clear clinical symptoms such as fetal bradycardia and marked QT prolongation ranging from 470 to 700 ms at rest as compared with a normal QT  $\approx$  420-440 ms. Prognosis is poor with lethal arrhythmia being the primary cause of death (>75%) during infancy (Gillis et al., 2012). The relationship between genotype and phenotype was easily established in recombinant systems and in induced pluripotent stem cells. Gain-of-function mutations G406R and G402S severely delayed Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation kinetics (Depil et al., 2011; Raybaud et al., 2006) thereby increasing Ca<sup>2+</sup> influx during each heartbeat (Yazawa et al., 2011). Likewise, single mutations within CaM have also been associated with an increased repolarization interval causing significant arrhythmias (Kryshtal et al., 2015; Limpitikul et al., 2014). LQTS-CaM mutants (D96V, D130G, and F142L) induced action-potential prolongation by specifically suppressing Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of the L-type Cav1.2 channel, suggesting that the biophysical properties of the L-type Cav1.2 channels are crucial in determining the electrical profile of cardiomyocytes.

At the other end of the spectrum, missense mutations of the L-type Cav1.2 channels were also identified in cohorts diagnosed with Brugada-like syndrome (BrS) and short repolarization intervals. It is estimated that 11-28% of BrS probands (BrS1), BrS3 and BrS4 can be caused

by mutations in *CACNA1C* (Cav1.2) (6.7%) and *CACNB2b* (Cav $\beta$ 2b) (4.8%) with  $\approx$  60-65% of BrS probands that have yet to be genotyped. In most cases mutations in Cav proteins give rise to BrS associated with short QT intervals ( $QTc \leq 360$  ms) (Antzelevitch et al., 2007; Burashnikov et al., 2010; Templin et al., 2011). In fact, up to 20% of the BrS and BrS + SQTs probands display mutations in Cav $\alpha$ 1, Cav $\beta$ 2, or Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 subunits (Burashnikov et al., 2010; Napolitano & Antzelevitch, 2011). It was concluded from recombinant studies that mutations A39V and G490R in Cav1.2 impair the trafficking of Cav1.2 (Antzelevitch et al., 2007; Templin et al., 2011) although other groups differed (Bourdin et al., 2010; Simms & Zamponi, 2012a). Loss-of-function variants T11I and S481L *CACNB2* gene were found to accelerate the inactivation kinetics and decrease the cell surface expression of the ion channel but the mechanism responsible for these effects remains to be identified (Antzelevitch et al., 2007; Cordeiro et al., 2009). Most reported mutations are located outside the “guanylate kinase” domain, the region supporting protein interaction, suggesting an indirect modulation of channel function.

Single missense mutations and/or genetic variants of *CACNA2D1* are contributing to cardiac arrhythmias associated with a short repolarization interval (Burashnikov et al., 2010; Templin et al., 2011). Heterologous expression studies have shown that the “loss-of-function” mutations studied in isolation had only a minor impact, if any, on the protein expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 or on channel function (Bourdin et al., 2015; Templin et al., 2011). This raises the limitations of studying genotype–phenotype relationships carried in the presence of genetically altered ion channels overexpressed in recombinant systems. Important factors that modulate ion channel expression, subcellular localization, and function, such as the relative expression of the native Cav $\beta$  subunits, transcription factors, microRNAs, and epigenetic profile, may differ between model cells and mature cardiomyocytes. Nonetheless, combining two of these silent variants (Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 D550Y/Q917H) significantly decreased L-type Cav1.2 currents and this effect appeared to be mediated through a decrease in the cell surface expression of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (Bourdin et al., 2015; Savalli et al., 2016). Silent polymorphisms in *CACNA2D1* could thus together contribute to create a arrhythmogenic substrate by impairing Cav1.2 currents.

Since the Cav1.2 channel properties are ultimately determined by the complex set of interactions between a host of subunits, one needs to consider the structural impact of various silent variants identified in the auxiliary subunits of the Cav1.2 channel. Insights into the protein interaction loci require the 3-D structure of native heteromeric complexes that can be manipulated through *in silico* modeling and molecular replacement. The first milestone was recently reached by the purification of the structurally related Cav1.1 channel and structure determination by cryo-electron microscopy (cryo-EM).

#### 4. High-resolution structure of L-type Ca<sup>2+</sup> channels

As a result of formidable technical advances in image processing and direct electron detectors (Doerr, 2015), the skeletal L-type Cav1.1 complex was recently solved by single particle cryo-EM at a resolution of 4.2 Å (J. Wu et al., 2015) and 3.6 Å (J. Wu et al., 2016b). Cryo-EM is best suited to study large macro-molecular complexes as it entails a flash-freezing process that minimizes disruptions in intermolecular interactions. Cavβ1 was expressed and purified as a GST-fusion protein which was then used to pull down the ion channel complex (Cavα1, Cavγ1, and Cavα2δ1) (J. Wu et al., 2016b; J. Wu et al., 2015) (**Fig 1**). As shown with CavAb, the selectivity filter is pictured with the four glutamate residues forming critical high-affinity binding locus that confers robust Ca<sup>2+</sup> selectivity (Parent & Gopalakrishnan, 1995b). Hydrophobic residues face each other at the channel intracellular cavity with an inner pore radius of ≈ 0.66 Å suggesting that the channel was captured in its closed state. The electronic density map declines significantly for the flexible intracellular linkers but the 3-D structure is compatible with a single high-affinity binding site for Cavβ on Cavα1.

One of the greatest scientific achievements in the cryo-EM models remains the elucidation of the 3-D structure of Cavα2δ1. By homology with the structure of the rabbit isoform, the human Cavα2δ1 is built from five structural domains: Cache1, von willebrand factor A (VWA), Cache2, Cache3, and Cache4 (Briot et al., 2016) (**Fig 2**). Cavα2δ1 is entirely extracellular and is held in the membrane through a glycosyl-phosphatidyl-inositol anchor at

cysteine 1074. The Cache domains are deployed away from the membrane and are formed by 3  $\alpha$ -helices intertwined with 5 anti-parallel  $\beta$ -sheets. The 6  $\alpha$ -helices of the VWA domain are organized along 6 anti-parallel  $\beta$ -sheets. The 3  $\beta$ -sheets from Cav $\delta$  are folded back beneath the Cache4 domain at more than 90 Å from the plasma membrane. Of the 16 potential sites, 14 glycosylation sites were identified in the structure. Only 5 of these sites are facing the extracellular medium (Asn94, Asn186, Asn470, Asn615, and Asn827). The Asn-glycans at Asn678 appear to bridge the Cache3 and the Cache2 domains suggesting they could contribute to protein folding. Disruption of this site in the rat isoform significantly decreased protein stability (Tetreault et al., 2016). The six novel disulfide bridges (C305-C1047, C356-C1062, C406-C1074, C907-C977, C999-C1029, and C1002-C1027 in the rabbit isoform) differ significantly from the residues previously identified through mutational analysis (Calderon-Rivera et al., 2012a). Additionally, the cryo-EM structure shows multiple contact areas between the Cache1, VWA and Cache2 domains of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 and the extracellular loops of repeat I and III of Cav $\alpha$ 1. It can be speculated that the arrhythmogenic mutations of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 will either directly alter protein trafficking and cell surface expression or indirectly modify the protein interface it shares with Cav $\alpha$ 1. The latter will be better pursued using structural biology methods.

## 5. Perspectives

The L-type Cav1.2 channel uniquely controls Ca<sup>2+</sup> influx and contributes to cardiac rhythmicity (Bodi et al., 2005). Genetic mutations on the proteins forming the Cav1.2 complex have been associated with alterations in the repolarization interval that ultimately lead to sudden cardiac death (Burashnikov et al., 2010). The molecular basis for these clinical manifestations is still being studied (Antzelevitch et al., 2007; Bourdin et al., 2015). The 3-D structure of the related Cav1.1 channel complex, solved by cryo-EM (J. Wu et al., 2016b), is improving significantly our understanding of the protein interaction network. This is especially important for the integrin-like Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 subunit that appears to display a unique 3-D structure. This discovery will provide a mechanistic basis to understand the contribution of

Ca<sub>v</sub>α2δ1 to cardiac dysfunctions and will open the door for the development of new drugs aimed at regulating the cell surface expression of the Ca<sub>v</sub>1.2 channel complex.

## **6. Abbreviations:**

3-D: three dimensional, BrS: Brugada syndrome, CaM: Calmodulin, Cryo-EM: Cryo-electron microscopy, QT: Time interval between the Q and the T waves on the cardiac electrocardiogram, LQT8: long QT syndrome 8, NavAb: voltage-gated Na<sup>+</sup> channel from *Arcobacter butzleri*, SQTs: Short QT syndrome, VWA: Von Willebrand factor A

**7. Acknowledgments:** This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to LP.

## **8. Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest

## **9. Ethical approval**

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## **10. Disclosures: NONE**

## References

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*, 1833(11), 2430-2437. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.04.001
- Ahern, C. A., & Horn, R. (2004). Stirring up controversy with a voltage sensor paddle. *Trends Neurosci*, 27(6), 303-307. doi:10.1016/j.tins.2004.03.008
- Almagor, L., Chomsky-Hecht, O., Ben-Mocha, A., Hendin-Barak, D., Dascal, N., & Hirsch, J. A. (2012). The role of a voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel intracellular linker: a structure-function analysis. *J Neurosci*, 32(22), 7602-7613. doi:10.1523/JNEUROSCI.5727-11.2012
- Aloy, P., Ceulemans, H., Stark, A., & Russell, R. B. (2003). The relationship between sequence and interaction divergence in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 332(5), 989-998.
- Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., . . . Zamponi, G. W. (2011). The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci*, 14(2), 173-180. doi:10.1038/nn.2712
- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2000). Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem Sci*, 25(11), 535-537.
- Andrade, A., Sandoval, A., Oviedo, N., De Waard, M., Elias, D., & Felix, R. (2007). Proteolytic cleavage of the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta subunit: structural and functional features. *Eur J Neurosci*, 25(6), 1705-1710. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05454.x
- Andranovits, S., Beyl, S., Hohaus, A., Zangerl-Plessl, E. M., Timin, E., & Hering, S. (2017). Key role of segment IS4 in Cav1.2 inactivation: link between activation and inactivation. *Pflugers Arch*, 469(11), 1485-1493. doi:10.1007/s00424-017-2038-3
- Andronache, Z., Ursu, D., Lehnert, S., Freichel, M., Flockerzi, V., & Melzer, W. (2007). The auxiliary subunit gamma 1 of the skeletal muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channel is an endogenous Ca<sup>2+</sup> antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(45), 17885-17890. doi:10.1073/pnas.0704340104
- Antzelevitch, C., Pollevick, G. D., Cordeiro, J. M., Casis, O., Sanguinetti, M. C., Aizawa, Y., . . . Wolpert, C. (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*, 115(4), 442-449. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.668392
- Armstrong, C. M., & Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol*, 70(5), 567-590.
- Bai, X. C., McMullan, G., & Scheres, S. H. (2015). How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem Sci*, 40(1), 49-57. doi:10.1016/j.tibs.2014.10.005
- Bakowski, D., & Parekh, A. B. (2007). Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid. *Curr Biol*, 17(12), 1076-1081. doi:10.1016/j.cub.2007.05.041

- Banerjee, A., Ghatak, S., & Sikdar, S. K. (2016). l-Lactate mediates neuroprotection against ischaemia by increasing TREK1 channel expression in rat hippocampal astrocytes in vitro. *J Neurochem*, *138*(2), 265-281. doi:10.1111/jnc.13638
- Barrett, P. J., Chen, J., Cho, M. K., Kim, J. H., Lu, Z., Mathew, S., . . . Sanders, C. R. (2013). The quiet renaissance of protein nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, *52*(8), 1303-1320. doi:10.1021/bi4000436
- Batas, B., Jones, H. R., & Chaudhuri, J. B. (1997). Studies of the hydrodynamic volume changes that occur during refolding of lysozyme using size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A*, *766*(1-2), 109-119.
- Baynes, B. M., Wang, D. I., & Trout, B. L. (2005). Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry*, *44*(12), 4919-4925. doi:10.1021/bi047528r
- Becker, A. K., Mikolajek, H., Werner, J. M., Paulsson, M., & Wagener, R. (2015). Characterization of recombinantly expressed matrilin VWA domains. *Protein Expr Purif*, *107*, 20-28. doi:10.1016/j.pep.2014.11.005
- Bergelson, J. M., & Hemler, M. E. (1995). Integrin-ligand binding. Do integrins use a 'MIDAS touch' to grasp an Asp? *Curr Biol*, *5*(6), 615-617.
- Berger, O., Edholm, O., & Jahnig, F. (1997). Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophysical Journal*, *72*(5), 2002-2013. doi:10.1016/S0006-3495(97)78845-3
- Berger, S. M., & Bartsch, D. (2014). The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res*, *357*(2), 463-476. doi:10.1007/s00441-014-1936-3
- Bernatchez, G., Talwar, D., & Parent, L. (1998). Mutations in the EF-hand motif impair the inactivation of barium currents of the cardiac alpha1C channel. *Biophysical Journal*, *75*(4), 1727-1739. doi:10.1016/S0006-3495(98)77614-3
- Berrou, L., Bernatchez, G., & Parent, L. (2001). Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of alpha1E (CaV2.3) calcium channels. *Biophysical Journal*, *80*(1), 215-228. doi:10.1016/S0006-3495(01)76008-0
- Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Tousignant, A., Dafi, O., Pelletier, J. N., & Parent, L. (2005). The C-terminal residues in the alpha-interacting domain (AID) helix anchor CaV beta subunit interaction and modulation of CaV2.3 channels. *J Biol Chem*, *280*(1), 494-505. doi:10.1074/jbc.M410859200
- Berrou, L., Klein, H., Bernatchez, G., & Parent, L. (2002). A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels. *Biophysical Journal*, *83*(3), 1429-1442. doi:10.1016/S0006-3495(02)73914-3
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198-205. doi:10.1038/415198a
- Beto, J. A. (2015). The role of calcium in human aging. *Clin Nutr Res*, *4*(1), 1-8. doi:10.7762/cnr.2015.4.1.1
- Betzenhauser, M. J., Pitt, G. S., & Antzelevitch, C. (2015). Calcium Channel Mutations in Cardiac Arrhythmia Syndromes. *Curr Mol Pharmacol*, *8*(2), 133-142.
- Beyl, S., Hohaus, A., Andranovits, S., Timin, E., & Hering, S. (2016). Upward movement of IS4 and IIIS4 is a rate-limiting stage in Cav1.2 activation. *Pflugers Arch*, *468*(11-12), 1895-1907. doi:10.1007/s00424-016-1895-5

- Bezanilla, F., & Perozo, E. (2003). The voltage sensor and the gate in ion channels. *Adv Protein Chem*, *63*, 211-241.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., . . . De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*, *25*(1), 177-190.
- Binstock, L., & Lecar, H. (1969). Ammonium ion currents in the squid giant axon. *J Gen Physiol*, *53*(3), 342-361.
- Boczek, N. J., Best, J. M., Tester, D. J., Giudicessi, J. R., Middha, S., Evans, J. M., . . . Ackerman, M. J. (2013). Exome sequencing and systems biology converge to identify novel mutations in the L-type calcium channel, CACNA1C, linked to autosomal dominant long QT syndrome. *Circ Cardiovasc Genet*, *6*(3), 279-289. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000138
- Boczek, N. J., Miller, E. M., Ye, D., Nesterenko, V. V., Tester, D. J., Antzelevitch, C., . . . Ware, S. M. (2015). Novel Timothy syndrome mutation leading to increase in CACNA1C window current. *Heart Rhythm*, *12*(1), 211-219. doi:10.1016/j.hrthm.2014.09.051
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., Akhter, S. A., & Schwartz, A. (2005). The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest*, *115*(12), 3306-3317. doi:10.1172/JCI27167
- Boldon, L., Laliberte, F., & Liu, L. (2015). Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano Rev*, *6*, 25661. doi:10.3402/nano.v6.25661
- Bootman, M. D. (2012). Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(7), a011171. doi:10.1101/cshperspect.a011171
- Borchard, U., & Hafner, D. (2000). [Ion channels and arrhythmias]. *Z Kardiol*, *89 Suppl 3*, 6-12.
- Bork, P., & Rohde, K. (1991). More von Willebrand factor type A domains? Sequence similarities with malaria thrombospondin-related anonymous protein, dihydropyridine-sensitive calcium channel and inter-alpha-trypsin inhibitor. *Biochem J*, *279 ( Pt 3)*, 908-910.
- Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M., & Lazdunski, M. (1985). The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Purification and subunit composition. *J Biol Chem*, *260*(26), 14255-14263.
- Boukens, B. J., Christoffels, V. M., Coronel, R., & Moorman, A. F. (2009). Developmental basis for electrophysiological heterogeneity in the ventricular and outflow tract myocardium as a substrate for life-threatening ventricular arrhythmias. *Circ Res*, *104*(1), 19-31. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.188698
- Bourdin, B., Briot, J., Tetreault, M. P., Sauve, R., & Parent, L. (2017). Negatively charged residues in the first extracellular loop of the L-type CaV1.2 channel anchor the interaction with the CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 auxiliary subunit. *J Biol Chem*, *292*(42), 17236-17249. doi:10.1074/jbc.M117.806893
- Bourdin, B., Marger, F., Wall-Lacelle, S., Schneider, T., Klein, H., Sauve, R., & Parent, L. (2010). Molecular determinants of the CaV $\beta$ -induced plasma membrane targeting of the CaV1.2 channel. *J Biol Chem*, *285*(30), 22853-22863. doi:10.1074/jbc.M110.111062



- Bourdin, B., Segura, E., Tetreault, M. P., Lesage, S., & Parent, L. (2016). Determination of the Relative Cell Surface and Total Expression of Recombinant Ion Channels Using Flow Cytometry. *J Vis Exp*(115). doi:10.3791/54732
- Bourdin, B., Shakeri, B., Tetreault, M. P., Sauve, R., Lesage, S., & Parent, L. (2015). Functional characterization of CaV $\alpha$ 2 $\delta$  mutations associated with sudden cardiac death. *J Biol Chem*, 290(5), 2854-2869. doi:10.1074/jbc.M114.597930
- Briot, J., D'Avanzo, N., Sygusch, J., & Parent, L. (2016). Three-Dimensional Architecture of the L-Type Calcium Channel: Structural Insights into the CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Auxiliary Protein. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*, Vol. 2(Issue 3). doi:10.21767/2471-8084.100025
- Briot, J., Tetreault, M. P., Bourdin, B., & Parent, L. (2017). Inherited Ventricular Arrhythmias: The Role of the Multi-Subunit Structure of the L-Type Calcium Channel Complex. *Adv Exp Med Biol*, 966, 55-64. doi:10.1007/5584\_2016\_186
- Bronner, F. (2001). Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal*, 1, 919-925. doi:10.1100/tsw.2001.489
- Brown, J. P., Dissanayake, V. U., Briggs, A. R., Milic, M. R., & Gee, N. S. (1998). Isolation of the [3H]gabapentin-binding protein/ $\alpha$  2  $\delta$  Ca $^{2+}$  channel subunit from porcine brain: development of a radioligand binding assay for  $\alpha$  2  $\delta$  subunits using [3H]leucine. *Anal Biochem*, 255(2), 236-243. doi:10.1006/abio.1997.2447
- Budde, T., Meuth, S., & Pape, H. C. (2002). Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci*, 3(11), 873-883. doi:10.1038/nrn959
- Bulheller, B. M., Rodger, A., & Hirst, J. D. (2007). Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys*, 9(17), 2020-2035. doi:10.1039/b615870f
- Buraei, Z., & Yang, J. (2010). The  $\alpha$  subunit of voltage-gated Ca $^{2+}$  channels. *Physiol Rev*, 90(4), 1461-1506. doi:10.1152/physrev.00057.2009
- Buraei, Z., & Yang, J. (2013). Structure and function of the  $\beta$  subunit of voltage-gated Ca(2+)(+) channels. *Biochim Biophys Acta*, 1828(7), 1530-1540. doi:10.1016/j.bbamem.2012.08.028
- Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpon, E., Hu, D., Desai, M., . . . Antzelevitch, C. (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm*, 7(12), 1872-1882. doi:10.1016/j.hrthm.2010.08.026
- Calderon-Rivera, A., Andrade, A., Hernandez-Hernandez, O., Gonzalez-Ramirez, R., Sandoval, A., Rivera, M., . . . Felix, R. (2012a). Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca $^{2+}$  channel  $\alpha$ (2) $\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium*, 51(1), 22-30. doi:10.1016/j.ceca.2011.10.002
- Calderon-Rivera, A., Andrade, A., Hernandez-Hernandez, O., Gonzalez-Ramirez, R., Sandoval, A., Rivera, M., . . . Felix, R. (2012b). Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca(2+) channel  $\alpha$ (2) $\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium*, 51(1), 22-30. doi:10.1016/j.ceca.2011.10.002
- Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Heblich, F., Wratten, J., Richards, M. W., . . . Dolphin, A. C. (2005). The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of  $\alpha$ 2 $\delta$  subunits is key to trafficking voltage-gated Ca $^{2+}$  channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(32), 11230-11235. doi:10.1073/pnas.0504183102

- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., & Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 36(2), 107-260. doi:10.1080/20014091074183
- Carrio, M. M., Cubarsi, R., & Villaverde, A. (2000). Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *Febs Letters*, 471(1), 7-11.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(8), a003947. doi:10.1101/cshperspect.a003947
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 411-425. doi:10.1124/pr.57.4.5
- Catterall, W. A., & Swanson, T. M. (2015). Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol Pharmacol*, 88(1), 141-150. doi:10.1124/mol.114.097659
- Catterall, W. A., & Yarov-Yarovoy, V. (2010). Helical motion of an S4 voltage sensor revealed by gating pore currents. *Channels (Austin)*, 4(2), 75-77.
- Catterall, W. A., & Zheng, N. (2015). Deciphering voltage-gated Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels by studying prokaryotic ancestors. *Trends Biochem Sci*, 40(9), 526-534. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.002
- Chen, H., Kim, S., Li, L., Wang, S., Park, K., & Cheng, J. X. (2008). Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Forster resonance energy transfer imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(18), 6596-6601. doi:10.1073/pnas.0707046105
- Chen, J., Liu, Y., Wang, Y., Ding, H., & Su, Z. (2008). Different effects of L-arginine on protein refolding: suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding. *Biotechnol Prog*, 24(6), 1365-1372. doi:10.1002/btpr.93
- Chen, Y. H., Li, M. H., Zhang, Y., He, L. L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., . . . Yang, J. (2004). Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature*, 429(6992), 675-680. doi:10.1038/nature02641
- Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A., & Walz, T. (2015). A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell*, 161(3), 438-449. doi:10.1016/j.cell.2015.03.050
- Chincholkar, M. (2018). Analgesic mechanisms of gabapentinoids and effects in experimental pain models: a narrative review. *Br J Anaesth*, 120(6), 1315-1334. doi:10.1016/j.bja.2018.02.066
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
- Clarke, D. T. (2011). Circular dichroism and its use in protein-folding studies. *Methods Mol Biol*, 752, 59-72. doi:10.1007/978-1-60327-223-0\_5
- Colecraft, H. M., Alseikhan, B., Takahashi, S. X., Chaudhuri, D., Mittman, S., Yegnasubramanian, V., . . . Yue, D. T. (2002). Novel functional properties of Ca(2+) channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J Physiol*, 541(Pt 2), 435-452.
- Colombatti, A., & Bonaldo, P. (1991). The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood*, 77(11), 2305-2315.
- Conway, B. E. (1981). Ionic Hydration in Chemistry and Biophysics. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61, 3331.

- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2013). *The cell : a molecular approach* (6th ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Cordeiro, J. M., Marieb, M., Pfeiffer, R., Calloe, K., Burashnikov, E., & Antzelevitch, C. (2009). Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, *46*(5), 695-703.
- Craig, D., Gao, M., Schulten, K., & Vogel, V. (2004). Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. *Structure*, *12*(11), 2049-2058. doi:10.1016/j.str.2004.09.009
- Crotti, L., Johnson, C. N., Graf, E., De Ferrari, G. M., Cuneo, B. F., Ovia, M., . . . George, A. L., Jr. (2013). Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. *Circulation*, *127*(9), 1009-1017. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001216
- Curtis, B. M., & Catterall, W. A. (1983). Solubilization of the calcium antagonist receptor from rat brain. *J Biol Chem*, *258*(12), 7280-7283.
- Curtis, B. M., & Catterall, W. A. (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry*, *23*(10), 2113-2118.
- Dafi, O., Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Sauve, R., & Parent, L. (2004). Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to CaV1.2. *Biophysical Journal*, *87*(5), 3181-3192. doi:10.1529/biophysj.104.045559
- Davare, M. A., Horne, M. C., & Hell, J. W. (2000). Protein phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Cav1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, *275*(50), 39710-39717. doi:10.1074/jbc.M005462200
- Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A. T., Wratten, J., Douglas, L., & Dolphin, A. C. (2007). Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci*, *28*(5), 220-228. doi:10.1016/j.tips.2007.03.005
- Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C. S., . . . Dolphin, A. C. (2010). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(4), 1654-1659. doi:10.1073/pnas.0908735107
- de Leon, M., Wang, Y., Jones, L., Perez-Reyes, E., Wei, X., Soong, T. W., . . . Yue, D. T. (1995). Essential Ca(2+)-binding motif for Ca(2+)-sensitive inactivation of L-type Ca2+ channels. *Science*, *270*(5241), 1502-1506.
- de Paoli, F. V., Ortenblad, N., Pedersen, T. H., Jorgensen, R., & Nielsen, O. B. (2010). Lactate per se improves the excitability of depolarized rat skeletal muscle by reducing the Cl-conductance. *J Physiol*, *588*(Pt 23), 4785-4794. doi:10.1113/jphysiol.2010.196568
- Deller, M. C., Kong, L., & Rupp, B. (2016). Protein stability: a crystallographer's perspective. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, *72*(Pt 2), 72-95. doi:10.1107/S2053230X15024619
- Demo, S. D., & Yellen, G. (1991). The inactivation gate of the Shaker K+ channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron*, *7*(5), 743-753.
- Depil, K., Beyl, S., Stary-Weinzinger, A., Hohaus, A., Timin, E., & Hering, S. (2011). Timothy mutation disrupts the link between activation and inactivation in Ca(V)1.2 protein. *J Biol Chem*, *286*(36), 31557-31564. doi:10.1074/jbc.M111.255273

- Dessau, M. A., & Modis, Y. (2011). Protein crystallization for X-ray crystallography. *J Vis Exp*(47). doi:10.3791/2285
- Doerr, A. (2015). Cryo-Em Goes High-Resolution. *Nat Methods*, 12(7), 598-599.
- Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S56-62. doi:10.1038/sj.bjp.0706442
- Dolphin, A. C. (2013). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta*, 1828(7), 1541-1549. doi:10.1016/j.bbamem.2012.11.019
- dos Reis, M. A., Aparicio, R., & Zhang, Y. (2011). Improving Protein Template Recognition by Using Small-Angle X-Ray Scattering Profiles. *Biophys J*, 101(11), 2770-2781. doi:10.1016/j.bpj.2011.10.046
- Douglas, L., Davies, A., Wratten, J., & Dolphin, A. C. (2006). Do voltage-gated calcium channel alpha2delta subunits require proteolytic processing into alpha2 and delta to be functional? *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 5), 894-898. doi:10.1042/BST0340894
- Dragicevic, E., Poetschke, C., Duda, J., Schlaudraff, F., Lammel, S., Schiemann, J., . . . Liss, B. (2014). Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in substantia nigra dopamine neurons. *Brain*, 137(Pt 8), 2287-2302. doi:10.1093/brain/awu131
- Ebashi, S. (1961). Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J Chir (Paris)*, 82, 236-244.
- Ebashi, S., & Kodama, A. (1965). A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J Biochem*, 58(1), 107-108.
- Edwards, Y. J., & Perkins, S. J. (1995). The protein fold of the von Willebrand factor type A domain is predicted to be similar to the open twisted beta-sheet flanked by alpha-helices found in human ras-p21. *Febs Letters*, 358(3), 283-286.
- Elgendi, M., Eskofier, B., Dokos, S., & Abbott, D. (2014). Revisiting QRS detection methodologies for portable, wearable, battery-operated, and wireless ECG systems. *PLoS One*, 9(1), e84018. doi:10.1371/journal.pone.0084018
- Ellis, S. B., Williams, M. E., Ways, N. R., Brenner, R., Sharp, A. H., Leung, A. T., . . . Harpold, M. M. (1988). Sequence and Expression of Messenger-Rnas Encoding the Alpha-1-Subunit and Alpha-2-Subunit of a Dhp-Sensitive Calcium-Channel. *Science*, 241(4873), 1661-1664. doi:Doi 10.1126/Science.2458626
- Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J., & Liddington, R. C. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell*, 101(1), 47-56. doi:10.1016/S0092-8674(00)80622-4
- Eroglu, C., Allen, N. J., Susman, M. W., O'Rourke, N. A., Park, C. Y., Ozkan, E., . . . Barres, B. A. (2009). Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell*, 139(2), 380-392. doi:10.1016/j.cell.2009.09.025
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., . . . Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3), 533-535.
- Fatt, P., & Katz, B. (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol*, 120(1-2), 171-204.
- Ferguson, M. A. J., Hart, G. W., & Kinoshita, T. (2015). Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, & P. H. Seeberger (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (3rd ed.). Cold Spring Harbor (NY).

- Fernandez-Leiro, R., & Scheres, S. H. (2016). Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature*, *537*(7620), 339-346. doi:10.1038/nature19948
- Field, M. J., Cox, P. J., Stott, E., Melrose, H., Offord, J., Su, T. Z., . . . Williams, D. (2006). Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(46), 17537-17542. doi:10.1073/pnas.0409066103
- Fiser, A. (2010). Template-based protein structure modeling. *Methods Mol Biol*, *673*, 73-94. doi:10.1007/978-1-60761-842-3\_6
- Flockerzi, V., Oeken, H. J., & Hofmann, F. (1986). Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur J Biochem*, *161*(1), 217-224.
- Flockerzi, V., Oeken, H. J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalie, A., & Trautwein, W. (1986). Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature*, *323*(6083), 66-68. doi:10.1038/323066a0
- Fukuyama, M., Ohno, S., Wang, Q., Kimura, H., Makiyama, T., Itoh, H., . . . Horie, M. (2013). L-type calcium channel mutations in Japanese patients with inherited arrhythmias. *Circ J*, *77*(7), 1799-1806.
- Fukuyama, M., Wang, Q., Kato, K., Ohno, S., Ding, W. G., Toyoda, F., . . . Horie, M. (2014). Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes. *Europace*, *16*(12), 1828-1837. doi:10.1093/europace/euu063
- Fuller-Bicer, G. A., Varadi, G., Koch, S. E., Ishii, M., Bodi, I., Kadeer, N., . . . Schwartz, A. (2009). Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel alpha2/delta-1-subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *297*(1), H117-124. doi:10.1152/ajpheart.00122.2009
- Gaborit, N., Steenman, M., Lamirault, G., Le Meur, N., Le Bouter, S., Lande, G., . . . Demolombe, S. (2005). Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation*, *112*(4), 471-481. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.506857
- Galinska-Rakoczy, A., Engel, P., Xu, C., Jung, H., Craig, R., Tobacman, L. S., & Lehman, W. (2008). Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *Journal of Molecular Biology*, *379*(5), 929-935. doi:10.1016/j.jmb.2008.04.062
- Gandhi, C. S., & Olcese, R. (2008). The voltage-clamp fluorometry technique. *Methods Mol Biol*, *491*, 213-231. doi:10.1007/978-1-59745-526-8\_17
- Garcia, J., Nakai, J., Imoto, K., & Beam, K. G. (1997). Role of S4 segments and the leucine heptad motif in the activation of an L-type calcium channel. *Biophysical Journal*, *72*(6), 2515-2523. doi:10.1016/S0006-3495(97)78896-9
- Gaudet, R. (2009). Divide and conquer: high resolution structural information on TRP channel fragments. *J Gen Physiol*, *133*(3), 231-237. doi:10.1085/jgp.200810137
- Ghatak, S., Banerjee, A., & Sikdar, S. K. (2016). Ischaemic concentrations of lactate increase TREK1 channel activity by interacting with a single histidine residue in the carboxy terminal domain. *J Physiol*, *594*(1), 59-81. doi:10.1113/JP270706
- Gillis, J., Burashnikov, E., Antzelevitch, C., Blaser, S., Gross, G., Turner, L., . . . Chitayat, D. (2012). Long QT, syndactyly, joint contractures, stroke and novel CACNA1C mutation: expanding the spectrum of Timothy syndrome. *Am J Med Genet A*, *158A*(1), 182-187. doi:10.1002/ajmg.a.34355

- Gonzalez-Gutierrez, G., Miranda-Laferte, E., Nothmann, D., Schmidt, S., Neely, A., & Hidalgo, P. (2008). The guanylate kinase domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels suffices to modulate gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(37), 14198-14203. doi:10.1073/pnas.0806558105
- Gorski, P. A., Trieber, C. A., Ashrafi, G., & Young, H. S. (2015). Regulation of the sarcoplasmic reticulum calcium pump by divergent phospholamban isoforms in zebrafish. *J Biol Chem*, *290*(11), 6777-6788. doi:10.1074/jbc.M114.585604
- Halling, D. B., Georgiou, D. K., Black, D. J., Yang, G., Fallon, J. L., Quioco, F. A., . . . Hamilton, S. L. (2009a). Determinants in CaV1 channels that regulate the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of bound calmodulin. *J Biol Chem*, *284*(30), 20041-20051. doi:10.1074/jbc.M109.013326
- Halling, D. B., Georgiou, D. K., Black, D. J., Yang, G. J., Fallon, J. L., Quioco, F. A., . . . Hamilton, S. L. (2009b). Determinants in Ca(V)1 Channels That Regulate the Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of Bound Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(30), 20041-20051. doi:10.1074/jbc.M109.013326
- Hazelbauer, G. L., Falke, J. J., & Parkinson, J. S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci*, *33*(1), 9-19. doi:10.1016/j.tibs.2007.09.014
- Heinemann, S. H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K., & Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, *356*(6368), 441-443. doi:10.1038/356441a0
- Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Warner, C., Ahljianian, M. K., Prystay, W., Gilbert, M. M., . . . Catterall, W. A. (1993). Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol*, *123*(4), 949-962.
- Herlitze, S., Hockerman, G. H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1997). Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel alpha1A subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(4), 1512-1516.
- Hille, B. (1971). The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J Gen Physiol*, *58*(6), 599-619.
- Hille, B. (1973). Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. *J Gen Physiol*, *61*(6), 669-686.
- Hockerman, G. H., Peterson, B. Z., Johnson, B. D., & Catterall, W. A. (1997). Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *37*, 361-396. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.361
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*, *116*(4), 449-472.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol*, *116*(4), 424-448.
- Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., & Wegener, J. W. (2014). L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev*, *94*(1), 303-326. doi:10.1152/physrev.00016.2013
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, *250*(4980), 533-538.

- Hullin, R., Khan, I. F., Wirtz, S., Mohacsi, P., Varadi, G., Schwartz, A., & Herzig, S. (2003). Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J Biol Chem*, *278*(24), 21623-21630. doi:10.1074/jbc.M211164200
- Hulme, J. T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T. W., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2006). Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol*, *576*(Pt 1), 87-102. doi:10.1113/jphysiol.2006.111799
- Hura, G. L., Menon, A. L., Hammel, M., Rambo, R. P., Poole, F. L., 2nd, Tsutakawa, S. E., . . . Tainer, J. A. (2009). Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS). *Nat Methods*, *6*(8), 606-612. doi:10.1038/nmeth.1353
- Jay, S. D., Ellis, S. B., McCue, A. F., Williams, M. E., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1990a). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, *248*(4954), 490-492.
- Jay, S. D., Ellis, S. B., Mccue, A. F., Williams, M. E., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1990b). Primary Structure of the Gamma-Subunit of the Dhp-Sensitive Calcium-Channel from Skeletal-Muscle. *Science*, *248*(4954), 490-492. doi:Doi 10.1126/Science.2158672
- Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1991a). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *J Biol Chem*, *266*(5), 3287-3293.
- Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1991b). Structural Characterization of the Dihydropyridine-Sensitive Calcium-Channel Alpha-2-Subunit and the Associated Delta-Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(5), 3287-3293.
- Johnson, J. N., & Ackerman, M. J. (2009). QTc: how long is too long? *Br J Sports Med*, *43*(9), 657-662. doi:10.1136/bjism.2008.054734
- Joshi, I., & Taylor, C. P. (2006). Pregabalin action at a model synapse: binding to presynaptic calcium channel alpha2-delta subunit reduces neurotransmission in mice. *Eur J Pharmacol*, *553*(1-3), 82-88. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.019
- Kamata, T., Liddington, R. C., & Takada, Y. (1999). Interaction between collagen and the alpha(2) I-domain of integrin alpha(2)beta(1). Critical role of conserved residues in the metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) region. *J Biol Chem*, *274*(45), 32108-32111.
- Kikhney, A. G., & Svergun, D. I. (2015). A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *Febs Letters*, *589*(19 Pt A), 2570-2577. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.027
- Kim, E. Y., Rumpf, C. H., Fujiwara, Y., Cooley, E. S., Van Petegem, F., & Minor, D. L., Jr. (2008). Structures of CaV2 Ca<sup>2+</sup>/CaM-IQ domain complexes reveal binding modes that underlie calcium-dependent inactivation and facilitation. *Structure*, *16*(10), 1455-1467. doi:10.1016/j.str.2008.07.010
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., & Hofmann, F. (1999). Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci*, *19*(2), 684-691.
- Klugbauer, N., Marais, E., & Hofmann, F. (2003). Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr*, *35*(6), 639-647.

- Kneuper, H., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Bock, V., Griesinger, C., & Unden, G. (2005). The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *280*(21), 20596-20603. doi:10.1074/jbc.M502015200
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., & Svergun, D. I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, *36*, 1277-1282. doi:10.1107/S0021889803012779
- Kopecky, B. J., Liang, R., & Bao, J. (2014). T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents. *Pflugers Arch*, *466*(4), 757-765. doi:10.1007/s00424-014-1454-x
- Krause, U., Gravenhorst, V., Kriebel, T., Ruschewski, W., & Paul, T. (2011). A rare association of long QT syndrome and syndactyly: Timothy syndrome (LQT 8). *Clin Res Cardiol*, *100*(12), 1123-1127. doi:10.1007/s00392-011-0358-4
- Kryshtal, D. O., Hwang, H. S., Johnson, C. N., Chazin, W. J., George, A. L., & Knollmann, B. C. (2015). Divergent Regulation of Cardiomyocyte Cav1.2 Currents by Calmodulin Mutants Associated with Human Sudden Death Syndromes. *Biophysical Journal*, *108*(2), 580A-580A.
- Kwasigroch, J. M., Chomilier, J., & Mornon, J. P. (1996). A global taxonomy of loops in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, *259*(4), 855-872. doi:10.1006/jmbi.1996.0363
- Lacinova, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys*, *24 Suppl 1*, 1-78.
- Lacroix, J. J., Hyde, H. C., Campos, F. V., & Bezanilla, F. (2014). Moving gating charges through the gating pore in a Kv channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(19), E1950-1959. doi:10.1073/pnas.1406161111
- Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Scobie, H. M., Young, J. A., & Collier, R. J. (2004). Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(17), 6367-6372. doi:10.1073/pnas.0401506101
- Lana, B., Page, K. M., Kadurin, I., Ho, S., Nieto-Rostro, M., & Dolphin, A. C. (2016). Thrombospondin-4 reduces binding affinity of [(3)H]-gabapentin to calcium-channel alpha2delta-1-subunit but does not interact with alpha2delta-1 on the cell-surface when co-expressed. *Sci Rep*, *6*, 24531. doi:10.1038/srep24531
- Lazniewska, J., & Weiss, N. (2017). Glycosylation of voltage-gated calcium channels in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, *1859*(5), 662-668. doi:10.1016/j.bbame.2017.01.018
- Lee, J. O., Bankston, L. A., Arnaout, M. A., & Liddington, R. C. (1995). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure*, *3*(12), 1333-1340.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A., & Liddington, R. (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, *80*(4), 631-638.
- Lee, K. S., Marban, E., & Tsien, R. W. (1985). Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol*, *364*, 395-411.



- Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D257-260. doi:10.1093/nar/gku949
- Leung, A. T., Imagawa, T., & Campbell, K. P. (1987). Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem*, 262(17), 7943-7946.
- Limpitikul, W. B., Dick, I. E., Joshi-Mukherjee, R., Overgaard, M. T., George, A. L., Jr., & Yue, D. T. (2014). Calmodulin mutations associated with long QT syndrome prevent inactivation of cardiac L-type Ca(2+) currents and promote proarrhythmic behavior in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 74, 115-124. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.04.022
- Lodish H, e. a. (2000). *Intracellular ion environment and membrane electric potential*. (Vol. Section 15.4).
- Long, S. B., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*, 309(5736), 897-903. doi:10.1126/science.1116269
- Luo, B. H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, 25, 619-647. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618
- Mahalingam, B., Ajroud, K., Alonso, J. L., Anand, S., Adair, B. D., Horenstein, A. L., . . . Arnaout, M. A. (2011). Stable coordination of the inhibitory Ca<sup>2+</sup> ion at the metal ion-dependent adhesion site in integrin CD11b/CD18 by an antibody-derived ligand aspartate: implications for integrin regulation and structure-based drug design. *J Immunol*, 187(12), 6393-6401. doi:10.4049/jimmunol.1102394
- Mallet, R. T., & Sun, J. (1999). Mitochondrial metabolism of pyruvate is required for its enhancement of cardiac function and energetics. *Cardiovasc Res*, 42(1), 149-161.
- Mallet, R. T., Sun, J., Knott, E. M., Sharma, A. B., & Olivencia-Yurvati, A. H. (2005). Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230(7), 435-443.
- Mangoni, M. E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J., & Nargeot, J. (2003). Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5543-5548. doi:10.1073/pnas.0935295100
- Marais, E., Klugbauer, N., & Hofmann, F. (2001). Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol*, 59(5), 1243-1248.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., . . . Bryant, S. H. (2015a). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D222-226. doi:10.1093/nar/gku1221
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S. N., Chitsaz, F., Geer, L. Y., . . . Bryant, S. H. (2015b). Cdd: Ncbi's Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*, 43(D1), D222-D226. doi:10.1093/nar/gku1221
- Mark James Abraham, T. M., Roland Schulz, Szilárd Páll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, Erik Lindahl. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2, 19-25. doi:doi:10.1016/j.softx.2015.06.001
- Matsudaira, P. T. (2000). *Molecular Cell Biology 4.0* (pp. 1 CD-ROM).

- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol*, *824*, 329-358. doi:10.1007/978-1-61779-433-9\_17
- McPhee, J. C., Ragsdale, D. S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J Biol Chem*, *270*(20), 12025-12034.
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, *70*(Pt 1), 2-20. doi:10.1107/S2053230X13033141
- Meier, V. M., Muschler, P., & Scharf, B. E. (2007). Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, *189*(5), 1816-1826. doi:10.1128/JB.00883-06
- Meshik, X., Choi, M., Baker, A., Malchow, R. P., Covnot, L., Doan, S., . . . Stroschio, M. A. (2017). Modulation of voltage-gated conductances of retinal horizontal cells by UV-excited TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanomedicine*, *13*(3), 1031-1040. doi:10.1016/j.nano.2016.11.008
- Meuth, S., Pape, H. C., & Budde, T. (2002). Modulation of Ca<sup>2+</sup> currents in rat thalamocortical relay neurons by activity and phosphorylation. *Eur J Neurosci*, *15*(10), 1603-1614.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., . . . Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, *340*(6230), 230-233. doi:10.1038/340230a0
- Milne, J. L., Borgnia, M. J., Bartesaghi, A., Tran, E. E., Earl, L. A., Schauder, D. M., . . . Subramaniam, S. (2013). Cryo-electron microscopy--a primer for the non-microscopist. *FEBS J*, *280*(1), 28-45. doi:10.1111/febs.12078
- Minor, D. L., Jr., & Findeisen, F. (2010). Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (Ca<sub>v</sub>) function and modulation. *Channels (Austin)*, *4*(6), 459-474. doi:10.4161/chan.4.6.12867
- Moss, A. J., & Kass, R. S. (2005). Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. *J Clin Invest*, *115*(8), 2018-2024. doi:10.1172/JCI25537
- Murata, K., & Wolf, M. (2017). Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbagen.2017.07.020
- Nagle, J. F. (1993). Area/lipid of bilayers from NMR. *Biophysical Journal*, *64*(5), 1476-1481. doi:10.1016/S0006-3495(93)81514-5
- Nakai, J., Adams, B. A., Imoto, K., & Beam, K. G. (1994). Critical roles of the S3 segment and S3-S4 linker of repeat I in activation of L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(3), 1014-1018.
- Napolitano, C., & Antzelevitch, C. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac voltage-dependent L-type calcium channel. *Circ Res*, *108*(5), 607-618. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.224279
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, *85*(4), 1205-1253. doi:10.1152/physrev.00002.2005
- Nothhaft, H., & Szymanski, C. M. (2010). Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat Rev Microbiol*, *8*(11), 765-778. doi:10.1038/nrmicro2383
- O'Dell, B. L., & Sunde, R. A. (1997). *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. New York: Marcel Dekker.

- O'Donnell-Tormey, J., Nathan, C. F., Lanks, K., DeBoer, C. J., & de la Harpe, J. (1987). Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med*, *165*(2), 500-514.
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., & van Gunsteren, W. F. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem*, *25*(13), 1656-1676. doi:10.1002/jcc.20090
- Opatowsky, Y., Chen, C. C., Campbell, K. P., & Hirsch, J. A. (2004). Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron*, *42*(3), 387-399.
- Ortner, N. J., & Striessnig, J. (2016). L-type calcium channels as drug targets in CNS disorders. *Channels (Austin)*, *10*(1), 7-13. doi:10.1080/19336950.2015.1048936
- Panca, R., & Fuxreiter, M. (2012). Interactions via intrinsically disordered regions: what kind of motifs? *IUBMB Life*, *64*(6), 513-520. doi:10.1002/iub.1034
- Pantazis, A., Savalli, N., Sigg, D., Neely, A., & Olcese, R. (2014). Functional heterogeneity of the four voltage sensors of a human L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(51), 18381-18386. doi:10.1073/pnas.1411127112
- Parent, L., & Gopalakrishnan, M. (1995a). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophysical Journal*, *69*(5), 1801-1813. doi:10.1016/S0006-3495(95)80050-0
- Parent, L., & Gopalakrishnan, M. (1995b). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophysical Journal*, *69*(5), 1801-1813.
- Parent, L., Gopalakrishnan, M., Lacerda, A. E., Wei, X., & Perez-Reyes, E. (1995). Voltage-dependent inactivation in a cardiac-skeletal chimeric calcium channel. *Febs Letters*, *360*(2), 144-150.
- Park, H. J., Min, S. H., Won, Y. J., & Lee, J. H. (2015). Asn-Linked Glycosylation Contributes to Surface Expression and Voltage-Dependent Gating of Cav1.2 Ca(2+)(+) Channel. *J Microbiol Biotechnol*, *25*(8), 1371-1379. doi:10.4014/jmb.1501.01066
- Patel, A. C., Brett, T. J., & Holtzman, M. J. (2009). The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. *Annual Review of Physiology*, *71*, 425-449. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163253
- Paulick, M. G., & Bertozzi, C. R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*, *47*(27), 6991-7000. doi:10.1021/bi8006324
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, *475*(7356), 353-358. doi:10.1038/nature10238
- Peracchia, C. (1994). *Handbook of membrane channels : molecular and cellular physiology*. San Diego: Academic Press.
- Pereverzev, A., Leroy, J., Krieger, A., Malecot, C. O., Hescheler, J., Pfitzer, G., . . . Schneider, T. (2002). Alternate splicing in the cytosolic II-III loop and the carboxy terminus of human E-type voltage-gated Ca(2+) channels: electrophysiological characterization of isoforms. *Mol Cell Neurosci*, *21*(2), 352-365.
- Perez-Reyes, E., Kim, H. S., Lacerda, A. E., Horne, W., Wei, X. Y., Rampe, D., . . . Birnbaumer, L. (1989). Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-

- subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature*, 340(6230), 233-236. doi:10.1038/340233a0
- Periasamy, M., & Huke, S. (2001). SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+)homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol*, 33(6), 1053-1063. doi:10.1006/jmcc.2001.1366
- Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., & Yue, D. T. (1999). Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup> -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*, 22(3), 549-558.
- Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I. (2015a). Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 71(Pt 5), 1051-1058. doi:10.1107/S1399004715002576
- Petoukhov, M. V., & Svergun, D. I. (2015b). Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 71, 1051-1058. doi:10.1107/S1399004715002576
- Philip, V., Harris, J., Adams, R., Nguyen, D., Spiers, J., Baudry, J., . . . Hinde, R. J. (2011). A survey of aspartate-phenylalanine and glutamate-phenylalanine interactions in the protein data bank: searching for anion-pi pairs. *Biochemistry*, 50(14), 2939-2950. doi:10.1021/bi200066k
- Pihlajamaa, T., Kajander, T., Knuuti, J., Horkka, K., Sharma, A., & Permi, P. (2013). Structure of Plasmodium falciparum TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von Willebrand factor A homologues. *Biochem J*, 450(3), 469-476. doi:10.1042/BJ20121058
- Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., . . . Striessnig, J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell*, 102(1), 89-97.
- Pless, S. A., Elstone, F. D., Niciforovic, A. P., Galpin, J. D., Yang, R., Kurata, H. T., & Ahern, C. A. (2014). Asymmetric functional contributions of acidic and aromatic side chains in sodium channel voltage-sensor domains. *J Gen Physiol*, 143(5), 645-656. doi:10.1085/jgp.201311036
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., & Smith, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275(29), 21785-21788. doi:10.1074/jbc.R000003200
- Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L., & Tainer, J. A. (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys*, 40(3), 191-285. doi:10.1017/S0033583507004635
- Putnam, D. K., Lowe, E. W., Jr., & Meiler, J. (2013). Reconstruction of SAXS Profiles from Protein Structures. *Comput Struct Biotechnol J*, 8, e201308006. doi:10.5936/csbj.201308006
- Qian, H., Patriarchi, T., Price, J. L., Matt, L., Lee, B., Nieves-Cintrón, M., . . . Hell, J. W. (2017). Phosphorylation of Ser1928 mediates the enhanced activity of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2 by the beta2-adrenergic receptor in neurons. *Sci Signal*, 10(463). doi:10.1126/scisignal.aaf9659
- Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Cabello, O. A., Birnbaumer, L., & Stefani, E. (1996). Identification of a second region of the beta-subunit involved in regulation of calcium channel inactivation. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 1), C1539-1545.

- Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M. L., Codd, E. E., & D'Andrea, M. R. (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel  $\alpha(2)\delta$ -4 subunit. *Mol Pharmacol*, 62(3), 485-496.
- Ramon, A., Senorale-Pose, M., & Marin, M. (2014). Inclusion bodies: not that bad. *Front Microbiol*, 5, 56. doi:10.3389/fmicb.2014.00056
- Rannou, F., Leschiera, R., Giroux-Metges, M. A., & Penneç, J. P. (2012). Effects of lactate on the voltage-gated sodium channels of rat skeletal muscle: modulating current opinion. *J Appl Physiol (1985)*, 112(9), 1454-1465. doi:10.1152/jappphysiol.00944.2011
- Raybaud, A., Dodier, Y., Bissonnette, P., Simoes, M., Bichet, D. G., Sauve, R., & Parent, L. (2006). The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Biol Chem*, 281(51), 39424-39436. doi:10.1074/jbc.M607405200
- Ringer, S. (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol*, 4(1), 29-42 23.
- Rogawski, M. A., & Taylor, C. P. (2006). Calcium Channel  $\alpha 2\text{-}\delta$  Subunit, A New Antiepileptic Drug Target. *Epilepsy Res*, 69(3), 183-272. doi:http://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2006.03.014
- Rosati, B., Yan, Q., Lee, M. S., Liou, S. R., Ingalls, B., Foell, J., . . . McKinnon, D. (2011). Robust L-type calcium current expression following heterozygous knockout of the Cav1.2 gene in adult mouse heart. *J Physiol*, 589(Pt 13), 3275-3288. doi:10.1113/jphysiol.2011.210237
- Rossmann, M. G., Moras, D., & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, 250(463), 194-199.
- Roussel, G., Tinti, E., Perpete, E., & Michaux, C. (2013). Refolding of SDS-denatured proteins using amphipathic cosolvents and osmolytes. *Curr Protoc Protein Sci, Chapter 28, Unit 28 25*. doi:10.1002/0471140864.ps2805s72
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 5(4), 725-738. doi:10.1038/nprot.2010.5
- Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. *Int J Mol Sci*, 14(6), 11643-11691. doi:10.3390/ijms140611643
- Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H. E., . . . Hofmann, F. (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*, 245(4922), 1115-1118.
- Sala-Rabanal, M., Yurtsever, Z., Berry, K. N., Nichols, C. G., & Brett, T. J. (2017). Modulation of TMEM16A channel activity by the von Willebrand factor type A (VWA) domain of the calcium-activated chloride channel regulator 1 (CLCA1). *J Biol Chem*, 292(22), 9164-9174. doi:10.1074/jbc.M117.788232
- Sala-Rabanal, M., Yurtsever, Z., Nichols, C. G., & Brett, T. J. (2015). Secreted CLCA1 modulates TMEM16A to activate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride currents in human cells. *Elife*, 4. doi:10.7554/eLife.05875
- Salkoff, L., Wei, A. D., Baban, B., Butler, A., Fawcett, G., Ferreira, G., & Santi, C. M. (2005). Potassium channels in *C. elegans*. *WormBook*, 1-15. doi:10.1895/wormbook.1.42.1
- San Sebastian, E., Mercero, J. M., Stote, R. H., Dejaegere, A., Cossio, F. P., & Lopez, X. (2006). On the affinity regulation of the metal-ion-dependent adhesion sites in integrins. *J Am Chem Soc*, 128(11), 3554-3563. doi:10.1021/ja054142a

- Sather, W. A., & McCleskey, E. W. (2003). Permeation and selectivity in calcium channels. *Annual Review of Physiology*, 65, 133-159. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142345
- Savalli, N., Pantazis, A., Sigg, D., Weiss, J. N., Neely, A., & Olcese, R. (2016). The alpha2delta-1 subunit remodels CaV1.2 voltage sensors and allows Ca<sup>2+</sup> influx at physiological membrane potentials. *J Gen Physiol*, 148(2), 147-159. doi:10.1085/jgp.201611586
- Schmidt, T. H., & Kandt, C. (2012). LAMBADA and InflateGRO2: efficient membrane alignment and insertion of membrane proteins for molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model*, 52(10), 2657-2669. doi:10.1021/ci3000453
- Schroder, E., Byse, M., & Satin, J. (2009). L-type calcium channel C terminus autoregulates transcription. *Circ Res*, 104(12), 1373-1381. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.191387
- Scoote, M., & Williams, A. J. (2004). Myocardial calcium signalling and arrhythmia pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 322(4), 1286-1309. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.034
- Segura, E., Bourdin, B., Tetreault, M. P., Briot, J., Allen, B. G., Mayer, G., & Parent, L. (2017). Proteolytic cleavage of the hydrophobic domain in the CaValpha2delta1 subunit improves assembly and activity of cardiac CaV1.2 channels. *J Biol Chem*, 292(26), 11109-11124. doi:10.1074/jbc.M117.784355
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., . . . Hofmann, F. (2000). Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse. *J Biol Chem*, 275(50), 39193-39199. doi:10.1074/jbc.M006467200
- Shakeri, B., Bourdin, B., Demers-Giroux, P. O., Sauve, R., & Parent, L. (2012). A quartet of leucine residues in the guanylate kinase domain of CaVbeta determines the plasma membrane density of the CaV2.3 channel. *J Biol Chem*, 287(39), 32835-32847. doi:10.1074/jbc.M112.387233
- Sharp, A. H., & Campbell, K. P. (1989a). Characterization of the 1,4-Dihydropyridine Receptor Using Subunit-Specific Polyclonal Antibodies - Evidence for a 32,000-Da-Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 264(5), 2816-2825.
- Sharp, A. H., & Campbell, K. P. (1989b). Characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor using subunit-specific polyclonal antibodies. Evidence for a 32,000-Da subunit. *J Biol Chem*, 264(5), 2816-2825.
- Sharp, A. H., Imagawa, T., Leung, A. T., & Campbell, K. P. (1987). Identification and characterization of the dihydropyridine-binding subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem*, 262(25), 12309-12315.
- Shattock, M. J., Ottolia, M., Bers, D. M., Blaustein, M. P., Boguslavskyi, A., Bossuyt, J., . . . Xie, Z. J. (2015). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the heart. *J Physiol*, 593(6), 1361-1382. doi:10.1113/jphysiol.2014.282319
- Shaw, R. M., & Colecraft, H. M. (2013). L-type calcium channel targeting and local signalling in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*, 98(2), 177-186. doi:10.1093/cvr/cvt021
- Shen, H., Zhou, Q., Pan, X., Li, Z., Wu, J., & Yan, N. (2017). Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science*, 355(6328). doi:10.1126/science.aal4326
- Shen, M. Y., & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci*, 15(11), 2507-2524. doi:10.1110/ps.062416606

- Shimaoka, M., Takagi, J., & Springer, T. A. (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, *31*, 485-516. doi:10.1146/annurev.biophys.31.101101.140922
- Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J. H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C. D., . . . Springer, T. A. (2003). Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*, *112*(1), 99-111.
- Simms, B. A., Souza, I. A., & Zamponi, G. W. (2014). Effect of the Brugada syndrome mutation A39V on calmodulin regulation of Cav1.2 channels. *Mol Brain*, *7*, 34. doi:10.1186/1756-6606-7-34
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2012a). The Brugada syndrome mutation A39V does not affect surface expression of neuronal rat Cav1.2 channels. *Mol Brain*, *5*, 9. doi:10.1186/1756-6606-5-9
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2012b). Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cell Mol Life Sci*, *69*(6), 843-856. doi:10.1007/s00018-011-0843-y
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, *82*(1), 24-45. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.016
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*, *14*, 41. doi:10.1186/s12934-015-0222-8
- Sinnesger-Brauns, M. J., Huber, I. G., Koschak, A., Wild, C., Obermair, G. J., Einzinger, U., . . . Striessnig, J. (2009). Expression and 1,4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms. *Mol Pharmacol*, *75*(2), 407-414. doi:10.1124/mol.108.049981
- Sivagangabalan, G., Nazzari, H., Bignolais, O., Maguy, A., Naud, P., Farid, T., . . . Nanthakumar, K. (2014). Regional ion channel gene expression heterogeneity and ventricular fibrillation dynamics in human hearts. *PLoS One*, *9*(1), e82179. doi:10.1371/journal.pone.0082179
- Skou, S., Gillilan, R. E., & Ando, N. (2014). Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nat Protoc*, *9*(7), 1727-1739. doi:10.1038/nprot.2014.116
- Smith, E. L., & Pickels, E. G. (1940). Micelle Formation in Aqueous Solutions of Digitonin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *26*(4), 272-277.
- Snutch, T. P., & Reiner, P. B. (1992). Ca<sup>2+</sup> channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol*, *2*(3), 247-253.
- Soldatov, N. M. (2012). Molecular Determinants of Cav1.2 Calcium Channel Inactivation. *ISRN Mol Biol*, *2012*, 691341. doi:10.5402/2012/691341
- Song, L., Espinoza-Fuenzalida, I. A., Etheridge, S., Jones, O. T., & Fitzgerald, E. M. (2015). The R-Domain: Identification of an N-terminal Region of the alpha2delta-1 Subunit Which is Necessary and Sufficient for its Effects on Cav2.2 Calcium Currents. *Curr Mol Pharmacol*, *8*(2), 169-179.
- Splawski, I., Timothy, K. W., Decher, N., Kumar, P., Sachse, F. B., Beggs, A. H., . . . Keating, M. T. (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(23), 8089-8096; discussion 8086-8088. doi:10.1073/pnas.0502506102
- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., . . . Keating, M. T. (2004). Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell*, *119*(1), 19-31. doi:10.1016/j.cell.2004.09.011

- Springer, T. A. (2006). Complement and the multifaceted functions of VWA and integrin I domains. *Structure*, 14(11), 1611-1616. doi:10.1016/j.str.2006.10.001
- Stevens, R. C. (2000). Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*, 8(9), R177-185.
- Stotz, S. C., Hamid, J., Spaetgens, R. L., Jarvis, S. E., & Zamponi, G. W. (2000). Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism? *J Biol Chem*, 275(32), 24575-24582. doi:10.1074/jbc.M000399200
- Stotz, S. C., & Zamponi, G. W. (2001). Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels. *Trends Neurosci*, 24(3), 176-181.
- Striessnig, J., Pinggera, A., Kaur, G., Bock, G., & Tuluc, P. (2014). L-type Ca<sup>2+</sup> channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, 3(2), 15-38. doi:10.1002/wmts.102
- Svergun, D., Barberato, C., & Koch, M. H. J. (1995). CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, 28, 768-773. doi:Doi 10.1107/S0021889895007047
- Svergun, D. I. (1999). Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing (vol 76, pg 2879, 1999). *Biophys J*, 77(5), 2896-2896.
- Takahashi, M., & Catterall, W. A. (1987). Identification of an alpha subunit of dihydropyridine-sensitive brain calcium channels. *Science*, 236(4797), 88-91.
- Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F., & Catterall, W. A. (1987a). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 5478-5482.
- Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F. X., & Catterall, W. A. (1987b). Subunit Structure of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels from Skeletal-Muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(15), 5478-5482. doi:Doi 10.1073/Pnas.84.15.5478
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., . . . Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328(6128), 313-318. doi:10.1038/328313a0
- Tang, H., Wang, S., Wang, J., Song, M., Xu, M., Zhang, M., . . . Bao, X. (2016). N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*, 6, 25654. doi:10.1038/srep25654
- Tang, L., El-Din, T. M., Swanson, T. M., Pryde, D. C., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2016). Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel by Ca<sup>2+</sup> antagonist drugs. *Nature*. doi:10.1038/nature19102
- Tang, L., Gamal El-Din, T. M., Payandeh, J., Martinez, G. Q., Heard, T. M., Scheuer, T., . . . Catterall, W. A. (2014). Structural basis for Ca<sup>2+</sup> selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature*, 505(7481), 56-61. doi:10.1038/nature12775
- Taylor, C. P. (2004). The biology and pharmacology of calcium channel alpha2-delta proteins Pfizer Satellite Symposium to the 2003 Society for Neuroscience Meeting. Sheraton New Orleans Hotel, New Orleans, LA November 10, 2003. *CNS Drug Rev*, 10(2), 183-188.
- Templin, C., Ghadri, J. R., Rougier, J. S., Baumer, A., Kaplan, V., Albesa, M., . . . Duru, F. (2011). Identification of a novel loss-of-function calcium channel gene mutation in



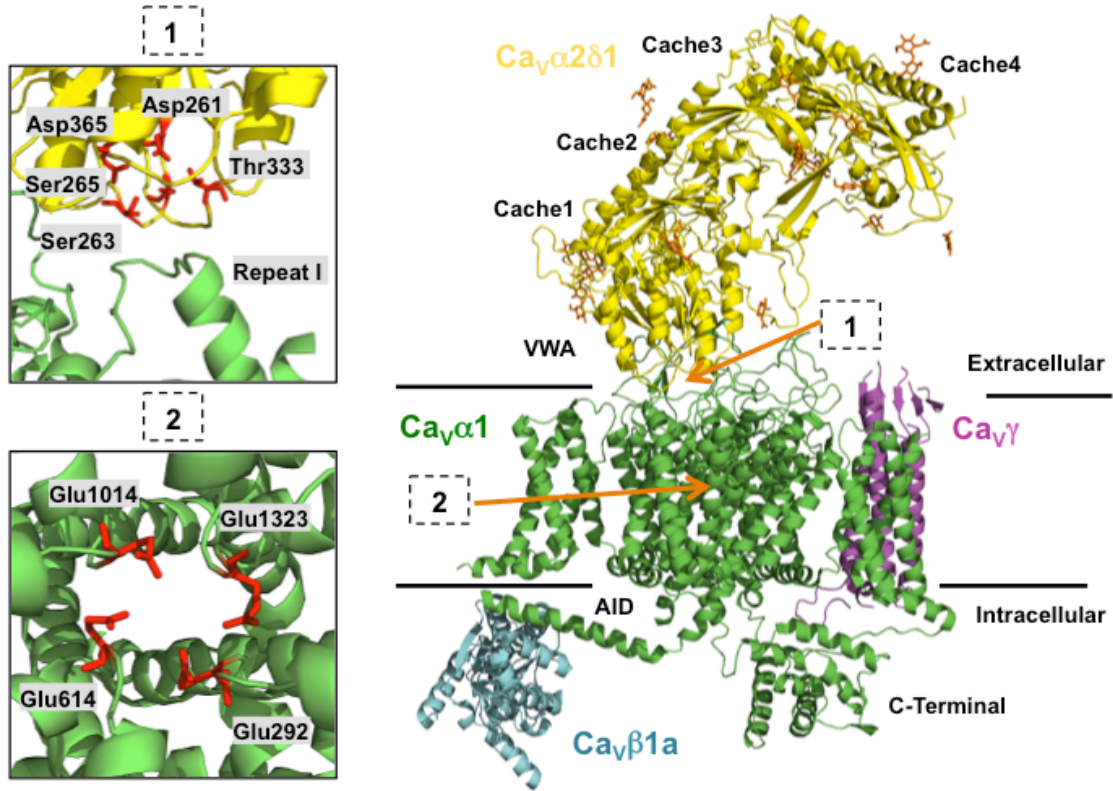
- short QT syndrome (SQTS6). *Eur Heart J*, 32(9), 1077-1088. doi:10.1093/eurheartj/ehr076
- Tetreault, M. P., Bourdin, B., Briot, J., Segura, E., Lesage, S., Fiset, C., & Parent, L. (2016). Identification of Glycosylation Sites Essential for Surface Expression of the CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 1 Subunit and Modulation of the Cardiac CaV1.2 Channel Activity. *J Biol Chem*, 291(9), 4826-4843. doi:10.1074/jbc.M115.692178
- Tokmakov, A. A., Kurotani, A., Takagi, T., Toyama, M., Shirouzu, M., Fukami, Y., & Yokoyama, S. (2012). Multiple post-translational modifications affect heterologous protein synthesis. *J Biol Chem*, 287(32), 27106-27116. doi:10.1074/jbc.M112.366351
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., & Arakawa, T. (2004). Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog*, 20(5), 1301-1308. doi:10.1021/bp0498793
- Tuckwell, D. (1999). Evolution of von Willebrand factor A (VWA) domains. *Biochem Soc Trans*, 27(6), 835-840.
- Upadhyay, A. A., Fleetwood, A. D., Adebali, O., Finn, R. D., & Zhulin, I. B. (2016). Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes. *Plos Computational Biology*, 12(4). doi:ARTN e1004862  
10.1371/journal.pcbi.1004862
- Valdramidou, D., Humphries, M. J., & Mould, A. P. (2008). Distinct roles of beta1 metal ion-dependent adhesion site (MIDAS), adjacent to MIDAS (ADMIDAS), and ligand-associated metal-binding site (LIMBS) cation-binding sites in ligand recognition by integrin  $\alpha$ 2beta1. *J Biol Chem*, 283(47), 32704-32714. doi:10.1074/jbc.M802066200
- Van Petegem, F., Chatelain, F. C., & Minor, D. L. (2005a). Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the Ca(V)1.2 IQ domain-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(12), 1108-1115. doi:10.1038/nsmb1027
- Van Petegem, F., Chatelain, F. C., & Minor, D. L., Jr. (2005b). Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol*, 12(12), 1108-1115. doi:10.1038/nsmb1027
- Van Petegem, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., & Minor, D. L. (2004a). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*, 429(6992), 671-675. doi:10.1038/nature02588
- Van Petegem, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., & Minor, D. L., Jr. (2004b). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*, 429(6992), 671-675. doi:10.1038/nature02588
- Van Petegem, F., Duderstadt, K. E., Clark, K. A., Wang, M., & Minor, D. L., Jr. (2008). Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaV $\alpha$ 1 AID-CaV $\beta$  interaction site that is critical for channel modulation. *Structure*, 16(2), 280-294. doi:10.1016/j.str.2007.11.010
- Venien-Bryan, C., Li, Z., Vuillard, L., & Boutin, J. A. (2017). Cryo-electron microscopy and X-ray crystallography: complementary approaches to structural biology and drug discovery. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 73(Pt 4), 174-183. doi:10.1107/S2053230X17003740

- Vivoli, M., Novak, H. R., Littlechild, J. A., & Harmer, N. J. (2014). Determination of protein-ligand interactions using differential scanning fluorimetry. *J Vis Exp*(91), 51809. doi:10.3791/51809
- Voigt, A., Freund, R., Heck, J., Missler, M., Obermair, G. J., Thomas, U., & Heine, M. (2016). Dynamic association of calcium channel subunits at the cellular membrane. *Neurophotonics*, 3(4), 041809. doi:10.1117/1.NPh.3.4.041809
- Wade, R. C., Gabdouliline, R. R., Ludemann, S. K., & Lounnas, V. (1998). Electrostatic steering and ionic tethering in enzyme-ligand binding: insights from simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 5942-5949.
- Wall-Lacelle, S., Hossain, M. I., Sauve, R., Blunck, R., & Parent, L. (2011). Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)2.3 calcium channel. *J Biol Chem*, 286(31), 27197-27205. doi:10.1074/jbc.M111.237412
- Walsh, C. P., Davies, A., Butcher, A. J., Dolphin, A. C., & Kitmitto, A. (2009). Three-dimensional structure of CaV3.1: comparison with the cardiac L-type voltage-gated calcium channel monomer architecture. *J Biol Chem*, 284(33), 22310-22321. doi:10.1074/jbc.M109.017152
- Walsh, C. P., Davies, A., Nieto-Rostro, M., Dolphin, A. C., & Kitmitto, A. (2009). Labelling of the 3D structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel. *Channels (Austin)*, 3(6), 387-392.
- Wang, M., Offord, J., Oxender, D. L., & Su, T. Z. (1999). Structural requirement of the calcium-channel subunit alpha2delta for gabapentin binding. *Biochem J*, 342 ( Pt 2), 313-320.
- Wang, M. C., Collins, R. F., Ford, R. C., Berrow, N. S., Dolphin, A. C., & Kitmitto, A. (2004). The three-dimensional structure of the cardiac L-type voltage-gated calcium channel: comparison with the skeletal muscle form reveals a common architectural motif. *J Biol Chem*, 279(8), 7159-7168. doi:10.1074/jbc.M308057200
- Webb, B., & Sali, A. (2017). Protein Structure Modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol*, 1654, 39-54. doi:10.1007/978-1-4939-7231-9\_4
- Weber, A. (1959). On the role of calcium in the activity of adenosine 5'-triphosphate hydrolysis by actomyosin. *J Biol Chem*, 234, 2764-2769.
- Wemhoner, K., Friedrich, C., Stallmeyer, B., Coffey, A. J., Grace, A., Zumhagen, S., . . . Decher, N. (2015). Gain-of-function mutations in the calcium channel CACNA1C (Cav1.2) cause non-syndromic long-QT but not Timothy syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, 80, 186-195. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.01.002
- Wetlaufer, D. B. (1973). Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(3), 697-701.
- Whittaker, C. A., & Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*, 13(10), 3369-3387. doi:10.1091/mbc.E02-05-0259
- Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., & Harpold, M. M. (1992). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron*, 8(1), 71-84.
- Winger, A. M., Taylor, N. L., Heazlewood, J. L., Day, D. A., & Millar, A. H. (2007). Identification of intra- and intermolecular disulphide bonding in the plant

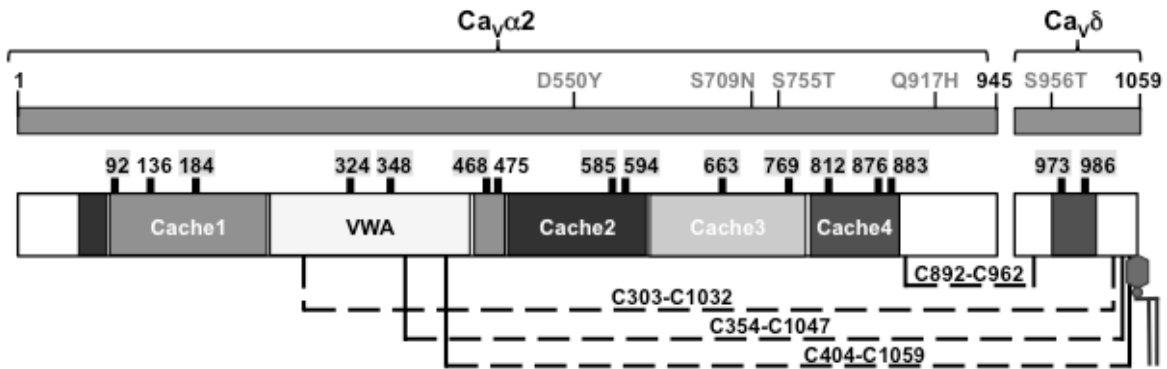
- mitochondrial proteome by diagonal gel electrophoresis. *Proteomics*, 7(22), 4158-4170. doi:10.1002/pmic.200700209
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci*, 80, 6 1 1-35. doi:10.1002/0471140864.ps0601s80
- Witcher, D. R., De Waard, M., Liu, H., Pragnell, M., & Campbell, K. P. (1995). Association of native Ca<sup>2+</sup> channel beta subunits with the alpha 1 subunit interaction domain. *J Biol Chem*, 270(30), 18088-18093.
- Wormuth, C., Lundt, A., Henseler, C., Muller, R., Broich, K., Papazoglou, A., & Weiergraber, M. (2016). Review: Cav2.3 R-type Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels - Functional Implications in Convulsive and Non-convulsive Seizure Activity. *Open Neurol J*, 10, 99-126. doi:10.2174/1874205X01610010099
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., . . . Yan, N. (2016a). Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*, 537(7619), 191-196. doi:10.1038/nature19321
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., . . . Yan, N. (2016b). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*. doi:10.1038/nature19321
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., & Yan, N. (2015). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science*, 350(6267), aad2395. doi:10.1126/science.aad2395
- Wu, R., Gu, M., Wilton, R., Babnigg, G., Kim, Y., Pokkuluri, P. R., . . . Schiffer, M. (2013). Insight into the sporulation phosphorelay: crystal structure of the sensor domain of *Bacillus subtilis* histidine kinase, KinD. *Protein Sci*, 22(5), 564-576. doi:10.1002/pro.2237
- Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., . . . Adelman, J. P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 395(6701), 503-507. doi:10.1038/26758
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, 4(1), 235-251. doi:10.3390/biom4010235
- Yamakage, M., & Namiki, A. (2002). Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth*, 49(2), 151-164. doi:10.1007/BF03020488
- Yan, B. X., & Sun, Y. Q. (1997). Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *J Biol Chem*, 272(6), 3190-3194.
- Yang, J., Ellinor, P. T., Sather, W. A., Zhang, J. F., & Tsien, R. W. (1993). Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> selectivity and ion permeation in L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature*, 366(6451), 158-161. doi:10.1038/366158a0
- Yang, J. Y., Yan, R. X., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*, 12(1), 7-8. doi:10.1038/nmeth.3213
- Yang, T., & Colecraft, H. M. (2013). Regulation of voltage-dependent calcium channels by RGK proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1828(7), 1644-1654. doi:10.1016/j.bbamem.2012.10.005

- Yazawa, M., Hsueh, B., Jia, X., Pasca, A. M., Bernstein, J. A., Hallmayer, J., & Dolmetsch, R. E. (2011). Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*, *471*(7337), 230-234. doi:10.1038/nature09855
- Yunker, A. M., & McEnery, M. W. (2003). Low-voltage-activated ("T-Type") calcium channels in review. *J Bioenerg Biomembr*, *35*(6), 533-575.
- Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev*, *67*(4), 821-870. doi:10.1124/pr.114.009654
- Zhang, J. F., Ellinor, P. T., Aldrich, R. W., & Tsien, R. W. (1994). Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature*, *372*(6501), 97-100. doi:10.1038/372097a0
- Zhang, K., & Chen, J. (2012). The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr*, *6*(1), 20-29. doi:10.4161/cam.18702
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, *9*, 40. doi:10.1186/1471-2105-9-40
- Zhang, Z., Witham, S., & Alexov, E. (2011). On the role of electrostatics in protein-protein interactions. *Phys Biol*, *8*(3), 035001. doi:10.1088/1478-3975/8/3/035001
- Zhao, N., Pang, B., Shyu, C. R., & Korkin, D. (2011). Charged residues at protein interaction interfaces: unexpected conservation and orchestrated divergence. *Protein Sci*, *20*(7), 1275-1284. doi:10.1002/pro.655
- Zhulin, I. B., Nikolskaya, A. N., & Galperin, M. Y. (2003). Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J Bacteriol*, *185*(1), 285-294.
- Zhulin, I. B., Taylor, B. L., & Dixon, R. (1997). PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci*, *22*(9), 331-333.

## FIGURES



**Figure 1: Membrane topology of the skeletal  $\text{Ca}_v1.1$  protein complex from the cryo-EM structure (PDB code 5GJV).**  $\text{Ca}_v\alpha1$  (in green) is composed of 24 transmembrane helices organized in four homologous Repeats (I to IV) around a central pore.  $\text{Ca}_v\beta1a$  (in blue) binds to the intracellular domain between Repeats I and II of  $\text{Ca}_v\alpha1$ . The VWA domain of the extracellular  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  (in yellow) is topping  $\text{Ca}_v\alpha1$ . Asn-linked glycans are in orange. The  $\text{Ca}_v\gamma$  subunit (purple) is not found in the L-type  $\text{Ca}_v1.2$  channel. Inset (1): Four polar residues of  $\text{Ca}_v\alpha2\delta1$  are potentially interfacing with Repeat I of  $\text{Ca}_v\alpha1$ . Inset (2): The selectivity locus formed by the projection of glutamate residues in the pore domain of  $\text{Ca}_v\alpha1$ . Cartoons were produced with PyMOL (Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).



**Figure 2: Structural organization of the human Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 (NM\_000722.3).** The five domains Cache1, VWA, Cache2, Cache3, and Cache4 are shown in different shades of grey. The numbers in black on the top rectangle indicate the amino acid boundaries for the human isoform 1 of Cav $\alpha$ 2 and Cav $\delta$ . The exact residue numbering varies between species due to slight differences in their primary structures. The five mutations of Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1 associated with cardiac arrhythmias are shown in pale grey. The 14 Asn-glycosylation sites identified in the cryo-EM structure are shaded and positioned directly above the domains. The two other Asn-glycosylation sites that were not identified are not shaded. The four intermolecular disulfide bonds between Cav $\alpha$ 2 and Cav $\delta$ 1 are shown above the dotted lines. The glycosylphosphatidylinositol anchor is located at cysteine 1059 which is equivalent to the last cysteine residue 1074 solved in the cryo-EM structure of the rabbit isoform.

