

Université de Montréal

Déterminants moléculaires de l'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage  
 $Ca_v2.3$  et  $Ca_v1.2$  : mutations ponctuelles dans la boucle I-II.

Par

BERROU Laurent  
Département de Physiologie  
Faculté de Médecine

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

août, 2001

© Laurent BERROU



W  
4  
U58  
2002  
V.056

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Déterminants moléculaires de l'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage  
Ca<sub>v</sub>2.3 et Ca<sub>v</sub>1.2 : mutations ponctuelles dans la boucle I-II.

Présenté par

Laurent BERROU

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Christiane Malo, président-rapporteur

Dr Rémy Sauvé, membre du jury

Dr Lucie Parent, directrice de recherche

Mémoire accepté le :

## Sommaire

Les canaux calciques activés par le potentiel membranaire (VDCC) contrôlent l'entrée du calcium dans les cellules excitables. En conséquence, les cinétiques d'activation et d'inactivation des VDCC déterminent directement l'influx calcique dans ces cellules. Les canaux calciques dépendants du voltage  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) (cinétiques rapides) et  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (cinétiques lentes) ont des cinétiques d'inactivation très différentes tout en possédant une identité de séquence primaire relativement élevée (~35%). Nos expériences précédentes montrent que les cinétiques d'inactivation de la chimère CEEE (domaine I de  $\alpha 1C$  et domaines II, III, IV de  $\alpha 1E$ ) se superposent à  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) en présence de  $Ba^{2+}$  (Bernatchez et al., 2001). Par exemple, en présence de la sous-unité  $\beta 3$ , le potentiel de mi-inactivation  $E_{0.5}$  de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) est  $-64 \pm 0.9$  mV (n=3) alors que celui de CEEE est  $-23 \pm 0.7$  mV (n=3), ce qui n'est pas différent de celui de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) avec  $-19 \pm 0.9$  mV (n=3). Malgré une homologie de > 80 % entre la structure primaire de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) et de CEEE, l'inactivation de CEEE est similaire à  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ), ce qui suggère un rôle dominant du domaine I et de la boucle cytoplasmique reliant les domaines I-II dans les cinétiques d'inactivation des canaux calciques HVA « high voltage activated ». Le projet de maîtrise a consisté à élucider les mécanismes moléculaires qui déterminent les cinétiques d'inactivation des canaux calciques. Nous avons effectué une série de mutations ponctuelles des canaux  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (cinétiques lentes) et  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) (cinétiques rapides) au niveau du site AID « alpha interaction domain ». Le site AID est présent dans la boucle cytoplasmique qui relie les domaines I



et II. Il est responsable de l'ancrage primaire des sous-unités  $\beta$  et se compose des acides aminés suivants : QQXEXXLXGYXXWIXXXE. Les ARNm codants pour le mutant  $\alpha 1E$  R378E et le quintuple mutant  $\alpha 1E$  N381K + R384L + A385D + D388T + K389Q (NRADK-KLDTQ) ont été exprimés dans des ovocytes de *Xenopus leavis*. Les cinétiques d'inactivation des mutants ont été estimées par la méthode de voltage imposé à deux électrodes. Le mutant  $\alpha 1E$  R378E, dont la mutation occupe la position 5 dans le site AID, s'inactive significativement plus lentement et à des potentiels plus positifs que le canal sauvage  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). En présence de  $\beta 3$ , les constantes d'inactivation sont de  $538 \pm 54$  ms (n=7) pour R378E et de  $74 \pm 4$  ms (n=3) pour  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) ( $t < 0.001$ ). L'inactivation de R378E se produit à des voltages plus positifs avec  $E_{0.5} = -50 \pm 1$  mV (n=7), ce qui contraste avec la valeur de  $-64 \pm 2$  mV (n=3) pour  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). Cette différence fonctionnelle persiste en absence de  $\beta$  alors que R378E/  $\alpha 2\delta$  s'inactive avec une constante d'inactivation de  $518 \pm 11$  ms (n=3) plutôt que  $299 \pm 20$  ms (n=3) pour  $\alpha 1E$ /  $\alpha 2\delta$  ( $t < 0.001$ ). Le ralentissement des cinétiques d'inactivation semble spécifique à R378 puisque la quintuple mutation NRADK-KLDTQ qui occupe les positions 8,11,12,15 et 16 du site AID n'a aucun effet sur l'inactivation du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). Nos résultats indiquent que le site AID peut moduler l'inactivation des VDCC en plus d'être responsable de la liaison des sous-unités  $\beta$ . Le rôle du segment AID pourrait expliquer en partie les résultats qui ont été obtenus avec la chimère CEEE.

## TABLE DES MATIÈRES

Page de présentation .....	ii
Identification du jury .....	iii
Sommaire .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x
ABRÉVIATIONS .....	xi

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Classification fonctionnelle des canaux calciques dépendants du potentiel membranaire.....	5
1.1.1. Canaux calciques LVA (« Low voltage activated »).....	5
1.1.2. Canaux calciques HVA (« high voltage activated »).....	7
1.2. Classification moléculaire des canaux $Ca^{2+}$ .....	12
1.3. Relations structure-fonction des canaux calciques.....	14
1.4. Relations structure-fonction de la sous-unité $\alpha 1$ .....	16
1.4.1. Structure de la sous-unité $\alpha 1$ .....	16
1.4.2. Sélectivité du canal aux ions $Ca^{2+}$ .....	18
1.4.3. Interaction avec les sous-unités $\beta$ .....	20
1.4.4. Sites de phosphorylation.....	24
1.4.5. Modulation par les protéines G.....	26
1.4.6. Modulation par les SNAREs.....	29
1.5. Structure de la sous-unité $\beta$ .....	32
1.6. Structure de la sous-unité $\alpha 2$ - $\delta$ .....	37
1.7. Structure de la sous-unité $\gamma$ .....	38
1.8. Inactivation des canaux calciques.....	39
1.8.1. Inactivation dépendante du calcium.....	41
1.8.2. Inactivation dépendante du voltage.....	42
1.8.2.1. Déterminants moléculaires de l'inactivation se situant au niveau des domaines transmembranaires.....	43
1.8.2.2. Déterminants moléculaires de l'inactivation se situant au niveau C-terminal de la sous-unité $\alpha 1$ .....	45
1.8.2.3. Déterminant moléculaire de l'inactivation se situant au niveau du N-terminal de la sous-unité $\alpha 1$ .....	45
1.8.2.4. Déterminant moléculaire de l'inactivation se situant au niveau de la boucle cytoplasmique reliant les domaines II et III.....	46
1.8.2.5. Déterminants moléculaires de l'inactivation se situant au niveau de la boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II.....	46
1.9. Description du projet.....	49

2. ARTICLE .....	52
3. DISCUSSION .....	67
3.1. L'acide aminé R378 est impliqué dans les changements des cinétiques d'inactivation des canaux calciques .....	67
3.2. Importance de la charge du résidu R378 dans le mécanisme d'inactivation des VDCC .....	70
3.3. La sous-unité $\beta 3$ module la sous-unité $\alpha 1$ même après mutation de l'acide aminé R378E .....	71
3.4. L'effet de la mutation R378E est conservé en absence de sous-unité $\beta 3$ .....	73
3.5. Comparaison avec d'autres travaux .....	74
3.6. Comparaison avec l'inactivation des canaux $K^+$ et $Na^+$ .....	76
3.7. Modèle d'inactivation des canaux calciques dépendant du voltage ....	77
3.8. Perspectives .....	85
4. LISTE DES RÉFÉRENCES .....	86

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : Maladies génétiques .....	3
TABLEAU II : Localisation tissulaire .....	10
TABLEAU III : Classification fonctionnelle des canaux $\text{Ca}^{2+}$ ....	11
TABLEAU IV : Classification moléculaire des canaux $\text{Ca}^{2+}$ .....	13

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique des canaux calciques .....	13
Figure 2 : Structure des canaux calciques dépendants du voltage .....	15
Figure 3 : Structure secondaire prédite des canaux calciques dépendants du voltage .....	17
Figure 4 : Modèle hypothétique du filtre de sélectivité des canaux calciques .....	19
Figure 5 : Structure du AID.....	21
Figure 6 : Sites de phosphorylation.....	25
Figure 7 : Sites d'interaction de la protéine $G\beta\gamma$ .....	28
Figure 8 : Modulation des canaux calciques par les SNAREs ....	31
Figure 9 : Carte fonctionnelle de la sous-unité $\beta$ .....	32
Figure 10 : Schéma de l'interaction $\alpha 1A$ - $\beta 4$ .....	35
Figure 11 : Inactivation des canaux sodiques et potassiques.....	40
Figure 12 : Schéma hypothétique du mécanisme d'interaction de la sous-unité $\beta 2a$ .....	78
Figure 13: Modèle hypothétique d'inactivation de Stotz et Zamponi.....	82
Figure 14 : Modèle hypothétique d'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage .....	84

# ABRÉVIATIONS

## Symboles

$\alpha 1$ : sous-unité alpha 1.  
 $\alpha 2\delta$ : sous-unité alpha 2 delta.  
 $\gamma$ : sous-unité gamma.  
 $\beta$ : sous-unité bêta.  
 $\beta 1_b$ : sous-unité bêta 1 b.  
 $\beta 2a$ : sous-unité bêta 2a.  
 $\beta 3$ : sous-unité bêta 3.  
 $\beta 4$ : sous-unité bêta 4.  
 $+\beta 3$ : injection des œufs de *Xenopus* avec sous-unité bêta 3.  
 $-\beta 3$ : injection des œufs de *Xenopus* sans sous-unité bêta 3.  
 $\tau_{inact}$ : cinétique d'inactivation.  
 $\mu M$ :  $10^{-6}$  molaire.  
 $\text{Å}$ : angström  $10^{-10}$  m.  
 $\Delta$ : délétion.

## A

A: alanine.  
 aa: acides aminés.  
 ALA: alanine.  
 ASP : aspartate.  
 ADN: acide déoxyribonucléique.  
 ARN: acide ribonucléique .  
 AID: « alpha interaction domain. »  
 AID<sub>A</sub>: « alpha interaction domain » de la sous-unité alpha 1A.  
 AID-BID: liaison du « alpha interaction domain » et de la sous-unité bêta.

## B

$Ba^{2+}$ : ion barium numéro atomique  $Z=56$ ; valence +2.  
 BID: « beta interaction domain ».  
 BID<sub>b</sub> : « bêta interaction domain » de la sous-unité bêta 1b.  
 Boucle I-II: boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II.

## C

C : cystéine.  
 $Ca^{2+}$ : ion calcium numéro atomique  $Z=20$ ; valence +2.  
 Camp: adénosine monophosphate.  
 Cav: canaux calciques dépendant du voltage.  
 CT: carboxyl terminal.

**D**

D : aspartate.  
Da: dalton  $1,66.10^{-27}$ kg.  
DHP: dihydropyridine.

**E**

E: glutamate.  
E<sub>0.5</sub>: potentiel de mi-inactivation.

**F**

F: phénylalanine.

**G**

G: glycine.  
GLU: glutamate.  
G: protéine G.  
GST: glutathione S-transférase.

**H**

HEK: « human embryonic kidney ».  
HVA: « high voltage activated ».

**I**

I: isoleucine.

**K**

K : lysine.  
K<sup>+</sup>: ion potassium numéro atomique Z=19; valence +1.  
kDa:  $10^3$  dalton.

**L**

L: leucine.  
LVA: « low voltage activated ».  
LYS: lysine.



**M**

M: molaire.  
 ms:  $10^{-3}$  s.  
 mV:  $10^{-3}$  volt.

**N**

N : asparagine.  
 Na<sup>+</sup>: ion sodium numéro atomique Z=11; valence +1.  
 nM:  $10^{-9}$  molaire.  
 NT: amino terminal.  
 NSF: «N-ethylmaleimide-sensitive factor».

**P**

P: proline.  
 PKA: protéine kinase A.  
 ps:  $10^{-12}$  siemens.

**Q**

Q: glutamine.

**R**

R : arginine.  
 R300 : fraction du courant restant à la fin d'un pulse de 300ms.

**S**

S4: segment transmembranaire IV.  
 S5: segment transmembranaire V.  
 S6: segment transmembranaire VI.  
 S: sérine.  
 s: siemens conductance (M-1L-2T3I2).  
 SCAM: «scanning cysteine accessibility».  
 SNARE: «N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors».  
 SNC: système nerveux central.

**T**

T : thréonine.  
 T: « transient ».  
 TSA-201: cellules HEK.

**V**

V: valine.

VDCC : canaux calciques activés par le potentiel membranaire.

Volt: potentiel (ML2T-3I-1).

**W**

W: tryptophane.

wt: type sauvage « wild type ».

**X**

X: n'importe quel acide aminé.

**Y**

Y: tyrosine.

## Remerciements

Je tiens à remercier le docteur Lucie Parent de m'avoir reçu dans son laboratoire. Elle a su se montrer disponible en acceptant de répondre aux nombreuses questions que je me suis posées tout au long de mes recherches.

Je tiens aussi à remercier Gérald Bernatchez (assistant de recherche 2<sup>ème</sup> auteur de l'article) pour son soutien technique aussi bien en biologie moléculaire qu'en électrophysiologie sur le projet.

En outre, la réalisation de ce mémoire n'aurait pu être possible sans le soutien de mes amis (Manon, David, Delphine, Jean-François, Dominic, Jonathan, Valeri, Karine, Olivier, Geneviève) et de ma famille.

Enfin, je voudrais remercier tout le personnel du pavillon Paul G-Desmarais, en particulier Joanne Payette pour sa patience et sa compréhension.





## 1. INTRODUCTION

Les ions calciques contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires telles que le couplage excitation-contraction musculaire, la libération d'hormones, de neurotransmetteurs et l'activation de nombreux enzymes (Walker et De Waard, 1998). La concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire au repos est de l'ordre de  $10^{-7}$  M. Dans les cellules excitables, la concentration s'élève de façon transitoire lors de dépolarisations membranaires qui provoquent l'ouverture de pores très sélectifs nommés « canaux calciques » (Nargeot et Charnet, 1994). Les canaux calciques, qui dépendent du potentiel membranaire, constituent une classe hétérogène de protéines qui se distinguent par leurs propriétés biophysiques (dépendance au voltage, probabilité d'ouverture et conductance), pharmacologiques, leur localisation et leur régulation.

Le maintien de l'homéostasie calcique est un déterminant critique du fonctionnement de la cellule. Toute élévation soutenue du calcium intracellulaire va favoriser des situations pathologiques pouvant provoquer la mort cellulaire. Des mutations dans les gènes codants pour des sous-unités  $\alpha 1$  sont responsables de plusieurs maladies génétiques, en particulier, la paralysie périodique hypokaliémique (canaux calciques  $\alpha 1S$ ) (Ptacek et al., 1994; Elbaz et al., 1995), certaines formes d'ataxie (type 6), d'épilepsie (Fletcher et al., 1996; Zhuchenko et al., 1997) et de migraine hémiplegique (canaux calciques  $\alpha 1A$ ) (Ophoff et al., 1996; Kraus et al., 1998; Hans et al., 1999a) (voir Tableau I).

## TABLEAU I : Maladies génétiques

(Lehmann-Horn et Jurkat-Rott, 1999)

nom du gène	numéro ID	Locus	Type de canal calcique	Tissu ou s'exprime la maladie
<b>CACNA1A</b> <b>CACNL1A4</b>	GDB: 126432 Z80114- Z80155, X99897, U79666	19p13 19p13.1	Type P/Q sous-unité $\alpha$ 1A ataxie épisodique 2, (familial) migraine hémiplégique ataxie 6	cerveau(cortex, bulbe olfactif, hippocampe, cervelet) motoneurones, rein
<b>CACNA1B</b> <b>CACNL1A5</b>	GDB: 580689 M94172, M94173	9q34	CACNN, type N sous-unité $\alpha$ 1B	système nerveux central et périphérique
<b>CACNA1C</b> <b>CACNL1A1</b>	GDB: 126094 L29536, L29534, L29529	12p13 12p13.3	CCHL1A1, type L sous-unité $\alpha$ 1C	cœur, fibroblaste, poumon, muscle lisse
<b>CACNA1D</b> <b>CACNL1A2</b>	GDB: 128872	3p14.3 3p21	CCHL1A2, type L sous-unité $\alpha$ 1D	cerveau pancréas, neuroendocrine
<b>CACNA1E</b> <b>CACNL1A6</b>	GDB: 434408	1q25-31	Type R sous-unité $\alpha$ 1E	cerveau, muscle squelettique
<b>CACNA1F</b>	GDB: 6053864	Xp11.23 -11.22	sous-unité $\alpha$ 1F	rétine
<b>CACN1AG</b>	AF27984	17q22	Type T Sous-unité $\alpha$ 1G	cerveau
<b>CACNA1S</b> <b>CACNL1A3</b>	GDB: 126431 Z22672, L33798 U30666- U30707	1q31-32	Type L sous-unité $\alpha$ 1S (5% 212, 95% 190kDa) hyperthermie maligne 5, hypokaliémie périodique paralysie	muscle squelettique(cer veau, rein)



<b>CACNA2 CACNL2A</b>	GDB: 132010 Z28613, Z28609 Z28605, Z28602 Z28599, M76559	7q21-22	CACNA2, CACNA2D1 sous-unité $\alpha 2/\delta$ (175 kDa) MHS3	$\alpha 2A$ : muscle squelettique, cœur, cerveau, iléon; $\alpha 2B$ : cerveau; $\alpha 2C/D$ aorte
<b>CACNB1 CACNLB1</b>	GDB: 132012 GDB: 1073281 U86952- U86961 M76560, L06111 GDB: 193328	17q21- 22	sous-unité $\beta 1$ (524 aa, 54 kDa)	$\beta 1A/M$ : muscle squelettique $\beta 1B/C$ : cerveau, cœur
<b>CACNB2 CACNLB2</b>	GDB: 132014 Q08289	10p12	MYSB, $\beta 2$ -subunit	$\beta 2A/B/E$ : cerveau, cœur, poumon, aorte
<b>CACNB3 CACNLB3</b>	GDB: 341023 L27584	12q13	sous-unité $\beta 3$ (482 aa)	cœur, poumon, muscle squelettique lisse, aorte, trachée, ovaire, colon
<b>CACNB4 CACNG CACNLG</b>	GDB: 6028693 GDB: 132015 L07738	2q22-23 17q24	sous-unité $\beta 4$ (222 aa, 30 kDa)	cerveau, rein, muscle squelettique, poumon
<b>CACNG2</b>			sous-unité $\gamma 2$ , épilepsie( souris « stargazer »)	cerveau
<b>RYR1</b>	GDB: 120359	19q13.1	récepteur ryanodine 1 hyperthermie maligne 1	muscle squelettique, cerveau
<b>RYR2</b>	GDB: 125278	1pter- qter 1q42.1- 43	RYR2	cœur, muscle lisse
<b>RYR3</b>	GDB: 138451	15q14 15q14- 15	RYR3	cerveau, muscle squelettique

**Légende tableau 1 :**

Ce tableau regroupe l'ensemble des maladies génétiques causées par des mutations au niveau des gènes codant pour les canaux calciques dépendants du voltage. La plupart des mutations se retrouvent au niveau de la sous-unité  $\alpha 1$  (Sous-unité  $\alpha 1A$  : ataxie épisodique 2 ) mais on en retrouve aussi au niveau des sous-unités accessoires (Sous-unité  $\gamma 2$  : épilepsie ( souris « stargazer »)).

## **1.1. Classification fonctionnelle des canaux calciques dépendants du potentiel membranaire**

Dans les cellules natives, les canaux calciques dépendants du potentiel membranaire sont classés en fonction de leur propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques (Tsien et al., 1991) (Tableau II & III). On les distingue tout d'abord en fonction de leur seuil d'activation. Les canaux calciques qui possèdent un seuil d'activation bas ( $\sim -70\text{mV}$ ) sont dit LVA (« Low voltage activated ») tandis que ceux qui possèdent un seuil d'activation plus élevé ( $\sim -30\text{mV}$ ) sont dit HVA (« high voltage activated »).

### **1.1.1. Canaux calciques LVA (« Low voltage activated »)**

Les canaux calciques LVA pour («low voltage activated») ou T pour («transient») ( $\text{Ca}_v3.1\text{-Ca}_v3.3$ ) s'activent à de faibles dépolarisations (seuil d'activation  $\sim -70\text{mV}$ ), s'inactivent rapidement ( $\sim 20\text{ms}$ ) de façon dépendante du voltage, ont une faible conductance élémentaire ( $\sim 8\text{ps}$ ) et une perméabilité équivalente pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et les ions  $\text{Ba}^{2+}$  (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes et al., 1998; Lee et al., 1999; Klugbauer et al., 1999b). Les canaux recombinants  $\alpha 1\text{G}$ ,  $\alpha 1\text{I}$  et  $\alpha 1\text{H}$  partagent les caractéristiques biophysiques des canaux de type T, cependant, ils possèdent aussi quelques différences individuelles. Un bon exemple de la diversité fonctionnelle des canaux de type T est la sous-unité  $\alpha 1\text{I}$  qui possède des cinétiques d'activation et d'inactivation plus lentes que les sous-unités  $\alpha 1\text{G}$  et  $\alpha 1\text{H}$  (Lee et al., 1999). Cette diversité biophysique des canaux

recombinants  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1I$  et  $\alpha 1H$  reflète les diversités phénotypiques observées au niveau des cellules natives (Huguenard, 1996; Tarasenko et al., 1997; Tsien et al., 1998).

Il existe peu d'inhibiteurs organiques vraiment spécifiques des canaux de type-T. Toutefois, quelques évidences semblent indiquer une action de l'amiloride et de la flunarizine sur les courants de type T. Récemment, le mibefradil a été suggéré comme inhibiteur sélectif des canaux calciques de type T ( Martin et al., 2000). Cependant, à des concentrations de l'ordre du micromolaire, le mibefradil semble perdre de sa spécificité et inhibe plusieurs types de canaux calciques (L,N,P/Q) ( Jiménez et al., 2000; Bernatchez et al., 2001a).

Les canaux calciques de type T sont vraisemblablement impliqués dans la génération d'activités répétitives de type « pacemaker » au niveau des cellules auriculaires du cœur et de certains neurones thalamiques (Walker et De Waard, 1998). La sous-unité  $\alpha 1H$  s'exprime majoritairement dans les tissus périphériques incluant le cœur et les reins mais aussi au niveau du SNC (Cribbs et al., 1998; Williams et al., 1999). Au contraire, les canaux  $\alpha 1G$  et  $\alpha 1I$  sont exprimés de façon prédominante au niveau du SNC et de façon plus faible au niveau des poumons (Talley et al., 1999; Klugbauer et al., 1999b). Le canal  $\alpha 1G$  est le plus exprimé au niveau du SNC. La distribution des ARNm (Talley et al., 1999) et les propriétés biophysiques de ce canal suggèrent qu'il est responsable des courants calciques thalamiques de type T (Huguenard, 1996).

### 1.1.2. Canaux calciques HVA (« high voltage activated »)

Les canaux calciques de type haut seuil ou HVA («high voltage activated») sont activés par des dépolarisations plus élevées (seuil d'activation  $\sim -30\text{mV}$ ) et s'inactivent généralement plus lentement. Il existe plusieurs types de canaux calciques HVA .

Tout d'abord, les canaux de type L ( $\text{Ca}_v1.1\text{-Ca}_v1.4$ ) sont caractérisés par une inactivation plutôt lente ( $\tau_{\text{inact}} > 500\text{ms}$ ) en  $\text{Ba}^{2+}$ , une conductance élémentaire plus grande que les canaux LVA et une perméabilité plus élevée pour les ions  $\text{Ba}^{2+}$  que pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . La caractéristique pharmacologique des canaux de type L est une sensibilité marquée aux antagonistes de la classe des dihydropyridines (DHP) telle que la nifédipine utilisée en thérapeutique cardio-vasculaire. Il existe quatre canaux calciques recombinants qui possèdent les caractéristiques biophysiques des canaux de type L :  $\alpha1\text{S}$  ( $\text{Ca}_v1.1$ ),  $\alpha1\text{C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ),  $\alpha1\text{D}$  ( $\text{Ca}_v1.3$ ) et  $\alpha1\text{F}$  ( $\text{Ca}_v1.4$ ). Le canal  $\alpha1\text{S}$  ( $\text{Ca}_v1.1$ ) est impliqué dans le couplage excitation-contraction des muscles squelettiques (Tanabe et al., 1993). Il existe deux isoformes du canal  $\alpha1\text{S}$ . Une isoforme de 212kDa (rare) qui est la protéine complète et une isoforme de 190kDa (95%) résultant d'une protéolyse post-traductionnelle de l'acide aminé 1690 (De Jongh et al., 1991; Beam et al., 1992). Le canal  $\alpha1\text{C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) est impliqué dans le potentiel d'action cardiaque. La sous-unité  $\alpha1\text{C}_a$  s'exprime au niveau du cœur et la sous-unité  $\alpha1\text{C}_b$  au niveau des muscles lisses. On le retrouve aussi au niveau du SNC (Mikami et al., 1989).  $\alpha1\text{D}$  ( $\text{Ca}_v1.3$ ) est le canal de type L le plus exprimé au niveau du SNC ou son rôle est probablement de déclencher l'expression de gènes dépendants du calcium (Bito et al.,

1997) et la libération de peptides au niveau dendritique (Simmons et al., 1995). On retrouve aussi beaucoup de sous-unités  $\alpha 1D$  au niveau de nombreuses cellules endocrines où elles jouent un rôle important dans le couplage excitation-sécrétion (Ashcroft et al., 1994; Bokvist et al., 1995). Pour l'instant, il n'a pas été rapporté de fonction pour la sous-unité  $\alpha 1F$  ( $Ca_v1.4$ ), bien que son expression se fasse au niveau de la rétine (Strom et al., 1998; Bech-Hansen et al., 1998).

Les autres types de canaux se distinguent par des critères pharmacologiques, mais diffèrent aussi par leurs propriétés biophysiques (dépendance au voltage, cinétique d'activation et d'inactivation). Le canal de type N ( $Ca_v2.2$ ) se retrouve dans un grand nombre de neurones au niveau présynaptique et est spécifiquement inhibé par une toxine peptidique isolée d'un escargot marin (*Conus geographicus*) :  $\omega$ -conotoxine GVIA ( $\omega$ -CgT-GVIA).

Le canal de type P ( $Ca_v2.1$ ) est exprimé au niveau des cellules de Purkinje mais aussi au niveau de la jonction neuromusculaire où il contrôlerait la libération d'acétylcholine. Il est inhibé par le venin d'une araignée (*Agelenopsis aperta*) et plus précisément par une polyamine (la FTX) et une fraction peptidique ( $\omega$ -Aga-IVA) contenues dans ce venin (Llinas et al., 1992; Mintz et al., 1992; Randall et Tsien, 1995). Le canal de type Q ( $Ca_v2.1$ ) qui est apparenté au canal de type P, se retrouve au niveau des cellules granulaires du cervelet et serait responsable de la transmission synaptique entre les neurones CA3 et CA1 de l'hippocampe (Wheeler et al., 1994). Il est sensible à la toxine  $\omega$ -Aga-IVA, mais est inhibé plus spécifiquement par la toxine  $\omega$ -conotoxine MVIIC

( $\omega$ -CmT-MVIIC) extraite de *Conus magus* (Wheeler et al., 1994). Les principales distinctions entre le type P et Q se situent au niveau de leurs cinétiques d'inactivation (lentes pour le type P et intermédiaire pour le type Q) et de leur sensibilité à la  $\omega$ -Aga-IVA (IC<sub>50</sub>~1nM pour le type P et ~0.1 $\mu$ M pour le type Q).

Ces différences fonctionnelles seraient dues à l'insertion de différents acides aminés au niveau des canaux de type P. En effet, l'épissage alternatif de la forme originale de la sous-unité  $\alpha$ 1A de rat ( $\alpha$ 1A-a) (type Q) produit l'insertion d'une valine à la position 421 dans la boucle I-II, d'une asparagine-proline au niveau de la boucle extracellulaire IVS3-IVS4 et d'un motif main EF au niveau du C-terminal de l'isoforme  $\alpha$ 1A-b (type P). L'insertion de la valine 421 convertit l'inactivation de Q ( $\alpha$ 1A-a) (intermédiaire) en P( $\alpha$ 1A-b) (inactivation lente) (Bourinet et al., 1999). L'insertion de l'asparagine-proline au niveau de la boucle IVS3-IVS4 de Q produit une baisse de l'affinité pour  $\omega$ -Aga-IVA (Randall et Tsien, 1995).

Enfin, le canal de type R (Cav 2.3) (Soong et al., 1993; Schneider et al., 1994; Piedras-Renteria et Tsien, 1998; Tottene et al., 2000) se retrouve au niveau du cerveau et permet la libération de neurotransmetteurs (Wu et al., 1998). Récemment, une toxine SNX-482 a été référencée comme inhibiteur sélectif des courants calciques des canaux  $\alpha$ 1E (Cav2.3) dans des systèmes d'expression hétérologues (Newcomb et al., 1998).

## TABLEAU II : Localisation tissulaire

(Nargeot et Charnet, 1994; Wheeler et al., 1994; Walker et De Waard, 1998; Wu et al., 1998; Ertel et al., 2000).

TYPE DE CANAL	TYPE DE SOUS-UNITÉ	LOCALISATION TISSULAIRE
TYPE P	$\alpha 1A$	cerveau / cervelet, rein
TYPE Q	$\alpha 1A$	cerveau / cervelet, rein
TYPE N	$\alpha 1B$	cerveau
TYPE R	$\alpha 1E$	cerveau /rétine, cœur
TYPE L	$\alpha 1C$	cœur, muscle lisse, cerveau
TYPE L	$\alpha 1D$	cerveau, pancréas, rein, ovaire
TYPE L	$\alpha 1F$	rétine
TYPE L	$\alpha 1S$	muscle squelettique
TYPE T	$\alpha 1G$	cerveau, ovaire, muscles lisses
TYPE T	$\alpha 1H$	cerveau, rein, cœur, foie
TYPE T	$\alpha 1I$	cerveau

### TABLEAU III : Classification fonctionnelle des canaux Ca<sup>2+</sup>

(Nargeot et Charnet, 1994; Wheeler et al., 1994; Newcomb et al., 1998; Martin et al., 2000; Jiménez et al., 2000).

	Classe	Sensibilité à des toxines	Sensibilité Pharmacologique	INACTIVATION
LVA	T	Kurtoxine	*MIBEFRADIL Amiloride Dihydropyridine (+/-)	TRÈS RAPIDE
HVA	L	Calcicludine Calciseptine	Dihydropyridines Benzothiazépines Phénylalkylamines	LENTE
HVA	N	$\omega$ -CgT-GVIA ++ $\omega$ -Cm-MVIIC +		RAPIDE
HVA	P/Q	$\omega$ -Aga-IVA $\omega$ -Cm-MVIIC		P : TRÈS LENTE Q:INTERMÉDIAIRE
HVA	R	SNX-482		RAPIDE

#### Légende tableau II & III :

Les canaux calciques natifs dépendants du potentiel membranaire sont classés en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques (Tsien et al., 1991). Ils sont regroupés en 5 catégories. Les canaux de type T (LVA) possèdent l'inactivation la plus rapide. Les canaux calciques N, P/Q et R (HVA) ont une inactivation plus lente que le type T. Enfin, les canaux de type L (LVA) ont l'inactivation la plus lente.

\*Le Mibefradil n'est pas très spécifique et inhibe plusieurs autres types de canaux tels que les canaux natifs de type L situés au niveau des myoblastes (Liu et al., 1999), des cellules bêtas pancréatiques (Wu et al., 2000) et les canaux recombinants Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>2.1, Ca<sub>v</sub>2.2, Ca<sub>v</sub>2.3 exprimés dans les œufs de Xenopus (Bezprozvanny et Tsien, 1995; Aczel et al., 1998; Bernatchez et al., 2001a).



## 1.2. Classification moléculaire des canaux $\text{Ca}^{2+}$

Les techniques de clonage moléculaire ont permis d'identifier la structure primaire de 10 canaux calciques dépendants du voltage (Tableau II). Une nouvelle classification a récemment été adoptée en se basant sur la nomenclature des canaux potassiques qui sont classés en fonction du degré d'homologie de leurs séquences en acides aminés (Ertel et al., 2000). À ce jour, trois familles ont été formées  $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$ ,  $\text{Ca}_v3$ . Ces familles sont composées de canaux qui possèdent une très grande homologie au niveau de leur séquence primaire (>70% entre canaux d'une même famille) (voir Tableau IV et figure 1).

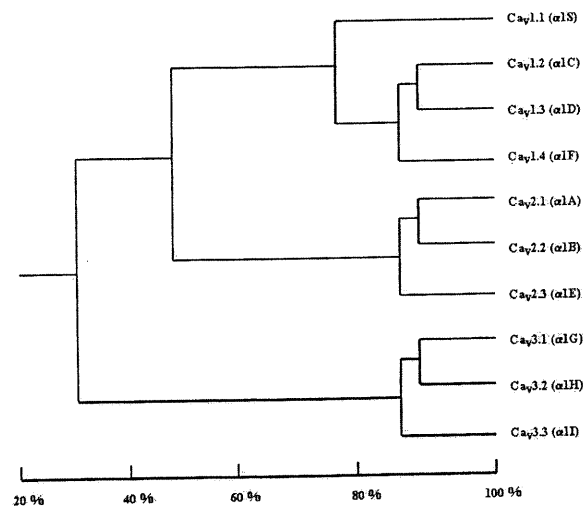
## TABLEAU IV : Classification moléculaire des canaux $Ca^{2+}$

(Ertel et al., 2000)

Classe	Ancienne	Nouvelle
L	$\alpha 1S$	$Ca_v1.1$
L	$\alpha 1C$	$Ca_v1.2$
L	$\alpha 1D$	$Ca_v1.3$
L	$\alpha 1F$	$Ca_v1.4$
P/Q	$\alpha 1A$	$Ca_v2.1$
N	$\alpha 1B$	$Ca_v2.2$
R	$\alpha 1E$	$Ca_v2.3$
T	$\alpha 1G$	$Ca_v3.1$
T	$\alpha 1H$	$Ca_v3.2$
T	$\alpha 1I$	$Ca_v3.3$

Figure 1 : Arbre phylogénétique des canaux calciques

(Ertel et al., 2000)



### Légende Tableau IV & figure 1:

Les techniques de clonage moléculaire ont permis d'identifier la structure primaire de 10 canaux calciques dépendants du voltage (Tableau IV).

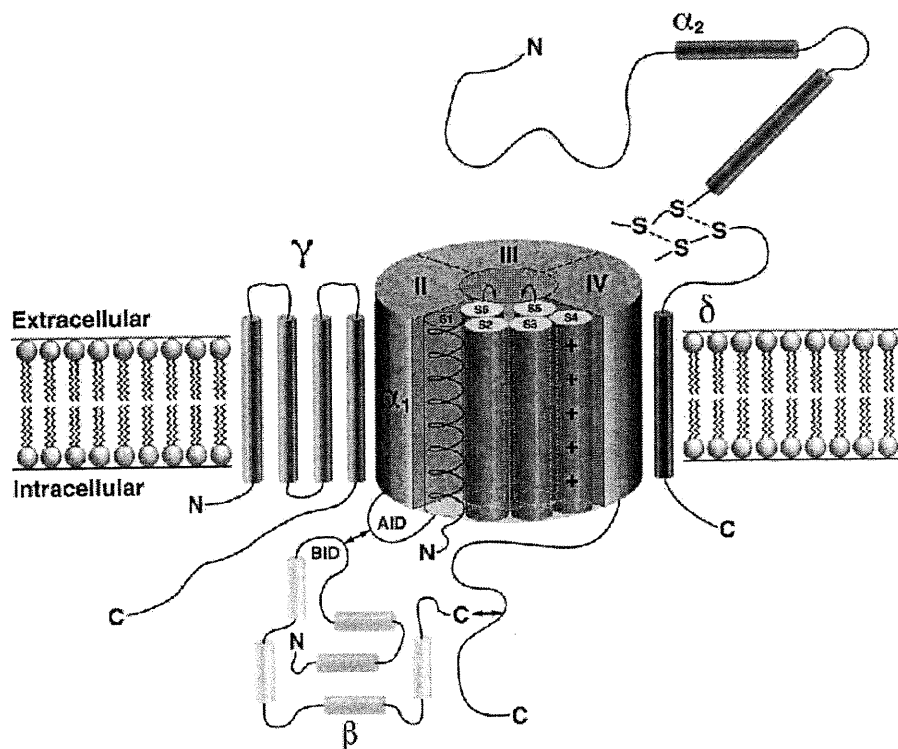
Ils sont divisés en 3 familles ( $Ca_v1.m$ ,  $Ca_v2.m$ ,  $Ca_v3.m$ ) avec une identité de séquence intra-famille de 80%. Une séquence consensus a été définie pour chacune des familles. Les homologies de séquence inter-famille sont entre  $Ca_v1.m$  et  $Ca_v2.m$  de ~52% et entre  $Ca_v3.m$  et  $Ca_v1.m$  ou  $Ca_v2.m$  de ~28%.

### **1.3. Relations structure-fonction des canaux calciques**

Les premiers canaux calciques ont été purifiés à partir de membranes isolées de tubules transverses de muscles squelettiques (Curtis et Catterall, 1984). Cette purification a permis de révéler la présence de 3 sous-unités  $\alpha_1$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Par la suite, des études biochimiques, plus poussées, ont révélé la présence d'une autre sous-unité  $\alpha_2$ - $\delta$  (Hosey et al., 1987; Leung et al., 1987; Striessnig et al., 1987; Takahashi et al., 1987) (voir figure 2).

## Figure 2 : Structure des canaux calciques dépendants du voltage

(Randall et Benham, 1999).



### Légende figure 2:

Les canaux calciques dépendants du voltage sont constitués de 5 sous-unités. La sous-unité  $\alpha_1$  (~175kDa) est responsable de la formation du canal proprement dit et possède les sites récepteurs des antagonistes calciques. Elle est composée de 4 domaines eux-mêmes divisés en 6 segments transmembranaires. Le segment S4 constitue le « voltage sensor » et la boucle entre les domaines S5 et S6 le filtre de sélectivité du canal. Les 4 autres sous-unités sont des sous-unités dites auxiliaires qui ont pour rôle de moduler les propriétés biophysiques de la sous-unité  $\alpha_1$ . La sous-unité  $\beta$  (~55kDa) est une sous-unité intracellulaire qui est impliquée dans la modulation des cinétiques d'activation et d'inactivation du canal. Elle interagit avec la sous-unité  $\alpha_1$  au niveau du domaine AID (ancrage primaire) (boucle I-II) mais aussi au niveau du NT et du CT. Les sous-unités  $\alpha_2$  (~140kDa) et  $\delta$  (~25kDa) sont liées ensemble par deux ponts disulfure. La sous-unité  $\alpha_2$  (glycoprotéine) constitue la partie extracellulaire de la glycoprotéine et la sous-unité  $\delta$  l'ancrage du complexe à la membrane (1 segment transmembranaire). La sous-unité  $\gamma$  présente au niveau du muscle squelettique ( $Ca_v1.1$ ) (~30 kDa) est une sous-unité transmembranaire qui possède 4 segments.

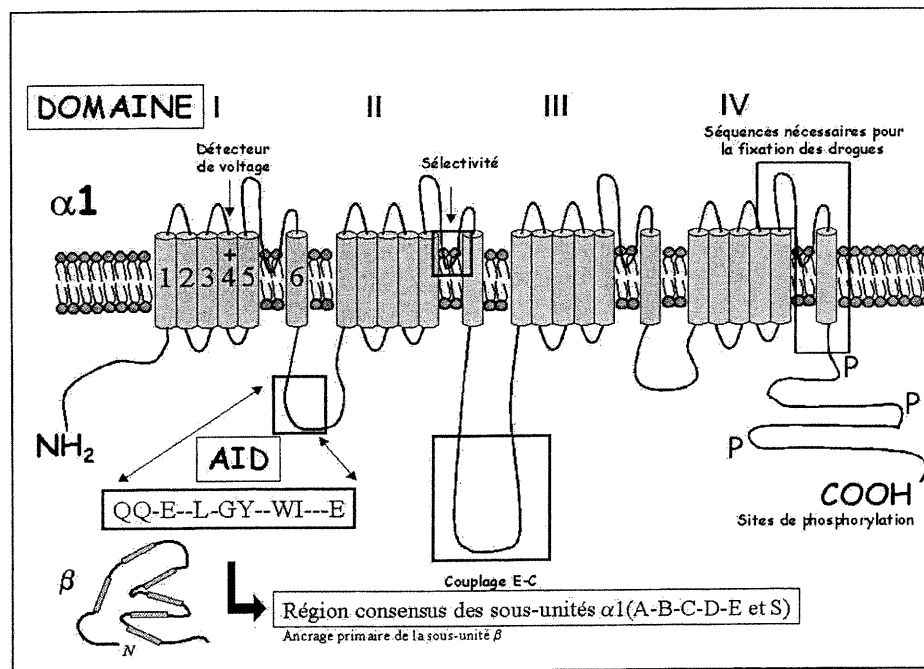
## **1.4. Relations structure-fonction de la sous-unité $\alpha 1$**

### **1.4.1. Structure de la sous-unité $\alpha 1$**

Les sous-unités  $\alpha 1$  de type HVA sont codées par des gènes nommés : A(Ca<sub>v</sub>2.1), B(Ca<sub>v</sub>2.2), S(Ca<sub>v</sub>1.1), C(Ca<sub>v</sub>1.2), D(Ca<sub>v</sub>1.3) et E(Ca<sub>v</sub>2.3) (Snutch et Reiner, 1992) correspondant probablement sur le plan fonctionnel aux canaux de type P/Q (classe A), N (classe B), L (classes S, C et D) et R (classe E) (Tableau III et IV). Quant aux canaux de type T, ils sont codés par les gènes G(Ca<sub>v</sub>3.1), H(Ca<sub>v</sub>3.2) et I(Ca<sub>v</sub>3.3). La diversité des sous-unités  $\alpha 1$  est accrue par l'existence de nombreuses isoformes générées par épissage différentiel.

## Figure 3 : Structure secondaire prédite des canaux calciques dépendants du voltage

(Nargeot et Charnet, 1994; Walker et De Waard, 1998)



### Légende figure 3 :

La sous unité  $\alpha 1$  (170-240 kDa) forme le canal proprement dit. Elle est constituée de 4 domaines qui sont chacun formés de 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires pour un total de 24 segments transmembranaires. Le quatrième segment transmembranaire S4 de chaque domaine est chargé positivement et permet la détection des changements de voltage (« voltage sensor »). La structure responsable du couplage excitation-contraction du canal de type squelettique  $Ca_v1.1$  ( $\alpha 1S$ ) (via le récepteur de la ryanodine) est situé au niveau de la boucle qui relie les domaines II et III (Tanabe et al., 1990). Les séquences nécessaires pour la fixation des dihydropyridines (Bay K, nifédipine), des benzothiazépines (diltiazem) et des phénylalkylamines (vérapamil) ont été localisées au niveau des domaines III et IV des canaux calciques de type L. L'ancrage primaire de la sous-unité  $\beta$  (domaine BID) est situé au niveau la boucle I-II (domaine AID). Le site d'interaction AID est composé de 18 aa dont 9 sont conservés parmi les canaux calciques  $Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$  et  $Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$ . Ce motif se lit ainsi : **QQEXXXLGYXXWIXXXE**.

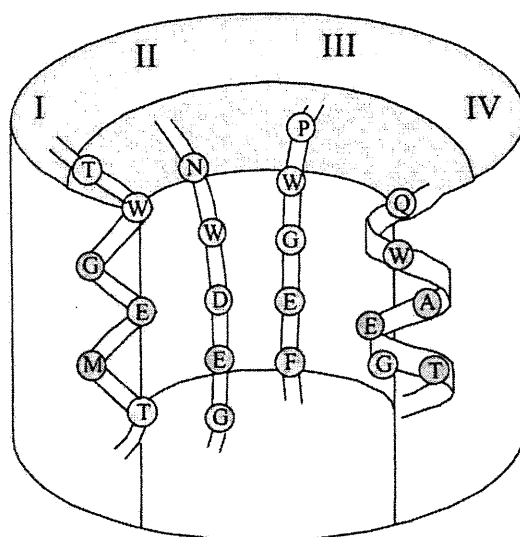
Les interactions secondaires se situent au niveau des C et N terminaux de la sous-unité  $\alpha 1$ .

### 1.4.2. Sélectivité du canal aux ions $\text{Ca}^{2+}$

La boucle peptidique qui relie les segments transmembranaires 5 et 6 (S5-S6) de chaque domaine dénommée SS1-SS2, est impliquée dans la formation du pore et la sélectivité du canal (voir figure 3). Les acides aminés impliqués dans la perméabilité et la sélectivité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ont été identifiés en les comparant à la structure primaire des canaux sodiques qui possèdent une structure secondaire prédite similaire mais ont une sélectivité plus importante aux ions  $\text{Na}^+$  qu'aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . La variation la plus marquée entre ces canaux au niveau SS1-SS2 se situe dans les domaines III et IV où des acides aminés chargés négativement (Glu) des canaux calciques sont remplacés par des acides aminés soit chargés positivement (Lys), soit neutres (Ala) dans les canaux sodiques (Yang et al., 1993). Les mutations  $\text{Lys}^{1422} \rightarrow \text{Glu}$  et  $\text{Ala}^{1714} \rightarrow \text{Glu}$  des canaux sodiques augmentent la perméabilité aux ions calcium (Heinemann et al., 1992). Inversement, la substitution dans les canaux calciques  $\alpha 1\text{C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) d'un ou de plusieurs de ces Glu dans la partie SS1-SS2 des domaines I, III ou IV diminue la perméabilité calcique et augmente la perméabilité de  $\alpha 1\text{C}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) aux ions sodium (Yang et al., 1993; Sather et al., 1994; Parent et Gopalakrishnan, 1995; Wu et al., 2000). L'hypothèse actuelle est que le filtre de sélectivité (diamètre environ  $6\text{\AA}$ ) contiendrait un site de haute affinité au calcium nommé locus EEEE qui serait formé de la projection des groupements carboxyles des résidus glutamate dans la lumière du pore (Wu et al., 2000) (voir figure 4).

## Figure 4 : Modèle hypothétique du filtre de sélectivité des canaux calciques

(Koch et al., 2000)



### Légende figure 4 :

Ce modèle a été élaboré à l'aide de la méthode de SCAM (« scanning cysteine accessibility method »). Les structures secondaires prédites sont les suivantes: un feuillet  $\beta$  en I, un enroulement aléatoire en II et III et une hélice  $\alpha$  en IV.

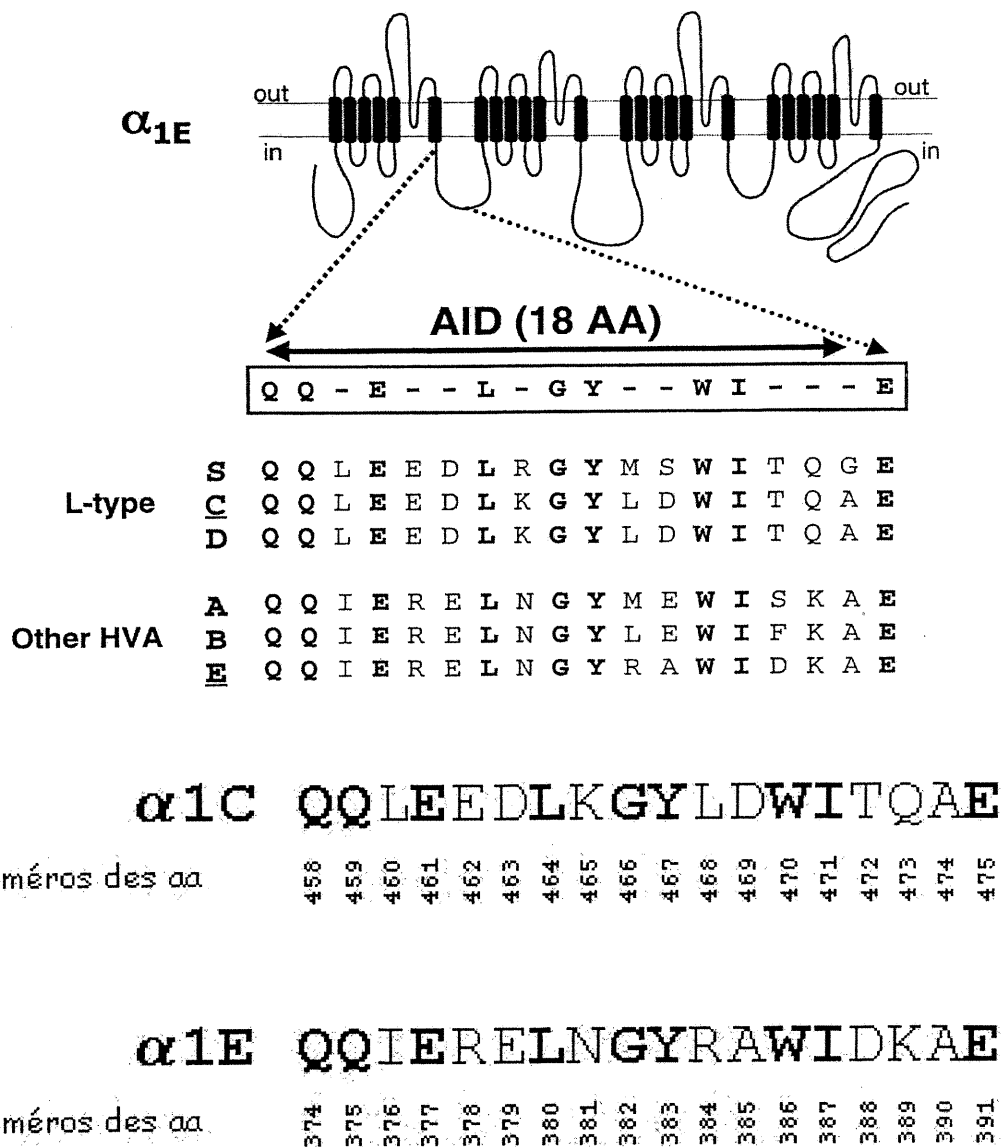


### 1.4.3. Interaction avec les sous-unités $\beta$

La boucle I-II des canaux  $\text{Ca}_v1.1\text{-Ca}_v1.4$  et  $\text{Ca}_v2.1\text{-Ca}_v2.3$  contient de nombreux sites importants dans la régulation des canaux calciques. Elle contient le site AID (pour « alpha interaction domain ») qui détermine le site principal de liaison de la sous-unité  $\beta$  (BID) (voir figure 2 et 3). Le site d'interaction AID est composé de 18 aa dont 9 sont conservés parmi les canaux calciques  $\text{Ca}_v1.1\text{-Ca}_v1.4$  et  $\text{Ca}_v2.1\text{-Ca}_v2.3$ . Ce motif se lit ainsi : **QQXEXXLXGYXXWIXXXE** (voir figure 5).

## Figure 5 : Structure du AID

(Walker et De Waard, 1998; Berrou et al., 2001)



### Légende figure 5:

Structure secondaire prédite d'un canal calcique dépendant du voltage. Il est composé de 4 domaines eux-mêmes organisés en 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires. Le site principal de liaison de la sous-unité  $\beta$  sur  $\alpha 1$  (AID)(18aa) est localisé au niveau de la boucle reliant les domaines I et II. La séquence consensus du motif AID (QQ-E-L-GY-WI---E) est représentée en caractère gras.

La liaison de la sous-unité  $\beta$  sur le AID permet la modulation de la sous-unité  $\alpha 1$ . Des expériences de mutagenèse dirigée sur le AID<sub>A</sub> (AID de  $\alpha 1A$  (Ca<sub>v</sub>2.1)) ont révélé que 3 résidus (**Y,W,I**) sont essentiels à la liaison de la sous-unité  $\beta 1b$  (voir figure 5). De plus, des mutations dans le site AID résultent en la perte de régulation de la sous-unité  $\beta$  démontrant que le AID est requis pour tous les effets fonctionnels de  $\beta$  (Pragnell et al., 1994; De Waard et al., 1996). Finalement, l'habilité qu'ont les peptides correspondant au AID<sub>A</sub> (18AA) à se lier avec la sous-unité  $\beta 1b$  suggère que la conformation du AID requise pour l'interaction n'est pas hautement dépendante du reste de la molécule (De Waard et al., 1995a). Cependant, il est important de noter que le peptide AID<sub>A</sub> (18aa) s'associe avec  $\beta 1b$  avec une affinité 57 fois plus basse qu'avec la protéine de fusion GST AID<sub>A</sub>(14aa+AIDA+18aa), ce qui suggère que l'interaction de AID avec  $\beta$  est fortement facilitée par les régions connexes du AID. Ces régions qui n'interagissent pas pourraient permettre l'établissement d'une conformation qui augmente l'affinité du domaine AID pour le domaine BID.

(Il faut aussi remarquer que les expériences d'interaction protéine-protéine ont été effectuées avec la sous-unité  $\beta$  entière car il semble que le BID<sub>b</sub> seul(30aa) ne se lie pas au domaine AID<sub>A</sub>).

Des études d'expression dans les cellules Cos7 ont démontré qu'il ne pouvait y avoir de sous-unités  $\alpha 1$  et/ou  $\alpha 2\delta$  localisées à la membrane en absence de sous-unités  $\beta$  (Brice et al., 1997). La boucle I-II contiendrait un signal de rétention endoplasmique qui pourrait être levé par l'expression de la sous-unité  $\beta$  (Bichet et al., 2000). Enfin, la boucle I-II interagit avec la protéine G au niveau d'un site qui chevauche le AID et donc entre en

compétition avec la liaison de la sous-unité  $\beta$  (Walker et De Waard, 1998 ; Dolphin et al., 1999) (voir figure 7).

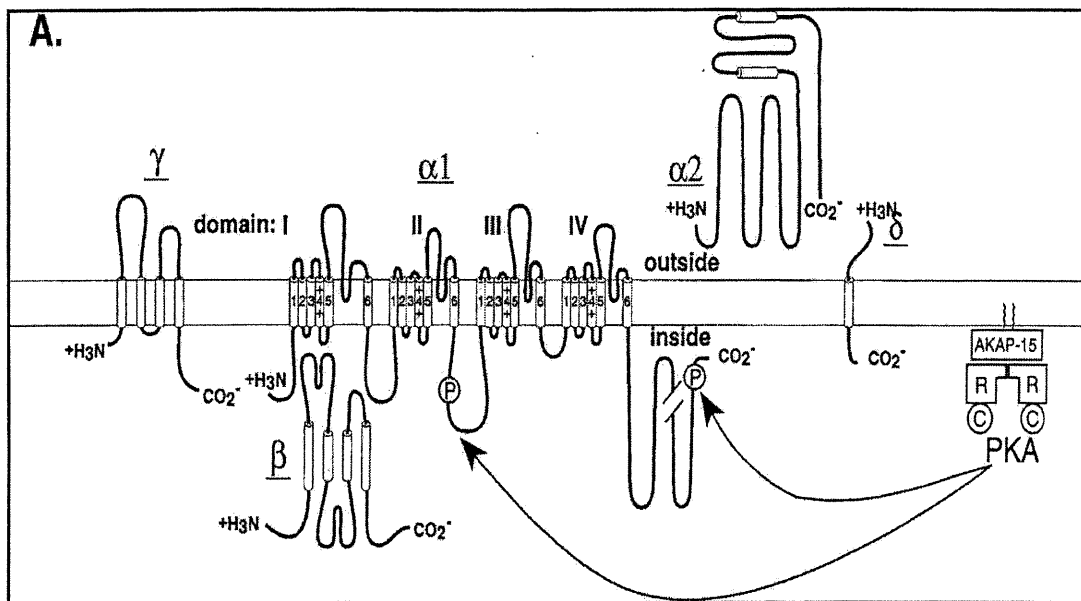
Il existe des interactions secondaires entre la sous-unité  $\beta$  et la sous-unité  $\alpha 1$  au niveau des extrémités carboxyl et amino terminal de  $\alpha 1$ . Des études entreprises par Tareilus et collaborateurs ont permis de mettre en évidence une interaction entre le C-terminal de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) et la sous-unité  $\beta 2a$  (Tareilus et al., 1997). Les travaux suivants ont révélé qu'une interaction identique existait entre  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) et  $\beta 4$  (domaine V) (Walker et de Ward, 1998). La même équipe a démontré qu'il existait aussi une interaction entre  $\beta 4$  (domaine V) et le N-terminal de  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) (Walker et al., 1999) (voir figure 10). Ces interactions secondaires interviennent dans la modulation de la sous-unité  $\alpha 1$  mais ne sont pas essentielles à la fixation de la sous-unité  $\beta$  sur  $\alpha 1$  (Walker et al., 1999). En effet, ces interactions secondaires ont une affinité 30 fois plus faible *in-vitro* que l'interaction AID-BID, ce qui suggère que l'interaction AID-BID constitue un ancrage primaire duquel dépendent les interactions secondaires.

#### 1.4.4. Sites de phosphorylation

Les sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$  des canaux calciques du muscle squelettique  $\alpha 1S$  ( $Ca_v1.1$ ) sont phosphorylées par des protéines kinases (ex: Protéines kinases dépendantes du AMPc) (Curtis et Catterall, 1985; Jahn et al., 1988). Il a été montré que la phosphorylation des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$  peut fortement augmenter le nombre de canaux calciques fonctionnels (Nunoki et al., 1989). Les expériences en canal unitaire ont permis de détecter une augmentation du nombre de canaux calciques fonctionnels ainsi qu'une augmentation de leur activité après phosphorylation par la protéine kinase dépendant du AMPc (Flockerzi et al., 1986; Hymel et al., 1988). Le site le plus rapidement phosphorylé par la PKA au niveau de la sous-unité  $\alpha 1$  (190kDa) (forme tronquée) du muscle squelettique  $\alpha 1S$  ( $Ca_v1.1$ ) est la sérine 687 qui se situe dans la boucle intracellulaire reliant les domaines II et III (Rotman et al., 1992). Cependant, l'analyse de la structure primaire d'autres isoformes de la sous-unité  $\alpha 1$  indique que les sites de phosphorylation dépendants de la protéine kinase A se situeraient plutôt sur la partie carboxyterminale de la sous-unité  $\alpha 1$ . La sérine 1854 (canal  $\alpha 1S$  ( $Ca_v1.1$ )) (212kDa) et la sérine 1928 (canal  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ )) présentes au niveau du C-terminal de la sous-unité  $\alpha 1$  sont phosphorylées par la PKA (De Jongh et al., 1996) (voir figure 6). La mutation de cette sérine en alanine réduit la régulation du canal calcique par le 8-br-cAMP dans des cellules HEK. L'augmentation des courants calciques généralement provoquée par la PKA est significativement réduite passant de 35% à 7% d'augmentation (Gao et al., 1997).

## Figure 6 : Sites de phosphorylation

(Catterall, 2000)



### Légende figure 6:

Les sites de phosphorylation par la PKA se situeraient sur la boucle cytoplasmique reliant les domaines II et III ainsi qu'au niveau du C-terminal de la sous-unité  $\alpha 1$ .

### 1.4.5. Modulation par les protéines G

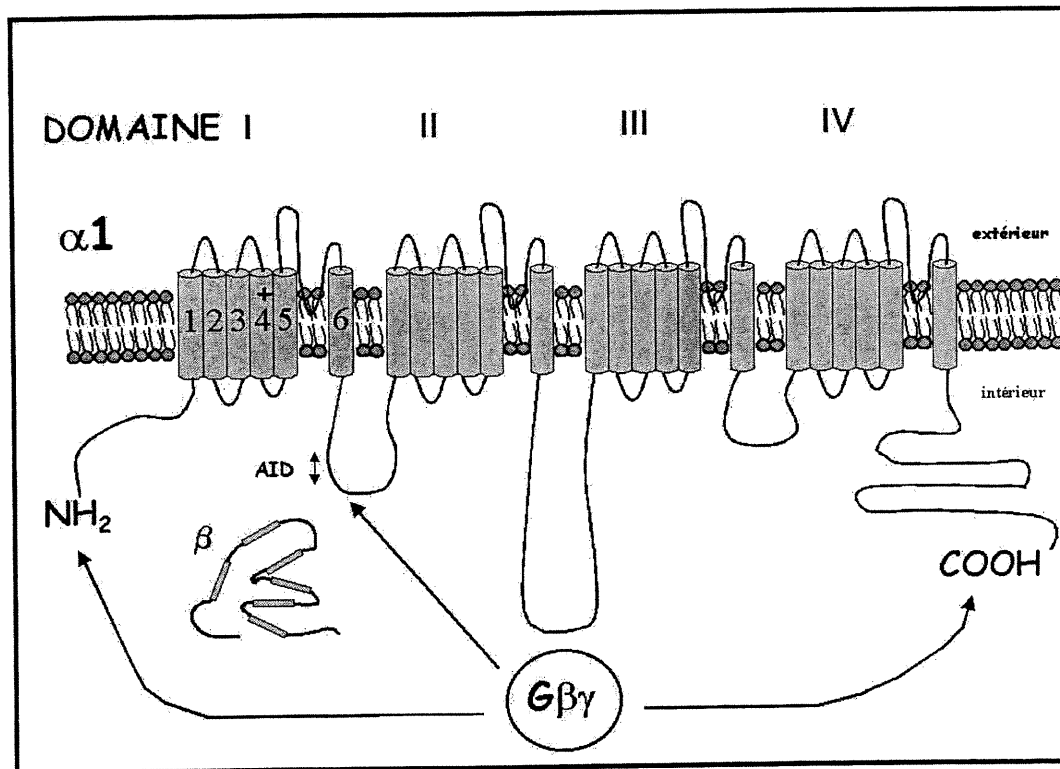
L'activation des protéines G inhibe certains canaux calciques en déplaçant la courbe de dépendance au voltage de l'activation vers des potentiels plus positifs et en ralentissant les cinétiques d'activation du canal («reluctant state») (Bean, 1989). La transfection de  $G\beta\gamma$  dans des cellules exprimants des canaux calciques P/Q induit la même modulation que la protéine G (Herlitze et al., 1996). La transfection de  $G\alpha$  n'a aucun effet ce qui semble indiquer que  $G\beta\gamma$  possède les motifs importants pour la régulation des canaux calciques. De même, la co-transfection de cellules TSA-201 avec  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ),  $\beta$  et  $G\beta\gamma$  cause un déplacement des courbes de dépendance au voltage des canaux calciques vers des potentiels plus positifs. Au contraire, la co-transfection avec  $G\alpha$  n'a aucun effet. La transfection de  $G\gamma$  seul ne permet pas de réguler le canal, mais la surexpression de  $G\beta$  exogène permet de rétablir la modulation du canal. Des expériences effectuées *in vitro* (De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997) et *in vivo* (Garcia et al., 1998) ont démontré que les protéines  $G\beta\gamma$  ont la capacité de se fixer sur la boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II au niveau du AID (voir figure 5 et 7). Des peptides de cette région (boucle I-II du canal  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ )) préviennent l'inhibition de l'activité du canal par les  $G\beta\gamma$  (Herlitze et al., 1997; Zamponi et al., 1997). Des mutations ponctuelles au niveau de cette région peuvent améliorer ou réduire l'inhibition du canal par  $G\beta\gamma$ . Il existe aussi de nombreuses évidences que les C- et N-terminaux de la sous-unité  $\alpha 1$  sont nécessaires pour la régulation par la  $G\beta\gamma$  (Canti et al., 1999; Furukawa, 1998a,b; Page et al., 1998; Qin et al., 1997; Simen et

Miller, 1998; Zhang et al., 1996). Les canaux  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ) sont plus fortement régulés par les protéines G que les canaux  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) et  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). Le transfert du domaine I ou de la boucle I-II de  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ) améliore la régulation de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) par les protéines G (Page et al., 1997). De même, le transfert du domaine I et du C-terminal de  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ) permet au canal  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) d'être régulé par la protéine G (Zhang et al., 1996) (voir figure 7).



## Figure 7 : Sites d'interaction de la protéine $G\beta\gamma$

(Catterall, 2000)



### Légende figure 7:

La protéine  $G\beta/\gamma$  interagit avec le N et C-terminal de la sous-unité  $\alpha 1$ . Elle entre aussi en compétition avec la sous-unité  $\beta$  pour la liaison avec le AID.

### 1.4.6. Modulation par les SNAREs

Un site d'interaction a été identifié entre la boucle cytoplasmique II-III des canaux calciques (reliant les domaines II et III), la syntaxine ( $\alpha 1A, \alpha 1B$ ) ( $Ca_v2.1, Ca_v2.2$ ), la SNAP25 ( $\alpha 1A, \alpha 1B$ ) et la synaptotagmine ( $\alpha 1A, \alpha 1B$ ). La syntaxine (Rettig et al., 1996) et SNAP25 (Sheng et al., 1996) sont des protéines de la membrane plasmique de la famille des SNAREs impliquées dans l'exocytose. Les SNAREs qui permettent la liaison du NSF et SNAPs se divisent en 2 groupes :

-SNARE vésiculaire: VAMP/synaptobrevine.

-SNARE cible (« target »): syntaxines, SNAP-25.

Cette famille de protéines permet la fusion des endosomes avec la membrane plasmique via un couplage avec les canaux  $Ca^{2+}$ . Le mécanisme se déroule en 3 différentes phases :

1) L'approche; 2) La modification; 3) La fusion via un influx de  $Ca^{2+}$ .

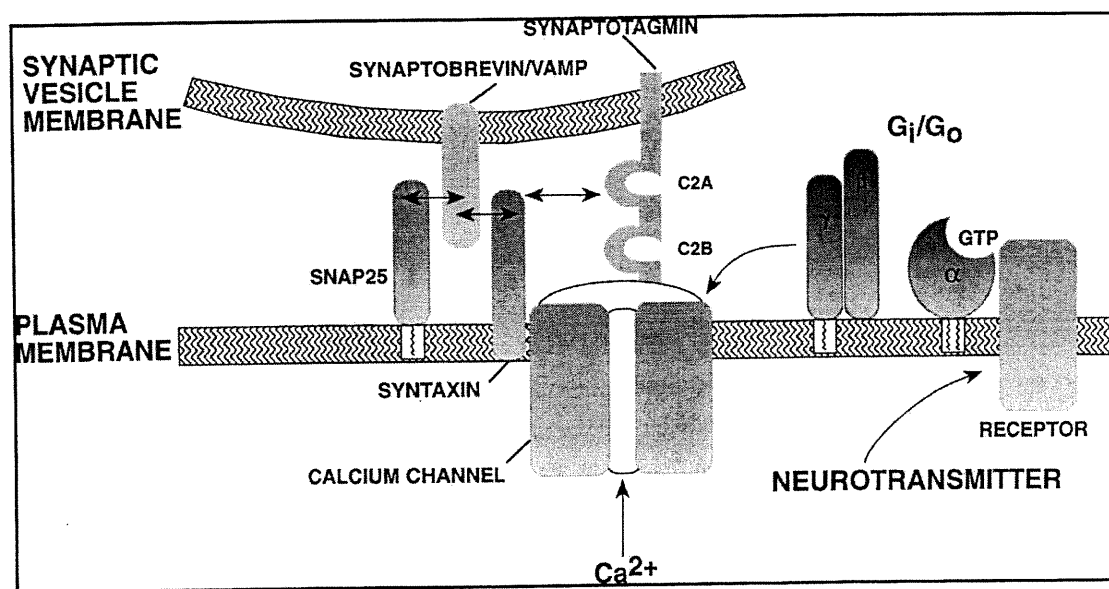
Avant le contact de l'endosome avec la membrane plasmique, la n-sec-1 (SNARE « master ») est couplée à la syntaxine et effectue sur cette dernière une régulation négative. L'endosome quant à lui exprime à sa surface, la synaptophysine, la VAMP ainsi que la Rab qui est une protéine GTPase ancrée dans la membrane amorçant la jonction des deux membranes.

Lors de l'étape de modification il y a attachement de la syntaxine (membrane plasmique) et de la synaptobrevine/VAMP (endosome) qui déplace la liaison de n-sec-1, permettant ainsi la fixation des protéines SNAP puis NSF. L'hydrolyse de l'ATP et

l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  déclenche la fusion et donc l'exocytose tout en permettant la libération de NSF et SNAP (voir figure 8).

## Figure 8 : Modulation des canaux calciques par les SNAREs

(Catterall, 2000).



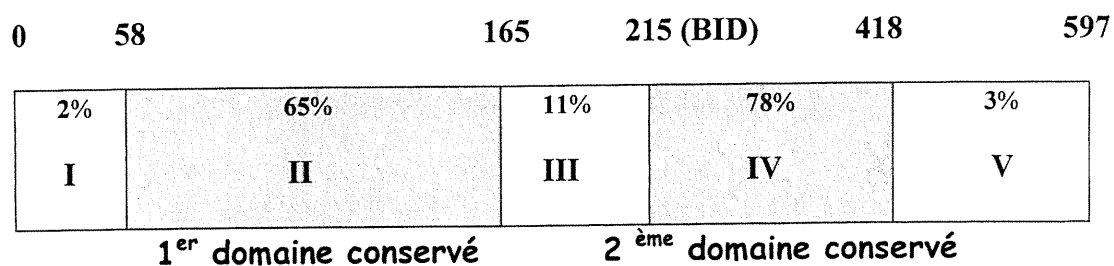
### Légende figure 8:

Ce schéma représente la modulation des canaux calciques par les SNAREs. Lors de l'étape de modification il y a attachement de la syntaxine (membrane plasmique) et de la synaptobrevine/VAMP (endosome) qui déplace la liaison de n-sec-1, permettant ainsi la fixation des protéines SNAP puis NSF. L'hydrolyse de l'ATP et l'entrée de  $Ca^{2+}$  déclenche la fusion et donc l'exocytose tout en permettant la libération de NSF et SNAP.

## 1.5. Structure de la sous-unité $\beta$

**Figure 9 : Carte fonctionnelle de la sous-unité  $\beta$**

(Walker et De Waard, 1998).



**Légende figure 9 :**

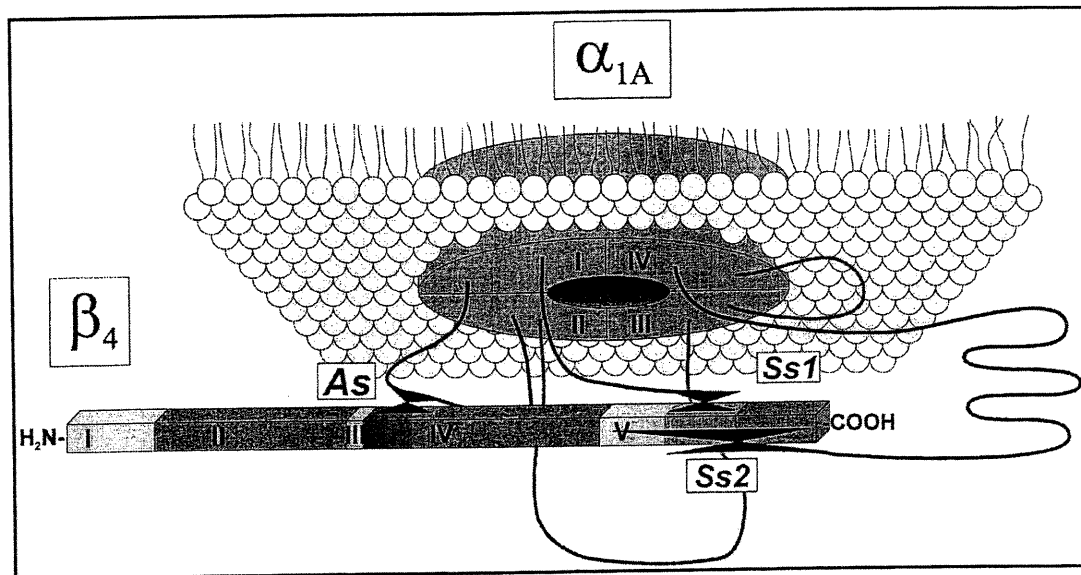
Cette carte représente la position des séquences de l'isoforme  $\beta 1b$ . La protéine se divise en 5 domaines qui représentent les taux de conservation de séquences entre les différentes isoformes de sous-unités  $\beta$ . Le BID est la séquence consensus responsable de la liaison de la sous-unité  $\beta$  à la sous-unité  $\alpha 1$ . Le BID se situe proche du N-terminal du deuxième domaine conservé.

La sous-unité  $\beta$  (52-78 kDa) est une protéine cytoplasmique. Toutefois, certaines sous-unités  $\beta$ , dont l'isoforme  $\beta_{2a}$ , sont ancrées à la membrane plasmique suite à une palmitoylation de deux résidus cystéine en N-terminal (Chien et al., 1996). La mutation de ces deux résidus cystéine en sérine (C3S et C4S) prévient la palmitoylation de ces sites et renverse partiellement le phénotype obtenu avec la sous-unité  $\beta_{2a}$  sauvage (Qin et al., 1998). Les sous-unités  $\beta$  proviennent de 4 gènes distincts  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  et de nombreuses isoformes (>15) qui sont générées par épissage différentiel. Les sous-unités  $\beta$  ne possèdent pas de distribution tissulaire aussi typique que les sous-unités  $\alpha_1$ . La présence d'un grand nombre de résidus proline, lui confère une structure tridimensionnelle très repliée, flexible, qui permet la formation d'interactions électrostatiques complexes, ce qui peut expliquer que son niveau de liaison soit hautement dépendant des séquences environnantes (De Waard et al., 1994). Il a été démontré que la délétion de séquences croissantes de la sous-unité  $\beta$  baisse l'affinité de cette dernière pour la sous-unité  $\alpha_1A$  ( $Ca_v2.1$ ). De même, l'affinité de différentes sous-unités  $\beta$  pour la protéine de fusion GST AID<sub>A</sub> décroît suivant l'ordre :  $\beta_4 > \beta_{2a} > \beta_{1b} > \beta_3$ . La sous-unité  $\beta$  contient 5 domaines distincts. Les domaines 1, 3 et 5 contiennent des séquences non conservées tandis que les domaines 2 et 4 contiennent des séquences conservées entre toutes les sous-unités  $\beta$  (voir figure 9). Dans le deuxième domaine conservé (domaine IV), on retrouve la séquence consensus BID ( pour «  $\beta$  interaction domain » ) qui serait responsable de la liaison de la sous-unité  $\beta$  à la sous-unité  $\alpha_1$  (voir figure 2, 9 et 10). La séquence BID est constituée de 30 aa dont 4 (**P, P, P, Y**) ont été identifiés par mutagenèse comme importants pour la

liaison avec  $\alpha 1$ . Le domaine 5 serait responsable de l'interaction avec les carboxyl- et amino-terminaux de  $\alpha 1$  (Walker et al., 1999) (voir figure 10).

## Figure 10 : Schéma de l'interaction $\alpha 1A$ - $\beta 4$

(Walker et al ., 1999)



### Légende figure 10:

Schéma de l'interaction  $\alpha 1A$ - $\beta 4$

Ce schéma représente le site d'ancrage AID-BID (As) impliquant la boucle I-II de  $\alpha 1A$  et les 30 premiers résidus du domaine IV de  $\beta 4$ . On y retrouve aussi les deux sites d'interaction secondaire NTA (SS1) et CTA (SS2) impliquant des régions chevauchantes du domaine V de  $\beta 4$ .



Des études récentes ont permis de démontrer que la sous-unité  $\beta$  participe aux mécanismes d'expression du canal ( $\alpha 1$ ) à la membrane. Elle faciliterait l'expression fonctionnelle, le ciblage à la membrane et la bonne conformation tridimensionnelle de la sous-unité  $\alpha 1$  du canal calcique (Bichet et al., 2000). La co-expression de sous-unité  $\beta$  avec les sous-unités  $\alpha 1$  dans des ovocytes de *Xenopus* augmente l'amplitude des courants calciques (Wei et al., 1991). Enfin, la sous-unité  $\beta$  module l'activité du canal calcique en accélérant les cinétiques d'activation et d'inactivation de la sous-unité  $\alpha 1$  (Walker et De Waard, 1998). Les taux d'inactivation du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) sont augmentés en présence des sous-unités  $\beta$  dans l'ordre  $\beta 3 > \beta 1 > \beta 4$  (de plus en plus rapidement) et diminués en présence de  $\beta 2a$  (Parent et al., 1997). Il faut noter que la coexpression du peptide BID seul a montré qu'il porte l'information requise pour le déplacement des courbes de dépendance au voltage de l'activation et les modifications des cinétiques d'activation et d'inactivation que l'on observe avec la sous-unité  $\beta$  entière.

## 1.6. Structure de la sous-unité $\alpha 2$ - $\delta$

La sous-unité  $\alpha 2$ - $\delta$  (140-170 kDa) est une glycoprotéine. Les sous-unités  $\alpha 2$  et  $\delta$  sont deux protéines reliées entre elles par 2 ponts disulfure (voir figure 2). Un seul gène code pour les 2 protéines qui sont obtenues par épissage alternatif. Ce complexe est accroché à la membrane grâce à la sous-unité  $\delta$  qui possède un seul passage transmembranaire. La sous-unité  $\alpha 2$  forme la partie extracellulaire de la protéine qui possède de nombreux sites de glycosylation. Il existe 3 sous-unités  $\alpha 2$ - $\delta$  dont 2 ont été identifiées récemment  $\alpha 2$ - $\delta 2$  et  $\alpha 2$ - $\delta 3$  (Klugbauer et al., 1999a). La comparaison de leur séquence primaire révèle quelques différences (conservation >30%). Les études de coexpression ont montré que  $\alpha 2$ - $\delta 3$  comme  $\alpha 2$ - $\delta 1$  modulaient les courants produits par  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) et  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) (Klugbauer et al., 1999a). La localisation tissulaire des ARNm de  $\alpha 2$ - $\delta 1$  et  $\alpha 2$ - $\delta 2$  est très large contrairement à  $\alpha 2$ - $\delta 3$  qui s'exprime majoritairement au niveau du SNC (Klugbauer et al., 1999a).

Le rôle de la sous-unité  $\alpha 2$ - $\delta$  reste mal établi. La présence d'une sous-unité  $\beta$  est souvent nécessaire pour que l'on puisse observer un effet fonctionnel (modulation du processus d'inactivation) de la sous-unité  $\alpha 2$ - $\delta$ . On reconnaît toutefois que la sous-unité  $\alpha 2$ - $\delta$  accélère les cinétiques d'inactivation, déplace légèrement les courbes de dépendance au voltage de l'activation et de l'inactivation (hyperpolarisation), augmente l'expression de la sous-unité  $\alpha 1$  et la stabilise dans la membrane (Walker et De Waard, 1998).

## 1.7. Structure de la sous-unité $\gamma$

La sous-unité  $\gamma_1$  (type L) (32 kDa) a tout d'abord été identifiée comme une sous-unité auxiliaire des canaux de type-L (muscle squelettique de lapin) (Jay et al., 1990). Elle est composée de 4 segments transmembranaires. Des études de coexpression ont révélé un rôle de la sous-unité  $\gamma$  dans les changements du pic du courant et aussi dans les modulations des cinétiques d'activation. Sa fonction principale est d'accélérer les cinétiques d'activation (Walker et De Waard, 1998). Les tentatives pour trouver d'autres sous-unités  $\gamma$  par des techniques de biologie moléculaire ont échoué. Cependant, récemment une seconde sous-unité a été identifiée après l'étude de souris souffrant d'épilepsie dû à une mutation dans un gène codant pour la sous-unité  $\gamma$  (souris «stargazer»)(Letts et al., 1998). Une faible hyperpolarisation des courbes d'inactivation fut observée lors de la coexpression de la sous-unité  $\gamma_2$  avec les sous-unités  $\alpha_1A$ ,  $\beta_1a$ ,  $\alpha_2\delta_1$  (Letts et al., 1998). À ce jour, 5 types de sous-unités  $\gamma$  ont été identifiés. Une nomenclature a été proposée par Klugbauer et collaborateurs en fonction de l'ordre d'identification et de l'homologie des séquences de chacune des sous-unités  $\gamma$  (Klugbauer et al., 2000). La sous-unité  $\gamma_1$  est une sous-unité spécifique au muscle squelettique de rat et possède 25 % d'homologie de séquence par rapport aux autres membres de la famille. La sous-unité  $\gamma_2$  est la sous-unité  $\gamma$  identifiée chez les souris «stargazer» par Letts et collaborateurs. Elle contient 100aa de plus que  $\gamma_1$ . Malgré cette importante différence, le profil d'hydrophobicité déterminé pour  $\gamma_2$  ressemble beaucoup à celui de  $\gamma_1$ . Les 2 sous-unités contiendraient 4 segments transmembranaires avec pour  $\gamma_2$  une extension au niveau du carboxyl terminal

intracellulaire (Letts et al., 1998). L'isolation de  $\gamma 2$  chez la souris a permis la localisation de  $\gamma 2$  chez l'humain sur le chromosome 22 (Black et Lennon, 1999). La sous-unité  $\gamma 3$  a été localisée au niveau du chromosome 16. Les sous-unités  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  et  $\gamma 4$  ont été identifiées dans le cerveau et possèdent une homologie de séquence bien plus grande de l'ordre de 60% et plus. La dernière sous-unité  $\gamma 5$  (identifiée par Klugbauer et collaborateurs) possède une homologie beaucoup plus faible avec les autres sous-unités  $\gamma$  (Klugbauer et al., 2000).

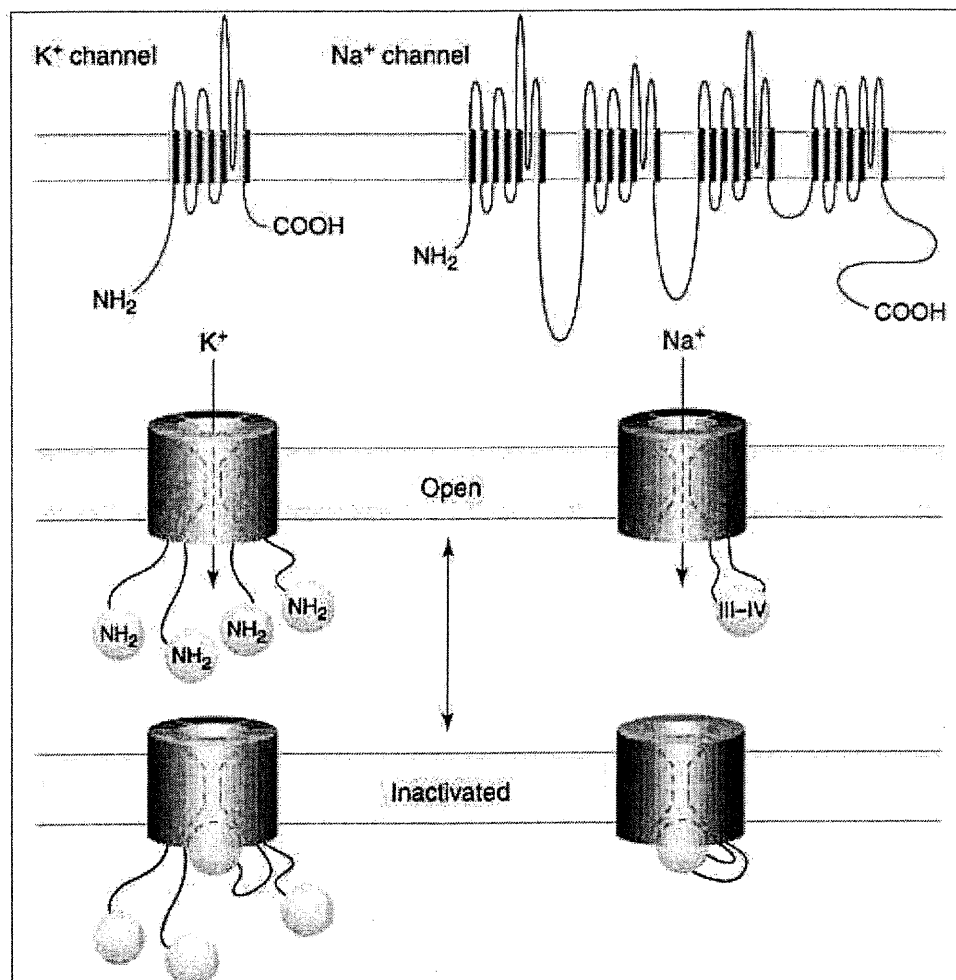
## 1.8. Inactivation des canaux calciques

L'inactivation des canaux calciques permet de moduler avec précision le signal calcique, tout en prévenant une augmentation à des niveaux toxiques de la concentration de calcium intracellulaire.

Comparativement aux canaux  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , les mécanismes qui gouvernent l'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage sont relativement moins bien connus. L'inactivation rapide des canaux  $\text{K}^+$  («Shaker») (type N) est due à la présence d'une région («ball») au N-terminal qui vient obstruer la face interne du canal («ball and chain mechanism») (Hoshi et al., 1990) tandis que l'inactivation des canaux sodiques se produit lors de l'occlusion du canal par un motif IFM (I 1488, F 1489, M1490) situé au niveau de la boucle intracellulaire entre les domaines III et IV («hinged lid mechanism») (Armstrong et Bezanilla, 1977; West et al., 1992) (voir figure 11).

## Figure 11 : Inactivation des canaux sodiques et potassiques

(Stotz et Zamponi, 2001b)



### Légende figure 11:

Représentation schématique du mécanisme d'inactivation des canaux Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> dépendants du voltage. Les canaux K<sup>+</sup> sont formés par l'association de 4 sous-unités  $\alpha$ , chacune contenant 6 segments transmembranaires. Les canaux Na<sup>+</sup> quant à eux sont constitués d'une sous-unité  $\alpha$  contenant 4 domaines homologues. L'inactivation des canaux K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> se produit lors de l'occlusion du pore par le N-terminal et la boucle III-IV, respectivement.

### 1.8.1. Inactivation dépendante du calcium

Pour les canaux de type L ( $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) et  $\alpha 1D$  ( $Ca_v1.3$ )), l'inactivation se produit principalement en réponse à une élévation de la concentration de calcium intracellulaire qui active un mécanisme de rétrocontrôle négatif. L'existence d'une inactivation dépendante du calcium a été mise en évidence suite à la découverte de cinétiques d'inactivation plus rapides en présence des ions calcium qu'en présence des ions barium (ou d'autres ions divalents ou monovalents). Ce type d'inactivation a été étudié tout d'abord dans les ciliés *paramecium* (Brehm et Eckert, 1978), puis analysé dans les canaux natifs  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (myocarde et muscle lisse) (Lee et al., 1985; Ganitkevich et al., 1987). Au niveau structural, l'inactivation dépendante du  $Ca^{2+}$  a tout d'abord été expliquée comme étant causée par la liaison spécifique du  $Ca^{2+}$  sur un motif « main EF » situé sur le C-terminal de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (De Leon et al., 1995). En effet, la substitution de ce motif par la séquence correspondante des canaux  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) élimine l'inactivation dépendante du calcium. Plus récemment, plusieurs équipes ont démontré que la calmoduline était le principal détecteur du  $Ca^{2+}$ . Les augmentations de la concentration intracellulaire de calcium seraient détectées par la calmoduline qui irait se fixer sur un motif IQ situé au niveau du carboxyl terminal de la sous-unité  $\alpha 1$  (Peterson et al., 1999; Peterson et al., 2000). Il a été démontré que la délétion partielle du motif IQ au niveau du carboxyl terminal de  $\alpha 1C$  élimine l'inactivation dépendante du calcium (Zuhlke et Reuter, 1998). De plus, la surexpression de la calmoduline mutée qui ne possède plus de sites de liaison du calcium réduit l'inactivation dépendante du calcium et la facilitation (Peterson et al., 1999; Zuhlke et al., 2000).

## 1.8.2. Inactivation dépendante du voltage

Dans la majorité des canaux calciques, l'inactivation dépend de la dépolarisation membranaire. Lors d'une dépolarisation il se produit un changement de conformation de la protéine dû au mouvement de charges positives au niveau du segment S4 (constituant le «voltage sensor») qui va éventuellement permettre le passage des ions calciques (Nargeot et Charnet, 1994). Parallèlement à l'activation des canaux calciques, la dépolarisation membranaire déclenche aussi un mécanisme d'inactivation qui possède une cinétique plus lente. L'ensemble des canaux qui entrent dans un état inactivé deviennent insensibles à toute nouvelle stimulation.

Les cinétiques d'inactivation diffèrent significativement entre les différentes classes de canaux calciques. Des expériences en présence de  $Ba^{2+}$  ont permis de démontrer que la famille  $Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$  (type T) possède les cinétiques d'inactivation les plus rapides (Perez-Reyes et al., 1999) suivi par les canaux  $Ca_v2.3$  (type R) (Zhang et al., 1994; Parent et al., 1997; Spaetgens et Zamponi, 1999),  $Ca_v2.2$  (type N) (Hans et al., 1999b),  $Ca_v2.1$  (type P/Q) (Sather et al., 1993) et les canaux  $Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$  qui ont les cinétiques d'inactivation les plus lentes (voir Tableau III).

L'étude de chimères (les chimères sont utilisées afin de transférer un déterminant fonctionnel (inactivation) d'un canal à un autre) de canaux calciques au cours des années semblerait indiquer que les déterminants moléculaires de l'inactivation des canaux  $Ca^{2+}$  sont très largement distribués le long de la structure primaire du canal.

### **1.8.2.1. Déterminants moléculaires de l'inactivation se situant au niveau des domaines transmembranaires**

Il existe de nombreux déterminants de l'inactivation se situant au niveau des domaines transmembranaires. Des chimères entre les canaux  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) et  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) ont permis de cibler les domaines II et III comme étant des régions impliquées dans l'inactivation des canaux  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) (Spaetgens et Zamponi, 1999).

Le segment IVS5 semble aussi être impliqué dans l'inactivation. La substitution d'une partie du segment IVS5 dans  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) par la séquence équivalente d'un canal  $Na^+$  qui s'inactive rapidement ralentit significativement les cinétiques de la chimère résultante par rapport à  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) suggérant ainsi un rôle du segment IVS5 dans les propriétés d'inactivation du canal (Motoike et al., 1999).

L'inactivation est très sensible aux mutations se situant sur la face interne du canal. Une mutation dans le segment IV S6 du type L (V1504A, Berjukow et al., 1999) et une double mutation dans le segment IIIS6 de  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) (IF1612/1613AA Sokolov et al., 2000) ralentissent de façon dramatique l'inactivation rapide. Hockerman et collaborateur ont établi par des techniques de mutagenèse que les segments IIIS6 et IVS6 étaient impliqués dans la modulation de l'inactivation (Hockerman et al., 1995; Hockerman et al., 1997). Leur étude a consisté à substituer systématiquement les acides aminés des segments IIIS6 et IVS6 dans  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) par des alanines. La triple



mutation YAI ( Y1463A, A1467S, I1470A) dans le segment 6 du domaine IV déplace la courbe de dépendance au voltage de l'inactivation du canal  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) vers des potentiels plus positifs ( $\sim 8\text{mV}$  plus positif ( $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ )  $E_{0.5} = -17.7 \pm 2.9 \text{ mV}$ ; YAI  $E_{0.5} = -9.3 \pm 1.3 \text{ mV}$ )) (Hockerman et al., 1995). De même, la mutation des aa V1165A, I1153A, F1164A dans le segment 6 du domaine III provoque un déplacement de la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels positifs (V1165A  $E_{0.5} = -14.5\text{mV}$ ; I1153A  $E_{0.5} = -11.6\text{mV}$ ; F1164A  $E_{0.5} = -9.1\text{mV}$ ). Au contraire, la mutation Y1152A a la propriété de déplacer la courbe de dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Y1152A  $E_{0.5} = -29.0\text{mV}$ ). Il est intéressant de noter que la combinaison des mutations YIFV provoque un déplacement vers des potentiels plus positifs ( $\sim 12\text{mV}$  plus positif que  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) sauvage (YIFV  $E_{0.5} = -5.7\text{mV}$ )) (Hockerman et al., 1997).

Le filtre de sélectivité du canal calcique est aussi un déterminant important de l'inactivation des canaux calciques. Le remplacement de 2 glutamates dans la boucle P, située au niveau des domaines II et IV connue pour former une partie du filtre de sélectivité (E709Q,E1419Q) (Hockerman et al., 1997), cause des changements significatifs dans l'inactivation. D'autres études entreprises par Hans et collaborateurs ont démontré qu'une simple mutation (E1740R) dans la boucle P du domaine IV de  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) accélérerait significativement les cinétiques d'inactivation du canal et déplaçait les courbes de dépendance au voltage, suggérant que l'acide aminé (E1740) jouait un rôle essentiel dans l'inactivation des canaux calciques (Hans et al., 1999b).

### **1.8.2.2. Déterminants moléculaires de l'inactivation se situant au niveau C-terminal de la sous-unité $\alpha 1$**

La coexpression de six isoformes du canal  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) avec  $\beta$  et  $\alpha 2-\delta$  a permis de montrer des différences significatives dans les cinétiques d'inactivation. Deux isoformes  $\alpha 1C$  72 et  $\alpha 1C$  86 contiennent des séquences différentes au niveau du C-terminal dû à un épissage alternatif des exons 40 et 42. Les courants  $Ba^{2+}$  mesurés pour  $\alpha 1C$  86 ont des cinétiques d'inactivation plus rapides (8-10 fois plus rapides que  $\alpha 1C$  77 à +20mV) (Soldatov et al., 1997). De plus, des travaux effectués dans notre laboratoire ont révélé qu'un résidu conservé dans le motif main EF de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (E1537) contribuait à l'inactivation dépendante du voltage (Bernatchez et al., 1998).

### **1.8.2.3. Déterminant moléculaire de l'inactivation se situant au niveau du N-terminal de la sous-unité $\alpha 1$**

La coexpression de  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ) ( $\Delta 1-55$ ) avec  $\beta 2a$  a permis de montrer des différences significatives dans l'inactivation du canal par rapport au canal sauvage  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ). La délétion du N-terminal ( $\Delta 1-55$ ) du canal  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ) permet l'apparition d'une composante d'inactivation rapide qui n'est pas présente pour le canal  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ). Ces résultats suggèrent que le mécanisme par lequel  $\beta 2a$  retarde l'inactivation se situe au niveau du N-terminal du canal  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ) (Stephens et al., 2000).

#### **1.8.2.4. Déterminant moléculaire de l'inactivation se situant au niveau de la boucle cytoplasmique reliant les domaines II et III**

Les SNAREs (voir 1.4.6 Modulation par les SNAREs) qui interagissent avec la boucle reliant les domaines II et III de  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) et  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ) représentent un mécanisme de plus par lequel l'inactivation des canaux calciques peut être régulée (Bezprozvanny et al., 1995; Zhong et al., 1999; Degtiar et al., 2000).

#### **1.8.2.5. Déterminants moléculaires de l'inactivation se situant au niveau de la boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II**

Les récentes études fonctionnelles nous amènent à conclure que l'interaction de la sous-unité  $\beta$  avec la sous-unité  $\alpha 1$  est un déterminant clef de l'inactivation des canaux calciques. Chacune des sous-unités  $\beta$  a un effet distinct sur l'inactivation du canal,  $\beta 2$  induisant les cinétiques les plus lentes, suivi de  $\beta 4$ ,  $\beta 1a$  et  $\beta 3$  (Sather et al., 1993; De Waard et Campbell, 1995; Parent et al., 1997). Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence l'importance de la boucle reliant les domaines I et II sur l'inactivation des canaux calciques. La surexpression de la boucle I-II de  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) accélère les cinétiques des courants suggérant que la boucle I-II pourrait jouer un rôle similaire au «ball and chain mechanism» des canaux  $K^+$  (Cens et al., 1999). La même équipe a aussi

émis l'hypothèse que l'inactivation dépendante du calcium et l'inactivation dépendante du voltage pouvaient partager certains déterminants moléculaires (Cens et al., 1999). L'équipe de Tsien a étudié les mécanismes d'inactivation en insérant des portions du canal  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) qui possède une inactivation lente dans les canaux  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) qui possèdent des cinétiques d'inactivation plus rapides. La chimère DB9 qui est constituée du domaine I plus une partie de la boucle I-II du canal  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) possède des cinétiques d'inactivation plus lentes que le canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). La chimère DB19 dans laquelle 140aa de  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) ont été insérés dans  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) possède des cinétiques d'inactivation lentes très similaires au canal  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ). La chimère DB18, dans laquelle la portion IS6 d'un canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) (inactivation rapide) a été transférée dans un canal  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) (inactivation plus lente), possède des cinétiques d'inactivation plus rapides qui se rapprochent plus des cinétiques d'inactivation des canaux  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) (Zhang et al., 1994). Le domaine IS6 et la boucle I-II ont donc été référencés comme des régions étant importantes dans l'inactivation des canaux calciques.

Nous avons aussi récemment observé que la boucle I-II de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) confère des cinétiques d'inactivation plus lentes aux canaux  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) (Bernatchez et al., 2001b). Les expériences précédentes effectuées dans notre laboratoire montrent que les cinétiques d'inactivation de la chimère CEEE (canal calcique  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ )) (inactivation rapide) possédant 160 aa de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (inactivation plus lente) (comprenant le AID) se superposent à celles de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) en présence de  $Ba^{2+}$ . Par exemple, en présence de la sous-unité  $\beta 3$ , le potentiel de mi-inactivation  $E_{0.5}$  de  $\alpha 1E$

(Ca<sub>v</sub>2.3) est de  $-61 \pm 0.9$  mV (n=3) alors que celui de CEEE est de  $-23 \pm 0.7$  mV (n=3), ce qui n'est pas différent de celui de  $\alpha$ 1C (Ca<sub>v</sub>1.2) avec  $-19 \pm 0.9$  mV (n=3). Malgré une homologie de  $> 80$  % entre la structure primaire de  $\alpha$ 1E (Ca<sub>v</sub>2.3) et de CEEE, l'inactivation de CEEE est similaire à  $\alpha$ 1C (Ca<sub>v</sub>1.2), ce qui suggère un rôle dominant du domaine I et de la boucle cytoplasmique reliant les domaines I-II dans les cinétiques d'inactivation des VDCC (Bernatchez et al., 2001b).

Afin d'isoler les acides aminés importants dans le mécanisme d'inactivation, d'autres équipes ont effectué des mutations ponctuelles au niveau de la boucle I-II. La comparaison des séquences de la boucle I-II et des propriétés d'inactivation de deux isoformes du canal Ca<sub>v</sub>2.1 ( $\alpha$ 1A-a et  $\alpha$ 1A-b) a révélé que l'insertion de l'aa V421 dans la boucle de  $\alpha$ 1A-a enlève presque complètement l'inactivation rapide permettant ainsi la conversion des cinétiques d'inactivation de Q en celles de P (inactivation lente) (Bourinet et al., 1999). De même, la mutation de QQIERE en QQIEEE ralentit l'inactivation des canaux  $\alpha$ 1A (Ca<sub>v</sub>2.1) mais déplace aussi la courbe de dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus positifs, tandis que la mutation inverse QQLEED-QQLERD dans les canaux  $\alpha$ 1C (Ca<sub>v</sub>1.2) accélère les cinétiques d'inactivation en Ba<sup>2+</sup> (Herlitze et al., 1997).

Les acides aminés QQIEXE font partie du domaine AID, séquence de 18 aa localisés au niveau de la boucle cytoplasmique reliant les domaines I et II (voir figure 5). La séquence AID se lit : **QQEXXLXGYXXWIXXXE**. Neuf acides aminés sont conservés dans les canaux Ca<sub>v</sub>1.1 à 1.4 et Ca<sub>v</sub>2.1 à 2.3. Il s'agit d'une séquence

cruciale pour l'ancrage primaire de la sous-unité  $\beta$  sur la sous-unité  $\alpha$ . Sans cette séquence, la sous-unité  $\beta$  ne peut se lier à la sous-unité  $\alpha$ . Les acides aminés conservés importants pour cette liaison ont été identifiés à l'aide de techniques de mutagenèse dirigée et d'interaction protéine-protéine entre AID<sub>A</sub> (AID de  $\alpha$ 1A (Ca<sub>v</sub>2.1)) et  $\beta$ 1b. Ces études ont révélé que 3 résidus (Y,W,I) sur le AID<sub>A</sub> sont essentiels à la liaison de la sous-unité  $\beta$ 1b ( De Waard et al., 1996). Les acides aminés non conservés, quant à eux, ne sont pas indispensables à la liaison de la sous-unité  $\beta$ 1b. Cependant, il est possible que ces acides aminés non conservés puissent en partie expliquer les différences d'affinité observées entre  $\alpha$ 1A et plusieurs sous-unités  $\beta$  ( De Waard et al., 1996).

## 1.9. Description du projet

Nous avons entrepris l'étude détaillée du domaine AID afin de déterminer son implication dans le mécanisme d'inactivation des canaux dépendants du voltage  $\alpha$ 1E (Ca<sub>v</sub>2.3) et  $\alpha$ 1C (Ca<sub>v</sub>1.2). Nous avons choisi d'étudier les canaux calciques  $\alpha$ 1E (Ca<sub>v</sub>2.3) et  $\alpha$ 1C (Ca<sub>v</sub>1.2) car ces canaux ont des cinétiques d'inactivation très différentes tout en possédant une identité de séquence primaire relativement élevée ( ~ 35% ). En présence de Ba<sup>2+</sup>, le canal  $\alpha$ 1E (Ca<sub>v</sub>2.3) s'inactive rapidement contrairement au canal  $\alpha$ 1C (Ca<sub>v</sub>1.2) qui s'inactive beaucoup plus lentement. Le canal  $\alpha$ 1C (Ca<sub>v</sub>1.2) fait partie de la famille des canaux Ca<sub>v</sub> 1 (type L) (inactivation lente) qui ont une séquence AID : **Q**Q**L**E**E**D**L**(K ou R)**G** **Y**(L ou M)(D ou S)**W**I**T**Q(A ou G)**E** tandis que le canal  $\alpha$ 1E (Ca<sub>v</sub>2.3) appartient à la classe Ca<sub>v</sub> 2 (inactivation plus rapide) qui a

une séquence AID : **Q**QIERELNGY(M ou L ou R)(E ou A)**W**I(S ou F ou D)KAE  
(voir figure 5).

Si on compare les séquences primaires des canaux  $\alpha 1E$  (Ca<sub>v</sub>2.3) et  $\alpha 1C$  (Ca<sub>v</sub>1.2), on peut remarquer que parmi les 9 résidus non conservés des canaux  $\alpha 1E$  (Ca<sub>v</sub>2.3) et  $\alpha 1C$  (Ca<sub>v</sub>1.2), les positions 3 et 6 du domaine AID impliquent une mutation conservatrice d'un résidu iso (I) pour un leu (L) et glu (E) pour asp (D) (voir figure 5). La position 17 est actuellement occupée par un résidu ala (A) qui est conservé entre  $\alpha 1E$  (Ca<sub>v</sub>2.3) et  $\alpha 1C$  (Ca<sub>v</sub>1.2). La position 5 est occupée par un résidu arginine (R) qui est conservé dans les canaux de type non L et est remplacé par un glu (E) dans le type L. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude détaillée de la fonction des 6 résidus non conservés au niveau du motif AID de  $\alpha 1E$  (Ca<sub>v</sub>2.3) soit : R378, N381, R384, A385, D388 ou K389 seuls ou en combinaison.

Notre stratégie de travail comportait les étapes suivantes :

- 1- Muter chacun des 6 résidus non conservés de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) par les 6 résidus homologues de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ): R378E, N381K, R384L, A385D, D388T et K389Q (voir figure 5).
- 2- Comparer les propriétés d'inactivation conférées par les différentes mutations par rapport aux cinétiques du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) sauvage (inactivation rapide). Nous nous attendions à ce que la mutation des résidus les plus importants déplacent les cinétiques d'inactivation et la dépendance au voltage de l'inactivation du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) vers celles du canal  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (mutant  $\tau_{inact} > \alpha 1E$  wt  $\tau_{inact} \sim 74$  ms ) (mutant  $E_{0.5} > \alpha 1E$  wt  $E_{0.5} \sim -64$  mV )).
- 3- Identifier le ou les résidus déterminants sur les cinétiques et la dépendance au voltage de l'inactivation. Caractériser la nature des interactions moléculaires impliquées dans la modulation du mécanisme d'inactivation en modifiant la taille et/ou la charge des acides aminés.
- 4- Effectuer la ou les mutations réciproques au niveau du canal  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) afin d'analyser l'universalité du mécanisme moléculaire.
- 5- Vérifier le rôle de la sous-unité auxiliaire  $\beta$  dans la modulation de nos mutants, ce contrôle permet de documenter l'intégrité de l'interaction fonctionnelle entre les sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta$ .
- 6- Proposer un modèle hypothétique du mécanisme d'inactivation.



## **2. ARTICLE**

## Molecular Determinants of Inactivation within the I-II Linker of $\alpha 1E$ ( $Ca_v2.3$ ) Calcium Channels

L. Berrou, G. Bernatchez, and L. Parent

Department of Physiology, Membrane Transport Research Group, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7 Canada

**ABSTRACT** Voltage-dependent inactivation of  $Ca_v2.3$  channels was investigated using point mutations in the  $\beta$ -subunit-binding site (AID) of the I-II linker. The quintuple mutant  $\alpha 1E$  N381K + R384L + A385D + D388T + K389Q (NRADK-KLDTQ) inactivated like the wild-type  $\alpha 1E$ . In contrast, mutations of  $\alpha 1E$  at position R378 (position 5 of AID) into negatively charged residues Glu (E) or Asp (D) significantly slowed inactivation kinetics and shifted the voltage dependence of inactivation to more positive voltages. When co-injected with  $\beta 3$ , R378E inactivated with  $\tau_{inact} = 538 \pm 54$  ms ( $n = 14$ ) as compared with  $74 \pm 4$  ms ( $n = 21$ ) for  $\alpha 1E$  ( $p < 0.001$ ) with a mid-potential of inactivation  $E_{0.5} = -44 \pm 2$  mV ( $n = 10$ ) for R378E as compared with  $E_{0.5} = -64 \pm 3$  mV ( $n = 9$ ) for  $\alpha 1E$ . A series of mutations at position R378 suggest that positively charged residues could promote voltage-dependent inactivation. R378K behaved like the wild-type  $\alpha 1E$  whereas R378Q displayed intermediate inactivation kinetics. The reverse mutation E462R in the L-type  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) produced channels with inactivation properties comparable to  $\alpha 1E$  R378E. Hence, position 5 of the AID motif in the I-II linker could play a significant role in the inactivation of  $Ca_v1.2$  and  $Ca_v2.3$  channels.

### INTRODUCTION

The influx of calcium through neuronal voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels regulates a wide range of cellular processes, including neurotransmitter release, activation of  $Ca^{2+}$ -dependent enzymes and second messenger cascades, gene regulation, and proliferation. To this date, molecular cloning has identified the primary structures for 10 distinct calcium channel  $\alpha_1$  subunits:  $\alpha 1S$  ( $Ca_v1.1$ ),  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ),  $\alpha 1D$  ( $Ca_v1.3$ ), and  $\alpha 1F$  ( $Ca_v1.4$ ) encode L-type channels;  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) encodes both P- and Q-type channels;  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ) defines N-type channels;  $\alpha 1G$  ( $Ca_v3.1$ ),  $\alpha 1H$  ( $Ca_v3.2$ ), and  $\alpha 1I$  ( $Ca_v3.3$ ) form T-type channels (Cribbs et al., 1998, 2000; Lee et al., 1999a; Monteil et al., 2000; Ertel et al., 2000) and  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) probably encodes a component of the resistant current identified in some neuronal preparations (Randall and Tsien, 1997; Piedras-Renteria and Tsien, 1998; Saegusa et al., 2000).

Calcium channel inactivation is a critical determinant of the temporal precision of calcium signals and serves to prevent long-term increases in intracellular calcium levels. In the L-type  $\alpha 1C$  channel, inactivation proceeds mostly in response to localized elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  providing negative  $Ca^{2+}$  feedback (deLeon et al., 1995; Bernatchez et al., 1998). The dominant  $Ca^{2+}$  sensor for such  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation in  $\alpha 1C$  and  $\alpha 1A$   $Ca^{2+}$  channels has recently been identified as calmodulin, which appears to be constitutively tethered to the channel complex (Qin et al., 1999; Zuhlke et al., 1999; Peterson et al., 1999; Lee et al., 1999b). This  $Ca^{2+}$  sensor induces channel inactivation by  $Ca^{2+}$ -dependent calmodulin binding to an IQ-like motif situated on the carboxyl tail of  $\alpha 1C$  (Peterson et al., 2000).

Fast and voltage-dependent inactivation appears to be a key mechanism by which other  $Ca^{2+}$  channels achieve regulation of internal calcium levels. The molecular mechanisms for voltage-dependent inactivation in  $Ca^{2+}$  channel proteins are incompletely understood. The importance of the I-II linker in  $Ca^{2+}$  channel inactivation has, however, recently emerged in various studies. Point mutations and chimeras in that region were shown to modify inactivation kinetics in  $\alpha 1A$  (Herlitz et al., 1997) and  $\alpha 1C$  channels (Adams and Tanabe, 1997). Overexpression of mRNA coding for the I-II linker from  $\alpha 1A$ , but not for the III-IV linker, was shown to speed up inactivation of wild-type  $\alpha 1A/\beta 2a$  in *Xenopus* oocytes (Cens et al., 1999). A chimeric channel containing the I-II linker from  $\alpha 1E$  accelerated the inactivation kinetics of  $\alpha 1C$  (Stotz et al., 2000). Conversely we have also recently observed that the I-II linker from  $\alpha 1C$  conferred slower inactivation kinetics to  $\alpha 1E$  (unpublished data). Hence, the I-II linker of HVA  $\alpha 1$  subunits appears a likely candidate for an inactivating blocking particle in an updated version of the hinged-lid mechanism observed in  $Na^+$  channels. In this model, most  $\beta$ -subunits would regulate  $Ca^{2+}$  channel inactivation kinetics by priming the I-II linker into a conformation more favorable to inactivation.

The I-II linker contains many crucial regulatory sites in  $Ca^{2+}$  channels. The I-II linker contains the high-affinity  $\beta$ -subunit-binding site AID (alpha-1 subunit interaction domain) that was first identified by protein overlay (Pragnell et al., 1994) and was shown to participate in  $\beta$ -subunit regulation (DeWaard and Campbell, 1995; Gerster et al., 1999; DeWaard et al., 1996). Mutations within the AID motif in  $\alpha 1A$  perturbed  $\beta$  binding (Pragnell et al., 1994). There are secondary binding sites between the cytoplasmic  $\beta$ - and the  $\alpha 1$ -subunits on the N-terminus for  $\alpha 1B$  (Ste-

Received for publication 29 June 2000 and in final form 5 October 2000.

Address reprint requests to Dr. L. Parent, Département de Physiologie, Membrane Transport Research Group, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada. Tel.: 514-343-6673; Fax: 514-343-7146; E-mail: lucie.parent@umontreal.ca.

© 2001 by the Biophysical Society

0006-3495/01/01/215/14 \$2.00

phens et al., 2000) and  $\alpha 1A$  (Walker et al., 1999) and on the C-terminus for  $\alpha 1E$  (Tareilus et al., 1997), but AID appears to be universally present in all non-T-type  $\alpha 1$ -subunits (Perez-Reyes et al., 1998). The AID binding site is composed of QQXEXXLGYXXWIXXXE, and a single substitution at the conserved Y (Tyr) position could disrupt plasma membrane targeting of the  $\alpha 1$ -subunit without, however, affecting the  $\beta$ -subunit-induced modulation of whole-cell and single-channel currents (Gerster et al., 1999). The I-II linker of the  $\alpha 1$ -subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal that is antagonized by the  $\beta$ -subunit (Bichet et al., 2000). Last, the I-II linker was also shown to interact with G-protein  $\beta\gamma$ -subunit (DeWaard et al., 1997; Dolphin, 1998) in a competitive fashion with  $\beta$ -subunits (Campbell et al., 1995).

Recent studies have strongly suggested a critical role for the I-II linker, and more precisely for the  $\beta$ -subunit-binding site (AID) in the inactivation of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels (VDCCs) (Page et al., 1997; Herlitze et al., 1997). Indeed, conversion of the AID motif from QQIERE to QQIEEE slowed inactivation of  $\alpha 1A$  channels as well as shifting its voltage dependence of inactivation to more positive potentials (Herlitze et al., 1997).

Point mutations E462R in  $\alpha 1C$  and its counterpart R387E in  $\alpha 1E$  channels were herein shown to significantly influence both the kinetics and the voltage dependence of inactivation. Furthermore, a quintuple mutant made in the same region,  $\alpha 1E$  N381K + R384L + A385D + D388T + K389Q, failed to affect either kinetics or voltage dependence of inactivation. Hence, along with containing the G-protein regulation site and the retention signal, the I-II loop in  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha 1$ -subunits may thus underlie three important modulatory influences in VDCCs.

## MATERIALS AND METHODS

### Recombinant DNA techniques

Standard methods of plasmid DNA preparation were used (Sambrook et al., 1989). cDNAs coding for wild-type rabbit  $\alpha 1C$  (GenBank X15539) and  $\beta 3$  (GenBank M88751) were kindly donated by Dr. E. Perez-Reyes. The wild-type human  $\alpha 1E$  (GenBank L27745) was a gift from Dr. T. Schneider. The rat brain  $\alpha 2b\delta$ -subunit was provided by Dr. T. P. Snutch. For the  $\alpha 1C$  mutants, a site *XhoI* was first engineered by polymerase chain reaction into  $\alpha 1C$  at position 1530 nt in the I-II linker, roughly 40 residues downstream to the  $\beta$ -subunit-binding site on the  $\alpha 1$ -subunit (AID). This is a nonsilent mutation creating a Gly-to-Arg mutation at this position. The resulting  $\alpha 1C$  (*XhoI*) channel, however, displayed inactivation and activation kinetics similar to the wild-type  $\alpha 1C$  (see Figs. 2 and 7). For point mutations, repeat I of  $\alpha 1E$  and  $\alpha 1C$  were respectively subcloned in Topo XL (Invitrogen, Carlsbad, CA) for conveniently using the Unique Site Elimination method (Pharmacia Biotech) developed by Deng and Nickoloff (1992) with *Drall/Hpal* selection. Constructs were verified by restriction mapping, and recombinant clones were screened by double-stranded sequence analysis of the entire ligated cassette. The nucleotide sequence of the mutated region was determined by the dideoxy chain termination method using either single- or double-stranded plasmid DNA (T7 Sequenase v 2.0, Amersham Pharmacia Biotech) in house or sent out for automatic sequencing by

BioST (Lachine, Québec, Canada). cDNA constructs for wild-type and mutated  $\alpha 1$ -subunits were linearized at the 3' end by *HindIII* digestion whereas the rat brain  $\beta 3$ -subunit was digested by *NotI*. Run-off transcripts were prepared using methylated cap analog m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G and T7 RNA polymerase with the mMessage mMachine transcription kit (Ambion, Austin, TX). The final cRNA products were resuspended in DEPC-treated H<sub>2</sub>O and stored at  $-80^{\circ}C$ . The integrity of the final product and the absence of degraded RNA was determined by a denaturing agarose gel stained with ethidium bromide.

### Functional expression of wild-type and mutant channels

Oocytes were obtained from female *Xenopus laevis* clawed frog (Nasco, Fort Atkinson, WI) as described previously (Parent et al., 1995, 1997; Parent and Gopalakrishnan, 1995; Bernatchez et al., 1998). Individual oocytes free of follicular cells were obtained after 30–40 min of incubation in a calcium-free solution (in mM: 82.5 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 Hepes, pH 7.6) containing 2 mg/ml collagenase (Gibco, Burlington, Ontario, Canada). Forty-six nanoliters of a solution containing between 35 and 50 ng of cRNA coding for the wild-type or mutated  $\alpha 1$ -subunit was injected 16 h later into stage V and VI oocytes. The cRNA concentration of the  $\alpha 1$ -subunit was generally adjusted to yield whole-cell peak currents in the 1–5- $\mu A$  range; hence RNA concentration coding for the  $\alpha 1E$  wild-type and mutant channels was established at the lowest end of this range whereas  $\alpha 1C$  wild-type and  $\alpha 1C$  E462R channels were measured after injection with the highest concentration possible. When specified, cRNA coding for rat brain  $\alpha 2b\delta$  (Williams et al., 1992) and rat brain  $\beta 3$  (Castellano et al., 1993) were co-injected with the  $\alpha 1$ -subunit at a 3:1:1 weight ratio. Oocytes were incubated at  $19^{\circ}C$  in a Barth's solution (in mM): 100 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 2.5 pyruvic acid, 100 U/ml penicillin, 50  $\mu g/ml$  gentamicin, pH 7.6. The inactivation properties of each mutant channel herein described was studied in a minimum of three different oocyte batches to account for the typical expression variability encountered from batch to batch. Furthermore, the corresponding wild-type channel ( $\alpha 1E$  in most cases) was systematically injected under the same experimental conditions every time a new mutant was analyzed, thus insuring that the mutant behavior was not caused by some aberrant properties (such as higher level of endogenous  $\beta$ -subunits) (Lacerda et al., 1994; Tareilus et al., 1997) of this particular batch of oocytes. Hence the properties of the wild-type  $\alpha 1E$  channel were analyzed in seven different oocyte batches for the current study.

### Electrophysiological recordings in oocytes

Wild-type and mutant channels were screened at room temperature for macroscopic barium current 4 to 7 days after RNA injection using a two-electrode voltage-clamp amplifier (OC-725C, Warner Instruments, Hamden, CT) as described earlier (Parent et al., 1995, 1997). Voltage and current electrodes were slightly broken under the microscope to decrease the electrode resistance to 0.5–1.5-M $\Omega$  tip resistance and were filled with 3 M KCl, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 7.4). Oocytes were first impaled in a modified Ringer solution (in mM): 96 NaOH, 2 KOH, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES titrated to pH 7.4 with methanesulfonic acid CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H (MeS). The bath was then perfused with the 10 mM Ba<sup>2+</sup> solution (in mM: 10 Ba(OH)<sub>2</sub>, 110 NaOH, 1 KOH, 20 Hepes titrated to pH 7.3 with MeS). To minimize kinetic contamination by the endogenous Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current, oocytes were injected with 18.4 nl of a 50 mM EGTA solution (Sigma, St. Louis, MO) 0.5–2 h before the experiments. Oocytes were superfused by gravity flow at a rate of 2 ml/min, which was fast enough to allow complete chamber fluid exchange within 30 s. Experiments were performed at room temperature (20–22°C).

## Data acquisition and analysis

PClamp software, Clampex 6.02 and Clampfit 6.02 (Axon Instruments, Foster City, CA), was used for on-line data acquisition and analysis. Unless stated otherwise, data were sampled at 10 kHz and low pass filtered at 5 kHz using the amplifier built-in filter. For all recordings, a series of voltage pulses were applied from a holding potential of  $-80$  mV at a frequency of 0.2 Hz from  $-40$  to  $+60$  mV. Isochronal inactivation data ( $h_{\infty}$  or  $h_{in}$ ) were obtained from tail currents generated at the end of a 5-s prepulse (Parent et al., 1995). Tail current amplitudes were estimated using the function Analyze in Clampfit 6.0 from the peak current arising during the first 10 ms after the capacitive transient (20 data points). Each of these currents was then normalized to the maximum current obtained before the prepulse voltage ( $i/i_{max}$ ) and was plotted against the prepulse voltage. For the isochronal inactivation figures, data points represent the mean of  $n \geq 3$  and were fitted to the Boltzmann Eq. 1:

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

Pooled data points (mean  $\pm$  SEM) were fitted to Eq. 1 using user-defined functions and the fitting algorithms provided by Origin 6.0 (Microcal Software, Northampton, MA) analysis software. Eq. 1 accounts for the fraction of non-inactivating current with  $E_{0.5}$ , mid-point potential;  $z$ , slope parameter;  $Y_0$ , fraction of non-inactivating current;  $V_m$ , the prepulse potential; and  $RT/F$  with their usual meanings. The fitting process generated values estimating errors on the given fit values.

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

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

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

As the number of exponential functions needed to account for the inactivation process varied between  $\alpha 1C$  and  $\alpha 1E$  channels, inactivation kinetics were quantified using  $r_{300}$  values, that is, the ratio of the whole-cell current remaining at the end of a 300-ms pulse. As inactivation kinetics can vary with current density, comparisons between constructs and mutants were generally restricted to whole-cell currents lower than  $5 \mu A$  as much as possible. Furthermore, this range of current densities made it easier to voltage clamp the oocyte uniformly, thus decreasing the possibility of series resistance artifacts contaminating the current kinetics data.

Capacitive transients were erased for clarity in the final figures. Statistical analyses and Student  $t$ -test were performed using the fitting routines provided by Origin 5.0 and 6.0 (Microcal Software).

## RESULTS

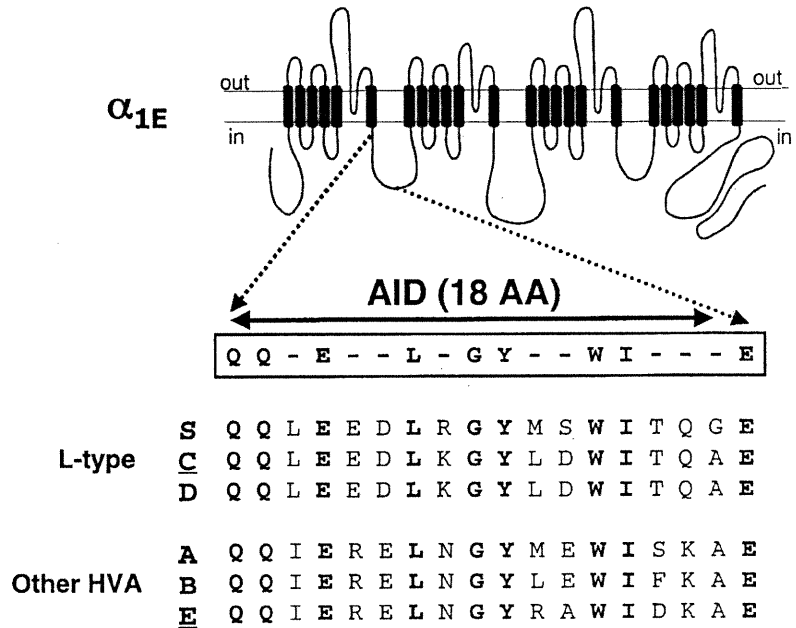
Recent studies have strongly suggested a critical role for the I-II linker and, more precisely, for the  $\beta$ -subunit-binding site (AID) in the inactivation of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels (VDCCs) (Page et al., 1997; Herlitz et al., 1997; Adams and Tanabe, 1997; Cens et al., 1999; Stotz et al., 2000). Some unpublished results from our lab obtained using  $\alpha 1E/\alpha 1C$  chimeras also point toward the high-affinity  $\beta$ -subunit-binding site in the I-II of the  $\alpha 1$ -subunit (AID) as

an important determinant of voltage-dependent inactivation in  $\alpha 1E$  channels (unpublished data). As the AID motif is conserved in all non-T-type  $\alpha 1$ -subunits, this observation suggests a role for nonconserved residues present in the AID domain. It is composed of a short stretch of 18 residues located in the 5' end of the I-II linker. Fig. 1 shows the consensus sequence QQXEXXLXGYXXWIXXXE for the  $\beta$ -subunit-binding site in the six gene families  $\alpha 1S$ ,  $\alpha 1C$ ,  $\alpha 1D$ ,  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ , and  $\alpha 1E$ . Identical residues are shown in bold. Of the nine nonconserved residues, positions 3 and 6 of the AID motif involve conservative mutation from an Iso (I) to a Leu (L) and from a Glu (E) to an Asp (D); position 17 is actually a conserved Ala (A) residue between  $\alpha 1E$  and  $\alpha 1C$ . Position 5 is occupied by an Arg (R) that is strictly conserved in non-L-type and is replaced by a Glu (E) in L-type. Hence we undertook a detailed mutagenesis study of the six nonconservative residues in the AID motif of  $\alpha 1E$  with R378, N381, R384, A385, D388, or K389 alone or in combination.

### Residue R378 is critical for $\alpha 1E$ (Ca<sub>v</sub>2.3) fast inactivation kinetics

Fig. 2 shows a family of whole-cell current recordings obtained in the presence of 10 mM  $Ba^{2+}$  for the wild-type  $\alpha 1E$ , triple-mutant N381K + R384L + A385D, quintuple-mutant N381K + R384L + A385D + D388T + K389Q, and point mutations K389E and R378E expressed in *Xenopus* oocytes on the  $\alpha 2b\delta$  and  $\beta 3$  auxiliary subunit background. Current traces recorded under the same conditions for the modified  $\alpha 1C$  (*XhoI*) channel (used to produce the  $\alpha 1C$  E462R mutant) are shown for comparison. The  $\beta 3$ -subunit was the chosen subunit as it triggers inactivation mostly from the closed state in neuronal  $Ca^{2+}$  channels as opposed to  $\beta 2a$  that favors inactivation from the open state (Patil et al., 1998). The quintuple-mutant NRADK-KLDTQ includes five of the six nonconserved residues between  $\alpha 1E$  and  $\alpha 1C$  in the AID motif. As seen, the triple-mutant NRA-KLD (positions 8, 11, and 12 of AID) and the quintuple-mutant NRADK-KLDTQ (positions 8, 11, 12, 15, and 16 of AID) inactivated like the wild-type  $\alpha 1E$  channel. Similar data were obtained with the quadruple-mutant NRAK-KLDQ (positions 8, 11, 12, and 16 of AID; results not shown). For instance,  $95 \pm 1\%$  ( $n = 21$ ) of the  $\alpha 1E$  whole-cell currents were inactivated at the end of a 300-ms pulse to 0 mV, which is identical to  $96 \pm 1\%$  ( $n = 3$ ) for NRA-KLD,  $96 \pm 1\%$  ( $n = 4$ ) for NRAK-KLDQ, and  $96 \pm 2\%$  ( $n = 5$ ) for NRADK-KLDTQ. In contrast, a single point mutation at position R378 (position 5 in AID) produced whole-cell currents with significantly slower inactivation kinetics with only  $72 \pm 4\%$  ( $n = 13$ ) of the R378E currents being inactivated under the same conditions. Mutation of the positively charged Lys residue at position 389 (position 16 in AID) to a negatively charged Glu (K to E) produced an intermediary inactivation phenotype with  $85 \pm 2\%$  ( $n =$

FIGURE 1 Predicted secondary structure for the human brain  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) channel with the four homologous repeats and the N and the C termini facing the cytoplasm. The  $\beta$ -subunit-binding site on the  $\alpha 1$  subunit (AID) is located within 20 residues of the IS6 transmembrane segment. The consensus sequence for the AID motif (QQxE $\alpha$ LxGY $\alpha$ xWl $\alpha$ xxE) is shown with conserved residues in bold letters. Non-conserved residues are represented by slashes (/) on the figure. The amino acid alignment for L-type ( $\alpha 1S$  ( $Ca_v1.1$ ),  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ), and  $\alpha 1D$  ( $Ca_v1.3$ )) and non-L-type ( $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ),  $\alpha 1B$  ( $Ca_v2.2$ ), and  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ))  $Ca^{2+}$  channels within this region is displayed enlarged. Of the nine "x" sites, positions 3 and 6 of the AID involve conservative mutation from an Iso (I) to a Leu (L) and from a Glu (E) to an Asp (D); position 17 is actually a conserved Ala (A) residue between  $\alpha 1E$  and  $\alpha 1C$ . Position 5 of AID is occupied by an Arg (R) that is strictly conserved in non-L-type and is replaced by a Glu (E) in L-type. These residues correspond to R378 in  $\alpha 1E$  and E462 in  $\alpha 1C$ .



15) of the currents inactivated at the end of a pulse to 0 mV. It should be noted that the milder K389Q mutation achieved within the quadruple and the quintuple mutants produced no significant effect on inactivation (Fig. 2). These rates of inactivation remained significantly faster than the rates observed for  $\alpha 1C$  (*XhoI*), for only  $29 \pm 3\%$  ( $n = 6$ ) of these currents were inactivated under the same conditions. Current density did not appear to play a significant role in

modulating inactivation kinetics in this series of experiments (Table 1). Whole-cell current density was lower for the fast inactivating mutant  $\alpha 1E$  NRA-KLD whereas the largest currents were generally recorded for  $\alpha 1E$  R378E.

Inactivation kinetics were computed using r300 ratios (Peterson et al., 2000), i.e., the fraction of whole-cell currents remaining at the end of a 300-ms pulse (Fig. 3 A). As seen, the rate of inactivation increased slightly with depo-

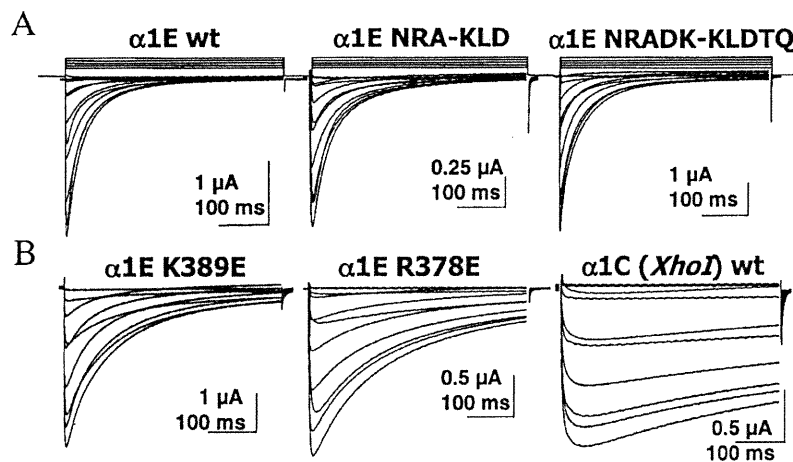


FIGURE 2 The  $\alpha 1E$  wt,  $\alpha 1E$  N381K + R384L + A385D (NRA), and  $\alpha 1E$  N381K + R384L + A385D + D388T + K389Q (NRADK) (A) and  $\alpha 1E$  K389E,  $\alpha 1E$  R378E, and  $\alpha 1C$  (*XhoI*) (B) were expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of  $\alpha 2\beta\delta$  and  $\beta 3$  subunits. Whole-cell currents were recorded using the two-electrode voltage-clamp technique in the presence of 10 mM  $Ba^{2+}$  after injection of EGTA. Holding potential was  $-80$  mV. Oocytes were pulsed from  $-40$  mV to  $+60$  mV using 10-mV steps for 450 ms. Capacitive transients were erased for the first millisecond after the voltage step. All mutants tested expressed significant whole-cell currents. Inactivation kinetics were slower in mutants K389E and R378E. Mutant and wild-type channels displayed similar activation properties (Table 1). Whole-cell currents peaked at  $-4 \pm 2$  mV ( $n = 7$ ) for  $\alpha 1E$ ;  $-3 \pm 3$  mV ( $n = 3$ ) for NRA-KLD;  $-5 \pm 3$  mV ( $n = 4$ ) for NRA-KLDQ;  $-3 \pm 3$  mV ( $n = 3$ ) for NRADK-KLDTQ;  $-3 \pm 2$  mV ( $n = 9$ ) for  $\alpha 1E$  R378E, and  $-4 \pm 2$  mV ( $n = 9$ ) for  $\alpha 1C$  (*XhoI*).

**TABLE 1** Biophysical properties of  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) and  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) channels and mutants

Channels expressed with $\alpha 2\beta\delta/\beta 3$	Inactivation (5 s)		Activation		Peak $I_{Ba}$ ( $\mu A$ )
	$E_{0.5}$ (mV)	$z$	$E_{0.5}$ (mV)	$z$	
$\alpha 1E$ wt	$-64 \pm 3$ (9)	$3.5 \pm 0.4$	$-18 \pm 2$ (9)	$6.1 \pm 0.4$	$-3.7 \pm 1.3$ (21)
$\alpha 1E$ NRA-KLD	$-68 \pm 2$ (7)	$2.8 \pm 0.5$	$-15 \pm 2$ (7)	$6.0 \pm 0.5$	$-1.9 \pm 0.4$ (7)
NRAK-KLDQ	$-64 \pm 3$ (4)	$3.1 \pm 0.5$	$-11 \pm 2$ (4)	$5.7 \pm 0.4$	$-3.6 \pm 1.4$ (4)
NRADK-KLDTQ	$-60 \pm 2$ (3)	$2.8 \pm 0.6$	$-15 \pm 1$ (3)	$5.8 \pm 0.2$	$-2.4 \pm 1.2$ (5)
$\alpha 1E$ K389E	$-60 \pm 3$ (5)	$2.2 \pm 0.7$	$-14 \pm 4$ (9)	$5.4 \pm 0.2$	$-4.1 \pm 1.1$ (15)
$\alpha 1E$ R378K	$-63 \pm 2$ (5)	$3.2 \pm 0.3$	$-14 \pm 3$ (5)	$4.8 \pm 0.3$	$-2.7 \pm 1.5$ (7)
$\alpha 1E$ R378A	$-51 \pm 2$ (6)*	$3.3 \pm 0.2$	$-21 \pm 5$ (6)	$5.1 \pm 0.3$	$-2.6 \pm 0.6$ (7)
$\alpha 1E$ R378Q	$-51 \pm 2$ (8)*	$3.1 \pm 0.2$	$-12 \pm 3$ (8)	$4.8 \pm 0.3$	$-3.1 \pm 0.5$ (8)
$\alpha 1E$ R378G	$-52 \pm 2$ (10)*	$2.9 \pm 0.4$	$-19 \pm 4$ (11)	$6.1 \pm 0.2$	$-3.8 \pm 1.0$ (11)
$\alpha 1E$ R378D	$-46 \pm 3$ (11) <sup>†</sup>	$2.7 \pm 0.3$	$-16 \pm 3$ (9)	$6.2 \pm 0.5$	$-3.5 \pm 0.7$ (14)
$\alpha 1E$ R378E	$-44 \pm 2$ (10) <sup>†</sup>	$2.3 \pm 0.5$	$-14 \pm 3$ (14)	$5.5 \pm 0.3$	$-4.6 \pm 1.7$ (14)
$\alpha 1C$ E462R	$-31 \pm 2$ (12) <sup>†</sup>	$4.2 \pm 0.2$	$-14 \pm 4$ (8)	$6.7 \pm 0.5$	$-2.0 \pm 0.4$ (12)
$\alpha 1C$ ( <i>Xhol</i> )	$-23 \pm 3$ (8) <sup>‡</sup>	$3.4 \pm 0.4$	$-13 \pm 5$ (8)	$9 \pm 2$	$-3.3 \pm 0.3$ (9)
$\alpha 1C$ wt	$-20 \pm 4$ (12) <sup>‡</sup>	$3.1 \pm 0.4$	$-11 \pm 3$ (7)	$10 \pm 2$	$-3.9 \pm 0.5$ (17)

Biophysical parameters of  $\alpha 1E$  and  $\alpha 1C$  wild-type (wt) and mutant channels expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of  $\alpha 2\beta\delta$  and  $\beta 3$  subunits. Whole-cell currents were measured in 10 mM  $Ba^{2+}$  throughout. The voltage dependence of inactivation was determined after 5-s pulses from  $-100$  to  $+50$  mV as shown on Fig. 6. Relative currents were fitted to Boltzmann Eq. 1. Activation data were estimated from the mean  $I-V$  relationships and fitted to Boltzmann Eq. 2. Peak  $I_{Ba}$  was determined from  $I-V$  relationships for the corresponding experiments. The data are shown with the mean  $\pm$  SEM and the number of samples ( $n$ ) appears in parentheses. Significance of difference between  $\alpha 1E$  and other channels is given by \* $p < 0.05$ , <sup>†</sup> $p < 0.005$ , and <sup>‡</sup> $p < 0.001$ .

larization for the  $\alpha 1E$  wild-type and mutant channels.  $\alpha 1E$  NRA-KLD, NRAK-KLDQ (results not shown), and NRADK-KLDTQ mutants behaved like the wild-type  $\alpha 1E$  at all potentials tested. In contrast, the  $r_{300}$  ratios were significantly higher for  $\alpha 1E$  R378E ( $p < 0.002$ ) and  $\alpha 1E$  K389E ( $p < 0.05$ ) as compared with  $\alpha 1E$ . Altogether, these results suggest that fast inactivation in  $\alpha 1E$  depends on the nature of residues at positions 5 and 16 of the AID.

The activation potentials were estimated from the mean peak current-voltage relationships (Fig. 3 B). Activation potentials were similar for NRA-KLD, NRADK-KLDTQ (results not shown), and  $\alpha 1E$  wt with  $E_{0.5}$  values around  $-17$  mV and slightly more positive for the quadruple-mutant NRAK-KLDQ with  $E_{0.5} = -11$  mV (see Table 1 for the exact values). Whereas inactivation kinetics were significantly slower for  $\alpha 1E$  K389E and R378E, both mutants were found to activate in a range of potentials not significantly different than  $\alpha 1E$  wt (Table 1).

### Position 5 in the AID motif influences the voltage dependence of $\alpha 1E$ ( $Ca_v2.3$ ) inactivation

If inactivation kinetics reflect the rate of transition to the inactivated state(s), the isochronal inactivation data provide the voltage range where channels are most likely to inactivate. The voltage dependence of inactivation was assessed from the relative tail currents measured after a series of 5-s depolarizations. Fig. 3 C shows a family of isochronal inactivation data for the wild-type  $\alpha 1E$  channel, NRA-KLD, NRAK-KLDQ (results not shown), NRADK-KLDTQ, K389E, R378E, and  $\alpha 1C$  wt. Mid-potentials of inactivation ( $E_{0.5}$ ) were estimated from Boltzmann fits (Eq. 1). The

voltage dependence of the isochronal inactivation for the first four mutant channels were comparable, with  $E_{0.5}$  varying from  $-60$  mV (NRADK and K389E) to  $-68$  mV (NRA). These values were not significantly different from the  $E_{0.5}$  of  $-64$  mV for wild-type  $\alpha 1E$  channels (Table 1). Hence, most mutants in the AID motif inactivated in the same voltage range as the wild-type  $\alpha 1E$  channel. Only mutant R378E experienced a significant shift in its voltage dependence of inactivation toward more positive potentials as compared with the wild-type  $\alpha 1E$  with a  $E_{0.5} = -44$  mV. This change in the voltage dependence of inactivation of  $\alpha 1E$  R378E occurred without any significant shift in the voltage dependence of activation (Table 1).

### Structural requirements for fast inactivation kinetics at position 378 of $\alpha 1E$ ( $Ca_v2.3$ )

Of the six nonconserved residues in the AID motif, only R378 was shown to affect both the kinetics and voltage dependence of inactivation. A series of point mutations was thus undertaken to evaluate the importance of the charge, the volume, and the hydrophilicity of the residue 378 in the  $\alpha 1E$  inactivation process. Fig. 4 shows the family of whole-cell  $Ba^{2+}$  current traces of mutants R378K, R378Q, R378A, R378G, R378D, and R378E after expression in *Xenopus* oocytes. Mutant  $\alpha 1E$  R378K displayed the fastest inactivation kinetics closely followed by R378A and R378Q. At  $-10$  mV, the rate of inactivation ranked as follows (from the fastest to the slowest)  $\alpha 1E$  wt  $\approx$  R378K  $\approx$  R378A  $>$  R378Q  $\gg$  R378G  $\approx$  R378D  $\approx$  R378E as seen by the  $r_{300}$  analysis shown in Fig. 5 A. This ranking remained true at voltages between  $-10$  and  $+20$  mV, although inactivation

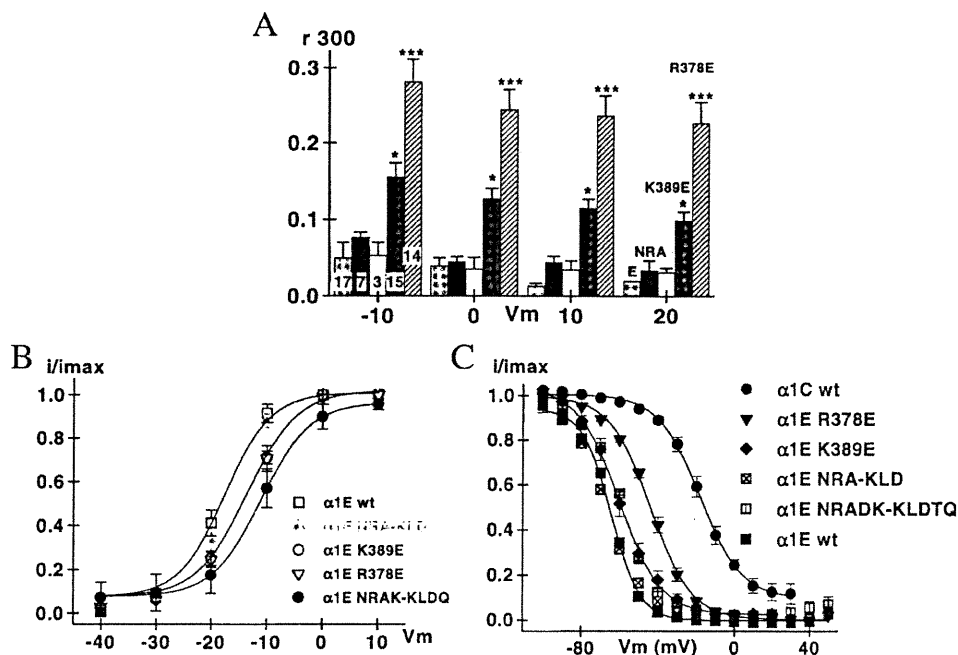


FIGURE 3 (A) The mean r300 ratios (the fraction of the whole-cell current remaining at the end of a 300-ms pulse) are shown  $\pm$  SEM at four voltages from  $-10$  to  $+20$  mV for  $\alpha 1E$  wt (light gray),  $\alpha 1E$  N381K + R384L + A385D (NRA) (black),  $\alpha 1E$  N381K + R384L + A385D + D388T + K389Q (NRADK) (white),  $\alpha 1E$  K389E (dark gray), and  $\alpha 1E$  R378E (hatched) from left to right as measured in  $10$  mM  $Ba^{2+}$ . The numbers on the columns refer to the numbers of experiments ( $n$ ) used for statistical analysis. The r300 ratios varied from  $0.05 \pm 0.02$  at  $-10$  mV to  $0.02 \pm 0.01$  ( $n = 17$ ) at  $+20$  mV for  $\alpha 1E$  and from  $0.05 \pm 0.02$  at  $-10$  mV to  $0.03 \pm 0.01$  ( $n = 14$ ) at  $+20$  mV for NRADK-KLDQ, NRAK-KLDQ, and NRA-KLD mutants when the data are pooled together. In contrast, r300 ratios were significantly different between  $\alpha 1E$  wt and  $\alpha 1E$  K389E ( $p < 0.01$ ) varying from  $0.16 \pm 0.02$  at  $-10$  mV to  $0.10 \pm 0.01$  ( $n = 15$ ) at  $+20$  mV for  $\alpha 1E$  K389E. The r300 ratios were also significantly different between  $\alpha 1E$  wt and  $\alpha 1E$  R378E ( $p < 0.002$ ) with values from  $0.33 \pm 0.04$  at  $-10$  mV to  $0.27 \pm 0.03$  ( $n = 14$ ) at  $+20$  mV for R378E. (B) Activation potentials were estimated from the mean normalized current-voltage relationships. The relative data points were plotted against the test voltage and were fitted to Boltzmann Eq. 2. The activation potentials were comparable for  $\alpha 1E$  wt, NRA-KLD, NRAK-KLDQ, NRADK-KLDQ (results not shown),  $\alpha 1E$  K389E, and  $\alpha 1E$  R378E. The fit values are given in Table 1. (C) The voltage dependence of inactivation was measured after a 5-s conditioning prepulse applied between  $-100$  and  $+50$  mV. The protocol is shown in detail in Fig. 6. The voltage dependence of inactivation was not significantly different for  $\alpha 1E$  wt, NRA-KLD, NRAK-KLDQ (results not shown), NRADK-KLDQ, and  $\alpha 1E$  K389E with  $E_{0.5}$  varying from  $-68$  to  $-60$  mV. In contrast, the mid-potential of inactivation for R378E was  $-44 \pm 2$  mV ( $n = 10$ ). Fit values are shown in Table 1.

kinetics tended to get faster with membrane depolarization especially for mutants R378Q, R378G, R378D, and R378E. The rate of R378K inactivation was comparable to  $\alpha 1E$  at  $-10$  and  $0$  mV but differed slightly at higher membrane potential as its inactivation kinetics remained relatively insensitive to depolarization. For R378Q, the r300 ratio was significantly ( $p < 0.05$ ) different from R378K at  $-10$  mV, but these differences were attenuated at  $+20$  mV. The r300 ratios for the neutral residue R378A were noticeably similar to R378K and to the wild-type  $\alpha 1E$  channel at all membrane potentials. R378A, a small and neutral residue, behaved like R378K, but R378G, which is also a small and neutral residue, behaved like negatively charged mutants R378D and R378E. Altogether, these results suggest that positively charged residues at this position may stimulate faster inactivation kinetics whereas negatively charged residues could trigger slower rates of inactivation. However, the effects of the neutral residues (A, Q, and G) cannot be simply explained in terms of either charge or size. Furthermore, none

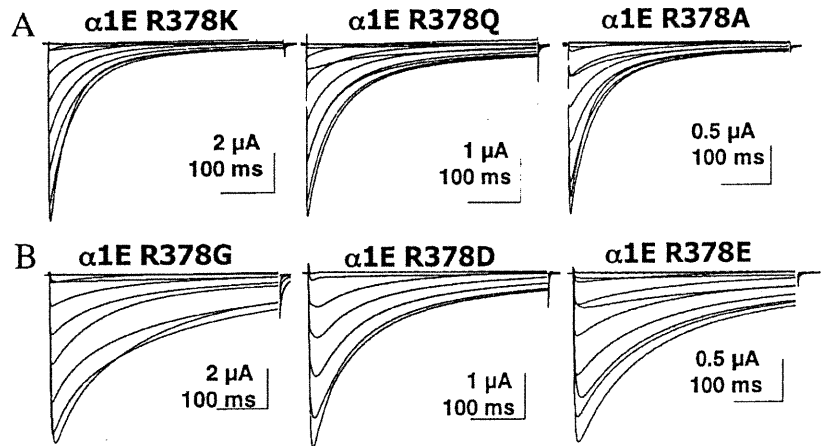
of the point mutations cause the  $\alpha 1E$  channel to inactivate in the same voltage range as the wild-type  $\alpha 1C$ .

The slower inactivation kinetics for R378 mutants were not correlated with any apparent change in their activation kinetics. Furthermore, the activation potentials  $E_{0.5}$  for mutants R378E, R378D, R378G, R378A, and R378K were comparable to the  $E_{0.5}$  for the wild-type  $\alpha 1E$  channel. Only R378Q appeared to activate at membrane potentials slightly more positive than the wild-type  $\alpha 1E$  channel. Hence, the reported shifts in the inactivation potentials for the R378 mutants were probably not linked to changes in whole-cell activation properties.

### Mutations at position 378 affect voltage-dependent inactivation of the human $\alpha 1E$ ( $Ca_v2.3$ )

The next series of experiments was undertaken to evaluate whether the charge of the side-chain at position 378 played

FIGURE 4 Mutants  $\alpha 1E$  R378K,  $\alpha 1E$  R378Q, and  $\alpha 1E$  R378A (A) and  $\alpha 1E$  R378G,  $\alpha 1E$  R378D, and  $\alpha 1E$  R378E (B) were expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of  $\alpha 2b\delta$  and  $\beta 3$  subunits. Current traces were obtained in the presence of 10 mM  $Ba^{2+}$  after injection of EGTA. Holding potential was  $-80$  mV. Oocytes were pulsed from  $-40$  mV to  $+60$  mV using 10-mV steps for 450 ms. Capacitive transients were erased for the first millisecond after the voltage step. All mutants tested expressed significant whole-cell currents. Inactivation kinetics appeared slower in mutants R378G, R378D, and R378E.



a role in the voltage range where  $\alpha 1E$  channels inactivate. Fig. 6 shows the isochronal inactivation data measured after 5-s pulses were applied from  $-100$  mV to voltages between  $-100$  and  $+50$  mV. Typical current traces are shown for the wild-type  $\alpha 1E$  and mutants R378K, R378Q, and R378E with an example of the voltage protocol used. The inactivation data for  $\alpha 1E$  R378K superimposed quite closely with the inactivation data points for the wild-type  $\alpha 1E$  (Table 1). In contrast, inactivation data points are shifted to the right for mutants  $\alpha 1E$  R378A, R378Q, R378G, R378D, and R378E and lay halfway between  $\alpha 1C$  and  $\alpha 1E$ . Mid-potentials of inactivation ranged from  $E_{0.5} = -52$  mV for R378G to  $E_{0.5} = -44$  mV for R378E. As seen above, the shifts in the voltage dependence of inactivation were not accompanied by any significant shift in the activation potentials (Table 1).

### The reverse mutation E462R triggers faster inactivation kinetics in $\alpha 1C$ (Ca<sub>v</sub>1.2)

The alignment shown in Fig. 1 pointed out that the positively charged arginine (R) residue in non-L-type  $Ca^{2+}$  channels is replaced by a glutamate (E) residue that is conserved in all L-type channels. Replacement of residue 378 with the corresponding residue of  $\alpha 1C$  was shown to slow inactivation kinetics and shift the voltage dependence of inactivation. The reverse mutation of E to R in the brain  $\alpha 1C$  channel has already been examined and was actually shown to speed up inactivation of the slower  $\alpha 1C$  channel (Herlitz et al., 1997). To compare the inactivation properties of  $\alpha 1E$  R378E and  $\alpha 1C$  E462R under our experimental conditions, we performed the  $\alpha 1C$  E462R mutation and expressed it in *Xenopus* oocytes. Fig. 7 A shows whole-cell current traces for  $\alpha 1E$ ,  $\alpha 1C$  E462R,  $\alpha 1E$  R378E, and  $\alpha 1C$  that were scaled and superimposed at membrane potentials between  $-10$  and  $+10$  mV. As seen on Fig. 7 B,  $\alpha 1C$  E462R and  $\alpha 1E$  R378E inactivated with a similar time course that turned out to be intermediary between the fast

$\alpha 1E$  and the slow  $\alpha 1C$  channel at all voltages with r300 ratios of  $\sim 0.3$  in both cases. In contrast, r300 ratios for  $\alpha 1C$  wt and  $\alpha 1C$  (*XhoI*) are higher with values of  $\sim 0.7$ . As seen, the inactivation kinetics for the modified  $\alpha 1C$  (*XhoI*) channel used for making  $\alpha 1C$  E462R were compiled and were found to be similar to the wild-type  $\alpha 1C$  channel. Hence, neither point mutation in  $\alpha 1E$  or  $\alpha 1C$  could completely reverse the inactivation phenotype to the opposite wild-type channel. As inactivation kinetics of  $\alpha 1C$  are exquisitely sensitive upon the current density, it should be pointed out that the current density for  $\alpha 1C$  E462R was in average smaller than for  $\alpha 1C$  (*XhoI*), ruling out current density as a critical factor for the faster inactivation kinetics (Table 1).

The voltage dependence of inactivation was next studied for mutant  $\alpha 1C$  E462R (5-s prepulses) and compared with  $\alpha 1E$ ,  $\alpha 1E$  R378E, and  $\alpha 1C$  (*XhoI*) (Fig. 7 C). As compared with the  $\alpha 1C$  (*XhoI*) channel, the inactivation data points for  $\alpha 1C$  E462R were shifted to the left by  $-10$  mV, but they remained significantly more positive than the inactivation curve for  $\alpha 1E$  R378E. Furthermore, the slope of the fit was much steeper for  $\alpha 1C$  E462R than for any other mutant tested in this study.

Given the fact that the I-II linker could also be involved in calcium-dependent inactivation (Adams and Tanabe, 1997), the inactivation kinetics of  $\alpha 1C$  E462R were also measured in the presence of 10 mM  $Ca^{2+}$ . Like the wild-type  $\alpha 1C$ ,  $\alpha 1C$  E462R was found to inactivate significantly faster in the presence of  $Ca^{2+}$  ions. For instance, the r300 ratios went from  $0.39 \pm 0.04$  ( $n = 6$ ) in  $Ba^{2+}$  to  $0.14 \pm 0.01$  ( $n = 3$ ) in  $Ca^{2+}$  at  $-10$  mV and from  $0.26 \pm 0.02$  ( $n = 6$ ) in  $Ba^{2+}$  to  $0.014 \pm 0.001$  ( $n = 3$ ) in  $Ca^{2+}$  at  $+20$  mV. These numbers compare well with the r300 ratios for  $\alpha 1C$  under the same  $Ca^{2+}$  conditions with  $0.13 \pm 0.03$  at  $-10$  mV and  $0.14 \pm 0.01$  at  $+20$  mV ( $n = 8$ ). This result indicates that mutations in the AID motif that disrupt voltage-dependent inactivation may not necessarily impair calcium-dependent inactivation, and further suggests that AID may not be the blocking particle common to both voltage-



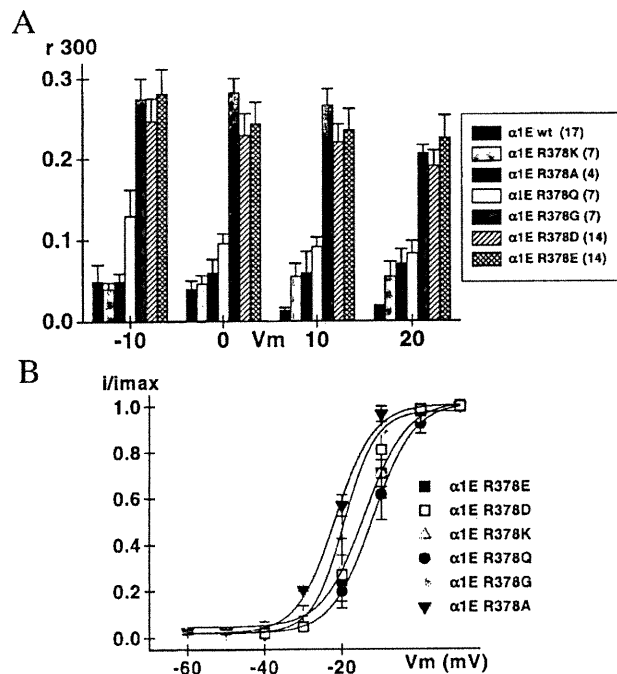


FIGURE 5 (A). Whole-cell currents obtained in the presence of 10 mM  $Ba^{2+}$ . The mean r300 ratios (the fraction of the whole-cell current remaining at the end of a 300-ms pulse) are shown  $\pm$  SEM at four voltages from  $-10$  to  $+20$  mV for  $\alpha 1E$  wt (black),  $\alpha 1E$  R378K (light gray),  $\alpha 1E$  R378A (dark gray),  $\alpha 1E$  R378Q (white),  $\alpha 1E$  R378G (gray),  $\alpha 1E$  R378D (hatched), and  $\alpha 1E$  R378E (cross-hatched) from left to right. At  $-10$  mV, the r300 ratios for  $\alpha 1E$  R378K and  $\alpha 1E$  R378A were not significantly different from  $\alpha 1E$  wt whereas those for  $\alpha 1E$  R378Q were different at  $p < 0.05$  and those for  $\alpha 1E$  R378G,  $\alpha 1E$  R378D, and  $\alpha 1E$  R378E were significantly different at  $p < 0.002$ . The r300 ratios went from  $0.04 \pm 0.01$  at  $-10$  mV and  $0.05 \pm 0.02$  at  $+20$  mV ( $n = 7$ ) for R378K, from  $0.05 \pm 0.01$  at  $-10$  mV to  $0.06 \pm 0.02$  at  $+20$  mV ( $n = 4$ ) for R378A, from  $0.13 \pm 0.03$  at  $-10$  mV to  $0.08 \pm 0.02$  at  $+20$  mV ( $n = 7$ ) for R378Q, from  $0.27 \pm 0.03$  at  $-10$  mV and  $0.21 \pm 0.01$  at  $+20$  mV ( $n = 7$ ) for R378G, from  $0.25 \pm 0.03$  at  $-10$  mV to  $0.19 \pm 0.02$  at  $+20$  mV ( $n = 14$ ) for R378D, and from  $0.28 \pm 0.03$  at  $-10$  mV to  $0.23 \pm 0.03$  at  $+20$  mV ( $n = 14$ ) for R378E as compared with  $0.05 \pm 0.02$  at  $-10$  mV and  $0.02 \pm 0.01$  at  $+20$  mV ( $n = 17$ ) for  $\alpha 1E$ . The number ( $n$ ) of experiments is shown in parentheses. (B) Activation potentials were estimated from the mean normalized current-voltage relationships. The relative data points were plotted against the test voltage and were fitted to Boltzmann Eq. 2. The activation potentials were comparable for all mutants although they increased slightly from  $\alpha 1E$  R378A  $\approx$   $\alpha 1E$  R378G  $\approx$   $\alpha 1E$  wt  $<$   $\alpha 1E$  R378K  $\approx$   $\alpha 1E$  R378D  $\approx$   $\alpha 1E$  R378E  $<$   $\alpha 1E$  R378Q. Table 1 contains the actual fit values.

and calcium-dependent inactivation mechanisms (Cens et al., 1999).

### $\beta$ -Subunit regulation is preserved in $\alpha 1E$ R378E and $\alpha 1C$ E462R channel mutants

As  $\beta$ -subunits are known to modulate the inactivation kinetics of the  $\alpha 1$ -subunit and to bind to the AID site (Pragnell et al., 1994), the next series of experiments was under-

taken to examine the possibility that the altered inactivation kinetics of  $\alpha 1E$  R378E and  $\alpha 1C$  E462R were secondary to a modification in the coupling between  $\beta 3$  and  $\alpha 1$ -subunits as all previous experiments were performed in the presence of a full complement of auxiliary  $\alpha 2b\delta$ - and  $\beta 3$ -subunits. The objectives were twofold: 1) to explore whether modifications in nonconserved residues in AID could influence  $\beta$ -subunit modulation of the inactivation kinetics and 2) to evaluate whether the changes in the inactivation kinetics were intrinsically determined by the  $\alpha 1$ -subunit. Mutant  $\alpha 1E$  R378E and  $\alpha 1C$  E462R were expressed in *Xenopus* oocytes in the presence ( $\alpha 2b\delta/\beta 3$ ) and in the absence of  $\beta 3$  with only  $\alpha 2b\delta$  as ancillary subunit (Fig. 8). Whole-cell currents were recorded in the presence of 10 mM  $Ba^{2+}$  under strictly paired conditions (same day of expression, same oocyte batch) to minimize nonspecific effects. The presence of  $\beta 3$  induced a leftward shift of the peak voltage by  $-10$  mV for both  $\alpha 1C$  E462R and  $\alpha 1E$  R378E (results not shown), which is similar to what has been reported before for the wild-type channels (Parent et al., 1997). The voltage dependence of inactivation estimated from isochronal measurements at 5 s was shifted to the left in the presence of  $\beta 3$  with  $E_{0.5} = -11 \pm 2$  mV ( $n = 4$ ) ( $-\beta 3$ ) and  $E_{0.5} = -26 \pm 2$  mV ( $n = 6$ ) ( $+\beta 3$ ) for  $\alpha 1C$  E462R and  $E_{0.5} = -26 \pm 1$  mV ( $n = 3$ ) ( $-\beta 3$ ) and  $E_{0.5} = -44 \pm 1$  mV ( $n = 3$ ) ( $+\beta 3$ ) for  $\alpha 1E$  R378E (results not shown). It thus appears that the mutants retained some modulation by the  $\beta 3$ -subunit despite structural rearrangements in the main  $\beta$ -subunit-binding site.

The time courses of inactivation for  $\alpha 1C$  E462R and  $\alpha 1E$  R378E remained comparable to each other whether it was measured in the absence (left panel) or in the presence of  $\beta 3$  (right panel) under all conditions except at  $-10$  mV in the absence of  $\beta 3$  as it can be inferred from the r300 ratio analysis (lower left panel). Moreover, the inactivation kinetics of both mutants remained significantly slower than  $\alpha 1E$  ( $p < 0.005$ ) under all conditions. The inactivation kinetics of  $\alpha 1C/\alpha 2b\delta$  were not reported as its expression in oocytes never rose above background currents. Co-injection with the  $\beta 3$ -subunit led to an apparent increase in inactivation kinetics for both mutants, which was confirmed by the r300 analysis. Hence, the inactivation kinetics remained similar for  $\alpha 1E$  R378E and  $\alpha 1C$  E462R in the absence of  $\beta 3$ .

## DISCUSSION

### Position R378 in the AID motif is critical in $\alpha 1E$ ( $Ca_v2.3$ ) inactivation

In this study, the molecular determinants of voltage-dependent inactivation in the  $\alpha 1E$   $Ca^{2+}$  channel were investigated following mutations within the high-affinity  $\beta$ -subunit-binding site (AID) of the I-II linker. The AID motif is composed of a stretch of 18 amino acids located about at the 5' end of the I-II linker that reads QQXEXXLXGYX-

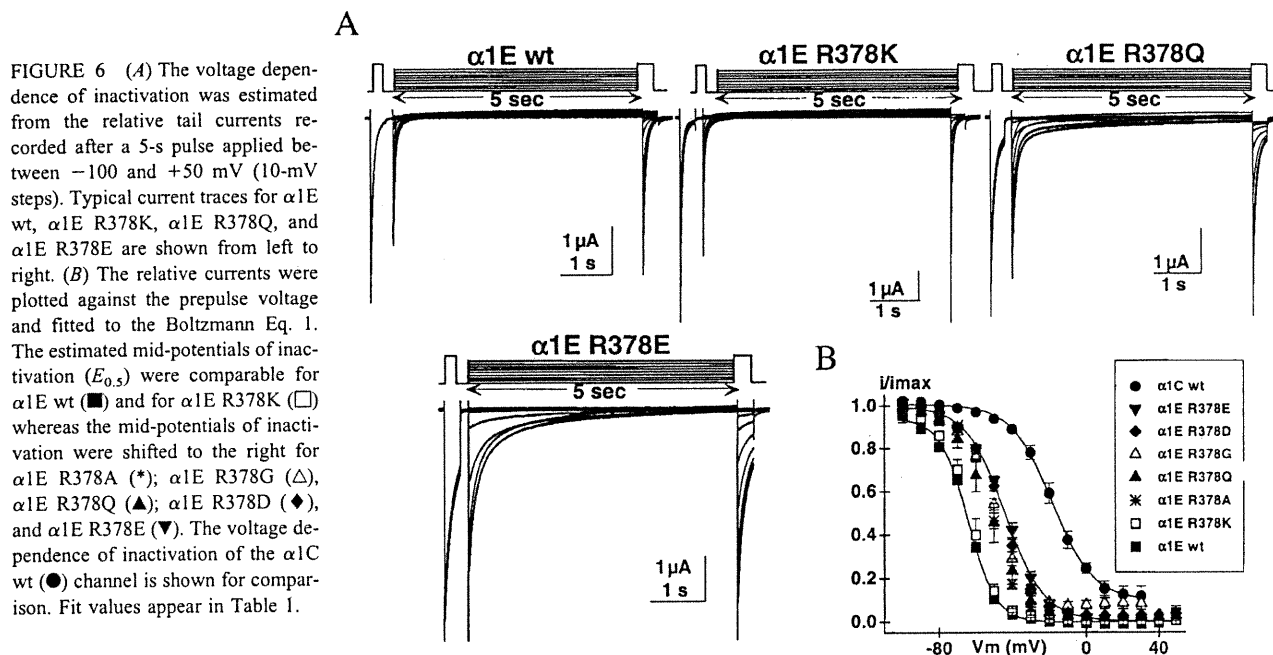


FIGURE 6 (A) The voltage dependence of inactivation was estimated from the relative tail currents recorded after a 5-s pulse applied between  $-100$  and  $+50$  mV (10-mV steps). Typical current traces for  $\alpha 1E$  wt,  $\alpha 1E$  R378K,  $\alpha 1E$  R378Q, and  $\alpha 1E$  R378E are shown from left to right. (B) The relative currents were plotted against the prepulse voltage and fitted to the Boltzmann Eq. 1. The estimated mid-potentials of inactivation ( $E_{0.5}$ ) were comparable for  $\alpha 1E$  wt (■) and for  $\alpha 1E$  R378K (□) whereas the mid-potentials of inactivation were shifted to the right for  $\alpha 1E$  R378A (\*);  $\alpha 1E$  R378G ( $\Delta$ ),  $\alpha 1E$  R378Q ( $\blacktriangle$ );  $\alpha 1E$  R378D ( $\blacklozenge$ ), and  $\alpha 1E$  R378E ( $\blacktriangledown$ ). The voltage dependence of inactivation of the  $\alpha 1C$  wt ( $\bullet$ ) channel is shown for comparison. Fit values appear in Table 1.

XWIXXXE. Considering that the I-II linker has recently emerged as an active participant in the inactivation of voltage-dependent calcium channels, we became interested in probing the role of the nonconserved residues in AID through a detailed mutational analysis at this site in  $\alpha 1E$ . Of the nine nonconserved residues, six positions involving significant changes in charge and/or size, as compared with the same sequence in  $\alpha 1C$ , were more thoroughly studied: R378E, N381K, R384L, A385D, D388T, K389Q, and K389E. All mutants tested expressed significant whole-cell currents after expression in *Xenopus* oocytes in the presence of  $\alpha 2b\delta$  and  $\beta 3$ -subunits. Some of these mutations were studied globally as they were included either in the triple (NRA-KLD), quadruple (NRAK-KLDQ), or the quintuple mutant (NRADK-KLDTQ). Neither multiple mutant displayed significant changes in their kinetics or voltage dependence of inactivation as compared with the wild-type  $\alpha 1E$ . In contrast, single point mutations of positively charged residues K to E at position K389 and the R to E mutation at position R378 significantly slowed the rate of inactivation. Of the two mutants, only the voltage dependence of inactivation of  $\alpha 1E$  R378E was affected with  $\sim +20$ -mV shift in its mid-potential of inactivation as compared with  $\alpha 1E$  wt. A series of mutations at the R378 position indicated that the net charge carried by the side-chain could play a role in the inactivation kinetics, although the net charge carried by the residue could not explain by itself the effects of R378A, R378G, and R378Q (see below). Alterations in the inactivation properties occurred without any significant difference in the activation properties, hence suggesting that the inactivated state was intrinsically mod-

ified by the R378E mutation. The same observation was made for the family of mutants analyzed in this study. However this conclusion regarding the absence of change in the activation potential, remains preliminary in the absence of single-channel data. The relationship between activation and inactivation states cannot be simply overlooked as they are often coupled in voltage-dependent cation channels (Patil et al., 1998).

The reverse mutation E to R in  $\alpha 1C$  was also shown to speed up inactivation and to shift the voltage dependence of inactivation to more negative membrane potentials (Fig. 7). The rates of  $\alpha 1C$  E462R and  $\alpha 1E$  R378E inactivation were both significantly altered and were almost indistinguishable at  $+20$  mV. However, neither point mutation at this position in  $\alpha 1E$  or  $\alpha 1C$  channels could completely reverse the inactivation phenotype. Similarly, a series of experiments have shown that the I-II loop from either  $\alpha 1B$  or  $\alpha 1A$  produced intermediary inactivation kinetics when inserted into  $\alpha 1E$  channels but could not completely reverse the inactivation kinetics of  $\alpha 1E$  (Page et al., 1997). The role of the AID motif in inactivation kinetics has been previously demonstrated in  $\alpha 1A$  and  $\alpha 1C$  channels (Herlitz et al., 1997; Sokolov et al., 1999), but this is the first report that the nonconserved R (Arg) residue in the AID motif may contribute to the inactivation phenotype of  $\alpha 1E$ . Hence, the 5th position of the AID motif could be a universal determinant of inactivation in non-T-type  $Ca^{2+}$  channels.

The AID motif has been intensively studied in  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1C$ , and  $\alpha 1E$  channels mostly in terms of its role in G-protein modulation (Toth et al., 1996; Bourinet et al., 1996; Mehrke et al., 1997; Page et al., 1998). Interestingly,

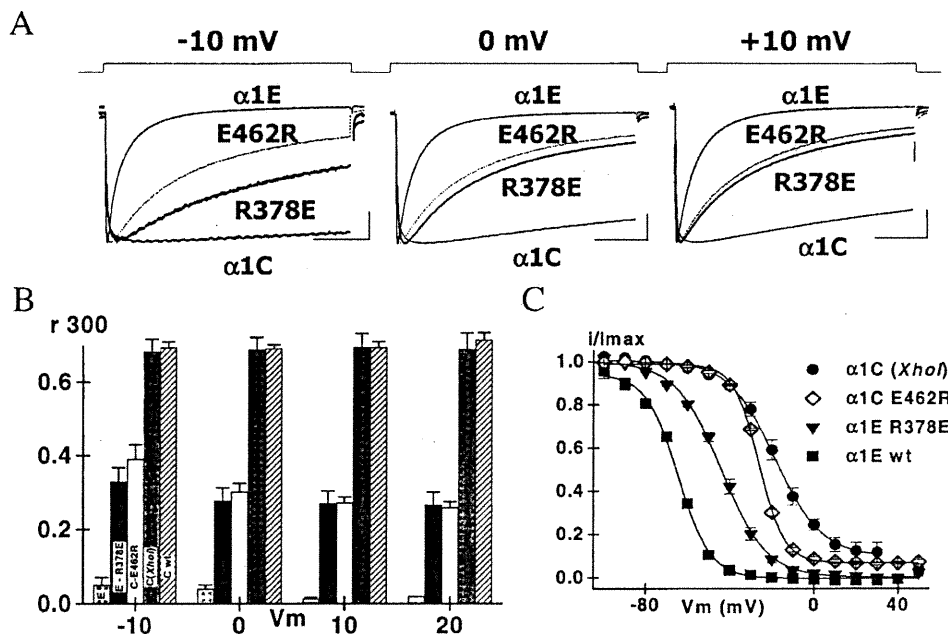


FIGURE 7 (A) Whole-cell currents obtained in the presence of 10 mM  $Ba^{2+}$  for  $\alpha 1E$  wt,  $\alpha 1C$  E462R,  $\alpha 1E$  R378E, and  $\alpha 1C$  wt were scaled and superimposed at the voltages of  $-10$  (left),  $0$  (middle), and  $+10$  mV (right). All  $\alpha 1$  subunits were co-injected with  $\alpha 2b\delta$  and  $\beta 3$  subunits. Mutant  $\alpha 1C$  E462R and  $\alpha 1E$  R378E inactivated following a time course intermediary between  $\alpha 1E$  and  $\alpha 1C$  at all membrane potentials. (B) The mean r300 ratios calculated for the same channels are shown  $\pm$  SEM at four voltages from  $-10$  to  $+20$  mV for  $\alpha 1E$  wt (light gray),  $\alpha 1E$  R378E (dark gray),  $\alpha 1E$  E462R (white),  $\alpha 1C$  (*Xhol*) (gray), and  $\alpha 1C$  wt (hatched) from left to right. The r300 ratios went from  $0.05 \pm 0.02$  at  $-10$  mV and  $0.02 \pm 0$  at  $+20$  mV ( $n = 17$ ) for  $\alpha 1E$ , from  $0.33 \pm 0.04$  at  $-10$  mV to  $0.27 \pm 0.03$  at  $+20$  mV ( $n = 14$ ) for  $\alpha 1E$  R378E, from  $0.39 \pm 0.04$  at  $-10$  mV to  $0.26 \pm 0.02$  at  $+20$  mV ( $n = 6$ ) for  $\alpha 1C$  E462R, from  $0.68 \pm 0.03$  at  $-10$  mV to  $0.69 \pm 0.04$  at  $+20$  mV ( $n = 6$ ) for  $\alpha 1C$  (*Xhol*), and from  $0.69 \pm 0.01$  at  $-10$  mV to  $0.71 \pm 0.02$  at  $+20$  mV ( $n = 9$ ) for  $\alpha 1C$  wt. (C) The voltage dependence of inactivation was estimated from the relative tail currents recorded after 5-s pulses. Normalized currents were fitted to the Boltzmann Eq. 1. The estimated mid-potential of inactivation ( $E_{0.5}$ ) for  $\alpha 1C$  E462R ( $\diamond$ ) was more negative than for the  $\alpha 1C$  (*Xhol*) construct ( $\bullet$ ) but more positive than for  $\alpha 1E$  R378E ( $\blacktriangledown$ ) and  $\alpha 1E$  wt ( $\blacksquare$ ). The fit values are shown in detail in Table 1.

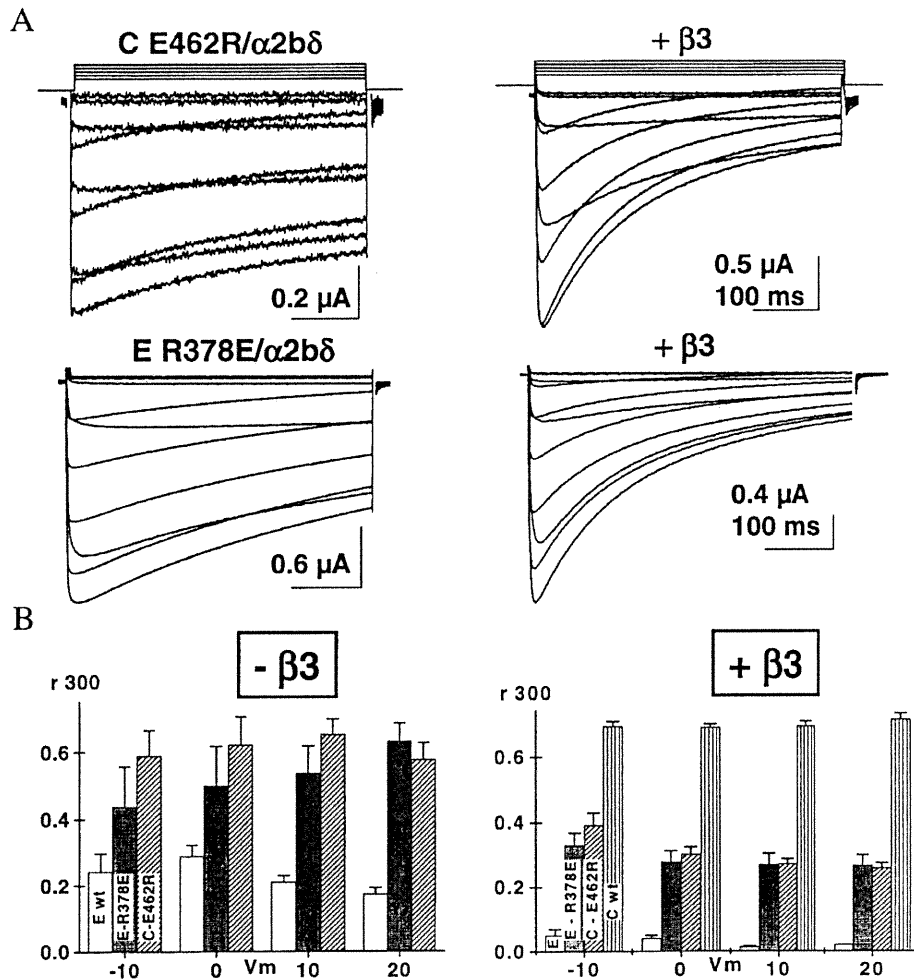
the R-to-E mutation at the same position of the AID motif has also been shown to eliminate G-protein regulation in  $\alpha 1A$  (Herlitze et al., 1997). However, it failed to affect G-protein modulation in  $\alpha 1B$  channels (Zhang et al., 1996) as did the reverse mutation E to R fail to bestow G-protein modulation to  $\alpha 1C$  channels (Zhang et al., 1996). Despite these small discrepancies, these results suggest that the I-II linker may be specialized to serve as a modulatory domain for  $Ca^{2+}$  channel gating with the Arg (R) at position 5 playing a determinant role in many overlapping processes (Zamponi et al., 1997; DeWaard et al., 1997; Herlitze et al., 1997).

#### A positive residue in the QQXXER motif triggers fast inactivation of $\alpha 1E$ ( $Ca_v2.3$ )

Only the mutation of the positively charged residue (R378) to negatively charged ones (E or D) at the 5th position of the QQXXER motif affected both the kinetics and voltage dependence of inactivation. Experiments were undertaken to investigate the role of electrostatic interaction in the inactivation kinetics of  $\alpha 1E$  with additional mutants R378K (positive), R378A (nonpolar and neutral), R378G (polar but

neutral), R378Q (polar but neutral), and R378D (negative). At first glance, an electrostatic interaction appears to play a determinant role in the inactivation properties, as  $\alpha 1E$  R378K was the only mutant to reproduce the wild-type inactivation kinetics and voltage dependence. In contrast, negatively charged mutants R378D and R378E showed the slowest inactivation properties. However, such an interpretation falls short of explaining the behavior of neutral mutants R378A, R378G, and R378Q. Mutant R378A inactivated like R378K between  $-10$  mV and  $+20$  mV. R378Q displayed intermediary inactivation kinetics at  $-10$  mV but tended to inactivate like R378K at  $+20$  mV. R378G produced, on the other hand, slow inactivation kinetics comparable to R378D and R378E at all membrane potentials. Hence, there was no simple correlation between the inactivation kinetics of R378 mutants (R378E, R378D, R378K, R378A, R378Q, and R378G) and any single physicochemical property (charge, polarity, hydrophobicity, and hydrophilicity). The intermediary behavior of R378Q could be partly explained by the relative polarity of its side-chain as compared with R378A. However, R378G, which also bears a neutral but slightly polar residue at the same position, diverged from that prediction. Glycine residues are known

**FIGURE 8**  $\beta$ 3-Subunit modulation of mutants  $\alpha$ 1E R378E and  $\alpha$ 1C E462R. (A) The  $\alpha$ 1E R378E and  $\alpha$ 1C E462R mutants were expressed in *Xenopus* oocytes in the presence of  $\alpha$ 2b $\delta$  (left) and  $\alpha$ 2b $\delta$ / $\beta$ 3 subunits (right). Whole-cell currents were recorded with 10 mM Ba<sup>2+</sup> using a series of pulses from -40 mV to +60 mV from a holding potential of -80 mV. Whole-cell currents peaked at +10  $\pm$  1 mV ( $n = 4$ ) for  $\alpha$ 1C E462R/ $\alpha$ 2b $\delta$  and +1  $\pm$  1 mV ( $n = 7$ ) for  $\alpha$ 1C E462R/ $\alpha$ 2b $\delta$ / $\beta$ 3, at +10  $\pm$  1 mV ( $n = 3$ ) for  $\alpha$ 1E R378E/ $\alpha$ 2b $\delta$ , and at 0  $\pm$  0.2 mV ( $n = 3$ ) for  $\alpha$ 1E R378E/ $\alpha$ 2b $\delta$ / $\beta$ 3. In both cases, co-injection with the  $\beta$ 3-subunit led to a significant increase in their respective inactivation kinetics. Time scale is 100 ms throughout. (B) At +10 mV,  $r_{300}$  went from 0.21  $\pm$  0.02 for  $\alpha$ 1E/ $\alpha$ 2b $\delta$  ( $n = 3$ ) to 0.01  $\pm$  0.005 for  $\alpha$ 1E/ $\alpha$ 2b $\delta$ / $\beta$ 3 ( $n = 6$ ), from 0.54  $\pm$  0.08 for  $\alpha$ 1E R378E/ $\alpha$ 2b $\delta$  ( $n = 3$ ) to 0.27  $\pm$  0.03 for  $\alpha$ 1E R378E/ $\alpha$ 2b $\delta$ / $\beta$ 3 ( $n = 9$ ), and from 0.65  $\pm$  0.05 for  $\alpha$ 1C E462R/ $\alpha$ 2b $\delta$  ( $n = 4$ ) to 0.27  $\pm$  0.02 for  $\alpha$ 1C E462R/ $\alpha$ 2b $\delta$ / $\beta$ 3 ( $n = 6$ ).



to confer flexibility to polypeptides (Creighton, 1993), which could considerably lessen whatever interaction takes place at this position. Although sometimes classified with alanine in terms of its physicochemical properties, glycine mutants have been shown to behave distinctively from alanine mutants when introduced into membrane proteins. For instance, in an extensive mutagenesis study of the  $\alpha$ 1-subunit of the human glycine receptor, Gly mutants at position 288 were found to display  $EC_{50}$  similar to the Glu mutants and significantly lower than the wild-type channel with an Ala residue at this position (Yamakura et al., 1999).

#### Mutations at the fifth position of the AID motif did not prevent $\beta$ -subunit modulation

The AID motif appears to be cumulating critical determinants for Ca<sup>2+</sup> channel gating (Herlitz et al., 1997; Dolphin, 1998), namely, in the context of this work (Walker and DeWaard, 1998), voltage-dependent inactivation and  $\beta$ -subunit modulation. Although it had been previously reported that the QQXER motif could play a role in voltage-depen-

dent inactivation, few groups have addressed the possibility that a modification in  $\beta$ -subunit modulation could explain the altered inactivation properties as the mutation involved a residue considered noncritical for  $\beta$ -subunit binding. By investigating the inactivation properties of  $\alpha$ 1E R378E and  $\alpha$ 1C E462R in the presence and in the absence of  $\beta$ 3, we showed that the R-to-E mutation at the nonconserved position 5 of the AID motif failed to prevent  $\beta$ -subunit modulation. Both mutants displayed the typical hallmarks of  $\beta$ -subunit modulation in Ca<sup>2+</sup> channels, namely, the increase in peak currents, negative shifts in the voltage dependence of activation and inactivation, and increases in the inactivation kinetics (Fig. 8). These data hence confirmed that the changes in the inactivation kinetics observed in  $\alpha$ 1E R378E and  $\alpha$ 1C E462R were intrinsically determined by changes in the  $\alpha$ 1-subunit. We, however, cannot completely rule out the possibility that mutations within the AID motif could somewhat modify the protein-protein interaction between the mutated  $\alpha$ 1- and the  $\beta$ -subunits, for modulation and protein interaction could be distinct processes. It is thus possible that  $\beta$ -subunits could modulate the  $\alpha$ 1-subunit

independently of their ability to bind to the main AID (Yamaguchi et al., 1998). This distinction appears confirmed by a recent study that showed that mutations of the conserved Y (Tyr) residue in  $\alpha 1C$  (Y467S) had no significant effect on  $\beta$ -subunit-induced modulation of whole-cell currents (Gerster et al., 1999).

### Could a hinged-lid mechanism explain voltage-dependent inactivation in $Ca^{2+}$ channels?

It is increasingly suggested that the I-II linker of HVA  $\alpha 1$ -subunits could behave as an inactivating blocking particle in channels (Bourinet et al., 1999; Cens et al., 1999; Stotz et al., 2000) by analogy to the hinged-lid mechanism described in  $Na^+$  channels. In this scheme, there could be a role for R378 contributing to a conformational change that could eventually cause occlusion of the channel pore. The proposition that inactivation in  $\alpha 1E$  channels involves the I-II linker as the inactivation gate remains, however, premature at this point in the absence of a three-dimensional structure.

Our data support a major contribution of R378 to the inactivation properties (kinetics and voltage dependence) of  $\alpha 1E$ . The mutation of a neighboring positive residue in K389E slowed the inactivation kinetics but failed to significantly influence the voltage dependence of inactivation. It remains to be seen, however, whether mutations at this site reverberate on other sites, critical for inactivation, that were not studied in this work. Indeed, mutations at the R378 position failed to completely eliminate voltage-dependent inactivation, indicating that other loci are required to fully account for voltage-dependent inactivation in  $\alpha 1E$  channels. Some other contributing sites could include, but are not restricted to, residues located downstream to the AID motif or residues located in the C-terminus. Indeed, splice variants in the I-II linker produced  $\alpha 1A$  channels with altered inactivation phenotypes (Bourinet et al., 1999), and mutations in the C-terminus were shown to slow voltage-dependent inactivation (Bernatchez et al., 1998). By analogy with inactivation in  $Na^+$  and  $K^+$  channels, it is highly possible that sites responsible for voltage-dependent inactivation in the  $\alpha 1E$   $Ca^{2+}$  channel are distributed along its primary structure.

Our data on the molecular determinants of inactivation in  $\alpha 1E$   $Ca^{2+}$  channel inactivation highlight some critical differences with the mechanism of fast inactivation in brain  $Na^+$  channels. Point mutations in the I-II linker failed to affect the voltage dependence of activation and inactivation of brain  $Na^+$  channels (Li et al., 1992). Furthermore, charge neutralization in the III-IV linker of the brain  $Na^+$  channel was not found to affect its fast inactivation kinetics (Patton et al., 1992). The locus of inactivation in brain  $Na^+$  channels is composed of three hydrophobic residues, the IFM motif (West et al., 1992). In an extensive site-directed mutagenesis of the Phe (F) site, Catterall and colleagues have shown that normal inactivation kinetics in  $Na^+$  chan-

nels requires hydrophobic residues (Kellenberger et al., 1997). In other words, amino acids with aliphatic and aromatic side-chains stabilized the interaction with the putative inactivation receptor activated state whereas hydrophilic ones tended to disrupt it (Kellenberger et al., 1997). Our data suggest that the inactivated state in  $\alpha 1E$   $Ca^{2+}$  channels could be disrupted by the presence of a negatively charged residue at position R378. Moreover, positively charged residues at position R378 are required to yield the fastest inactivation kinetics whereas nonpolar residues could mimic to a certain extent the normal inactivation kinetics. As the residues in the inactivation ball in the N-terminus of the *Shaker*  $K^+$  channels were mostly hydrophobic (Hoshi et al., 1991), it appears that the molecular mechanisms explaining inactivation in  $\alpha 1E$  channels could differ substantially from the ones in  $Na^+$  and  $K^+$  channels, especially regarding the nature of the interaction at the inactivation site. It is, in addition, too early to draw any parallel between the observation that inactivation in  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ , and  $\alpha 1E$   $Ca^{2+}$  channels could occur from intermediate closed states (Patil et al., 1998) and the general description of voltage-dependent inactivation in many voltage-gated sodium (Armstrong and Bezanilla, 1977; Bean, 1981; Kuo and Bean, 1994) and potassium channels (Hoshi et al., 1990; Demo and Yellen, 1991) where inactivation rates accelerate sharply and progressively in proximity to the open state.

The ongoing debate regarding the molecular locus of voltage-induced inactivation in  $Ca^{2+}$  channels underscores the intricate and complex nature of this mechanism. Recent data gathered from mutagenesis studies appear to converge toward residues within the I-II linker in  $\alpha 1E$  (Stotz et al., 2000; our data),  $\alpha 1C$  (Herlitz et al., 1997; our data), and  $\alpha 1A$  channels (Ellinor et al., 1993; Herlitz et al., 1997; Bourinet et al., 1999). As the I-II linker of T-type  $\alpha 1G$ ,  $\alpha 1H$ , and  $\alpha 1I$  does not display a high degree of homology with other  $\alpha 1$ -subunits, transitions to the inactivated state in these channels probably involve other molecular determinants.

We thank Dr. Toni Schneider for the human  $\alpha 1E$ -subunit, Dr. Ed Perez-Reyes for the  $\beta_3$ -subunit, and Dr. R. Sauvé for critical reading. L.P. is a senior scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. This work was completed with grants from the Medical Research Council of Canada (MT13390) and from the Canadian Heart and Stroke Foundation to L.P.

## REFERENCES

- Adams, B., and T. Tanabe. 1997. Structural regions of the cardiac  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunit involved in  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation. *J. Gen. Physiol.* 110:379–389.
- Armstrong, C. M., and F. Bezanilla. 1977. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* 70:567–590.
- Bean, B. P. 1981. Sodium channel inactivation in the crayfish giant axon: must channels open before inactivating? *Biophys. J.* 35:595–614.
- Bernatchez, G., D. Talwar, and L. Parent. 1998. Mutations in the EF-hand motif of the cardiac  $\alpha_{1C}$  calcium channel impair the inactivation of barium currents. *Biophys. J.* 75:1727–1739.

- Bichet, D., V. Cornet, S. Geib, E. Carlier, S. Volsen, T. Hoshi, Y. Mori, and M. DeWaard. 2000. The I-II loop of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the  $\beta$  subunit. *Neuron*. 25:177-190.
- Bourinet, E., T. W. Soong, A. Stea, and T. P. Snutch. 1996. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:1486-1491.
- Bourinet, E., T. W. Soong, K. Sutton, S. Slaymaker, E. Mathews, A. Monteil, G. W. Zamponi, J. Nargeot, and T. P. Snutch. 1999. Splicing of  $\alpha_1A$  subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat. Neurosci.* 2:407-415.
- Campbell, V., N. S. Berrow, E. M. Fitzgerald, K. Brickley, and A. C. Dolphin. 1995. Inhibition of the interaction of G protein G(o) with calcium channels by the calcium channel  $\beta$  subunit in rat neurones. *J. Physiol. (Lond.)*. 485:365-372.
- Castellano, A., X. Wei, L. Birnbaumer, and E. Perez-Reyes. 1993. Cloning and expression of a third calcium channel  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* 268:3450-3455.
- Cens, T., S. Restituito, S. Galas, and P. Charvet. 1999. Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J. Biol. Chem.* 274:5483-5490.
- Creighton, T. E. 1993. *Proteins, Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman, New York.
- Cribbs, L. L., J. C. Gomora, A. N. Daud, J. H. Lee, and E. Perez-Reyes. 2000. Molecular cloning and functional expression of  $\text{Ca}(v)3.1c$ , a T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett.* 466:54-58.
- Cribbs, L. L., J. H. Lee, J. Yang, J. Satin, Y. Zhang, A. Daud, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees, and E. Perez-Reyes. 1998. Cloning and characterization of  $\alpha_1H$  from human heart, a member of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel gene family. *Circ. Res.* 83:103-109.
- deLeon, M., Y. Wang, L. Jones, E. Perez-Reyes, X. Wei, T. W. Soong, T. P. Snutch, and D. T. Yue. 1995. Essential  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif for  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive inactivation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Science*. 270:1502-1506.
- Demo, S. D., and G. Yellen. 1991. The inactivation gate of the *Shaker*  $\text{K}^+$  channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron*. 7:743-753.
- Deng, W. P., and J. A. Nickoloff. 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200:81-88.
- DeWaard, M., and K. P. Campbell. 1995. Subunit regulation of the neuronal  $\alpha_{1A}$   $\text{Ca}^{2+}$  channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)*. 485:619-634.
- DeWaard, M., H. Liu, D. Walker, V. E. Scott, C. A. Gurnett, and K. P. Campbell. 1997. Direct binding of G-protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*. 385:446-500.
- DeWaard, M., V. E. Scott, M. Pragnell, and K. P. Campbell. 1996. Identification of critical amino acids involved in  $\alpha_1$ - $\beta$  interaction in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *FEBS Lett.* 380:272-276.
- Dolphin, A. C. 1998. Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J. Physiol.* 506:3-11.
- Ellinor, P. T., J. F. Zhang, A. D. Randall, M. Zhou, T. L. Schwarz, R. W. Tsien, and W. A. Horne. 1993. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature*. 363:455-458.
- Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien, and W. A. Catterall. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 25:533-535.
- Gerster, U., B. Neuhuber, K. Groschner, J. Striessnig, and B. E. Flucher. 1999. Current modulation and membrane targeting of the calcium channel  $\alpha_1C$  subunit are independent functions of the  $\beta$  subunit. *J. Physiol. (Lond.)*. 517:353-368.
- Herlitz, S., G. H. Hockerman, T. Scheuer, and W. A. Catterall. 1997. Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel  $\alpha_{1A}$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1512-1516.
- Hoshi, T., W. N. Zagotta, and R. W. Aldrich. 1990. Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science*. 250:533-538.
- Hoshi, T., W. N. Zagotta, and R. W. Aldrich. 1991. Two types of inactivation in *Shaker*  $\text{K}^+$  channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*. 7:547-556.
- Kellenberger, S., J. W. West, T. Scheuer, and W. A. Catterall. 1997. Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA  $\text{Na}^+$  channels. *J. Gen. Physiol.* 109:589-605.
- Kuo, C. C., and B. P. Bean. 1994.  $\text{Na}^+$  channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron*. 12:819-829.
- Lacerda, A. E., E. Perez-Reyes, X. Wei, A. Castellano, and A. M. Brown. 1994. T-type and N-type calcium channels of *Xenopus* oocytes: evidence for specific interactions with  $\beta$  subunits. *Biophys. J.* 66:1833-1843.
- Lee, J. H., A. N. Daud, L. L. Cribbs, A. E. Lacerda, A. Pereverzev, U. Klockner, T. Schneider, and E. Perez-Reyes. 1999a. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci.* 19:1912-1921.
- Lee, A., S. T. Wong, D. Gallagher, B. Li, D. R. Storm, T. Scheuer, and W. A. Catterall. 1999b.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature*. 399:155-159.
- Li, M., J. W. West, Y. Lai, T. Scheuer, and W. A. Catterall. 1992. Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron*. 8:1151-1159.
- Mehrke, G., A. Pereverzev, H. Grabsch, J. Hescheler, and T. Schneider. 1997. Receptor-mediated modulation of recombinant neuronal class E calcium channels. *FEBS Lett.* 408:261-270.
- Monteil, A., J. Chemin, E. Bourinet, G. Mennessier, P. Lory, and J. Nargeot. 2000. Molecular and functional properties of the human  $\alpha_1G$  subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 275:6090-6100.
- Page, K. M., C. Canti, G. J. Stephens, N. S. Berrow, and A. C. Dolphin. 1998. Identification of the amino terminus of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_1$  subunits  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1E}$  as an essential determinant of G-protein modulation. *J. Neurosci.* 18:4815-4824.
- Page, K. M., G. J. Stephens, N. S. Berrow, and A. C. Dolphin. 1997. The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. *J. Neurosci.* 17:1330-1338.
- Parent, L., and M. Gopalakrishnan. 1995. Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Biophys. J.* 69:1801-1813.
- Parent, L., M. Gopalakrishnan, A. E. Lacerda, X. Wei, and E. Perez-Reyes. 1995. Voltage-dependent inactivation in a cardiac-skeletal chimeric calcium channel. *FEBS Lett.* 360:144-150.
- Parent, L., T. Schneider, C. P. Moore, and D. Talwar. 1997. Subunit regulation of the human brain  $\alpha_{1E}$  calcium channel. *J. Membr. Biol.* 160:127-140.
- Patil, P. G., D. L. Brody, and D. T. Yue. 1998. Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron*. 20:1027-1038.
- Patton, D. E., J. W. West, W. A. Catterall, and A. L. Goldin. 1992. Amino acid residues required for fast  $\text{Na}^+$  channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10905-10909.
- Perez-Reyes, E., L. L. Cribbs, A. Daud, A. E. Lacerda, J. Barclay, M. P. Williamson, M. Fox, M. Rees, and J. H. Lee. 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature*. 391:896-900.
- Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, J. P. Adelman, and D. T. Yue. 1999. Calmodulin is the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*. 22:549-558.
- Peterson, B. Z., J. S. Lee, J. G. Mülle, Y. Wang, L. M. de, and D. T. Yue. 2000. Critical determinants of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Biophys. J.* 78:1906-1920.
- Piedras-Renteria, E. S., and R. W. Tsien. 1998. Antisense oligonucleotides against  $\alpha_{1E}$  reduce R-type calcium currents in calcium currents in cerebellar granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:7760-7765.
- Pragnell, M., M. De Waard, Y. Mori, T. Tanabe, T. P. Snutch, and K. P. Campbell. 1994. Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha_1$ -subunit. *Nature*. 368:67-70.

- Qin, N., R. Olcese, M. Bransby, T. Lin, and L. Birnbaumer. 1999.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced inhibition of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channel depends on calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:2435–2438.
- Randall, A. D., and R. W. Tsien. 1997. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology*. 36:879–893.
- Saegusa, H., T. Kurihara, S. Zong, O. Minowa, A. Kazuno, W. Han, Y. Matsuda, H. Yamanaka, M. Osanai, T. Noda, and T. Tanabe. 2000. Altered pain responses in mice lacking  $\alpha 1\text{E}$  subunit of the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:6132–6137.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sokolov, S., R. G. Weiss, B. Kurka, F. Gapp, and S. Hering. 1999. Inactivation determinant in the I-II loop of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha 1$ -subunit and  $\beta$ -subunit interaction affect sensitivity for the phenylalkylamine (-)gallopamil. *J. Physiol. (Lond.)*. 519:315–322.
- Stephens, G. J., K. M. Page, Y. Bogdanov, and A. C. Dolphin. 2000. The  $\alpha 1\text{B}$   $\text{Ca}^{2+}$  channel amino terminus contributes determinants for subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J. Physiol. (Lond.)*. 525:377–390.
- Stotz, S. C., J. Hamid, R. L. Spaetgens, S. E. Jarvis, and G. W. Zamponi. 2000. Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels: a hinged-lid mechanism. *J. Biol. Chem.* 275:24575–24582.
- Tareilus, E., M. Roux, N. Qin, R. Olcese, J. Zhou, E. Stefani, and L. Birnbaumer. 1997. A *Xenopus* oocyte  $\beta$  subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:1703–1708.
- Toth, P. T., L. R. Shekter, G. H. Ma, L. H. Philipson, and R. J. Miller. 1996. Selective G-protein regulation of neuronal calcium channels. *J. Neurosci.* 16:4617–4624.
- Walker, D., D. Bichet, S. Geib, E. Mori, V. Cornet, T. P. Snutch, Y. Mori, and M. De Waard. 1999. A new  $\beta$  subtype-specific interaction in  $\alpha 1\text{A}$  subunit controls P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation. *J. Biol. Chem.* 274:12383–12390.
- Walker, D., and M. De Waard. 1998. Subunit interaction sites in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels: role in channel function. *Trends Neurosci.* 21:148–154.
- West, J. W., D. E. Patton, T. Scheuer, Y. Wang, A. L. Goldin, and W. A. Catterall. 1992. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast  $\text{Na}^{+}$  channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10910–10914.
- Williams, M. E., D. H. Feldman, A. F. McCue, R. Brenner, G. Velicelebi, S. B. Ellis, and M. M. Harpold. 1992. Structure and functional expression of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron*. 8:71–84.
- Yamaguchi, H., M. Hara, M. Strobeck, K. Fukasawa, A. Schwartz, and G. Varadi. 1998. Multiple modulation pathways of calcium channel activity by a  $\beta$  subunit: direct evidence of  $\beta$  subunit participation in membrane trafficking of the  $\alpha 1\text{C}$  subunit. *J. Biol. Chem.* 273:19348–19356.
- Yamakura, T., S. J. Mihic, and R. A. Harris. 1999. Amino acid volume and hydrophobicity of a transmembrane site determine glycine and anesthetic sensitivity of glycine receptors. *J. Biol. Chem.* 274:23006–23012.
- Zamponi, G. W., E. Bourinet, D. Nelson, J. Nargeot, and T. P. Snutch. 1997. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha 1$  subunit. *Nature*. 385:442–446.
- Zhang, J. F., P. T. Ellinor, R. W. Aldrich, and R. W. Tsien. 1996. Multiple structural elements in voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels support their inhibition by G proteins. *Neuron*. 17:991–1003.
- Zhou, J., R. Olcese, N. Qin, F. Noceti, L. Birnbaumer, and E. Stefani. 1997. Feedback inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by  $\text{Ca}^{2+}$  depends on a short sequence of the C terminus that does not include the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding function of a motif with similarity to  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:2301–2305.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, K. Deisseroth, R. W. Tsien, and H. Reuter. 1999. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature*. 399:159–162.

### 3. DISCUSSION

#### 3.1. L'acide aminé R378 est impliqué dans les changements des cinétiques d'inactivation des canaux calciques

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à élucider le rôle des résidus non conservés du domaine AID ( **QQXEXXLXGYXXWIXXXE** ) dans l'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage. Parmi les 9 résidus non conservés dans  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ), 6 positions impliquent un changement significatif de charge ou de taille par rapport à  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ): R378E, N381K, R384L, A385D, D388T et K389Q. Les mutants ont été étudiés après expression dans des œufs de *Xenopus* en présence des sous-unités  $\alpha 2\delta$  et  $\beta 3$ . Les 5 dernières mutations ont été étudiées en combinaison NRA-KLD ; NRAK-KLDQ; NRADK-KLDTQ. Les potentiels d'activation sont similaires pour NRA-KLD, NRADK-KLDTQ, K389E, R378E et  $\alpha 1E$  wt ( $Ca_v2.3$ ) avec une valeur de  $E_{0.5}$  d'environ  $-16$  mV et un potentiel légèrement plus positif pour le quadruple mutant NRAK-KLDQ ( $E_{0.5} \sim -11 \pm 2$  mV)(voir tableau 1 et figure 3B de l'article). Les mutants triple, quadruple et quintuple n'ont aucun effet significatif sur l'inactivation de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ), contrairement à la mutation ponctuelle  $\alpha 1E$  R378E qui ralentit significativement les cinétiques d'inactivation ( $\alpha 1E$  wt  $\tau_{inact} = 74 \pm 4$  ms ( $n=21$ ),  $\alpha 1E$  R378E  $\tau_{inact} = 538 \pm 54$  ms ( $n=14$ ) ) et déplace la dépendance au voltage vers des potentiels plus positifs ( $\alpha 1E$  wt  $E_{0.5} = -64 \pm 3$  mV ( $n=9$ ),  $\alpha 1E$  R378E  $E_{0.5} = -44 \pm 2$  mV ( $n=10$ ) ) (voir tableau 1 et figure 3A et 3C de l'article) (Berrou et al., 2001). La mutation ponctuelle R378E permet donc d'altérer les propriétés d'inactivation sans changer les propriétés d'activation du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ), indiquant que la mutation



R378E modifie de façon spécifique le mécanisme d'inactivation. Nous pouvons remarquer que la mutation K389E semble aussi avoir un effet sur les cinétiques d'inactivation du canal, mais ne change pas de manière significative la dépendance au voltage de l'inactivation. Cette mutation connexe montre que les mécanismes gouvernant les cinétiques et la dépendance au voltage de l'inactivation sont peut être des mécanismes distincts se situant sur des régions différentes.

La mutation inverse E462R dans  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) a permis d'accélérer les cinétiques d'inactivation et de déplacer la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs (  $\alpha 1C$  wt  $E_{0.5} = -20 \pm 4mV$  (n=12),  $\alpha 1C$  E462R  $E_{0.5} = -31 \pm 2mV$  (n=12) ). Les taux d'inactivation de  $\alpha 1C$  E462R et de  $\alpha 1E$  R378E sont significativement altérés et se distinguent très peu l'un de l'autre à +20mV quand ils sont mesurés dans les mêmes conditions expérimentales (voir figure 7A et 7B de l'article).

Cependant, aucune des mutations ponctuelles n'a totalement renversé le phénotype des canaux  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ), ou  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ), ce qui indique que d'autres sites doivent être impliqués dans le processus d'inactivation. En effet, il est fort probable que les boucles cytoplasmiques II-III et III-IV, les domaines transmembranaires ainsi que les sous-unités  $\beta$  influencent le mécanisme d'inactivation.

Nos études précédentes avaient déjà montré que la chimère CEEE comprenant le domaine I plus une partie de la boucle I-II incluant le AID avait des propriétés se rapprochant des caractéristiques d'inactivation du canal  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) sans complètement renverser le phénotype du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) (Bernatchez et al., 2001b). Des résultats semblables ont été obtenus par d'autres groupes de recherche. De façon similaire, l'équipe de Spaetgens et Zamponi n'a pu renverser le phénotype du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) avec une chimère ECEE comprenant le domaine II plus une partie de la boucle I-II et II-III. La chimère ECEE a ralenti les cinétiques d'inactivation du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) et déplacé la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus positifs sans toutefois reproduire l'inactivation du canal  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (Spaetgens et Zamponi, 1999).

Le rôle du motif QQXEX, dans les cinétiques d'inactivation, a déjà été démontré pour les canaux  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) (Herlitze et al., 1997), mais notre étude est la première à montrer que le résidu Arg (aa non conservé) du motif AID est impliqué dans l'inactivation des canaux calciques  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). Le résidu Arg serait aussi impliqué dans la régulation des canaux calciques par les protéines G. En effet, une simple mutation de l'aa R en E élimine la régulation par les protéines G dans les canaux  $\alpha 1A$  (Herlitze et al., 1997).

### 3.2. Importance de la charge du résidu R378 dans le mécanisme d'inactivation des VDCC

L'étape suivante a consisté à changer le résidu Arg par des résidus de charge et de taille différentes afin d'essayer de faire ressortir une corrélation entre la charge et la taille du résidu R378 et les cinétiques d'inactivation des VDCC. Le mutant R378K possède des cinétiques d'inactivation et une dépendance au voltage identique au canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) sauvage. Ce résultat n'est pas très surprenant puisque les aa R et K ont la même charge positive et possèdent une chaîne latérale de taille comparable. Au contraire, les mutations du résidu Arg (chargé +) par des résidus chargés négativement tel que Asp et Glu ralentissent fortement les cinétiques d'inactivation du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). Ces mutations semblent démontrer que la charge est un déterminant important de l'inactivation. Toutefois, si le mutant R378A (non polaire et neutre) tend à s'inactiver comme R378K et donc comme  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ), il en est tout autrement pour les mutants R378Q (polaire, neutre et hydrophile) et surtout R378G (non polaire, neutre). Le mutant R378Q possède des cinétiques d'inactivation intermédiaires à  $-10mV$  et tend à s'inactiver comme R378K à  $+20mV$  (voir figure 5 A de l'article). Les cinétiques du mutant R378Q pourraient être expliquées en partie par la polarité de la chaîne latérale du résidu Q par rapport au résidu A. Le plus surprenant est le mutant R378G qui produit des cinétiques d'inactivation semblables au mutant R378E et R378D (mutants de charge négative). Cet effet du résidu glycine sur les cinétiques d'inactivation peut être expliqué en partie par le fait que ce résidu est connu pour conférer aux polypeptides une certaine flexibilité (Creighton, 1993). Il n'existe donc pas de corrélation simple

entre les cinétiques d'inactivation et les propriétés biophysiques (charge, hydrophobicité, polarité, hydrophilicité) de l'aa muté à la position R378.

Si on observe la dépendance au voltage de l'inactivation, on peut remarquer que celle-ci est dépendante de la charge. Les acides aminés chargés positivement (R et K) ne changent pas la dépendance au voltage de l'inactivation ( $\sim -60\text{mV}$ ) tandis que les acides aminés chargés négativement déplacent la dépendance au voltage de l'inactivation vers des potentiels plus positifs ( $\sim -45\text{mV}$ ). Les acides aminés non chargés polaire (Q) et non polaires (G et A) ont une dépendance au voltage de l'inactivation à des potentiels intermédiaires ( $\sim -50\text{mV}$ )(voir tableau 1 et figure 6B de l'article).

### **3.3. La sous-unité $\beta 3$ module la sous-unité $\alpha 1$ même après mutation de l'acide aminé R378E**

Le domaine AID interagit avec de nombreuses protéines cytoplasmiques allant des protéines G jusqu'aux sous-unités  $\beta$ . Nous avons vu précédemment qu'il permet l'ancrage de ces protéines au canal permettant ainsi la modulation des propriétés biophysiques de la sous-unité  $\alpha 1$ . En effet, le AID constitue l'ancrage primaire de la sous-unité  $\beta$  sur le canal. Les travaux précédents ont mis en évidence que les aa de la boucle I-II pouvaient jouer un rôle dans l'inactivation, mais peu de groupes ont testé la possibilité que les changements des propriétés d'inactivation observés pouvaient être dus à une modification de l'interaction AID-BID induite par leurs mutations. A titre de comparaison, mentionnons que Spaetgens et Zamponi ont injecté leurs chimères ECEE

et CeCCC en présence de sous-unités  $\alpha 2\delta$  et  $\beta 1b$  mais n'ont pas effectué les mêmes expériences en absence de cette dernière (Spaetgens et Zamponi, 1999). De même, le groupe de Herlitze n'a injecté le mutant  $\alpha 1A$  (QQIER-QQIEE) qu'en présence de sous-unités  $\alpha 2\delta$  et  $\beta 1b$  (Herlitze et al., 1997). Leurs études ne permettent donc pas de vérifier l'effet de ces mutations sur l'interaction AID-BID et de savoir si les cinétiques d'inactivation ne sont pas ralenties à cause d'une diminution de la modulation de la sous-unité  $\alpha 1$  par la sous-unité  $\beta$ .

Nous avons donc injecté, dans les œufs de *Xenopus laevis*, nos mutants avec ou sans sous-unité  $\beta 3$  afin d'observer les modifications apportées par la substitution des aa R378E et E462R. En présence de  $\beta 3$ , il se produit une augmentation de la densité des courants macroscopiques, un déplacement de l'activation vers des potentiels plus positifs, un déplacement de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs (pour R378E ( $-\beta 3 E_{0.5} = -26 \pm 1\text{mV}$  (n=3);  $+\beta 3 E_{0.5} = -44 \pm 1\text{mV}$  (n=3)) et E462R ( $-\beta 3 E_{0.5} = -11 \pm 2\text{mV}$  (n=4);  $+\beta 3 E_{0.5} = -26 \pm 1\text{mV}$  (n=3))) et une accélération des cinétiques d'inactivation pour  $\alpha 1C$  E462R (r300 significative à tout les potentiels) et  $\alpha 1E$  R378E (r300 non significative à  $-10\text{mV}$  mais significative à 0, 10 et  $20\text{mV}$ ). Ces résultats indiquent que la sous-unité  $\beta 3$  continue de moduler la sous-unité  $\alpha 1$  même après la mutation des sites non-conservés dans le AID.

Toutefois, il n'est pas exclu que l'affinité de la sous-unité  $\beta$  pour le AID muté soit affectée. Un changement de conformation du AID due à la substitution d'un acide aminé pourrait entraîner des différences d'interaction entre les sous-unités  $\beta$  et  $\alpha 1$ . Si

on compare les valeurs de  $r_{300}$  à  $-10\text{mV}$  on peut se rendre compte que l'accélération des cinétiques d'inactivation en présence de  $\beta_3$  est plus prononcée pour  $\alpha_1\text{E}$  ( $\text{Ca}_v2.3$ ) que pour  $\alpha_1\text{E R378E}$  (voir figure 8 B de l'article). Il semblerait donc que la sous-unité  $\beta_3$  module le mutant R378E de façon moins importante que le  $\alpha_1\text{E}$  ( $\text{Ca}_v2.3$ ) sauvage. La mutation R378E pourrait donc avoir affecté l'affinité de  $\alpha_1\text{E}$  pour la sous-unité  $\beta_3$ . C'est pour cela que nous envisageons d'effectuer des expériences d'interaction protéine-protéine entre nos mutants et les différentes sous-unités  $\beta$  à l'aide de protéines de fusion GST.

### **3.4. L'effet de la mutation R378E est conservé en absence de sous-unité $\beta_3$**

L'injection des œufs de *Xenopus laevis* avec nos mutants en présence et en absence de sous-unité  $\beta_3$  a permis de vérifier que l'effet de nos mutations sur les cinétiques d'inactivation du canal était aussi conservé en absence de sous-unité  $\beta_3$ . En effet, en absence de  $\beta_3$ , le mutant R378E s'inactive plus lentement que  $\alpha_1\text{E}$  ( $\text{Ca}_v2.3$ ) ( $r_{300}$  à  $+10\text{mV}$   $\alpha_1\text{E}/\alpha_2\beta\delta = 0.21 \pm 0.02$  ( $n=3$ );  $\text{R378E}/\alpha_2\beta\delta = 0.54 \pm 0.08$  ( $n=3$ )) ce qui tend à démontrer un effet intrinsèque de la mutation R378E sur le processus d'inactivation des VDCC.

### 3.5. Comparaison avec d'autres travaux

Parallèlement à notre travail, d'autres groupes ont étudié le rôle de la boucle I-II dans le processus d'inactivation. Leur expérience a consisté à étudier l'inactivation d'une série de chimères entre les canaux  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) et  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) de rat. Leur chimère CEEE (domaine I (IS1-6)) a des cinétiques d'inactivation très proches du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). Au contraire, la chimère ECEE (domaine II plus boucle I-II plus une portion de la boucle II-III) a des cinétiques qui se rapprochent de celles de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (Spaetgens et Zamponi, 1999). Ceci semble indiquer que le domaine II, la boucle I-II et la boucle II-III sont importants dans le mécanisme d'inactivation. Les chimères inverses confirment cette observation : alors que ECCC a des cinétiques proches de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ), la chimère CECC se rapproche de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) suggérant que les régions importantes dans l'inactivation de  $\alpha 1C$  et  $\alpha 1E$  seraient semblables. Le rôle de la boucle I-II a été étudié plus particulièrement. La chimère CeCCC (boucle I-II de  $\alpha 1E$  dans  $\alpha 1C$ ) confère une inactivation plus rapide au canal  $\alpha 1C$  (Stotz et al., 2000). Cependant, la chimère CecCCC qui possède 18 aa de moins que CeCCC au niveau 3' de la boucle I-II montre des cinétiques d'inactivation plus lentes que  $\alpha 1C$  (Stotz et Zamponi, 2001a). Ces effets contradictoires concernant la boucle I-II ne permettent pas de tirer de conclusion claire quant aux fonctions de la boucle I-II.

Certains résultats obtenus par l'équipe de Zamponi sur les chimères CEEE et ECEE sont compatibles avec les résultats que nous avons obtenus pour les chimères CEEE (domaine I plus une portion de la boucle I-II comprenant le AID), EC(AID)EEE

(portion de la boucle I-II environ 50 aa de plus que le AID) et C(IS1-6)EEE (domaine I) (Bernatchez et al., 2001b). Cependant, nos résultats indiquent de façon plus précise les domaines impliqués dans l'inactivation. En effet, nous avons, lors de cette étude, réussi à isoler le domaine responsable des cinétiques d'inactivation que nous observions avec la chimère CEEE. Le domaine I ne semble pas être crucial dans l'inactivation. La chimère EC(IS1-6)EEE n'a pas des cinétiques d'inactivation significativement différentes de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). Au contraire, la chimère EC(AID)EEE tend à s'inactiver comme  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ). Ces observations nous ont donc permis d'isoler le AID et les régions connexes comme étant importants dans le mécanisme d'inactivation des canaux  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ).

Nos derniers résultats sur les canaux  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) indiquent que la chimère inverse CE(AID)CCC s'inactive plus lentement que les canaux  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) (résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que la nature des aa présents dans la boucle I-II a un effet déterminant sur l'inactivation de  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) mais pas nécessairement sur l'inactivation de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ).



### 3.6. Comparaison avec l'inactivation des canaux $K^+$ et $Na^+$

Nos résultats mettent en évidence certaines différences en termes de mécanismes d'inactivation entre les canaux calciques, les canaux sodiques et potassiques. En effet, bien que les canaux calciques et sodiques possèdent une structure secondaire prédite assez semblable, leurs déterminants fonctionnels semblent différents. Les mutations ponctuelles de la boucle reliant les domaines I et II des canaux sodiques du cerveau n'a aucun effet sur la dépendance au voltage de l'activation et de l'inactivation contrairement aux canaux calciques qui montrent une sensibilité aux mutations sur le AID (Li et al., 1992). Les motifs importants pour l'inactivation des canaux sodiques seraient localisés au niveau des résidus IFM (plus particulièrement le résidu F1489) situés au niveau de la boucle reliant les domaines III et IV. Les canaux calciques quant à eux ne possèdent pas de tels motifs. Alors que notre étude démontre l'importance des résidus chargés positivement et négativement, l'étude des canaux sodiques semble démontrer l'importance des résidus hydrophobes (Kellenberger et al., 1997). En effet, les acides aminés hydrophobes (IFM) tendent à stabiliser l'interaction avec le site important pour l'inactivation tandis que les aa hydrophiles tendent à déstabiliser cette interaction. De même, les résidus impliqués dans l'inactivation des canaux potassiques (« shaker ») au niveau du N-terminal sont hydrophobes (Hoshi et al., 1991), ce qui indique que le mécanisme moléculaire d'inactivation des canaux calciques est très différent de celui des canaux potassiques et sodiques.

### **3.7. Modèle d'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage**

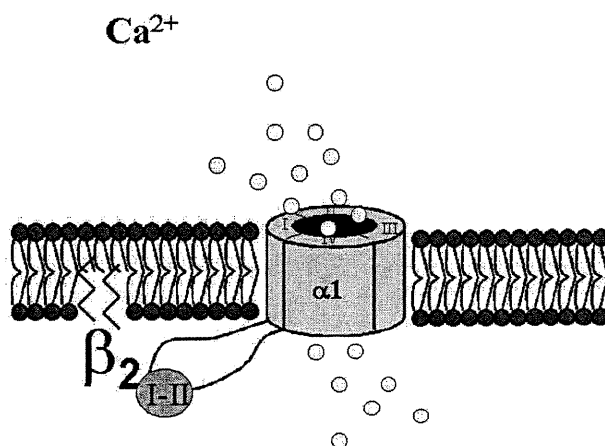
Il est de plus en plus suggéré que la boucle I-II pourrait jouer le rôle d'une particule d'inactivation (Stotz et al., 2000; Berrou et al., 2001) par analogie au « hinged-lid mechanism » des canaux sodiques (Berrou et al., 2001).

Récemment, l'équipe de Restituto a démontré que la sous-unité  $\beta 2a$  (ancrée à la membrane) permettait de réduire fortement les cinétiques d'inactivation du canal  $\alpha 1A$  (Cav2.1) par un mécanisme de « frein » (Restituto et al., 2000). Leur hypothèse est que la sous-unité  $\beta 2a$  agirait comme un lien rigide entre la membrane, via une palmitoylation au niveau du N-terminal de  $\beta 2a$  (site d'ancrage à la membrane (MAS)) et la particule d'inactivation (boucle I-II via son domaine BID). Quand ce lien serait brisé par la mutation C3,4S qui empêche la palmitoylation, la particule d'inactivation (boucle I-II) pourrait bouger librement et produire l'inactivation du canal.

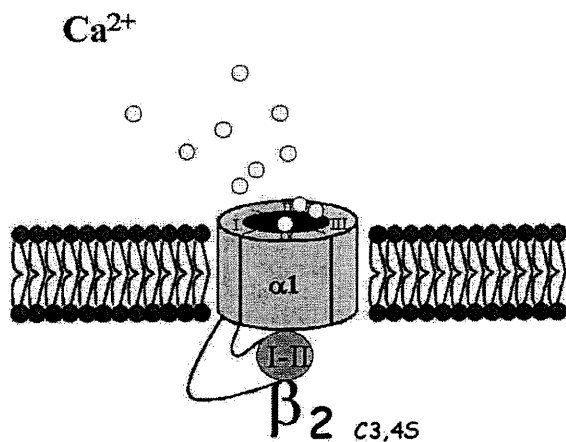
**Figure 12 : Schéma hypothétique du mécanisme d'interaction de la sous-unité  $\beta 2a$**

(Restituto et al., 2000)

**A**



**B**



**légende figure 12 :**

**A :**  $\beta 2a$  agirait comme un lien rigide entre la membrane (via une palmitoylation au niveau du N-terminal de  $\beta 2a$  (site d'ancrage à la membrane (MAS)) ) et la particule d'inactivation (boucle I-II via son domaine BID). **B :** Quand ce lien serait brisé (mutation C3,4S dépalmitoylation), la particule d'inactivation (boucle I-II) pourrait bouger librement et produire l'inactivation du canal.

Cette étude semble démontrer que la mobilité de la boucle I-II (comprenant le AID) est importante pour l'inactivation du canal  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ). La seconde partie de leur étude a consisté à chercher un récepteur potentiel de la boucle I-II (particule d'inactivation) situé sur la face intracellulaire du canal. Leur étude semble indiquer que la boucle I-II interagirait avec plusieurs domaines intracellulaires tels que la boucle connectant les domaines III et IV (boucle III-IV), le N terminal (NT6) et le C terminal (CT1,CT6) de la sous-unité  $\alpha 1$  (Restituito et al., 2000). L'inactivation serait donc la résultante de l'interaction des boucles cytoplasmiques entre elles qui viendraient progressivement obstruer la face interne du canal. Il a été démontré que la surexpression de la boucle I-II de  $\alpha 1A$  ( $Ca_v2.1$ ) accélère les cinétiques des courants suggérant que la boucle I-II pourrait jouer un rôle similaire au «ball and chain mechanism» des canaux  $K^+$  (Cens et al., 1999).

Si la boucle I-II semble être un déterminant important dans le mécanisme d'inactivation, d'autres équipes ont suggéré que les segments S6 des domaines transmembranaires pourraient être importants dans l'inactivation des canaux calciques dépendant du voltage. Tsien et collaborateurs ont démontré que la portion IS6 d'un canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) pouvait accélérer l'inactivation d'un canal  $\alpha 1A$  (voir introduction 1.9.4)(Zhang et al., 1994). De même, la substitution du domaine IIS6 et/ou IIIS6 de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v1.2$ ) par  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ) a provoqué une accélération des cinétiques d'inactivation (Stotz et al., 2000). Cependant, aucune substitution simple ou combinée de IIS6 et IIIS6 n'a pu reproduire le phénotype du  $\alpha 1E$  sauvage, indiquant que la région S6 contribue seulement de façon partielle à l'inactivation dépendante du voltage. De

plus, la substitution inverse des domaines IIS6 et IIIS6 de  $\alpha 1E$  (Cav 2.3) par  $\alpha 1C$  (Cav 1.2) ne ralentit pas l'inactivation des canaux  $\alpha 1E$ . Toutefois, l'article fait mention d'un effet des substitutions IIS6 et IIIS6 sur la chimère CcEEE (domaine I plus boucle I-II de  $\alpha 1C$ ). En effet, lors de l'addition des substitutions précédentes (IIS6 et IIIS6 de  $\alpha 1C$ ) sur la chimère CcEEE, les cinétiques d'inactivation sont ralenties (Stotz et al., 2000). Cependant, en absence des enregistrements de CcEEE seul (sans les mutations IIS6 et IIIS6), il est difficile d'attribuer cet effet aux mutations IIS6 et IIIS6 sachant que la boucle I-II de  $\alpha 1C$  (Cav 1.2) seule permet de ralentir les cinétiques d'inactivation. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, nos résultats ont démontré que la chimère CEEE, équivalente à la chimère CcEEE de l'équipe de Zamponi (domaine I plus boucle I-II de  $\alpha 1C$ ), ralentissait les cinétiques d'inactivation de  $\alpha 1E$  (Cav 2.3) (Bernatchez et al., 2001b). Les substitutions II et III S6 ne semblent avoir d'effets que sur le canal  $\alpha 1C$  (Cav 1.2), ce qui suggère que l'inactivation des canaux  $\alpha 1C$  (Cav 1.2) et  $\alpha 1E$  (Cav 2.3) se produit suivant des mécanismes différents.

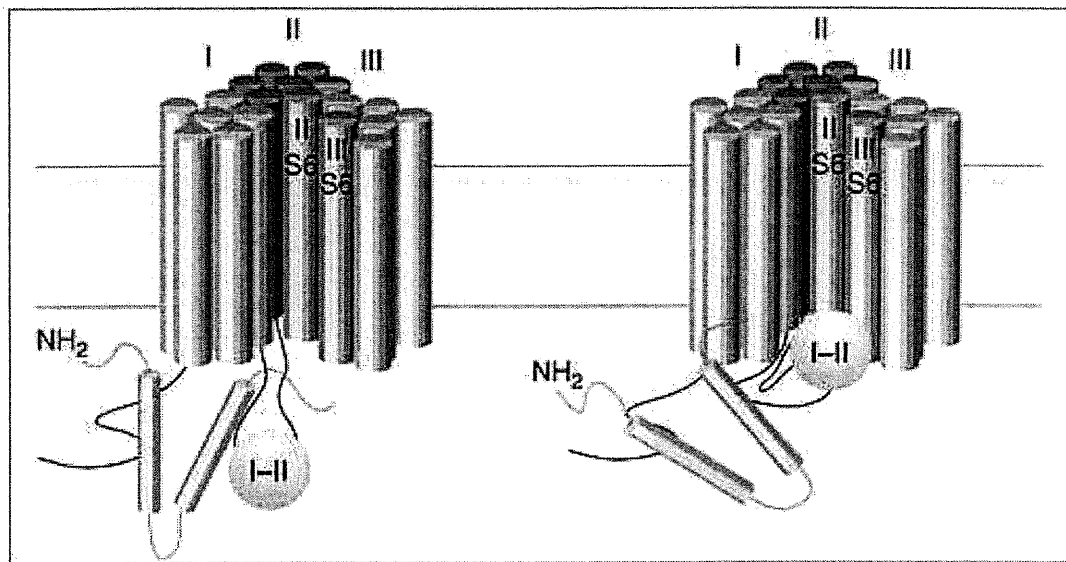
Les acides aminés impliqués dans l'inactivation des canaux  $\alpha 1C$  (Cav 1.2) au niveau du domaine IIS6 ont été identifiés. Dans cette région, les canaux  $\alpha 1C$  (Cav 1.2) et  $\alpha 1E$  (Cav 2.3) diffèrent au niveau de 7 aa. Le changement de 5 résidus, seuls ou en combinaison, ne modifie pas l'inactivation. Par contre, la substitution des résidus F823 ou I829 de  $\alpha 1C$  (Cav 1.2) par les résidus correspondants de  $\alpha 1E$  (Cav 2.3) accélère significativement les cinétiques d'inactivation. Lorsque l'on substitue les 2 résidus en même temps, les cinétiques d'inactivation se rapprochent encore plus de celles de  $\alpha 1E$  (Cav 2.3) (Stotz et Zamponi, 2001a).

Les domaines I, II et IIS6 ne sont pas les seuls domaines impliqués. Le remplacement du domaine IVS6 de  $\alpha 1C$  ( $Ca_v 1.2$ ) avec la séquence correspondante de  $\alpha 1A$  produit une accélération des cinétiques d'inactivation dépendantes du voltage (Berjukow et al., 2001).

Le rôle des segments S6 dans l'inactivation n'est pas encore connu; cependant, certaines équipes avancent l'hypothèse que ces segments pourraient servir de réceptacle à la particule d'inactivation (boucle I-II) (Stotz et al., 2000).

### Figure 13: Modèle hypothétique d'inactivation de Stotz et Zamponi

(Stotz et Zamponi, 2001b)



#### Légende figure 13:

L'équipe de Zamponi a émis l'hypothèse que la boucle I-II pourrait former une structure du type « hinged lid / ball and chain » qui pourrait physiquement obstruer la face interne en se fixant sur les domaines II et III<sub>S6</sub>.

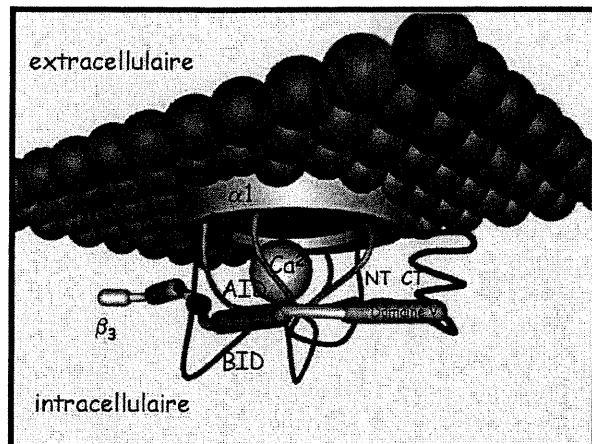
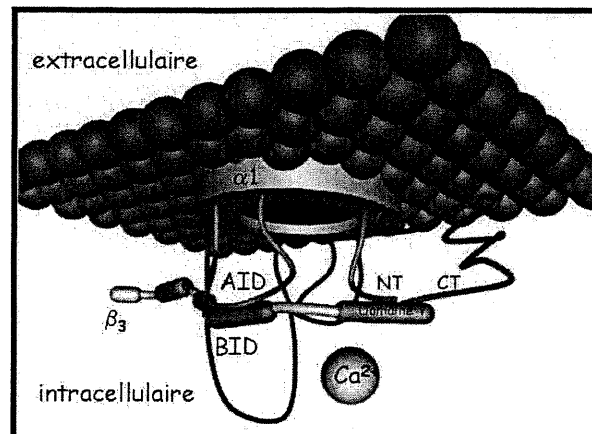
Nous pensons également que ce type de modèle pourrait être valable dans le cas de notre canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ). Cependant, notre étude va plus loin que les études précédentes. En effet, les études effectuées par d'autres équipes démontrent que la boucle I-II viendrait inactiver le canal. Notre étude plus détaillée nous permet d'avancer l'hypothèse que c'est le AID et plus particulièrement l'aa R378 qui permettrait d'obstruer la face interne du canal et ceci en présence ou en absence de sous-unité  $\beta 3$ . Toutefois, en absence de toute structure tridimensionnelle il serait prématuré de tirer de telles conclusions.

Notre modèle hypothétique d'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage se rapprocherait du schéma décrit à la figure 14 faisant intervenir la particule d'inactivation AID, la sous-unité  $\beta$  mais aussi les boucles cytoplasmiques et les acides aminés des domaines se situant face au milieu intracellulaire. Toutefois, ce modèle n'est pas valable pour les canaux de type T ( $Ca_v3$ ) car ils ne possèdent pas le domaine AID et se distinguent donc du canal  $\alpha 1E$  ( $Ca_v2.3$ ).



## Figure 14 : Modèle hypothétique d'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage

(Catterall, 1995; Walker et De Waard, 1998).



### Légende figure 14 :

En réponse à la dépolarisation membranaire, la boucle I-II pourrait subir un changement de conformation qui lui permettrait d'obstruer la face interne du pore. Plusieurs autres régions seraient impliquées notamment la boucle cytoplasmique III-IV (Restituito et al., 2000) mais aussi les segments S6 (Berjukow et al., 1999; Stotz et al., 2000; Berjukow et al., 2001; Stotz et Zamponi, 2001a) de chacun des domaines qui pourraient jouer le rôle de réceptacle pour la particule d'inactivation. La sous-unité  $\beta_3$  quant à elle pourrait accentuer l'effet en se fixant sur le AID et la sous-unité  $\beta_2a$  pourrait ralentir les cinétiques en bloquant le AID ( $\beta_2a$  ancré à la membrane) (voir ci-dessus Restituito et al., 2000).

### 3.8. Perspectives

Afin de tester notre modèle d'inactivation (voir figure 14), nous allons tout d'abord étudier l'affinité (études d'interactions protéine-protéine) des mutants EC(AID)EEE et  $\alpha 1E$  R378E (protéines de fusion  $\alpha 1E$  R378E-GST et EC(AID)EEE-GST) pour différentes sous-unités  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2a$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 4$ ) (protéines  $\beta$  marquées au S<sup>35</sup>). Cette étude nous permettra de savoir si ces mutations ont affecté la liaison AID-BID. Les études précédentes sur les canaux  $\alpha 1A$  (Ca<sub>v</sub>2.1), ont montré que les aa importants pour l'interaction avec  $\beta 1b$  étaient les aa conservés Y,W, I (De Waard et al., 1996). Cependant, il n'est pas exclu que la mutation d'aa non conservés puisse influencer qualitativement la liaison avec la sous-unité  $\beta$ . L'article de De Waard souligne d'ailleurs que les aa non conservés pourraient expliquer les différences d'affinités observées entre  $\alpha 1A$  (Ca<sub>v</sub>2.1) et plusieurs sous-unités  $\beta$  (De Waard et al., 1996).

Dans un deuxième temps, nous testerons l'affinité de EC(AID)EEE et  $\alpha 1E$  R378E pour les C et N terminaux, la boucle III-IV et les segments transmembranaires. La boucle I-II interagirait avec plusieurs domaines intracellulaires (boucle III-IV, N terminal, C-terminal (Restituito et al., 2000), segments transmembranaires). Il est donc important de tester l'impact de nos mutations sur ces interactions.

Enfin, dans un troisième temps, nous comparerons les données concernant l'affinité avec les enregistrements que nous avons effectué en électrophysiologie afin d'établir un modèle hypothétique d'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage.

## 4. LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aczel, S., Kurka, B., & Hering, S. (1998). Mechanism of voltage- and use-dependent block of class A Ca<sup>2+</sup> channels by mibefradil. *Br.J Pharmacol.* **125**, 447-454.
- Armstrong, C. M. & Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen.Physiol.* **70**, 567-590.
- Ashcroft, F. M., Proks, P., Smith, P. A., Ammala, C., Bokvist, K., & Rorsman, P. (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem.* **55 Suppl**, 54-65.
- Beam, K. G., Adams, B. A., Niidome, T., Numa, S., & Tanabe, T. (1992). Function of a truncated dihydropyridine receptor as both voltage sensor and calcium channel. *Nature* **360**, 169-171.
- Bean, B. P. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* **340**, 153-156.
- Bech-Hansen, N. T., Naylor, M. J., Maybaum, T. A., Pearce, W. G., Koop, B., Fishman, G. A., Mets, M., Musarella, M. A., & Boycott, K. M. (1998). Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat.Genet.* **19**, 264-267.
- Berjukow, S., Gapp, F., Aczel, S., Sinnegger, M. J., Mitterdorfer, J., Glossmann, H., & Hering, S. (1999). Sequence differences between alpha1C and alpha1S Ca<sup>2+</sup> channel subunits reveal structural determinants of a guarded and modulated benzothiazepine receptor. *J Biol Chem* **274**, 6154-6160.
- Berjukow, S., Marksteiner, R., Sokolov, S., Weiss, R. G., Margreiter, E., & Hering, S. (2001). Amino Acids in Segment IVS6 and beta -Subunit Interaction Support Distinct Conformational Changes during Cav2.1 Inactivation. *J Biol Chem* 2001.May.18.;276.(20.):17076.-82. **276**, 17076-17082.
- Bernatchez, G., Talwar, D., & Parent, L. (1998). Mutations in the EF-hand motif impair the inactivation of barium currents of the cardiac alpha1C channel. *Biophys J* **75**, 1727-1739.
- Bernatchez, G., Sauve, R., & Parent, L. (2001a). State-dependent inhibition of inactivation-deficient Ca(V)1.2 and Ca(V)2.3 channels by mibefradil. *J.Membr.Biol.*2001.Nov.15.;184.(2):143.-59. **184**, 143-159.
- Bernatchez, G., Berrou, L., Benakezouh, Z., Ducay, J., & Parent, L. (2001b). Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca(V)2.3 channel. *Biochim.Biophys.Acta* 2001.Oct.1;1514.(2):217.-29. **1514**, 217-229.

Berrou, L., Bernatchez, G., & Parent, L. (2001). Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of alpha1E (CaV2.3) calcium channels. *Biophys J* 2001.Jan.;80.(1.):215-28. **80**, 215-228.

Bezprozvanny, I. & Tsien, R. W. (1995). Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes by the Ca<sup>2+</sup> channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967). *Mol.Pharmacol.* **48**, 540-549.

Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., & De, W. 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* 2000.Jan.;25.(1.):177-90. **25**, 177-190.

Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. (1997). Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation in neuronal gene expression. *Curr.Opin.Neurobiol.* **7**, 419-429.

Black, J. L. & Lennon, V. A. (1999). Identification and cloning of putative human neuronal voltage-gated calcium channel gamma-2 and gamma-3 subunits: neurologic implications. *Mayo Clin.Proc.* **74**, 357-361.

Bokvist, K., Eliasson, L., Ammala, C., Renstrom, E., & Rorsman, P. (1995). Co-localization of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J* **14**, 50-57.

Bourinet, E., Soong, T. W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A., Zamponi, G. W., Nargeot, J., & Snutch, T. P. (1999). Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat.Neurosci.* **2**, 407-415.

Brehm, P. & Eckert, R. (1978). Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* **202**, 1203-1206.

Brice, N. L., Berrow, N. S., Campbell, V., Page, K. M., Brickley, K., Tedder, I., & Dolphin, A. C. (1997). Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody. *Eur.J Neurosci.* **9**, 749-759.

Canti, C., Page, K. M., Stephens, G. J., & Dolphin, A. C. (1999). Identification of residues in the N terminus of alpha1B critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by Gbeta gamma. *J Neurosci.* **19**, 6855-6864.

Catterall, W. A. (2000). STRUCTURE AND REGULATION OF VOLTAGE-GATED Ca<sup>2+</sup> CHANNELS. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol* 2000.;16.:521.-555. **16**, 521-555.

Cens, T., Restituito, S., Galas, S., & Charnet, P. (1999). Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J Biol Chem* **274**, 5483-5490.

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

Creighton, T. E. (1993). *Proteins, Structure and Molecular Properties*. W.H. Freeman, New York.

Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., & Perez-Reyes, E. (1998). Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ.Res.* **83**, 103-109.

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**, 2113-2118.

Curtis, B. M. & Catterall, W. A. (1985). Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82**, 2528-2532.

De Jongh, K., Warner, C., Colvin, A. A., & Catterall, W. A. (1991). Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 10778-10782.

De Jongh, K., Murphy, B. J., Colvin, A. A., Hell, J. W., Takahashi, M., & Catterall, W. A. (1996). Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the alpha 1 subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry* **35**, 10392-10402.

de Leon, M., Wang, Y., Jones, L., Perez-Reyes, E., Wei, X., Soong, T. W., Snutch, T. P., & Yue, D. T. (1995). Essential Ca<sup>2+</sup>-binding motif for Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* **270**, 1502-1506.

De Waard, M., Pragnell, M., & Campbell, K. P. (1994). Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* **13**, 495-503.

De Waard, M., Witcher, D. R., Pragnell, M., Liu, H., & Campbell, K. P. (1995a). Properties of the alpha 1-beta anchoring site in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* **270**, 12056-12064.

De Waard, M. & Campbell, K. P. (1995b). Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca<sup>2+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.(Lond.)* **485 ( Pt 3)**, 619-634.

- De Waard, M., Scott, V. E., Pragnell, M., & Campbell, K. P. (1996). Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *FEBS Lett.* **380**, 272-276.
- De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V. E., Gurnett, C. A., & Campbell, K. P. (1997). Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels [see comments]. *Nature* **385**, 446-450.
- Degtjar, V. E., Scheller, R. H., & Tsien, R. W. (2000). Syntaxin modulation of slow inactivation of N-type calcium channels. *J Neurosci.* 2000.Jun.15.;20.(12.):4355.-67. **20**, 4355-4367.
- Dolphin, A. C., Page, K. M., Berrow, N. S., Stephens, G. J., & Canti, C. (1999). Dissection of the calcium channel domains responsible for modulation of neuronal voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **868**, 160-174.
- Elbaz, A., Vale-Santos, J., Jurkat-Rott, K., Lapie, P., Ophoff, R. A., Bady, B., Links, T. P., Piussan, C., Vila, A., & Monnier, N. (1995). Hypokalemic periodic paralysis and the dihydropyridine receptor (CACNL1A3): genotype/phenotype correlations for two predominant mutations and evidence for the absence of a founder effect in 16 caucasian families. *Am.J Hum.Genet.* **56**, 374-380.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., & Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels [letter; comment]. *Neuron* 2000.Mar.;25.(3.):533.-5. **25**, 533-535.
- Fletcher, C. F., Lutz, C. M., O'Sullivan, T. N., Shaughnessy, J. D. J., Hawkes, R., Frankel, W. N., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (1996). Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell* **87**, 607-617.
- 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**, 66-68.
- Furukawa, T., Miura, R., Mori, Y., Strobeck, M., Suzuki, K., Ogihara, Y., Asano, T., Morishita, R., Hashii, M., Higashida, H., Yoshii, M., & Nukada, T. (1998a). Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels with G-protein alpha and beta gamma subunits. II. Evidence for direct binding. *J Biol Chem* **273**, 17595-17603.
- Furukawa, T., Nukada, T., Mori, Y., Wakamori, M., Fujita, Y., Ishida, H., Fukuda, K., Kato, S., & Yoshii, M. (1998b). Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels with G-protein alpha and beta gamma subunits. I. Molecular determination. *J Biol Chem* **273**, 17585-17594.

Ganitkevich, V. Y., Shuba, M. F., & Smirnov, S. V. (1987). Calcium-dependent inactivation of potential-dependent calcium inward current in an isolated guinea-pig smooth muscle cell. *J Physiol.(Lond.)* **392**, 431-449.

Gao, T., Puri, T. S., Gerhardstein, B. L., Chien, A. J., Green, R. D., & 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.

Garcia, D. E., Li, B., Garcia-Ferreiro, R. E., Hernandez-Ochoa, E. O., Yan, K., Gautam, N., Catterall, W. A., Mackie, K., & Hille, B. (1998). G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci.* **18**, 9163-9170.

Hans, M., Luvisetto, S., Williams, M. E., Spagnolo, M., Urrutia, A., Tottene, A., Brust, P. F., Johnson, E. C., Harpold, M. M., Stauderman, K. A., & Pietrobon, D. (1999a). Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci.* **19**, 1610-1619.

Hans, M., Urrutia, A., Deal, C., Brust, P. F., Stauderman, K., Ellis, S. B., Harpold, M. M., Johnson, E. C., & Williams, M. E. (1999b). Structural elements in domain IV that influence biophysical and pharmacological properties of human alpha1A-containing high-voltage-activated calcium channels. *Biophys J* **76**, 1384-1400.

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**, 441-443.

Herlitze, S., Garcia, D. E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1996). Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 258-262.

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**, 1512-1516.

Hockerman, G. H., Johnson, B. D., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J Biol Chem* **270**, 22119-22122.

Hockerman, G. H., Johnson, B. D., Abbott, M. R., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1997). Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the alpha1 subunit. *J.Biol.Chem.* **272**, 18759-18765.

- Hosey, M. M., Barhanin, J., Schmid, A., Vandaele, S., Ptasienski, J., O'Callahan, C., Cooper, C., & Lazdunski, M. (1987). Photoaffinity labelling and phosphorylation of a 165 kilodalton peptide associated with dihydropyridine and phenylalkylamine-sensitive calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 1137-1145.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation [see comments]. *Science* **250**, 533-538.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1991). Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**, 547-556.
- Huguenard, J. R. (1996). Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 329-348.
- Hymel, L., Striessnig, J., Glossmann, H., & Schindler, H. (1988). Purified skeletal muscle 1,4-dihydropyridine receptor forms phosphorylation-dependent oligomeric calcium channels in planar bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4290-4294.
- Jahn, H., Nastainczyk, W., Rohrkasten, A., Schneider, T., & Hofmann, F. (1988). Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II. *Eur. J. Biochem.* **178**, 535-542.
- Jay, S. D., Ellis, S. B., McCue, A. F., Williams, M. E., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., & Campbell, K. P. (1990). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **248**, 490-492.
- Jimenez, C., Bourinet, E., Leuranguer, V., Richard, S., Snutch, T. P., & Nargeot, J. (2000). Determinants of voltage-dependent inactivation affect Mibefradil block of calcium channels. *Neuropharmacology* **39**(1), 1-10.
- Kellenberger, S., West, J. W., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1997). Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* **109**, 589-605.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., & Hofmann, F. (1999a). Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J. Neurosci.* **19**, 684-691.
- Klugbauer, N., Marais, E., Lacinova, L., & Hofmann, F. (1999b). A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflügers Arch.* **437**, 710-715.
- Klugbauer, N., Dai, S., Specht, V., Lacinova, L., Marais, E., Bohn, G., & Hofmann, F. (2000). A family of gamma-like calcium channel subunits. *FEBS Lett.* **470**(2), 189-197.



- Koch, S. E., Bodi, I., Schwartz, A., & Varadi, G. (2000). Architecture of Ca<sup>2+</sup> channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000.Nov.3.;275.(44.):34493.-500. **275**, 34493-34500.
- Kraus, R. L., Sinnegger, M. J., Glossmann, H., Hering, S., & Striessnig, J. (1998). Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem* **273**, 5586-5590.
- Lee, J. H., Daud, A. N., Cribbs, L. L., Lacerda, A. E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T., & Perez-Reyes, E. (1999). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci.* **19**, 1912-1921.
- 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.(Lond.)* **364**, 395-411.
- Lehmann-Horn, F. & Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol.Rev.* **79**, 1317-1372.
- Letts, V. A., Felix, R., Biddlecome, G. H., Arikath, J., Mahaffey, C. L., Valenzuela, A., Bartlett, F. S., Mori, Y., Campbell, K. P., & Frankel, W. N. (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca<sup>2+</sup>-channel gamma subunit [see comments]. *Nat. Genet.* **19**, 340-347.
- 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**, 7943-7946.
- Li, M., West, J. W., Lai, Y., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1992). Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* **8**, 1151-1159.
- Liu, J. H., Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R., & Bernheim, L. (1999). Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents in human fusion-competent myoblasts. *Br.J Pharmacol.* **126**, 245-250.
- Llinas, R., Sugimori, M., Hillman, D. E., & Cherksey, B. (1992). Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the mammalian central nervous system. *Trends neurosci.* **15**, 351-355.
- Martin, R. L., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E., & Hanck, D. A. (2000). Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol.Exp.Ther.*2000.Oct.;295.(1.):302.-8. **295**, 302-308.

Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., & Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**, 230-233.

Mintz, I. M., Venema, V. J., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Bean, B. P., & Adams, M. E. (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* **355**, 827-829.

Motoike, H. K., Bodi, I., Nakayama, H., Schwartz, A., & Varadi, G. (1999). A region in IVS5 of the human cardiac L-type calcium channel is required for the use-dependent block by phenylalkylamines and benzothiazepines. *J Biol Chem* **274**, 9409-9420.

Nargeot joël et Charnet Pierre (1994). Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Médecine sciences* **10**, 1293-1308.

Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J. A., Dooley, D. J., Nadasdi, L., Tsien, R. W., Lemos, J., & Miljanich, G. (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* **37**, 15353-15362.

Nunoki, K., Florio, V., & Catterall, W. A. (1989). Activation of purified calcium channels by stoichiometric protein phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**, 6816-6820.

Ophoff, R. A., Terwindt, G. M., Vergouwe, M. N., van, E. R., Oefner, P. J., Hoffman, S. M., Lamerdin, J. E., Mohrenweiser, H. W., Bulman, D. E., Ferrari, M., Haan, J., Lindhout, D., van, O. G., Hofker, M. H., Ferrari, M. D., & Frants, R. R. (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell* **87**, 543-552.

Page, K. M., Stephens, G. J., Berrow, N. S., & Dolphin, A. C. (1997). The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. *J Neurosci.* **17**, 1330-1338.

Page, K. M., Canti, C., Stephens, G. J., Berrow, N. S., & Dolphin, A. C. (1998). Identification of the amino terminus of neuronal Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunits alpha1B and alpha1E as an essential determinant of G-protein modulation. *J Neurosci.* **18**, 4815-4824.

Parent, L. & Gopalakrishnan, M. (1995). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca<sup>2+</sup> channel. *Biophys J* **69**, 1801-1813.

Parent, L., Schneider, T., Moore, C. P., & Talwar, D. (1997). Subunit regulation of the human brain alpha 1E calcium channel. *J Membr.Biol* **160**, 127-140.

Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., & Lee, J. H. (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel [see comments]. *Nature* **391**, 896-900.

Perez-Reyes, E., Lee, J. H., & Cribbs, L. L. (1999). Molecular characterization of two members of the T-type calcium channel family. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **868**, 131-143.

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 [published erratum appears in *Neuron* 1999 Apr;22(4):following 893]. *Neuron* **22**, 549-558.

Peterson, B. Z., Lee, J. S., Mulle, J. G., Wang, Y., de, L. M., & Yue, D. T. (2000). Critical determinants of Ca(2+)-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca(2+) channels. *Biophys J* 2000.Apr.;78(4.):1906.-20. **78**, 1906-1920.

Piedras-Renteria, E. S. & Tsien, R. W. (1998). Antisense oligonucleotides against alpha1E reduce R-type calcium currents in cerebellar granule cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 7760-7765.

Pragnell, M., De, W. M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., & Campbell, K. P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit [see comments]. *Nature* **368**, 67-70.

Ptacek, L. J., Tawil, R., Griggs, R. C., Engel, A. G., Layzer, R. B., Kwiecinski, H., McManis, P. G., Santiago, L., Moore, M., & Fouad, G. (1994). Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis. *Cell* **77**, 863-868.

Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Stefani, E., & Birnbaumer, L. (1997). Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 8866-8871.

Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Costantin, J. L., Stefani, E., & Birnbaumer, L. (1998). Unique regulatory properties of the type 2a Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 4690-4695.

Randall, A. & Tsien, R. W. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* **15**, 2995-3012.

Randall, A. & Benham, C. D. (1999). Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol.Cell Neurosci.* **14**, 255-272.

- Restituto, S., Cens, T., Barrere, C., Geib, S., Galas, S., De, W. M., & Charnet, P. (2000). The [beta]2a subunit is a molecular groom for the Ca<sup>2+</sup> channel inactivation gate. *J Neurosci*. 2000. Dec. 15.;20.(24.):9046-52. **20**, 9046-9052.
- Rettig, J., Sheng, Z. H., Kim, D. K., Hodson, C. D., Snutch, T. P., & Catterall, W. A. (1996). Isoform-specific interaction of the alpha1A subunits of brain Ca<sup>2+</sup> channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 7363-7368.
- Rotman, E. I., De, J. K., Florio, V., Lai, Y., & Catterall, W. A. (1992). Specific phosphorylation of a COOH-terminal site on the full-length form of the alpha 1 subunit of the skeletal muscle calcium channel by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **267** , 16100-16105.
- Sather, W. A., Tanabe, T., Zhang, J. F., Mori, Y., Adams, M. E., & Tsien, R. W. (1993). Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* **11**, 291-303.
- Sather, W. A., Yang, J., & Tsien, R. W. (1994). Structural basis of ion channel permeation and selectivity. *Curr.Opin.Neurobiol.* **4**, 313-323.
- Schneider, T., Wei, X., Olcese, R., Costantin, J. L., Neely, A., Palade, P., Perez-Reyes, E., Qin, N., Zhou, J., & Crawford, G. D. (1994). Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1 subunit. *Receptors.Channels* **2**, 255-270.
- Sheng, Z. H., Rettig, J., Cook, T., & Catterall, W. A. (1996). Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature* **379**, 451-454.
- Simen, A. A. & Miller, R. J. (1998). Structural features determining differential receptor regulation of neuronal Ca channels. *J Neurosci.* **18**, 3689-3698.
- Simmons, M. L., Terman, G. W., Gibbs, S. M., & Chavkin, C. (1995). L-type calcium channels mediate dynorphin neuropeptide release from dendrites but not axons of hippocampal granule cells. *Neuron* **14**, 1265-1272.
- Snutch, T. P. & Reiner, P. B. (1992). Ca<sup>2+</sup> channels: diversity of form and function. *Curr.Opin.Neurobiol.* **2**, 247-253.
- Soldatov, N. M., Zuhlke, R. D., Bouron, A., & Reuter, H. (1997). Molecular structures involved in L-type calcium channel inactivation. Role of the carboxyl-terminal region encoded by exons 40-42 in alpha1C subunit in the kinetics and Ca<sup>2+</sup> dependence of inactivation. *J Biol Chem* **272**, 3560-3566.
- Soong, T. W., Stea, A., Hodson, C. D., Dubel, S. J., Vincent, S. R., & Snutch, T. P. (1993). Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* **260**, 1133-1136.

Spaetgens, R. L. & Zamponi, G. W. (1999). Multiple structural domains contribute to voltage-dependent inactivation of rat brain alpha(1E) calcium channels. *J Biol Chem* **274**, 22428-22436.

Stephens, G. J., Page, K. M., Bogdanov, Y., & Dolphin, A. C. (2000). The alpha1B Ca<sup>2+</sup> channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol.* 2000.Jun.1.;525.Pt.2.:377.-90. **525 Pt 2**, 377-390.

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* 2000.Aug.11.;275.(32.):24575.-82. **275**, 24575-24582.

Stotz, S. C. & Zamponi, G. W. (2001a). Identification of inactivation determinants in the domain IIS6 region of high voltage activated calcium channels. *J Biol Chem* 2001.Jun.11.; ..

Stotz, S. C. & Zamponi, G. W. (2001b). Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels. *Trends Neurosci.* 2001.Mar.;24.(3):176.-81. **24**, 176-181.

Striessnig, J., Knaus, H. G., Grabner, M., Moosburger, K., Seitz, W., Lietz, H., & Glossmann, H. (1987). Photoaffinity labelling of the phenylalkylamine receptor of the skeletal muscle transverse-tubule calcium channel. *FEBS Lett.* **212**, 247-253.

Strom, T. M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B. H., Wutz, K., Gutwillinger, N., Ruther, K., Drescher, B., Sauer, C., Zrenner, E., Meitinger, T., Rosenthal, A., & Meindl, A. (1998). An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* **19**, 260-263.

Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F., & Catterall, W. A. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**, 5478-5482.

Talley, E. M., Cribbs, L. L., Lee, J. H., Daud, A., Perez-Reyes, E., & Bayliss, D. A. (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci.* **19**, 1895-1911.

Tanabe, T., Beam, K. G., Adams, B. A., Niidome, T., & Numa, S. (1990). Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* **346**, 567-569.

Tanabe, T., Mikami, A., Niidome, T., Numa, S., Adams, B. A., & Beam, K. G. (1993). Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **707**, 81-86.

Tarasenko, A. N., Kostyuk, P. G., Eremin, A. V., & Isaev, D. S. (1997). Two types of low-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in neurones of rat laterodorsal thalamic nucleus. *J Physiol.* **499 ( Pt 1)**, 77-86.

- Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E., & Birnbaumer, L. (1997). A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 1703-1708.
- Tottene, A., Volsen, S., & Pietrobon, D. (2000). alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J Neurosci.* 2000.Jan. 1.;20.(1.):171.-8. **20**, 171-178.
- Tsien, R. W., Ellinor, P. T., & Horne, W. A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol.Sci.* **12**, 349-354.
- Tsien, R. W. (1998). Molecular physiology. Key clockwork component cloned. *Nature* **391**, 839, 841.
- Walker, D. & De Waard, M. (1998). Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels: role in channel function. *Trends neurosci.* **21**, 148-154.
- Walker, D., Bichet, D., Geib, S., Mori, E., Cornet, V., Snutch, T. P., Mori, Y., & De Waard, M. (1999). A new beta subtype-specific interaction in alpha1A subunit controls P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel activation. *J Biol Chem* **274**, 12383-12390.
- Wei, X. Y., Perez-Reyes, E., Lacerda, A. E., Schuster, G., Brown, A. M., & Birnbaumer, L. (1991). Heterologous regulation of the cardiac Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* **266**, 21943-21947.
- West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na<sup>(+)</sup>-channel inactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 10910-10914.
- Wheeler, D. B., Randall, A., & Tsien, R. W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission [see comments]. *Science* **264**, 107-111.
- Williams, M. E., Washburn, M. S., Hans, M., Urrutia, A., Brust, P. F., Prodanovich, P., Harpold, M. M., & Stauderman, K. A. (1999). Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem.* **72**, 791-799.
- Wu, L. G., Borst, J. G., & Sakmann, B. (1998). R-type Ca<sup>2+</sup> currents evoke transmitter release at a rat central synapse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 4720-4725.
- Wu, X. S., Edwards, H. D., & Sather, W. A. (2000). Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel [In Process Citation]. *J Biol Chem* 2000.Oct.13.;275.(41.):31778.-85. **275**, 31778-31785.

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**, 158-161.

Zamponi, G. W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J., & Snutch, T. P. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit [see comments]. *Nature* **385**, 442-446.

Zhang, J. F., Ellinor, P. T., Aldrich, R. W., & Tsien, R. W. (1994). Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* **372**, 97-100.

Zhang, J. F., Ellinor, P. T., Aldrich, R. W., & Tsien, R. W. (1996). Multiple structural elements in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* **17**, 991-1003.

Zhong, H., Yokoyama, C. T., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1999). Reciprocal regulation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat. Neurosci.* **2**, 939-941.

Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., Dobyns, W. B., Subramony, S. H., Zoghbi, H. Y., & Lee, C. C. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat. Genet.* **15**, 62-69.

Zuhlke, R. D. & Reuter, H. (1998). Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3287-3294.

Zuhlke, R. D., Pitt, G. S., Tsien, R. W., & Reuter, H. (2000). Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit. *J Biol Chem* **275**, 21121-21129.