

Université de Montréal

**Modulation de l'adressage membranaire et de la
fonction du canal $Ca_v2.3$ par les résidus leucine du
domaine guanylate kinase impliqués dans la liaison à
forte affinité de $Ca_v\beta$**

par

Behzad Shakeri

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences
en physiologie
option physiologie et biophysique moléculaires**

septembre 2012

© Behzad Shakeri, 2012

**Université de Montréal
Faculté de médecine**

Ce mémoire intitulé :

**Modulation de l'adressage membranaire et de la
fonction du canal $Ca_v2.3$ par les résidus leucine du
domaine guanylate kinase impliqués dans la liaison à
forte affinité de $Ca_v\beta$**

présenté par :

Behzad Shakeri

**a été évalué par un jury composé des personnes
suivantes :**

Dr Céline Fiset, président rapporteur

Dr Lucie Parent, directrice de recherche

Dr Réjean Couture, membre du jury

Résumé

Les canaux Ca^{2+} activés par le voltage (Ca_V) sont des protéines membranaires qui génèrent des courants Ca^{2+} dans les cellules excitables suite à une dépolarisation membranaire. Ces complexes oligomériques sont classifiés selon les propriétés structurales de la sous-unité principale qui forme le pore du canal, soit la sous-unité $\text{Ca}_V\alpha_1$. La sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_V\beta$ module l'expression membranaire et la dépendance au voltage du « gating » de la sous-unité $\text{Ca}_V\alpha_1$ des canaux HVA (« high-voltage-activated ») Ca_V1 et Ca_V2 . La sous-unité $\text{Ca}_V\beta$ est formée par un domaine SH3 (« Src homology-3 ») connecté à un domaine GK (« guanylate kinase-like ») par le biais d'un domaine variable HOOK. Dans le but d'identifier les résidus dans la $\text{Ca}_V\beta_3$ qui sont responsables de la densité membranaire du $\text{Ca}_V2.3$, nous avons produit des mutants de la sous-unité auxiliaire le long de ses domaines fonctionnels. Cela dit, la délétion complète du domaine SH3 ainsi que la délétion du domaine HOOK n'ont pas modifié la densité membranaire de $\text{Ca}_V2.3$ ni ses propriétés d'activation. Cependant, la délétion de cinq résidus dans le domaine GK interrompt l'expression membranaire et l'expression fonctionnelle de $\text{Ca}_V2.3$. La mutation de résidus identifiés précédemment comme soutenant une affinité de liaison de l'ordre du nanomolaire dans le domaine GK de $\text{Ca}_V\beta$ n'a pas modifié de manière significative l'adressage membranaire de $\text{Ca}_V2.3$. Toutefois, les mutations de quatre résidus leucine dans les régions α_3 , α_6 , β_{10} et α_9 du domaine GK ont grandement réduit l'adressage membranaire du canal $\text{Ca}_V2.3$. Nos résultats confirment que le domaine GK contient les déterminants moléculaires responsables de la fonction chaperone de $\text{Ca}_V\beta$. Cela dit, l'adressage membranaire induit par $\text{Ca}_V\beta$ semble être déterminé par des éléments structuraux qui ne sont pas strictement dépendants d'une liaison à haute affinité de $\text{Ca}_V\beta$ sur $\text{Ca}_V\alpha_1$.

Mots-clés : Canaux calciques, adressage membranaire, « gating », modélisation par homologie, électrophysiologie, cytométrie de flux

Abstract

Voltage-activated Ca^{2+} channels (Ca_v) are membrane proteins that play a key role in promoting Ca^{2+} influx in response to membrane depolarization in excitable cells. They form oligomeric complexes that are classified according to the structural properties of the pore-forming $\text{Ca}_v\alpha 1$ subunit. Auxiliary $\text{Ca}_v\beta$ subunits modulate cell-surface expression and voltage-dependent gating of high-voltage-activated (HVA) $\text{Ca}_v 1$ and $\text{Ca}_v 2$ $\alpha 1$ subunits. $\text{Ca}_v\beta$ subunits are formed by a Src homology-3 (SH3) domain and a guanylate kinase-like (GK) domain connected through a variable HOOK-domain. In order to identify the residues responsible for the $\text{Ca}_v\beta 3$ -induced membrane density of $\text{Ca}_v 2.3$, we produced mutants along $\text{Ca}_v\beta 3$'s functional domains. Complete deletion of the SH3 domain as well as deletion of the HOOK domain did not alter plasma membrane targeting of $\text{Ca}_v 2.3$ nor its typical activation gating. In contrast, 5-residue deletions in the GK domain disrupted cell surface trafficking and functional expression of $\text{Ca}_v 2.3$. Mutations of residues known to carry nanomolar affinity binding in the GK domain of $\text{Ca}_v\beta$ did not significantly alter cell surface density. Mutations of a quartet of leucine residues in the $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 10$, and $\alpha 9$ regions of the GK domain, each expected to curtail protein-protein interaction, were found to significantly impair cell surface targeting of $\text{Ca}_v 2.3$ channels. Altogether, our results confirm that the GK domain includes the molecular determinants carrying the chaperone function of $\text{Ca}_v\beta$. However, $\text{Ca}_v\beta$ -induced cell surface targeting appears to be determined by structural elements that are not strictly dominated by high-affinity binding of $\text{Ca}_v\beta$ onto $\text{Ca}_v\alpha 1$.

Keywords: Calcium channels, targeting, gating, homology modeling, electrophysiology, flow cytometry

Table des matières

1	INTRODUCTION	1
1.1	L'ion Ca^{2+} comme messager second.....	1
1.1.1	Homéostasie de l'ion Ca^{2+}	2
1.1.2	Transport membranaire de l'ion Ca^{2+}	3
1.2	Canaux calciques activés par le voltage.....	5
1.2.1	Canaux calciques de type HVA.....	8
1.2.1.1	Canaux calciques de type Ca_v1	9
1.2.1.2	Canaux calciques de type Ca_v2	10
1.2.2	Rôles physiologiques des canaux calciques de type HVA	11
1.2.2.1	Mécanisme d'excitation–contraction du muscle squelettique.....	13
1.2.2.2	Mécanisme d'excitation–contraction du muscle cardiaque	13
1.2.2.3	Fonction au niveau neuronal.....	14
1.2.2.4	Couplage excitation-transcription.....	15
1.2.2.5	Pathologies associées aux canaux HVA.....	17
1.2.3	Structure quaternaire.....	21
1.2.3.1	La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$	22
1.2.3.2	La sous-unité $\text{Ca}_v\beta$	27
1.2.3.3	La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha2\delta$	30
1.2.3.4	La sous-unité $\text{Ca}_v\gamma$	32
1.2.4	Propriétés biophysiques	32
1.2.4.1	L'activation	35
1.2.4.2	L'inactivation	35
1.2.4.2.1	L'inactivation dépendante du calcium (CDI).....	35
1.2.4.2.2	L'inactivation dépendante du voltage (VDI).....	37
1.2.4.3	L'activation des canaux calciques.....	40
1.2.4.3.1	Le senseur du voltage S4	40
1.2.4.3.2	La porte d'activation.....	42
1.3	Hypothèses et objectifs de recherche.....	47
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	50
2.1	Techniques de biologie moléculaire	50
2.1.1	Matériel utilisé	50
2.1.2	Mutagenèse dirigée.....	50
2.1.3	Insertion de l'épitope HA	52
2.1.4	Délétions des domaines fonctionnels de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta3$	54
2.2	Culture cellulaire et transfection des cellules.....	56
2.2.1	Culture cellulaire.....	56
2.2.2	Transfection des cellules HEKT	57
2.3	Immunobuvardage de type Western.....	58
2.3.1	Lysat cellulaire.....	58

2.3.2	Gel SDS-PAGE	58
2.3.3	Transfert.....	58
2.3.4	Immunomarquage	59
2.3.5	Révélation par chimioluminescence	59
2.4	FACS (« Fluorescence Activated Cell Sorting »)	59
2.5	Électrophysiologie	61
2.5.1	Enregistrements des données.....	61
2.5.2	Analyse des données.....	62
2.6	Modélisation par homologie (par Pierre-Olivier Demers-Giroux)	63
3	RÉSULTATS (par article)	64
3.1	Summary	65
3.2	Introduction and hypothesis.....	66
3.3	Experimental procedures.....	70
3.4	Results.....	74
3.5	Discussion	78
3.6	Conclusion.....	82
3.7	Footnotes.....	82
3.8	Figures.....	83
3.9	Tables.....	93
4	DISCUSSION	100
4.1	Une affinité de l'ordre du μM est suffisante pour moduler le « gating » ainsi que l'adressage membranaire	100
4.2	Des délétions partielles dans le domaine GK de $\text{Ca}_v\beta 3$ rompent l'adressage membranaire de $\text{Ca}_v2.3$	101
4.3	Des résidus leucine dans le domaine GK de $\text{Ca}_v\beta 3$ favorisent l'adressage membranaire de $\text{Ca}_v2.3$	102
5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	105
6	BIBLIOGRAPHIE	107

Liste des tableaux

Tableau I : Classification, localisation tissulaire et propriétés pharmacologiques des canaux VGCC.....	7
Tableau II : Propriétés biophysiques des canaux VGCC.....	9
Tableau III : Pathologies associées aux canaux HVA.....	12
Tableau IV : Les différentes sous-unités utilisées.....	50
Tableau V : Localisation prédite des segments transmembranaires du domaine I du canal calcique $Ca_v2.3$	54

Liste des tableaux dans l'article

TABLE I : Biophysical properties of $Ca_v2.3$ channels in the absence of $Ca_v\alpha2\delta-1$	93
TABLE II : Biophysical properties of $Ca_v2.3$ channels in the presence of $Ca_v\alpha2\delta-1$	95
TABLE III : Fluorescent-activated cell sorting analysis of $Ca_v2.3$	97
TABLE IV : Fluorescent-activated cell sorting analysis of $Ca_v\beta3$ constructs	98

Liste des figures

Figure 1: Homologie entre les canaux calciques activés par le voltage (VGCC).....	8
Figure 2 : Mécanisme d'excitation-contraction du muscle cardiaque.	15
Figure 3 : Mécanisme d'exocytose de neurotransmetteurs dépendant du calcium.	16
Figure 4 : Mécanisme du couplage excitation-transcription.	17
Figure 5 : Structure secondaire prédite des canaux calciques VGCC.....	23
Figure 6 : Alignement de séquence des segments S4 des canaux VGCC.	24
Figure 7 : Alignement de séquence des domaines AID des canaux HVA.	26
Figure 8 : Interactions entre la sous-unité $Ca_v\beta 3$ et le domaine AID de la sous-unité $Ca_v1.2$	27
Figure 9 : Diagramme de l'organisation schématique des domaines fonctionnels de la sous-unité $Ca_v\beta 3$ selon la structure cristalline.	28
Figure 10 : La sous-unité $Ca_v\beta 2a$ est ancrée dans la membrane cellulaire.	28
Figure 11 ; Structure tertiaire de la sous-unité $Ca_v\beta$	29
Figure 12 : Modifications post-traductionnelles proposées pour la sous-unité $Ca_v\alpha 2\delta$	31
Figure 13 : Diagramme cinétique minimal pour le canal $Ca_v2.3$	34
Figure 14 : Modèle proposé de l'inactivation de type « Ball and Chain » pour les canaux HVA.	38
Figure 15 : Modèle proposé de l'inactivation de type « Hinged-Lid » pour les canaux HVA.	39
Figure 16 : L'alignement proposé des quatre segments S6 du canal $Ca_v2.3$ avec le segment S6 du canal $K_v1.2$. (figure inspirée de Wall-Lacelle, Hossain et al. 2011). (Wall-Lacelle, Hossain et al. 2011)	45
Figure 17 : Représentation schématique des états de transition des canaux VGCC.	46
Figure 18 : Position de l'épitope HA dans le canal $Ca_v2.3$	53
Figure 19 : Graphiques obtenus suite à l'analyse des échantillons en FACS.	61

Liste des figures dans l'article

FIGURE- 1 : $Ca_v\beta 3$ stimulated whole-cell currents and cell surface density of $Ca_v2.3$	83
FIGURE- 2 : $Ca_v\beta$ isoforms stimulated whole-cell currents and cell surface density of $Ca_v2.3$	84
FIGURE- 3 : $Ca_v\alpha 2\delta-1$ mildly improves half-life of $Ca_v2.3$ upon arrest of cellular protein synthesis.	85
FIGURE- 4 : Single point mutants W386A and Y383G are found to disrupt plasma membrane targeting.	86
FIGURE- 5 : C-terminal of $Ca_v\beta 3$ does not contribute significantly to functional modulation of $Ca_v2.3$	87
FIGURE- 6 : Homology model of AID from $Ca_v2.3$ in complex with $Ca_v\beta 3$	88
FIGURE- 7 : Dissection of the SH3-HOOK-GK fragment along structural boundaries.	89
FIGURE- 8 : Mutations of Leucine residues in the GK domain decrease plasma membrane targeting.	90
FIGURE- 9 : Homology model of AID from $Ca_v2.3$ in complex with $Ca_v\beta 3$ highlighting the quartet of leucine residues in $Ca_v\beta 3$ surrounding the AID helix in three different orientations.	91
FIGURE- 10 : $Ca_v2.3$ protein density decreased with $Ca_v\beta 3$ Leu mutants.....	92

Liste des abréviations

- A -

A : Alanine (Ala)

Achr : Récepteur à l'acétylcholine

AID : « Alpha Interaction Domaine »

- B -

BID : « Beta Interaction Domain »

BTZ : Benzothiazépine

- C -

C : Cystéine (Cys)

CDI : Inactivation Dépendante du Calcium

CFU : « Colony Forming Unit »

CICR : « Ca²⁺-induced Ca²⁺ release »

CRE : « cAMP Response Element »

- D -

D : Aspartate (Asp)

ΔG_{act} : Énergie libre de Gibbs d'activation

DHP : Dihydropyridine

- E -

E : Glutamate (Glu)

$E_{0.5, \text{act}}$: Potentiel de mi-activation

$E_{0.5, \text{inact}}$: Potentiel de mi-inactivation

EDTA : Acide diaminotétracarboxylique

EGTA : Acide glycol-bis(2-aminoéthyléther)-*N,N,N',N'*-tétraacétique

- F -

F : Phénylalanine (Phe)

- G -

G : Glycine (Gly)

GK : Guanylate Kinase

- H -

H : Histidine (His)

HVA : « High Voltage Activated »

- I -

I : Isoleucine (Ile)

- K -

K : Lysine (Lys)

- L -

L : Leucine (Leu)

LVA : « Low Voltage Activated »

- M -

M : Méthionine (Met)

MAGUK : Guanylates Kinases Associées à la Membrane

MES : Acide méthanesulfonique

MTS : Méthanethiosulfonate

MTSET : Méthanethiosulfonate-éthyltriméthylammonium

- N -

N : Asparagine (Asn)

NK : « Nucleotide Kinase »

- O -

ω -CTx-GVIA : ω -conotoxine-GVIA

ω -aga-IVA : ω -agatoxine-IVA

- P -

P : Proline (Pro)

PAA : Phénylalkylamine

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

Réaction en chaîne par polymérase

PDZ : « Post synaptic Disc Large Zona »

- Q -

Q : Glutamine (Gln)

- R -

R : Arginine (Arg)

R100 : Courant résiduel à 100 ms

RE : Réticulum Endoplasmique

ROC : « Receptor Operated Channel »

RS : Réticulum Sarcoplasmique

- S -

S : Serine (Ser)

SCAM : « Substituted Cysteins Accessibility Method »

S.E.M. : Écart standard à la moyenne

SH3 : « Src Homology-3 »

- T -

T : Thréonine (Thr)

TEA : Tétréthylammonium

TRP : « Transient Receptor Potential »

τ_{deact} : Constante de temps de désactivation

τ_{inact} : Constante de temps d'inactivation

- V -

V : Valine (Val)

$V_{0.5, \text{act}}$: Potentiel de mi-activation

VDCC : Canal Calcique Dépendant du Voltage

VDI : Inactivation Dépendante du Voltage

- W -

W : Tryptophane (Trp)

- X -

X : Acide aminé quelconque

- Y -

Y : Tyrosine (Tyr)

À Parivash et Bahareh

Remerciements

Je suis très reconnaissant envers le Dr Lucie Parent pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et dans son équipe. Durant les trois années d'interaction quotidienne, elle a su canaliser mes efforts afin de produire un résultat final dont je suis fier. Son professionnalisme et son intégrité scientifique exemplaires ne manqueront pas de me servir lors de mes projets à venir. J'ai grandement apprécié sa haute estime et ses exigences envers ses étudiants et surtout, la transmission du savoir-faire rigoureux qui ont servi d'agonistes à mon apprentissage. Son encadrement, sa direction, son encouragement et ses conseils précieux ont catalysé l'avancement de ce projet.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire, soient Pierre-Olivier Demers-Giroux pour les moments surréels, Yolaine Dodier pour son aide, Julie Verner pour m'avoir appris les techniques en culture cellulaire, Fabrice Marger et Sébastien Wall-Lacelle pour m'avoir initié à l'électrophysiologie. J'adresse aussi mes plus grands remerciements au Dr Benoîte Bourdin pour m'avoir appris les nombreuses techniques de biologie moléculaire, son enseignement quotidien, sa grande patience et surtout pour son amitié. Je voudrais aussi souligner l'aide précieuse de M. Serge Sénéchal, responsable de l'appareil de cytométrie de flux.

Je souhaite témoigner ma reconnaissance aux membres du jury, les docteurs Céline Fiset et Réjean Couture pour l'évaluation de ce mémoire ainsi que pour leurs conseils précieux lors de la réunion du comité de parrainage. Je tiens aussi à remercier le docteur Pierre Bissonnette qui m'a recommandé au Dr Parent suite à mon stage au sein du GEPRM.

Finalement, je tiens à remercier du fond du cœur ma mère Parivash Danesh-Hosseini et mon beau-père Shahrddad Shadab et tout spécialement ma sœur Bahareh pour leur support et encouragement inépuisable tout au long de mes études.

1 INTRODUCTION

Deux articles publiés en 1883 par Sydney Ringer attribuent le rôle de messenger second au Ca^{2+} , un cation divalent. Dans le premier article, Ringer établit l'importance relative des ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} , présents dans le sang sur la contractilité du muscle cardiaque de grenouille (Ringer 1883a). Dans le second article, en remplaçant l'eau du robinet de la ville de Londres utilisée pour préparer ses solutions salines par de l'eau distillée, il observe une diminution des contractions du muscle cardiaque suivie d'un arrêt total après 20 minutes. Cependant, pour maintenir les contractions du cœur de grenouille, il réalise l'importance d'ajouter du sel de calcium à sa solution saline (Ringer 1883b), présentement connue sous le nom de solution de Ringer.

1.1 L'ion Ca^{2+} comme messenger second

Qu'est-ce qui justifie la nécessité d'un messenger second? En effet, chez un organisme pluricellulaire, les cellules sont spécialisées pour accomplir des tâches précises afin d'assurer le bon fonctionnement de l'organisme. C'est pourquoi au cours de l'évolution, les organismes pluricellulaires ont développé des moyens astucieux et complexes pour générer et traiter l'information. Ainsi, l'information est acheminée directement aux cellules par le biais des messagers primaires ou indirectement via les messagers secondaires intracellulaires. Les messagers primaires sont hétérogènes alors que les messagers secondaires sont moins nombreux et ubiquitaires dans les cellules. En tant que messenger second, l'ion Ca^{2+} assume des rôles très diversifiés (Carafoli, Santella et al. 2001). Ce cation divalent est un signal intracellulaire ubiquitaire qui joue un rôle important dans de nombreuses réactions physiologiques. Cette diversité résulte de la capacité de la cellule à interpréter les variations de la concentration intracellulaire de l'ion Ca^{2+} en termes de vitesse, amplitude et aussi selon son profil temporel et

spatial (Berridge, Lipp et al. 2000). La cellule doit cet ajustement aux protéines qui contrôlent l'homéostasie de l'ion Ca^{2+} tels les canaux calciques activés par le voltage (VGCC), les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), les pompes Ca^{2+} ATPases et les protéines qui tamponnent le Ca^{2+} comme la calnexine (Berridge, Bootman et al. 2003). Ces protéines contrôlent les fluctuations de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} ou réagissent face à ces fluctuations en stimulant d'autres voies de signalisation.

Le rôle indéniable que joue l'ion calcium dans d'innombrables activités dans les cellules différenciées débute donc avec la découverte de son implication dans la contraction du muscle cardiaque. L'ion Ca^{2+} intervient dans les processus cellulaires du début de la vie, lors de la fertilisation, jusqu'à la mort de celle-ci par apoptose, en passant par la contraction musculaire, la sécrétion, la régulation de l'expression des gènes, le métabolisme, la prolifération, l'apprentissage et la mémoire, pour n'en nommer que quelques uns (Berridge, Lipp et al. 1999).

1.1.1 Homéostasie de l'ion Ca^{2+}

La concentration intracellulaire basale de l'ion Ca^{2+} libre se situe entre 10^{-5} et 10^{-4} mM tandis que le milieu extracellulaire en contient entre 1 et 2 mM. Ce gradient de concentration favorise l'influx d'ions Ca^{2+} dans la cellule. La membrane cellulaire lipidique étant imperméable aux ions chargés, l'ion Ca^{2+} ne peut pas s'introduire par simple diffusion passive en suivant son gradient de concentration. Les canaux protéiques permettent un accès contrôlé aux ions Ca^{2+} . De plus, la concentration du Ca^{2+} intracellulaire ne doit dépasser 1 μM car la cellule doit pomper le cation à l'extérieur et se préparer pour le prochain message calcique aussi rapidement que possible. À titre d'exemple, un simple pulse calcique ou « *single-pulse* » dans le cytoplasme d'une cellule eucaryote permet à la concentration de Ca^{2+} intracellulaire d'atteindre 10^{-3} mM (Carafoli and Klee 1999). Il existe deux voies majeures d'entrée de Ca^{2+} dans le cytosol :

- le Ca^{2+} peut provenir du milieu extracellulaire via les canaux calciques situés à la membrane plasmique
- Les réticulums sarcoplasmique et endoplasmique constituent un réservoir de calcium intracellulaire qui peut contribuer à augmenter la concentration cytosolique de Ca^{2+}

1.1.2 Transport membranaire de l'ion Ca^{2+}

La membrane plasmique est constituée de protéines diverses insérées dans la matrice fluide de la double couche lipidique. La double couche lipidique forme la trame de la membrane, mais ce sont les protéines qui déterminent la plupart de ses fonctions et ses caractéristiques. La membrane plasmique et les membranes des différentes organelles possèdent toutes leurs propres ensembles de protéines. Les phospholipides qui forment la double couche lipidique sont constitués d'une tête phosphorylée et d'une ou de plusieurs chaînes d'acides gras. Les phospholipides manifestent donc un comportement amphiphile. Leurs queues sont formées d'hydrocarbures hydrophobes tandis que le groupement phosphate et les molécules polaires qu'elles portent forment une tête hydrophile. C'est le centre hydrophobe de la membrane qui entrave le passage des ions et des molécules polaires. Les cations et les anions doivent passer, soit par des canaux qui sont des pores aqueux formés par des protéines transmembranaires spécifiques, soit par des protéines de transport actif primaire et secondaire (Alters 2000).

Dans la cellule, le gradient de concentration de Ca^{2+} est soumis à des mécanismes qui visent à augmenter la concentration de Ca^{2+} intracellulaire alors que d'autres tentent de la réduire. C'est l'équilibre entre ces deux mécanismes qui établit la concentration intracellulaire de Ca^{2+} soit au repos, soit lors d'une stimulation (Bootman, Collins et al. 2001). Les

cellules utilisent plusieurs types de canaux calciques pour générer des flux calciques à l'intérieur de la cellule, tels :

- les canaux calciques activés par le voltage « *Voltage-gated calcium channels, VGCC* » sont majoritairement exprimés dans les cellules excitables telles les cellules musculaires et neuronales, où ils sont activés suivant une dépolarisation de la membrane plasmique,
- les canaux calciques activés par un récepteur « *Receptor-operated calcium channels, ROCC* » sont majoritairement exprimés dans les cellules sécrétrices ainsi que dans les terminaisons nerveuses, où ils sont activés par la liaison d'un agoniste tels que le récepteur NMDA du glutamate, le récepteur P2X₇ de l'ATP et le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (Berridge, Bootman et al. 2003).
- les canaux calciques mécaniquement activés « *Mechanically activated calcium channels* » sont exprimés dans plusieurs types cellulaires comme les cellules épithéliales de la trachée (Boitano, Dirksen et al. 1992) et les cellules cardiaques (Dostal and Baker 1998) pour en nommer quelques unes. Ces canaux sont activés par la déformation cellulaire,
- SOC signifie « *Store-operated calcium channels, SOCCs* ». Ces canaux sont activés en réponse à une déplétion des réserves calciques intracellulaires.

Pour maintenir le gradient de concentration de Ca²⁺ au repos, ou pour redresser son gradient après une stimulation, la cellule doit pomper le Ca²⁺ à l'extérieur contre son gradient. Deux systèmes dans la membrane plasmique participent pour accomplir cette tâche : l'échangeur NCX qui est un échangeur à haute capacité avec une faible affinité et une pompe Ca²⁺ ATPase à haute affinité mais à faible capacité. Tandis que les pompes Ca²⁺ ATPases sont ubiquitaires, les échangeurs NCX sont particulièrement

abondants dans les cellules excitables, telles les cellules cardiaques (Carafoli, Santella et al. 2001).

1.2 Canaux calciques activés par le voltage

La première classification des canaux calciques VGCC a été fondée sur des propriétés biophysiques. En 1975, deux types de courants calciques entrants ont été observés dans des œufs d'étoiles de mer, *Mediaster aequalis*. Le premier type de courants observés s'active autour de -50 mV alors que le deuxième type s'active autour de -6 mV (Hagiwara, Ozawa et al. 1975). En 1981, un autre groupe de recherche publie des résultats semblables en étudiant les propriétés électrophysiologiques des neurones du corps olivaire inférieur du cochon d'Inde *Cavia porcellus* (Llinas and Yarom 1981). Deux familles de canaux calciques sont alors établies en 1986 : la famille des canaux calciques activés par une faible dépolarisation (Low-Voltage-Activated, LVA) et la famille de canaux calciques activés par une forte dépolarisation (High-Voltage-Activated, HVA) (Mitra and Morad 1986). Aujourd'hui, il est clairement établi que les canaux LVA produisent des courants de type T alors que les canaux HVA produisent des courants de type L. Les courants de type T s'activent à un potentiel membranaire d'environ -70 mV pour atteindre un courant maximal autour de -45 mV. Les courants de type L s'activent à un potentiel membranaire autour de -40 mV pour atteindre un courant maximal autour de 5 mV (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). Au cours des années 1980, d'autres canaux de type HVA ont été identifiés, produisant les courants de types P/Q, R et N au niveau des neurones (Nowycky, Fox et al. 1985) (Fox, Nowycky et al. 1987).

Ce n'est qu'au milieu des années 1980 que le groupe de Catterall découvre la composition multimérique des canaux calciques. En effet, les expériences révèlent que les canaux calciques sont en réalité composés de trois à quatre sous-unités (Curtis and Catterall 1986). Dès lors, la

nomenclature des canaux calciques est révisée et ainsi, la sous-unité principale est appelée $Ca_v\alpha_1$ et les sous-unités auxiliaires sont appelées $Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ et $Ca_v\gamma$. C'est la sous-unité principale qui forme le pore du canal et c'est elle qui détermine ses propriétés biophysiques et pharmacologiques. Le rôle des sous-unités auxiliaires est de moduler l'activité de la sous-unité principale. Selon cette nomenclature, on obtient une classification qui est représentée dans le Tableau I.

La nomenclature utilisée présentement s'inspire des modèles utilisés pour les canaux potassiques. Cela résulte en une appellation du type $Ca_vx.y$ où x désigne le chiffre de la famille à laquelle appartient le canal tandis que y distingue les membres d'une même famille. Ainsi, les canaux qui produisent les courants de type L sont rangés dans la famille Ca_v1 , ceux produisant les courants de type P/Q, N et R sont rangés dans la famille Ca_v2 et les canaux produisant les courants de type T sont classés dans la famille Ca_v3 (Tableau I). La nomenclature pour les sous-unités auxiliaires se décrit comme $Ca_v\beta nm$, $Ca_v\alpha_2\delta nm$ et $Ca_v\gamma nm$ où le chiffre n définit la famille de protéine/gène alors que la lettre m fait référence aux différentes isoformes selon l'épissage alternatif (Ertel, Campbell et al. 2000). Une comparaison des séquences primaires des sous-unités principales des canaux calciques suggère une première évolution séparant les canaux calciques en HVA et LVA, avec moins de 30% d'homologie de la séquence primaire. Un deuxième événement évolutif sépare les canaux HVA en deux sous-familles, les canaux Ca_v1 et Ca_v2 qui partagent 50% d'homologie de séquence, et 80% d'homologie pour les membres d'une même famille. Les isoformes obtenues suite à un épissage alternatif partagent plus de 95% d'homologie (**Figure 1**) (Lacinova 2005).

Tableau I : Classification, localisation tissulaire et propriétés pharmacologiques des canaux VGCC.
(Birnbaumer, Campbell et al. 1994; Koschak, Reimer et al. 2003; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005; Catterall 2011)

Zone d'activation	Classification fonctionnelle	Canal (Ca _v α1)	Ancienne nomenclature	Localisation tissulaire	Inhibiteurs
HVA	L (L pour « large » et « long-lasting »)	Ca _v 1.1	α1S	Muscle squelettique, tubules transverses	Dihydropyridines (DHP) Phénylalkylamines (PAA) Benzothiazépines (BTZ) (IC ₅₀ < 50 nM et pour Ca _v 1.4: IC ₅₀ < 300 nM)
		Ca _v 1.2	α1C	Myocytes cardiaques, muscle lisse, cellules endocrines, corps cellulaires et dendrites des neurones	
		Ca _v 1.3	α1D	Cellules endocrines, neurones, myocytes des oreillettes et du nœud sinusal, cellules de la cochlée	
		Ca _v 1.4	α1F	Cellules en bâtonnet et les cellules bipolaires de la rétine	
	P/Q (P pour les cellules Purkinje)	Ca _v 2.1	α1A	Terminaisons nerveuses, dendrites et cellules endocrines	ω-agatoxine IVA (IC ₅₀ = 1-3 nM pour le type P et 100-200 nM pour le type Q)
	N (N pour neuronal)	Ca _v 2.2	α1B		ω-conotoxine GVIA (IC ₅₀ = 1-2 μM)
	R (R pour résistant)	Ca _v 2.3	α1E	Corps cellulaires et dendrites des neurones	SNX-482 (IC ₅₀ = 27 nM)
LVA	T (T pour « tiny » et « transient »)	Ca _v 3.1	α1G	Corps cellulaires et dendrites des neurones et myocytes des muscles lisses Nœud sinusal (Ca _v 3.1)	Mibefradil, U92032, Penfluridol, Pimozide (susceptibles d'inhiber de manière moindre les familles Ca _v 1 et Ca _v 2)
		Ca _v 3.2	α1H		
		Ca _v 3.3	α1I	Corps cellulaires et dendrites des neurones	

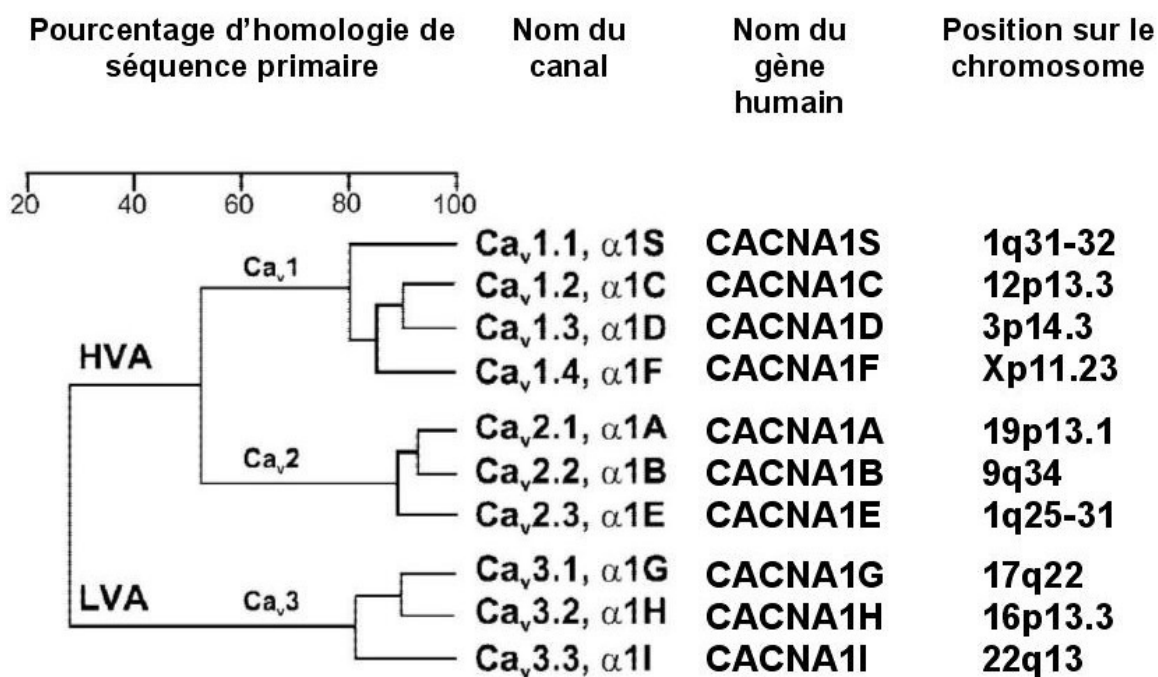


Figure 1: Homologie entre les canaux calciques activés par le voltage (VGCC).

On dénombre 10 canaux VGCC qui sont regroupés en trois familles. Les canaux HVA comprennent les familles Ca_v1 et Ca_v2 tandis que la famille Ca_v3 fait partie des canaux LVA (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005; Lacinova 2005; Bidaud, Mezghrani et al. 2006) (figure inspirée de Perez-Reyes 2003).

1.2.1 Canaux calciques de type HVA

Les familles des canaux Ca_v1 et Ca_v2 forment la classe des canaux HVA. L'ion physiologique pour ces canaux est le Ca²⁺ mais le pore reste perméable à d'autres cations divalents. À titre d'exemple, il est possible d'observer des courants en présence de Ba²⁺ ainsi qu'en présence de Sr²⁺, mais avec des conductances unitaires différentes de celle du Ca²⁺ (Yoshii, Tsunoo et al. 1988). Ces deux familles de canaux requièrent une forte dépolarisation membranaire pour passer à l'état ouvert, mais différent au point de vue de cinétiques d'activation et d'inactivation en plus de leur distribution tissulaire (**Tableau II**).

Tableau II : Propriétés biophysiques des canaux VGCC.

Zone d'activation	Classification fonctionnelle	Canal	Seuil d'activation	Constante d'inactivation	Conductance unitaire
HVA	L	Ca _v 1.1	De -14 à 2.5 mV (15 mM Ba ²⁺)	> 500 ms (10 mM Ba ²⁺)	Ba ²⁺ > Ca ²⁺
		Ca _v 1.2			
		Ca _v 1.3			
		Ca _v 1.4			
	P/Q	Ca _v 2.1	De 3.5 à 9.5 mV (15 mM Ba ²⁺)	≈ 50 à 80 ms (15 mM Ba ²⁺)	Ba ²⁺ = Ca ²⁺
	N	Ca _v 2.2			
R	Ca _v 2.3				
LVA	T	Ca _v 3.1	De -46 à -44 mV (1,25 mM Ca ²⁺)	≈ 20 à 50 ms (10 mM Ca ²⁺)	Ba ²⁺ = Ca ²⁺
	Ca _v 3.2				
	Ca _v 3.3				

Tableau II : (Fox, Nowycky et al. 1987; Klockner, Lee et al. 1999; Ertel, Campbell et al. 2000; Yamakage and Namiki 2002; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005)

1.2.1.1 Canaux calciques de type Ca_v1

Présentement, la famille des canaux calciques Ca_v1 comprend quatre membres : Ca_v1.1, Ca_v1.2, Ca_v1.3 et Ca_v1.4. Ces canaux génèrent des courants de type L qui représentent les courants calciques dominants dans les muscles cardiaque, squelettique et lisse, ainsi que dans la rétine. Ces canaux sont caractérisés par leur activation sous l'effet d'une forte dépolarisation, une inactivation dépendante du Ca²⁺ (CDI), une conductance unitaire relativement élevée en Ba²⁺ et une inactivation dépendante du voltage relativement rapide en présence de Ca²⁺ et lente en présence d'autres ions divalents tels que Ba²⁺ et Sr²⁺. Des antagonistes, ou agents bloqueurs sont des outils précieux pour distinguer et identifier les différents types de courants calciques. À titre d'exemple, les canaux Ca_v1 peuvent sélectivement être inhibés par des antagonistes tels les dihydropyridines (DHP), les phénylalkylamines (PAA) et les benzothiazépines (BTZ). Plusieurs médicaments provenant de ces familles

de composés chimiques sont couramment utilisés pour traiter l'hypertension, l'angine et certains types d'arythmies cardiaques (Nowycky, Fox et al. 1985; Triggle 1999; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). Pour le traitement d'arythmie, ces composés exercent principalement deux effets sur le coeur. En premier lieu, ils ont un effet dromotrope négatif en diminuant la conductivité entre les oreillettes et les ventricules, et en deuxième lieu, ils ont un effet bathmotrope négatif, en diminuant l'excitabilité des cellules au niveau du nœud sino-atrial (Hockerman, Peterson et al. 1997a; Huber, Wappl et al. 2000; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). Les canaux Ca_v1 se distinguent aussi par une conductance en Ba^{2+} supérieure par un facteur de deux à la conductance observée en Ca^{2+} ainsi que par une inactivation lente ($\tau_{inact} > 500$ ms) en présence de Ba^{2+} (Ferreira, Rios et al. 2003).

1.2.1.2 Canaux calciques de type Ca_v2

Les canaux Ca_v2 produisent des courants de type P/Q ($Ca_v2.1$), N ($Ca_v2.2$) et R ($Ca_v2.3$). Ils ne sont généralement pas affectés par les antagonistes des canaux Ca_v1 mais ils sont inhibés par certaines toxines peptidiques. Certains de ces canaux montrent, tout comme les membres de la famille Ca_v1 , une conductance en Ba^{2+} supérieure à celle en Ca^{2+} . Cependant, leur inactivation ne dépend pas du Ca^{2+} et elle est plus rapide, avec une constante de temps d'inactivation située entre 50 et 80 ms, dépendamment de l'isoforme considérée.

Les courants de type P ont été originellement identifiés dans les cellules Purkinje du cervelet et sont hautement sensibles à la toxine ω -agatoxine IVA d'araignée avec une constante de dissociation (Kd) d'environ 2 nM (Llinas, Sugimori et al. 1989). Les courants de type Q ont été découverts dans les cellules granulaires du cervelet et leurs sensibilités à la toxine ω -agatoxine IVA sont différentes des courants de type P, avec une Kd > 100 nM. Les cinétiques d'inactivation de ces deux

types de courants sont aussi différentes : les courants de type P ne démontrent pas d'inactivation lors d'une dépolarisation membranaire prolongée alors que les courants de type Q s'inactivent de manière prononcée. (Bourinet, Soong et al. 1999).

Les courants de type N ont été initialement observés dans les neurones du ganglion de la racine dorsale du poulet (Carbone and Lux 1984). Ces courants ont généralement une inactivation dépendante du voltage plus rapide que les courants de type L mais plus lente que les courants de type T (Nowycky, Fox et al. 1985). Pharmacologiquement, ces courants sont sensibles à l'inhibition par les toxines ω -conotoxines, une famille de petits peptides (13-29 acides aminés) provenant du venin d'escargots marins (Olivera, Miljanich et al. 1994).

Les courants de type R constituent environ 15% des courants générés par les canaux HVA dans les cellules granulaires du cervelet et ils se différencient, entre autres, par le fait qu'ils étaient, jusqu'à tout récemment, considérés comme insensibles aux bloqueurs chimiques et peptidiques des canaux calciques mentionnés précédemment (Randall and Tsien 1995). La toxine extraite du venin de la tarentule *Hysteroocrates gigas* appelée SNX-482 bloque les canaux Ca_v2 exprimés de manière hétérologue et elle s'est avérée partiellement efficace pour bloquer les courants natifs de type R dans les cellules du cervelet (Newcomb, Szoke et al. 1998; Tottene, Volsen et al. 2000).

1.2.2 Rôles physiologiques des canaux calciques de type HVA

Une des fonctions majeures des canaux VGCC est de contribuer à la phase de dépolarisation lors d'un potentiel d'action dans les cellules. L'ouverture des canaux VGCC entraîne un influx de Ca^{2+} qui régule des mécanismes intracellulaires, tels la contraction par les cellules des muscles cardiaque et squelettique, la sécrétion par les cellules endocrines,

la neurotransmission par les neurones ainsi que l'expression génique dans plusieurs types cellulaires. Étant donné l'impressionnante étendue des fonctions physiologiques assurées par ces canaux, un mauvais fonctionnement de ces derniers est souvent à l'origine de nombreuses pathologies chez l'homme telles que le syndrome de Timothy, la rétinite pigmentaire de type 2 et l'hyperthermie maligne (**Tableau III**).

Tableau III : Pathologies associées aux canaux HVA.

Classification fonctionnelle	Canal	Mutation et pathologie	Effet fonctionnel perte de fonction (-) gain de fonction (+)
L	Ca _v 1.1	Paralysies périodiques hypokaliémiques (chez l'homme) ^{1, 2, 3} Hyperthermie maligne (chez l'homme) ^{1, 2}	-
	Ca _v 1.2	Arrêt cardiaque subit (chez l'homme) ⁶	-
		Syndrome de Timothy (chez l'homme) ^{1, 2}	+
	Ca _v 1.3	Troubles auditifs et cardiaques majeurs (chez la souris)	-
	Ca _v 1.4	Rétinite pigmentaire de type 2 (chez l'homme) ^{1, 2}	-
P/Q	Ca _v 2.1	Migraine familiale hémiparalytique (chez l'homme) ^{1, 2}	+
		Ataxie épisodique de type 2 (chez l'homme) ^{1, 2, 3}	-
		Ataxie spino-cérébelleuse de type 6 (chez l'homme) ^{1, 2, 3}	
N	Ca _v 2.2	Pas de mutation détectée chez l'homme. Chez la souris Ca _v 2.2 ^{-/-} , modification des réponses nociceptives, baisse des fonctions du système nerveux sympathique, pression artérielle et rythme cardiaque élevés, modifications dans la sensibilité à l'éthanol ainsi qu'aux anesthésiants ^{1, 2}	-
R	Ca _v 2.3	Diabète de type 2 (chez l'homme) ^{4, 5}	-

Tableau III : 1 : (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). **2 :** (McKeown, Robinson et al. 2006). **3 :** (Bidaud, Mezghrani et al. 2006). **4 :** (Holmkvist, Tojjar et al. 2007). **5 :** (Muller, Hanson et al. 2007). **6 :** (Antzelevitch, Pollevick et al. 2007)

1.2.2.1 Mécanisme d'excitation–contraction du muscle squelettique

Les canaux $Ca_v1.1$ étant exprimés dans les muscles squelettiques, ils assument un rôle important dans le couplage excitation-contraction. Ce couplage se produit grâce à l'interaction physique et mécanique entre le canal $Ca_v1.1$ qui se trouve dans la membrane des tubules transverses et le récepteur à la ryanodine RyR1 qui se trouve dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. L'entrée de Ca^{2+} extracellulaire n'est pas nécessaire pour l'initiation de la contraction dans le muscle squelettique (Adams and Beam 1990; Rios and Pizarro 1991). En effet, seul le changement de conformation du canal Ca_v1 induit par le changement de potentiel permet d'activer le canal RyR1 qui, à son tour, donne lieu à un relarguage d'ions Ca^{2+} dans le cytoplasme. Le Ca^{2+} en provenance du réticulum sarcoplasmique se fixe sur la troponine C et entraîne un changement de conformation de la troponine, ce qui déplace légèrement la tropomyosine qui est liée à la troponine, démasquant ainsi les sites de liaison actine-myosine. Ceci entraîne le glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine. Suite à la contraction, le Ca^{2+} est repompé dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe Ca^{2+} ATPase (SERCA) qui hydrolyse de l'ATP pour déplacer les ions Ca^{2+} contre leur gradient électrochimique. La diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire engendre alors la relaxation du muscle (Guénard 2001).

1.2.2.2 Mécanisme d'excitation–contraction du muscle cardiaque

Le mécanisme du couplage excitation-contraction dans le muscle cardiaque est très similaire à celui dans le muscle squelettique. Cependant, l'entrée du Ca^{2+} par le milieu extracellulaire est nécessaire pour le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes. C'est l'entrée de Ca^{2+} via le canal $Ca_v1.2$ qui active à son tour le canal RyR2, initiant le processus appelé « calcium-induced calcium-release » ou CICR.

Dans ce mécanisme, l'entrée de charges positives Ca^{2+} à travers le canal $\text{Ca}_v1.2$ contrebalance la sortie d'ions K^+ , ce qui prolonge la phase de dépolarisation pendant le potentiel d'action. L'augmentation locale d'ions Ca^{2+} dans l'espace « cleft » entre la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique induit le relargage du Ca^{2+} contenu dans le réticulum sarcoplasmique en activant le canal RyR2 (Bers 2002). En effet, bien que les canaux calciques ne soient pas en interaction directe, certaines protéines, telle la sorcine, interagissent avec RyR2 d'une part et avec l'extrémité C-terminale de $\text{Ca}_v1.2$ d'autre part, favorisant leur couplage fonctionnel (Meyers, Puri et al. 1998) (**Figure 2**).

1.2.2.3 Fonction au niveau neuronal

L'influx de Ca^{2+} à travers les canaux VGCC neuronaux déclenche divers processus cellulaires tels le relargage de neurotransmetteurs, l'activation d'enzymes dépendantes du Ca^{2+} ainsi que la régulation de l'excitabilité neuronale (Wheeler, Randall et al. 1994; Dunlap, Luebke et al. 1995). Les types de courants qui sont observés dans le système nerveux central sont les courants de type T, N, L, P/Q et R. Cependant, les espèces prédominantes dans les terminaisons présynaptiques sont les courants de type P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) et N ($\text{Ca}_v2.2$). Le potentiel d'action voyage le long de l'axone pour atteindre la synapse où il active les canaux VGCC se trouvant sur la membrane présynaptique. Ces derniers sont physiquement couplés aux protéines formant le complexe de sécrétion des vésicules présynaptiques, de sorte que l'entrée de Ca^{2+} à travers ces canaux favorise la fusion des membranes des vésicules de sécrétion avec la membrane présynaptique. Ainsi, l'entrée de Ca^{2+} et la dissociation du complexe de sécrétion qui s'ensuit sont des étapes clés dans la libération de neurotransmetteurs dépendante de Ca^{2+} (**Figure 3**) (Stanley 1997).

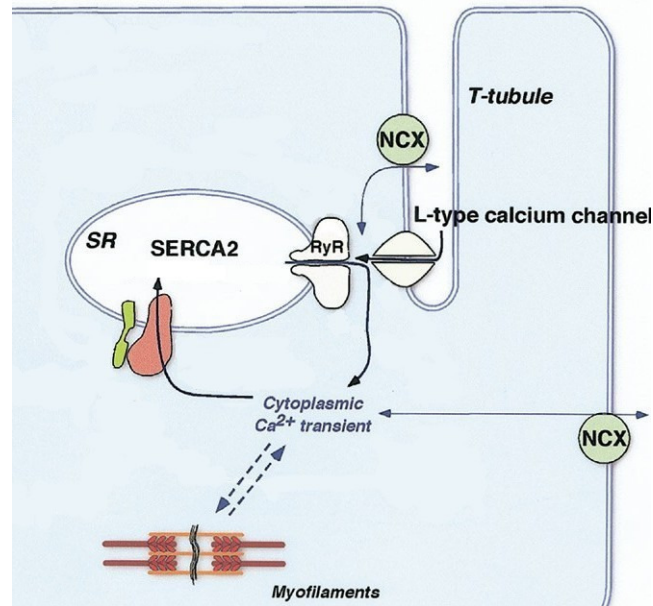


Figure 2 : Mécanisme d'excitation-contraction du muscle cardiaque.

Le mécanisme du couplage excitation-contraction dans le muscle cardiaque est très similaire à celui dans le muscle squelettique. Cependant, l'entrée du calcium par le milieu extracellulaire est nécessaire pour le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes. C'est l'entrée de calcium via le canal Ca_v1.2 qui active à son tour le canal RyR2, initiant le processus appelé « calcium-induced calcium-release » ou CICR. L'augmentation locale d'ions Ca²⁺ dans l'espace « cleft » entre la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique (« SR ») induit le relarguage du Ca²⁺ contenu dans le réticulum sarcoplasmique en activant le canal RyR2. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ entraîne le glissement des filaments d'actine (« Myofilaments »). Suite à la contraction, le Ca²⁺ est repompé dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe SERCA2 ou à l'extérieur de la cellule par l'échangeur NCX. La diminution de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire engendre alors la relaxation du muscle cardiaque (figure inspirée de Hoshijima, Knoll et al. 2006).

1.2.2.4 Couplage excitation-transcription

Un des rôles importants du calcium en tant que messenger second est celui d'activer des voies de signalisation menant à l'expression de différents gènes.

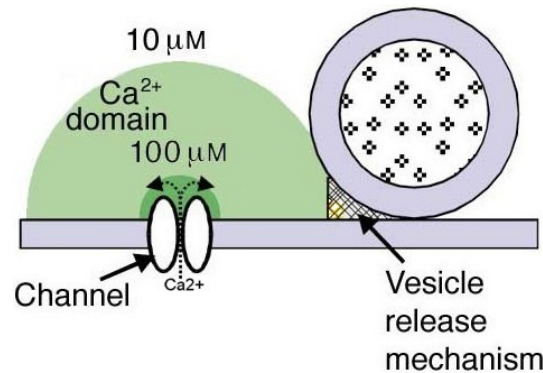


Figure 3 : Mécanisme d'exocytose de neurotransmetteurs dépendant du calcium.

Sous l'effet de l'entrée du Ca^{2+} à travers les canaux VGCC, les vésicules sont menées à fusionner avec la membrane présynaptique pour déverser les molécules de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (figure inspirée de Stanley 1997).

Des études faites sur le génome complet ont identifié plus de 300 gènes et 30 facteurs de transcription qui sont régulés par la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Les canaux de la famille Ca_v1 sont parfois associés à ce couplage excitation-transcription. Dans ce mécanisme, l'entrée de calcium via ces canaux peut activer la transcription de certains gènes par une interaction avec la protéine CREB. Les canaux Ca_v1 activent CREB suite à leur association avec des complexes de signalisation, notamment grâce à la calmoduline (CaM) (Dolmetsch 2003). La protéine CREB est un facteur de transcription qui, lorsqu'elle est phosphorylée, se lie sur une séquence d'ADN de type CRE (« cAMP Response Element »). La liaison de la protéine CREB sur la séquence CRE permet de réguler la transcription du gène associé (**Figure 4**) (Hardingham, Cruzalegui et al. 1998). Un mécanisme alternatif de signalisation directe entre le canal et le noyau a été proposé par le groupe de Dolmetsch. En effet, ce groupe a montré qu'un fragment de l'extrémité C-terminale de $\text{Ca}_v1.2$ est capable de se transloquer dans le noyau et de réguler la transcription d'une grande variété de gènes importants pour l'excitabilité et la signalisation neuronale (Gomez-Ospina, Tsuruta et al. 2006). Il a aussi été démontré que le canal

Ca_v2.1 est capable de réguler l'expression de la syntaxine 1A qui relie le canal à la machinerie de sécrétion synaptique (Sutton, McRory et al. 1999).

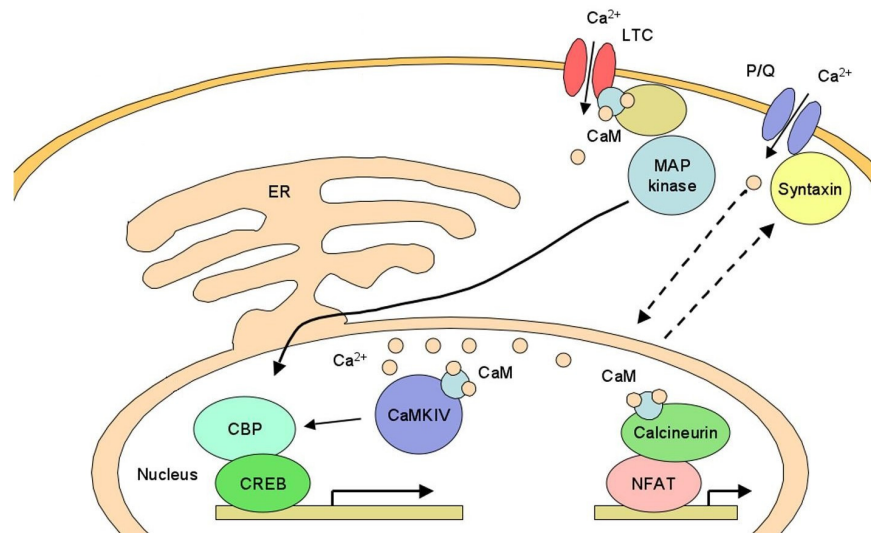


Figure 4 : Mécanisme du couplage excitation-transcription.

Les canaux de type L (LTC) utilisent la CaM pour détecter les élévations locales de Ca²⁺ et ainsi activer la transcription de gènes par la voie des MAP Kinases. L'activation des canaux Ca_v2.1 mène à l'expression de la syntaxine 1A qui relie le canal à la machinerie de sécrétion synaptique. Certains signaux calciques sont médiés par la phosphorylation de CBP (CREB binding protein) par la CaM kinase IV. La protéine CREB est un facteur de transcription qui, lorsqu'elle est phosphorylée, se lie sur une séquence d'ADN de type CRE (« cAMP Response Element »). La liaison de la protéine CREB sur la séquence CRE ainsi que son interaction avec le coactivateur CBP permettent de réguler la transcription du gène associé. Le Ca²⁺ dans le noyau peut aussi activer la calcineurine qui déphosphoryle NFAT, ce qui amorce la transcription du gène en amont (figure inspirée de Dolmetsch 2003).

1.2.2.5 Pathologies associées aux canaux HVA

Tel que mentionné précédemment, les canaux calciques VGCC transforment les changements de potentiel dans la membrane en un influx de calcium. Cette propriété leur permet de transformer un signal électrique en événements biochimiques intracellulaires. Le Ca²⁺ étant une importante molécule de signalisation intracellulaire, une altération dans la fonction d'un canal calcique pourrait avoir des répercussions très étendues dans le

fonctionnement de la cellule (Lorenzon and Beam 2000). L'importance de ces canaux est aussi mise en évidence par le grand nombre de maladies génétiques qui leur sont associées. Ces mutations peuvent avoir deux effets. Dans le premier cas, la mutation provoque une perte de régulation du canal qui se traduit par une augmentation anormale de son activité, soit un gain de fonction. Dans le second cas, la mutation provoque une absence totale ou partielle d'activité, soit une perte de fonction. Bien que différents dans leurs effets, ces deux types de modulation fonctionnelle mènent souvent au mauvais fonctionnement de plusieurs tissus (**Tableau III**) (McKeown, Robinson et al. 2006).

La première mutation *in vivo* identifiée est celle qui cause la dysgénésie musculaire chez les souris. Cette mutation invalide le gène qui code le canal $Ca_v1.1$ par un décalage du cadre de lecture à partir du nucléotide 4010. La délétion en C-terminal qui en résulte est létale chez la souris et se caractérise par un développement embryonnaire normal mais suivi d'un arrêt respiratoire lors de la naissance de l'animal (Beam, Knudson et al. 1986). Chez l'homme, des mutations dans le gène codant pour $Ca_v1.1$ induisent généralement une perte de fonction qui cause des paralysies périodiques hypokaliémiques (Elbaz, Vale-Santos et al. 1995) et de l'hyperthermie maligne (Stewart, Hogan et al. 2001).

Les souris dans lesquelles le gène codant pour $Ca_v1.2$ a été invalidé meurent durant leur développement embryonnaire par cause d'insuffisance cardiovasculaire, confirmant le rôle fondamental de ce canal dans le mécanisme de contraction cardiaque (Seisenberger, Specht et al. 2000). Chez l'humain, les mutations A39V et G490R causent une perte de fonction et elles sont associées à l'arrêt cardiaque subit produit par un intervalle QT plus court que la normale, rappelant le phénotype du syndrome de Brugada. Ce dernier étant caractérisé par un sus-décalage de l'intervalle ST au niveau des dérivations précordiales droites V1, V2 et V3, ainsi que par un aspect de bloc de branche droit à

l'électrocardiogramme (Antzelevitch, Pollevick et al. 2007). Deux autres mutations faux-sens (G402S et G406R) *de novo* causant un gain de fonction ont été répertoriées dans le canal $Ca_v1.2$ chez l'humain. Ces mutations ralentissent l'inactivation du canal (Barrett and Tsien 2008) et causent le syndrome de Timothy, qui est caractérisé par un dérèglement multi-systémique qui comprend, entre autres, la syndactylie, l'immunodéficience, le syndrome du long QT et le syndrome de mort subite du nouveau-né (Splawski, Timothy et al. 2004; Splawski, Timothy et al. 2005).

Chez l'humain, on ne connaît pas encore de cas de défaut génétique pour le canal $Ca_v1.3$. Cependant, des modèles animaux permettent d'élucider le rôle physiologique de ce canal et d'étudier un déficit potentiel. Les souris déficientes en $Ca_v1.3$ sont viables. Elles présentent cependant des troubles auditifs et cardiaques majeurs (Platzer, Engel et al. 2000). Leur surdité congénitale s'explique par une perte totale d'influx de calcium dans les cellules ciliées de la cochlée, causant ainsi un important changement dans la morphologie de celle-ci. Dans le cœur, $Ca_v1.3$ joue un rôle important dans l'induction de l'activité rythmique cardiaque dans les cellules du nœud sino-auriculaire grâce à son seuil d'activation relativement moins élevé que $Ca_v1.2$ (Zhang, He et al. 2005).

On dénombre plus de 73 mutations du gène codant pour $Ca_v1.4$. Chez l'homme, elles sont associées à la rétinite pigmentaire de type 2 (Zeit, Minotti et al. 2005). Ces mutations entraînent une interruption de la signalisation calcique et de la transmission synaptique au niveau des terminaisons des photorécepteurs de la rétine et perturbent l'organisation cellulaire de celle-ci chez la souris (Mansergh, Orton et al. 2005). Il y a aussi une certaine association qui est établie entre les patients souffrant de schizophrénie et le locus *CACNA1F* codant pour le canal $Ca_v1.4$. Cependant, les mutations ne sont pas encore connues et les études sont peu nombreuses sur ce sujet (Wei and Hemmings 2006).

Le canal $Ca_v2.1$ est exprimé à travers tout le système nerveux. La libération rapide de neurotransmetteurs dans la fente synaptique est principalement sous le contrôle de ce canal. L'une des premières preuves associant un désordre neurologique au canal $Ca_v2.1$ vient d'une étude faite sur des souris vacillantes (« tottering (*tg*) mouse ») (Fletcher, Lutz et al. 1996). Les souris déficientes en $Ca_v2.1$ meurent 3 à 4 semaines après la naissance et présentent un phénotype sévère d'ataxie et de dystonie (Jun, Piedras-Renteria et al. 1999). On observe une absence des courants de type P dans les cellules de Purkinje et une absence des courants de type Q dans les cellules granulaires. Ces courants sont impliqués dans la transmission synaptique rapide qui est tout de même maintenue en leur absence. Chez l'homme, des mutations du canal $Ca_v2.1$ sont associées à trois maladies : la migraine familiale hémiplégique (gain de fonction) (Kraus, Sinnegger et al. 1998; Kraus, Sinnegger et al. 2000), l'ataxie épisodique de type 2 (perte de fonction) (Ophoff, Terwindt et al. 1996) et l'ataxie spino-cérébelleuse de type 6 (perte de fonction) (Zhuchenko, Bailey et al. 1997; Zamponi, Lory et al. 2010).

Présentement, il n'y a pas de cas de mutation identifiée chez l'humain pour le canal $Ca_v2.2$ malgré un rôle similaire au canal $Ca_v2.1$. Selon les études effectuées sur des souris déficientes en $Ca_v2.2$, aucun phénotype sévère n'est documenté et les souris sont viables. Cependant, on observe chez ces souris une baisse des réponses nociceptives dans le test à la formaline. L'injection de formaline dans la patte de la souris cause des lésions tissulaires et permet de caractériser la réponse de l'animal à la douleur persistante (Saegusa, Matsuda et al. 2002). On observe aussi une sensibilité accrue aux stimuli nociceptifs de nature thermique (Hatakeyama, Wakamori et al. 2001), une baisse des fonctions du système nerveux sympathique, une pression artérielle et un rythme cardiaque élevés (Ino, Yoshinaga et al. 2001), des modifications dans la sensibilité à

l'éthanol (Newton, Orr et al. 2004) ainsi qu'aux anesthésiants (Takei, Saegusa et al. 2003).

L'inactivation du gène codant pour $Ca_v2.3$ cause un phénotype plus obscur chez les souris, qui sont viables malgré cette inactivation. Des travaux effectués en 2005 sur des souris déficientes en $Ca_v2.3$ prédisaient que des mutations de ce gène pouvaient affecter la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose dans les cellules bêta du pancréas. La première phase de sécrétion d'insuline est puissante mais n'est maintenue que pendant 10 minutes approximativement. Le canal $Ca_v2.3$ contrôle la seconde phase de sécrétion d'insuline qui est plus modeste mais soutenue sur une période plus longue, soit de quelques heures (Jing, Li et al. 2005). Le groupe de Schneider a aussi montré que cette inactivation peut causer une baisse de l'activité cardiaque chez les souris (Lu, Pereverzev et al. 2004). Ce n'est qu'en 2007 qu'un polymorphisme du gène *CACNA1E* codant pour le canal $Ca_v2.3$ chez l'humain est découvert. Ce polymorphisme joue un rôle chez les patients atteints du diabète de type 2 (McKeown, Robinson et al. 2006; Holmkvist, Tojjar et al. 2007; Muller, Hanson et al. 2007).

1.2.3 Structure quaternaire

Le premier canal de type VGCC à être purifié est le $Ca_v1.1$ provenant des tubules transverses du muscle squelettique du lapin. Cette première purification permet de déceler quatre sous-unités : une sous-unité principale α_1 (190-250 kDa), et trois sous-unités auxiliaires $\alpha_2\delta$ (130-200 kDa), β (52-78 kDa) et γ (28-35 kDa). Ainsi, les quatre sous-unités forment un complexe protéique (Borsotto, Barhanin et al. 1984; Curtis and Catterall 1984; Walker, Bichet et al. 1998; Qin, Yagel et al. 2002; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). Une analyse des propriétés biochimiques, des propriétés de glycosylation ainsi que d'hydrophobicité pour ces quatre sous-unités permet d'avancer un modèle où la sous-unité α_1 est

transmembranaire. Elle s'associe avec la sous-unité auxiliaire $\alpha 2\delta$ qui est un hétérodimère lié par un pont disulfure et ancré dans la membrane. La sous-unité β est intracellulaire et la sous-unité γ est transmembranaire (**Figure 5**) (Takahashi, Seagar et al. 1987). Les trois sous-unités auxiliaires ne sont pas nécessairement présentes dans le complexe formant le canal calcique. La composition du complexe protéique dépend de plusieurs facteurs, tels la famille à laquelle appartient la sous-unité principale, le tissu natif, le système d'expression. À titre d'exemple, la purification des canaux calciques squelettiques, marqués par la dihydropyridine, révèle la présence des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, β et γ alors que l'immunoprécipitation des canaux calciques neuronaux, marqués aussi par la dihydropyridine, ne révèle que la présence des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$ et β (Catterall 2011). Lorsqu'exprimé dans des systèmes d'expression hétérologues comme les ovocytes de *Xenopus* ou dans des lignées cellulaires de mammifères (CHO et HEK sont des lignées qui sont souvent utilisées), la sous-unité $\alpha 1$ pourrait démontrer un comportement différent de celui qu'elle aurait dans le tissu natif. Ainsi, pour reproduire le courant natif dans des systèmes recombinants, il est souvent nécessaire de coexprimer certaines sous-unités auxiliaires (Lacinova 2005).

1.2.3.1 La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$

La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ est la sous-unité principale des canaux VGCC et forme le pore en lui conférant ses propriétés biophysiques et pharmacologiques. L'analyse de la séquence en acides aminés pour $\text{Ca}_v\alpha 1$ prédit une structure qui est semblable à la sous-unité α des canaux sodiques. Elle est composée de quatre domaines homologues (I à IV), chacun comprenant six hélices (ou segments) transmembranaires (S1 à S6), et une boucle membranaire (ou boucle du pore) entre les segments S5 et S6. Les extrémités N- et C-terminales ainsi que les boucles reliant les quatre domaines entre eux sont intracellulaires (Tanabe, Takeshima et al. 1987; Catterall 2011).

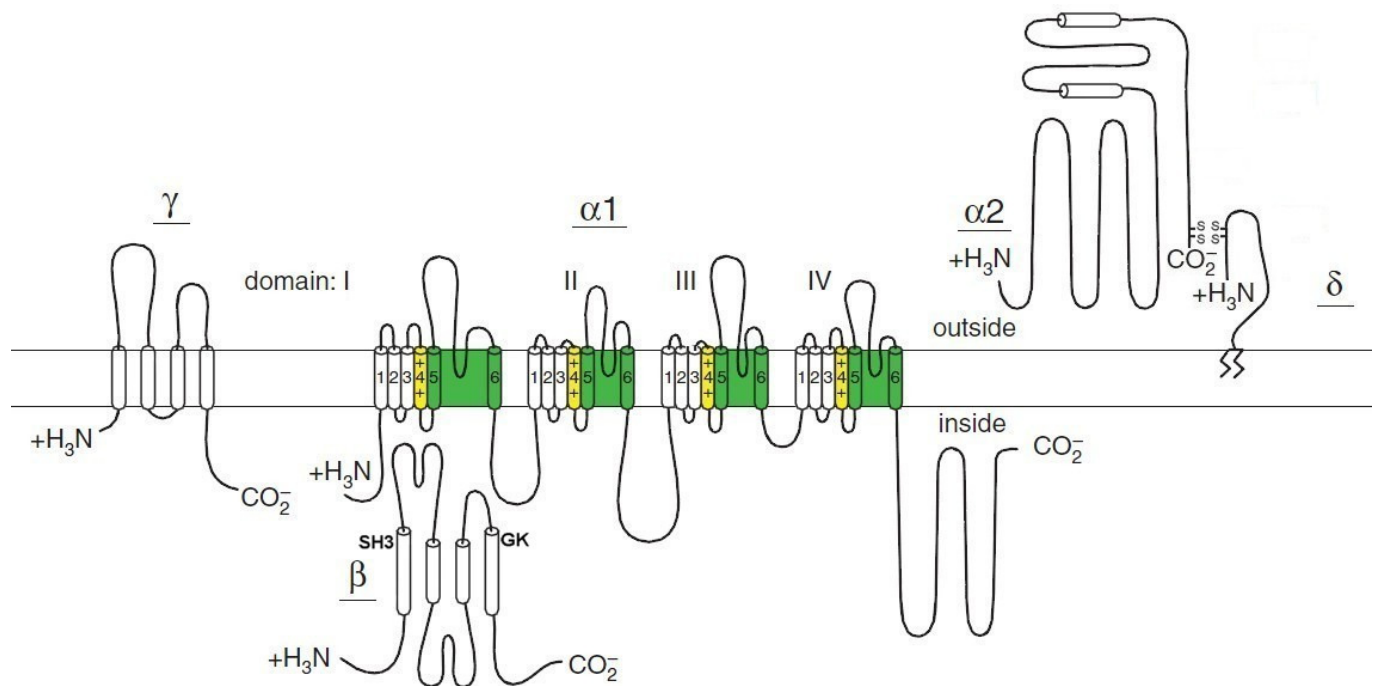


Figure 5 : Structure secondaire prédite des canaux calciques VGCC.

Les canaux VGCC sont des complexes hétéromériques. $Ca_v\alpha 1$ est la sous-unité principale qui forme le pore du canal. Elle est composée de quatre domaines comprenant chacun six hélices transmembranaires. Les autres sous-unités sont auxiliaires et la composition du complexe protéique dépend de la sous-unité principale et du tissu natif. $Ca_v\alpha 2$ est extracellulaire et liée à la sous-unité $Ca_v\delta$ par des ponts disulfures. La sous-unité $Ca_v\delta$ est ancrée à la membrane via une molécule de glycoposphatidylinositol. La sous-unité $Ca_v\beta$ est cytosolique tandis que la sous-unité $Ca_v\gamma$ est transmembranaire (Davies, Kadurin et al. 2010; Catterall 2011). Les segments transmembranaires S4 formant le senseur de voltage sont représentés en jaune alors que les segments transmembranaires S5 et S6 formant le pore sont représentés en vert (figure inspirée de Catterall 2011).

Les segments S1 à S4 servent de détecteur de voltage pour activer le canal calcique. Les segments S4 des canaux VGCC contiennent cinq à six acides aminés chargés positivement à pH physiologique, majoritairement des arginines, tous espacés de deux ou trois résidus neutres (**Figure 6**). Ainsi, sous l'effet d'une dépolarisation (ou d'un champ électrique) l'hélice S4 se déplace vers l'extérieur en faisant un mouvement de rotation. Ce mouvement engendre un changement de conformation qui est transmis au pore du canal et l'ouvre (Bezanilla 2002).

	IS4	IIS4	IIIS4	IVS4
Ca 1,1	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR CIRLLR LFKITKYW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	SAFFRLFRVMRLIKLLSRAE
Ca 1,2	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR CVRLLR IFKITRYW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE
Ca 1,3	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR CVRLLR IFKVTRHW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSKGE
Ca 1,4	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVFR CVRLLR IFKVTRHW	VKILRVLRVLRPLRAINRA	ITFFRLFRVMRLIKLLSRGE
Ca 2,1	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR ALRLLR IFKVTKYW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	LSFLRLFRAARLIKLLRQGY
Ca 2,2	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR ALRLLR IFKVTKYW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	LSFLRLFRAARLIKLLRQGY
Ca 2,3	VKALRAFRVLRPLRLVSGV	ISVLR ALRLLR IFKITKYW	IKSLRVLRVLRPLKTIKRL	MSFLKLFRAARLIKLLRQGY
Ca 3,1	FSAVRTVRVLRPLRAINRV	LSVLR TFRLMRV LKLVRF	LRVLR LLRTL RPLRVISRA	IRIMRVLR IARV LKLLKMAV
Ca 3,2	LSAIRTVRVLRPLRAINRV	LSVLR TFRLLRV LKLVRF	LRVLR LLRTL RPLRVISRA	IRIMRVLR IARV LKLLKMAT
Ca 3,3	LSAIRTVRVLRPLKAINRV	LSVLR TFRLLRV LKLVRF	LRVLR LLRTL RPLRVISRA	IRIMRVLR IARV LKLLKMAT

Figure 6 : Alignement de séquence des segments S4 des canaux VGCC.

Les acides aminés chargés positivement sont surlignés en gris (Lacinaova 2005).

Les hélices S5 et S6 forment le pore des canaux calciques VGCC. L'extrémité extracellulaire du pore est plus étroite et elle est plutôt formée par la boucle du pore « P-loop » qui relie les hélices S5 et S6. En 1995, Parent et Gopalakrishnan montrent que quatre résidus glutamate, chacun présent dans un domaine différent, sont importants pour la sélectivité au Ca^{2+} . Chaque glutamate se situe sur une boucle du pore et ainsi, en structure tertiaire, ces glutamates se retrouvent proches les uns des autres et créent ainsi un espace électronégatif dû à la projection des groupements $-COOH$ des chaînes latérales qui forment une bulle d'hydratation à l'intérieur du canal (Parent and Gopalakrishnan 1995). D'autres cations divalents tels que le Ba^{2+} et le Sr^{2+} peuvent passer, mais l'affinité pour le Ca^{2+} est la plus forte ($K_d \approx 1 \mu M$). Des cations monovalents peuvent aussi traverser le canal à condition que le milieu soit totalement dépourvu de cations divalents (Wu, Edwards et al. 2000; Cibulsky and Sather 2003). Réciproquement, des substitutions à des positions équivalentes qui remplacent les résidus DEKA dans la boucle du pore entre S5 et S6 des domaines II, III et IV des canaux sodiques, par des résidus homologues EEEE dans les canaux calciques, sont suffisantes pour conférer aux canaux sodiques une sélectivité au calcium (Heinemann, Terlau et al. 1992; Sather and McCleskey 2003). La partie du pore se trouvant du côté extracellulaire forme les sites de liaison des antagonistes de type dihydropyridine (DHP), bloqueurs spécifiques des

canaux calciques Ca_v1 (Hockerman, Peterson et al. 1997a; Hockerman, Peterson et al. 1997b).

Les canaux HVA possèdent un domaine IQ [isoleucine (Ile)-glutamine (Gln)] dans l'extrémité C-terminale cytosolique, un motif qui est retrouvé chez les protéines modulées par la calmoduline. Chez l'humain, la calmoduline est une protéine d'environ 148 acides aminés qui peut lier jusqu'à quatre atomes de calcium. Malgré qu'elle soit une protéine ubiquitaire hautement exprimée, la calmoduline est considérée comme une sous-unité auxiliaire pour les canaux HVA étant donné qu'elle module les processus de CDI (calcium-dependent inactivation) et de CDF (calcium-dependent facilitation). En effet, l'apo-calmoduline, la calmoduline dépourvue de calcium, est constitutivement liée au domaine IQ et joue le rôle de senseur de calcium. Ce n'est qu'en présence de calcium qu'elle s'active pour intervenir dans les processus de modulation (Mori, Vander Kooi et al. 2008). Sur cette même extrémité C-terminale, on y retrouve aussi un site de liaison à la PKA par l'intermédiaire de l'AKAP15. C'est pourquoi, dans le cas des canaux $Ca_v1.1$ et $Ca_v1.2$, il est clairement établi que la phosphorylation participe à la modulation de ces deux canaux, ce qui résulte en une augmentation des courants calciques (Curtis and Catterall 1985; Chang, Gutierrez et al. 1991; Hulme, Ahn et al. 2002). Pour le canal $Ca_v2.3$, la modulation par le calcium est plutôt assurée par la boucle intracellulaire qui relie les domaines II et III du canal (Leroy, Pereverzev et al. 2003). En effet, la liaison de la protéine chaperonne hsp70 sur cette boucle intracellulaire jouerait le rôle de protéine adaptatrice qui recrute la protéine PKC d'une manière qui est dépendante du calcium. La PKC étant activée par le Ca^{2+} , elle s'auto-phosphoryle et permet l'augmentation des courants calciques en phosphorylant le canal $Ca_v2.3$ sur un site qui se trouve possiblement dans l'extrémité C-terminale. (Kamatchi, Franke et al. 2004; Krieger, Radhakrishnan et al. 2006).

La boucle intracellulaire qui relie les domaines I et II dans les sous-unités $Ca_v\alpha_1$ des canaux Ca_v1 et Ca_v2 possède un domaine dit AID (α interaction domaine) qui permet l'interaction avec la sous-unité $Ca_v\beta$. Le domaine AID est composé d'une séquence de 18 acides aminés dont huit sont conservés (**Figure 7**) (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008).

L-type	$Ca_v1.1$	QQLDEDLRGYMSWITQGE
	$Ca_v1.2$	QQLEEDLKGYLDWITQAE
	$Ca_v1.3$	QQLEEDLKGYLDWITQAE
	$Ca_v1.4$	QQMEEDLRGYLDWITQAE
Non-L-type	$Ca_v2.1$	QQIERELNGYMEWISKAE
	$Ca_v2.2$	QQIERELNGYLEWIFKAE
	$Ca_v2.3$	QQIERELNGYRAWIDKAE

Figure 7 : Alignement de séquence des domaines AID des canaux HVA.

Huit acides aminés parmi les 18 qui composent le domaine AID sont hautement conservés. Les résidus conservés sont surlignés en gris (figure inspirée de Van Petegem, Duderstadt et al. 2008).

On peut donc déduire la séquence universelle suivante : QQXXXXLXGYXXWIXXE, où X est un acide aminé quelconque.

La région AID contient trois acides aminés importants pour la liaison avec la sous-unité β , soit les résidus W et I (**Figure 8**). Bien que la liaison puisse se faire en remplaçant les résidus Y et I par mutagenèse dirigée, la présence du résidu W est essentielle pour observer une liaison. Des mutations hydrophobes, hydrophiles ou aromatiques de ce tryptophane empêchent effectivement toute la liaison de $Ca_v\beta$ sur la sous-unité $Ca_v2.3$ (Berrou, Klein et al. 2002).

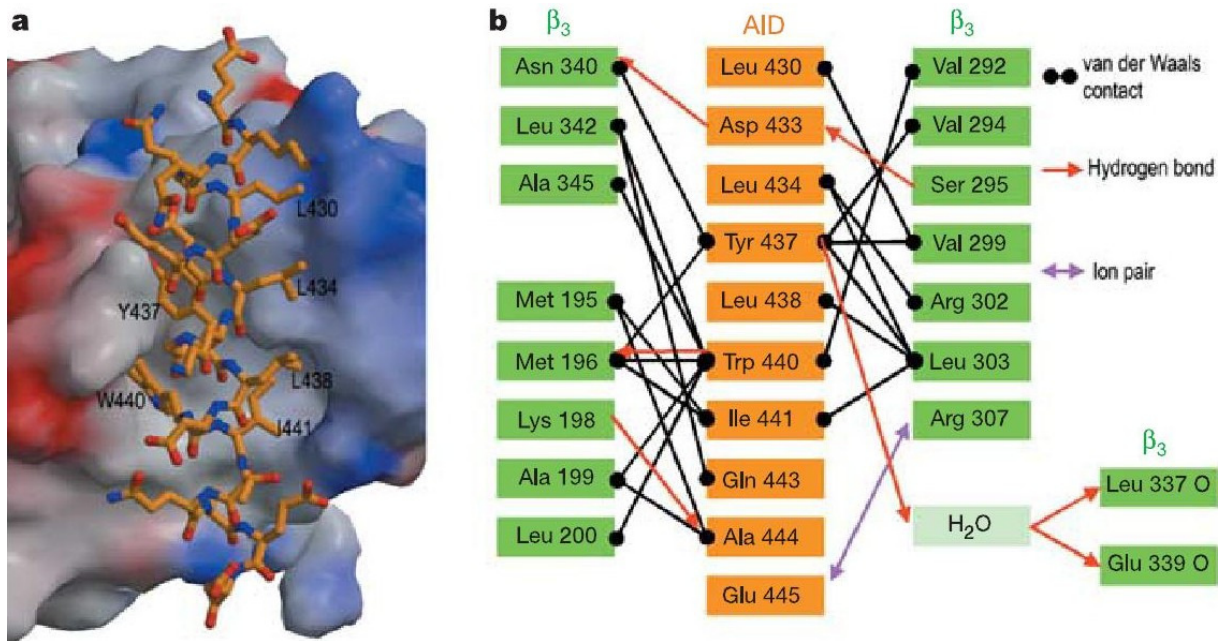


Figure 8 : Interactions entre la sous-unité $\text{Ca}_v\beta_3$ et le domaine AID de la sous-unité $\text{Ca}_v1.2$.

a, Une représentation en 3D de l'interaction β_3 -AID par le logiciel GRASP. Les régions en rouge et en bleu représentent les potentiels électrostatiques négatifs et positifs, respectivement. Les résidus hydrophobes sont identifiés dans le domaine AID (représentation en bâtonnets). **b**, Les interactions spécifiques entre la sous-unité β_3 et le domaine AID (figure inspirée de Chen, Li et al. 2004).

1.2.3.2 La sous-unité $\text{Ca}_v\beta$

$\text{Ca}_v\beta$ est une sous-unité auxiliaire cytosolique qui stimule l'adressage membranaire de tous les canaux HVA. On dénombre quatre isoformes $\text{Ca}_v\beta$ (β_1 - β_4) codées par des gènes distincts. Chaque isoforme possède plusieurs variants obtenus par épissage alternatif (Walker and De Waard 1998). La sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ possède des propriétés structurales semblables à celles de la famille des protéines d'échafaudage MAGUK (« membrane-associated guanylate kinase »), avec certaines différences qui incluent, entre autres, l'orientation relative des domaines SH3 (« Src homology 3 ») et NK (« nucleotide kinase ») ainsi que la présence d'un seul domaine d'interaction protéine-protéine de type PDZ (« post synaptic

D-95/disc large/zona occludens ») (**Figure 9** et **Figure 11**) (Arikkath and Campbell 2003).

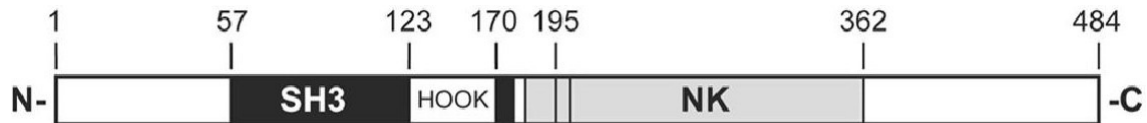


Figure 9 : Diagramme de l'organisation schématique des domaines fonctionnels de la sous-unité $Ca_v\beta3$ selon la structure cristalline. (Bourdin, Marger et al. 2010)

L'une de ces sous-unités, soit la $Ca_v\beta2a$, est ancrée à la membrane plasmique par la palmitoylation de ses deux résidus cystéines se trouvant sur son extrémité N-terminale. Il a été montré que cette palmitoylation modifie les propriétés cinétiques du canal (**Figure 10**). En effet, lorsque la sous-unité est ancrée dans la membrane plasmique, les cinétiques d'inactivation du canal sont grandement ralenties. Lorsque les résidus cystéines sont mutés en sérines, la sous-unité perd son point d'ancrage et elle devient cytosolique. Cette modification se traduit par une accélération des cinétiques d'inactivation (Chien, Carr et al. 1996; Qin, Platano et al. 1998; Restituito, Cens et al. 2000; Striessnig 2009).

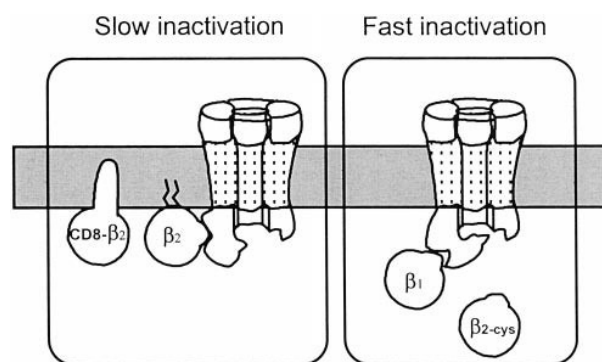


Figure 10 : La sous-unité $Ca_v\beta2a$ est ancrée dans la membrane cellulaire.

L'ancrage de la sous-unité $Ca_v\beta2a$ ralentit les cinétiques d'inactivation des canaux calciques HVA (figure inspirée de Restituito, Cens et al. 2000).

Le domaine HOOK forme une boucle. Il a été suggéré que le domaine SH3 interagit avec le domaine NK pour orienter le domaine HOOK de façon optimale vers le domaine AID de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ (Richards, Leroy et al. 2007). Une autre hypothèse veut que le domaine SH3 interagisse aussi directement avec le domaine AID mais avec une faible affinité par rapport au domaine ABP (« α -binding pocket »), une région hautement conservée parmi les sous-unités $Ca_v\beta$ et qui est formée par le domaine NK (Maltez, Nunziato et al. 2005). Cependant, des études de co-cristallisation montrent que la liaison du domaine AID de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ se fait dans cette pochette ABP (Van Petegem and Minor 2006). Le domaine HOOK pourrait aussi jouer un rôle dans la modulation des cinétiques d'inactivation en ralentissant ces dernières (Richards, Leroy et al. 2007).

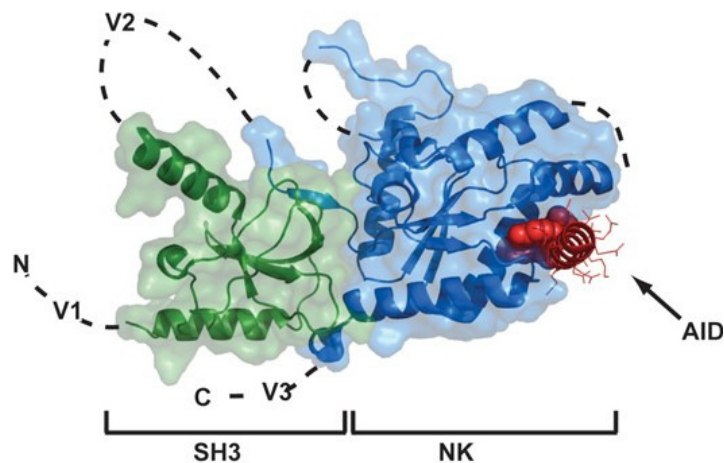


Figure 11 ; Structure tertiaire de la sous-unité $Ca_v\beta$.

Les domaines SH3 et NK de la sous-unité $Ca_v\beta$ sont représentés respectivement en vert et en bleu. Le domaine AID de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ est en rouge (Van Petegem and Minor 2006).

La sous-unité $Ca_v\beta$ joue un rôle important dans l'adressage à la membrane plasmique des canaux HVA (Brice, Berrow et al. 1997). En effet, certains canaux Ca_v , comme $Ca_v1.2$, ne s'expriment que très faiblement à la membrane sans la présence de $Ca_v\beta$ (Bourdin, Marger et al. 2010). Il a été proposé que la boucle I-II de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ des

canaux HVA contient un signal de rétention qui retient la protéine au réticulum endoplasmique (RE). La haute affinité de $\text{Ca}_v\beta$ [$K_d \cong 5,3$ nM pour le AID du canal $\text{Ca}_v1.2$ (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008)] permettrait cependant de retirer la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$ du RE et de l'amener à la membrane plasmique (Bichet, Cornet et al. 2000). La nature moléculaire de ce signal de rétention n'est toutefois pas encore identifiée.

Outre son rôle dans l'adressage membranaire de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$, la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ exerce un effet sur les propriétés de « gating » des canaux HVA. De manière générale, l'activation et l'inactivation dépendante du voltage sont déplacées vers des potentiels membranaires plus négatifs, sans oublier l'accélération des cinétiques lors de l'inactivation du canal. Ces effets dépendent de la liaison à haute affinité de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ qui s'associe à $\text{Ca}_v\alpha1$ ($K_d = 26 \pm 6$ nM pour la sous-unité $\text{Ca}_v\beta2a$ et le peptide AID du canal $\text{Ca}_v1.1$) (Stotz and Zamponi 2001; Arikath and Campbell 2003; Opatowsky, Chen et al. 2004; Catterall 2011). À titre d'exemple, la sous-unité $\text{Ca}_v\beta3$ déplace le potentiel de mi-inactivation du canal $\text{Ca}_v2.3$ vers des potentiels hyperpolarisants en plus d'accélérer les cinétiques d'inactivation. À l'opposé, tel que mentionné précédemment, la sous-unité $\text{Ca}_v\beta2a$ ralentit les cinétiques d'inactivation et déplace la courbe d'inactivation du même canal vers des potentiels dépolarisants. Pour la même sous-unité principale $\text{Ca}_v\alpha1$, il a été observé que l'amplitude de la modification des cinétiques d'inactivation en fonction de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ varie de la plus rapide à la plus lente dans l'ordre $\text{Ca}_v\beta3 \cong \text{Ca}_v\beta1b > \text{Ca}_v\beta1a \cong \text{Ca}_v\beta4 \gg \text{Ca}_v\beta2a$ (Parent, Schneider et al. 1997).

1.2.3.3 La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha2\delta$

La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ est une protéine hautement glycosylée avec plusieurs séquences hydrophobes (Ellis, Williams et al. 1988). Des études faites sur la biosynthèse de cette protéine démontrent que $\text{Ca}_v\alpha2$ est une

glycoprotéine membranaire extrinsèque, extracellulaire et ancrée à la membrane cellulaire par le biais de deux ponts disulfures qui l'attachent à la sous-unité $Ca_v\delta$. La sous-unité δ est codée par l'extrémité 3' de la séquence du même gène que la sous-unité α_2 . La forme mature de $Ca_v\alpha_2\delta$ est produite par un clivage protéolytique suivi d'une liaison S-S, tous les deux étant des modifications post-traductionnelles (De Jongh, Warner et al. 1990). Initialement, il était accepté que l'ancrage de la sous-unité δ se faisait à travers un segment transmembranaire (Klugbauer, Lacinova et al. 1999). Cependant, certaines études récentes sont en faveur d'un ancrage à la membrane cellulaire de la sous-unité δ via une modification post-traductionnelle. En effet, cette modification remplace le segment transmembranaire par une molécule de glycophosphatidylinositol (GPI) membranaire servant de point d'ancrage (**Figure 12**) (Davies, Kadurin et al. 2010).

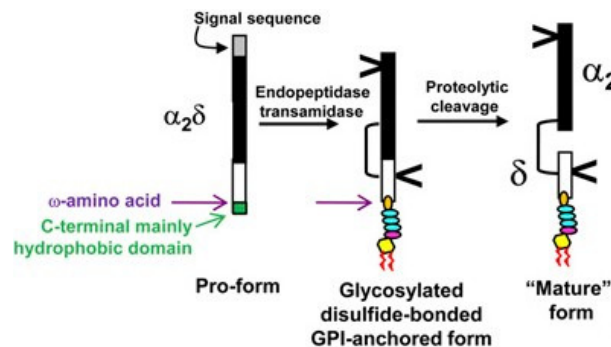


Figure 12 : Modifications post-traductionnelles proposées pour la sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$.

Pour trouver sa forme mature, la sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ subit un clivage protéolytique suivi d'une liaison covalente S-S. Dans ce nouveau modèle, le segment transmembranaire de la sous-unité $Ca_v\delta$ est remplacé par une molécule de glycophosphatidylinositol (GPI) membranaire servant de point d'ancrage (figure inspirée de Davies, Kadurin et al. 2010).

On retrouve quatre isoformes différentes de cette protéine, $Ca_v\alpha_2\delta$ -1 à $Ca_v\alpha_2\delta$ -4 (Qin, Yagel et al. 2002; Klugbauer, Marais et al. 2003). Leur rôle varie selon l'isoforme concernée, mais comprend un ou plusieurs de ces effets sur la sous-unité $Ca_v\alpha_1$: un accroissement de l'amplitude des

courants ioniques, une accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation, un déplacement de la courbe courant-voltage vers des potentiels hyperpolarisants (Singer, Biel et al. 1991; Obermair, Tuluc et al. 2008).

1.2.3.4 La sous-unité $\text{Ca}_v\gamma$

Plus spécifique au muscle squelettique, la sous-unité $\text{Ca}_v\gamma$ est formée de quatre segments transmembranaires. Ses extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires et les boucles extracellulaires sont fortement glycosylées (N-glycosylation) (Jay, Ellis et al. 1990). À ce jour, huit isoformes différentes de cette sous-unité sont connues, soient $\text{Ca}_v\gamma 1$ à $\text{Ca}_v\gamma 8$ (**Figure 5**). Le rôle physiologique de la sous-unité $\text{Ca}_v\gamma$ est moins bien défini que pour les deux autres sous-unités auxiliaires. Il a été rapporté que dans certains cas, $\text{Ca}_v\gamma$ peut diminuer (Kang and Campbell 2003) ou augmenter (Rousset, Cens et al. 2001) les niveaux de courants et déplacer la courbe d'activation vers des potentiels hyperpolarisants. Cela dit, les effets sont non seulement fonction de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ présente, mais aussi de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ utilisée (Rousset, Cens et al. 2001). La sous-unité $\text{Ca}_v\gamma$ interagit aussi avec le récepteur AMPA et stimule son adressage membranaire (Tomita, Chen et al. 2003; Waithe, Ferron et al. 2011).

1.2.4 Propriétés biophysiques

Le mouvement d'ions Ca^{2+} à travers le canal Ca_v est déterminé par l'importance du gradient chimique couplé à la présence d'un potentiel membranaire. La concentration cellulaire de Ca^{2+} libre est environ 1000 fois plus faible que la concentration extracellulaire. Ainsi, selon la loi de diffusion de Fick, les ions diffusent du compartiment le plus concentré vers le compartiment le moins concentré, soit, pour l'ion Ca^{2+} , du côté extracellulaire vers le côté intracellulaire. Cependant, la membrane plasmique cellulaire est soumise à une différence de potentiel. Au repos, le

potentiel membranaire, déterminé par les ions K^+ , est d'environ -80 mV. Dès lors, deux facteurs interviennent dans la diffusion des ions : un gradient électrique et un gradient de concentration chimique. On parle alors de gradient électrochimique. C'est l'équation de Nernst qui détermine le potentiel électrochimique d'un ion donné à l'équilibre, en absence de mouvement ionique :

$$E_{Ca^{2+}} = \frac{RT}{z_{Ca^{2+}} F} \ln \left(\frac{[Ca^{2+}]_{ext}}{[Ca^{2+}]_{int}} \right)$$

où $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$: constante des gaz parfaits, T : température en Kelvin, $F = 9,6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$: constante de Faraday en Coulomb mol^{-1} .

Pour les cations Ca^{2+} , cette équation prend les valeurs $RT/F \approx 25$ mV à 22°C, $z_{Ca^{2+}} = 2$, $[Ca^{2+}]_{ext} = 1.5 \text{ mM}$ et $[Ca^{2+}]_{int} = 10^{-4} \text{ mM}$. Le potentiel de Nernst pour l'ion calcium est donc d'environ +120 mV à 22°C. Cette valeur signifie qu'à des potentiels membranaires plus négatifs que +120 mV, donc pour toute la gamme des potentiels physiologiques, les ions Ca^{2+} subissent une force vers l'intérieur de la cellule alors qu'à des potentiels membranaires plus positifs que +120 mV, ces ions subissent une force vers l'extérieur de la cellule. Ainsi, à un potentiel de repos d'environ -80 mV, l'influx d'ions Ca^{2+} est favorisé, mais les canaux VGCC sont majoritairement dans la conformation fermée. Lors d'une dépolarisation où la membrane est amenée à un potentiel plus positif, les canaux VGCC subissent un changement de conformation vers les états ouverts pour ensuite s'inactiver. Ces changements de conformation et les différents états (ouvert, inactivé, fermé) sont intrinsèques à un canal donné et sont collectivement appelés par le mot anglais « gating » (Yellen 1998). Il faut cependant noter qu'il existe souvent plusieurs conformations

différentes qui peuvent mener au même état discernable. Au potentiel de repos de la cellule, $Ca_v2.3$ est en partie fermé et en partie inactivé. En effet, ayant un potentiel de mi-inactivation (mesuré dans des ovocytes de *Xenopus* en présence de la sous-unité $Ca_v\beta3$ dans une solution de 10 mM Ba^{2+}) de $-63,4 \pm 0,4$ mV ($n = 74$) (Raybaud, Baspinar et al. 2007), on observe que 14 ± 1 % ($n = 74$) des canaux sont dans l'état inactivé au potentiel de repos de la cellule, celui-ci étant de -80mV dans les cellules excitables (Patil, Brody et al. 1998). Ceci est une propriété du canal $Ca_v2.3$ et ne se retrouve pas nécessairement dans tous les canaux calciques. Le canal calcique de type L $Ca_v1.2$ a un potentiel de mi-inactivation, en 10 mM Ba^{2+} , de -23 ± 1 mV ($n = 21$) (Dafi, Berrou et al. 2004), donc ne s'inactive que très peu à partir de l'état fermé (**Figure 13**).

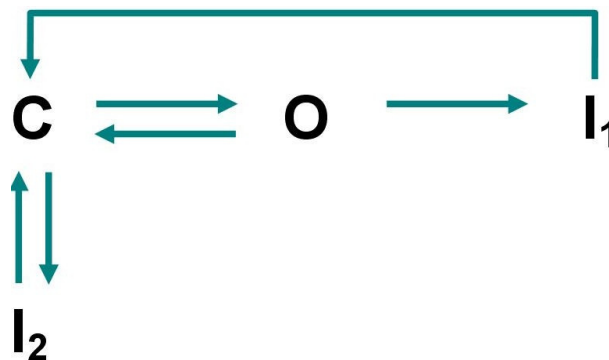


Figure 13 : Diagramme cinétique minimal pour le canal $Ca_v2.3$.

Le canal calcique $Ca_v2.3$ peut passer directement de l'état fermé (C) à l'état ouvert (O) ou à l'état inactivé (I_2) ou à l'état inactivé (I_1) mais le passage de l'état inactivé à l'état ouvert doit nécessairement passer par l'état fermé (figure inspirée de Patil, Brody et al. 1998).

Lorsque la cellule subit une dépolarisation, les canaux qui se trouvent dans l'état fermé pourront changer de conformation pour passer à l'état activé qui laisse passer les ions. Après un certain temps (T_{inact} , constante d'inactivation), qui est une propriété intrinsèque des canaux et des sous-unités présentes, ceux se trouvant dans l'état ouvert subiront un changement de conformation pour passer à l'état inactivé, un état

conformationnel différent de l'état fermé mais dans lequel la protéine ne laisse pas passer les ions.

1.2.4.1 L'activation

L'activation des canaux VGCC consiste au passage de l'état fermé à l'état ouvert et se produit en réponse à une dépolarisation de la membrane. Chaque hélice S4 de la protéine contient un motif où l'on retrouve une série d'acides aminés chargés, majoritairement des arginines (nommées R1, R2, etc.), tous espacés de deux à trois acides aminés neutres. Ces résidus chargés se déplacent sous l'effet du champ électrique membranaire. Ce déplacement induit un changement de conformation qui permet l'ouverture des hélices S6 et donc le passage des ions à travers le canal (Yellen 1998).

1.2.4.2 L'inactivation

En plus des états ouvert et fermé de la protéine, il y a un troisième état qui, malgré le maintien de la dépolarisation membranaire, empêche le passage des ions. Il s'agit de l'état inactivé. Chez les canaux de type VGCC, l'inactivation peut être déterminée soit par le voltage (VDI pour « voltage dependent inactivation ») soit par les ions Ca^{2+} (CDI pour « calcium dependent inactivation »).

1.2.4.2.1 L'inactivation dépendante du calcium (CDI)

L'inactivation dépendante du Ca^{2+} a été d'abord observée dans les canaux de type Ca_v1 où l'inactivation dépendante du voltage ne suffit pas à complètement inactiver les courants macroscopiques observés en présence de Ba^{2+} . En effet, chez $\text{Ca}_v1.2$, ces courants ne sont inactivés qu'à $50 \pm 1\%$ après un pulse de 800 ms en présence de 10 mM Ba^{2+} . Or, en présence de la même concentration de Ca^{2+} , on observe un courant résiduel de $1 \pm 1\%$ (Dafi, Berrou et al. 2004).

La première hypothèse reconnaît un motif de type « EF hand », se trouvant dans la partie C-terminale de la protéine, comme senseur de calcium et par conséquent, responsable du mécanisme de CDI (de Leon, Wang et al. 1995; Bernatchez, Talwar et al. 1998). Cette théorie fut plus tard abandonnée au profit d'un autre site de liaison situé, lui aussi, dans la partie C-terminale et qui fait intervenir la calmoduline (CaM). Ainsi, la CDI dépend de la liaison du Ca^{2+} sur la calmoduline qui est constitutivement liée à la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ des canaux de type VGCC. La CaM est une protéine ubiquitaire qui présente quatre sites de liaison au Ca^{2+} et dont la fonction et la conformation dépendent de la présence de calcium. Il est démontré avec $\text{Ca}_v1.2$ que l'extrémité C-terminale de la protéine présente un motif IQ qui sert de site de liaison à la CaM (Rhoads and Friedberg 1997; Zuhlke and Reuter 1998). Plusieurs mutations des acides aminés présents dans ce motif réduisent grandement l'inactivation du canal en présence de calcium, supportant ainsi l'hypothèse que le motif IQ lie la CaM et que celle-ci est fortement impliquée dans la CDI (Zuhlke, Pitt et al. 1999; Zuhlke, Pitt et al. 2000). L'expression d'une construction dominante négative de la CaM (les mutations D20A, D56A, D93A et D129A dans les quatre sites de liaison empêchent la liaison des quatre ions Ca^{2+}) ainsi que le remplacement du Ca^{2+} par du Ba^{2+} comme porteur de charge, diminuent appréciablement la CDI (Bourdin, Marger et al. 2010). Finalement, en 2005, le groupe de Minor a publié la structure cristalline du complexe $\text{Ca}_v1.2\text{-IQ/CaM/ Ca}^{2+}$ qui montra sans équivoque que le domaine IQ de $\text{Ca}_v1.2$ forme une hélice enchâssée au milieu des lobes N- et C-terminaux de la calmoduline (Van Petegem, Chatelain et al. 2005).

1.2.4.2.2 L'inactivation dépendante du voltage (VDI)

Bien que les facteurs déterminants de la CDI soient bien connus, ceux de l'inactivation dépendante du voltage (VDI) restent à ce jour des éléments peu étudiés. Les modèles présentement proposés pour l'inactivation des canaux VGCC sont inspirés des canaux potassiques et sodiques. En effet, les canaux potassiques présentent une inactivation de type « Ball and Chain ». Lors de l'inactivation, la partie N-terminale de la protéine se replie sous la face cytoplasmique du pore pour obstruer ce dernier. Les courants sont alors inhibés, malgré que le pore demeure dans sa conformation ouverte (Yellen 1998). Dans les canaux sodiques, le groupe de Catterall a identifié un motif IFM contenu dans la boucle reliant les domaines III et IV qui serait responsable du repliement de cette boucle intracellulaire qui viendrait bloquer le pore pour inhiber le passage des ions (**Figure 14**) (Catterall 1996).

Les premiers pas vers l'identification des déterminants moléculaires de la VDI des canaux VGCC furent effectués par le groupe de R.W. Tsien. À l'aide de chimères des canaux $Ca_v1.2$, $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.3$, ils identifièrent le segment S6 du domaine I et la boucle cytoplasmique associée à celui-ci comme étant importants dans ce type d'inactivation (Zhang, Ellinor et al. 1994). Cette inactivation procéderait à partir de l'état fermé, probablement due au repliement de la boucle I-II sous la face cytoplasmique du canal. De plus, les résidus hydrophobes du segment S6 du domaine voisin, soit le domaine II, sont identifiés pour exercer un contrôle sur la porte d'activation du canal $Ca_v2.3$ en changeant les cinétiques d'inactivation. (Raybaud, Baspinar et al. 2007; Wall-Lacelle, Hossain et al. 2011). Cette deuxième type d'inactivation procéderait à partir de l'état ouvert en mettant en jeu les résidus distaux des segments S6 du pore.

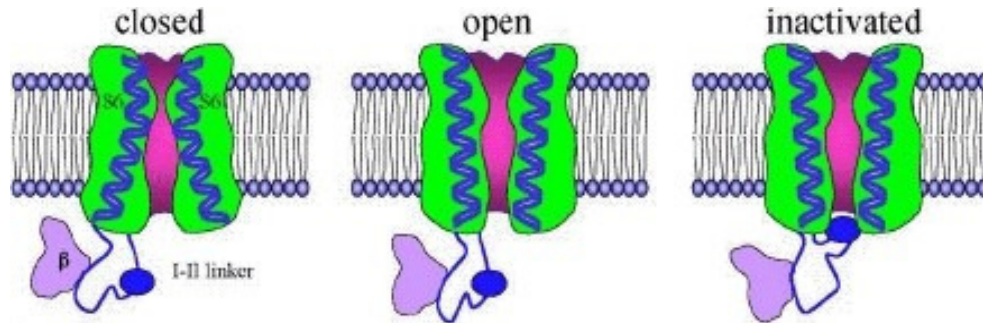


Figure 14 : Modèle proposé de l'inactivation de type « Ball and Chain » pour les canaux HVA.

La boucle intracellulaire reliant les domaines I et II pourrait se replier sous la face cytoplasmique du canal et prévenir l'influx d'ions calcium à travers le canal (figure inspirée de Zamponi 2005).

D'autres études ont été effectuées sur deux isoformes issues de l'épissage alternatif de $Ca_v2.1$ nommées $Ca_v2.1a$ et $Ca_v2.1b$. La boucle I-II de $Ca_v2.1b$ contient une valine supplémentaire. Or, cet isoforme présente des cinétiques d'inactivation beaucoup plus lente et son potentiel de mi-inactivation se voit déplacé de +20 mV (Bourinet, Soong et al. 1999). Le laboratoire de Lucie Parent a montré par mutagenèse dirigée que les résidus chargés négativement de la partie N-terminale du AID de $Ca_v1.2$ (E461, E462 et D463) jouent un rôle dans la VDI de celui-ci (Dafi, Berrou et al. 2004). La cristallisation de l'AID a montré que les chaînes latérales de ces résidus pointent à l'opposé du site de liaison et la sous-unité $Ca_v\beta$. Lorsque ces acides aminés sont mutés en résidus neutres ou positifs, on observe une accélération des cinétiques d'inactivation. En effet, la fraction du courant résiduel après un pulse de 300 ms (R300) passe de 0,7 pour le canal de type sauvage à 0,3 pour la mutation E462R, dans des ovocytes de *Xenopus*. Plusieurs observations, incluant celles-ci, ont mené à un modèle de type « Hinged-Lid » où la boucle I-II qui lie la sous-unité β viendrait se replier sous la face cytoplasmique du pore pour interagir avec les segments IIS6 et IIIS6 (**Figure 15**) (Stotz, Hamid et al. 2000; Bernatchez, Berrou et al. 2001). En 2006, le groupe de Lucie Parent a mis en évidence le rôle de la glycine G436 dans $Ca_v1.2$ qui agirait à titre de pivot dans le repliement de la boucle I-II sous le canal durant l'inactivation

(**Figure 14**). En effet, les mutations de cette glycine tendent à produire un canal qui ne s'inactive que très peu (les mutations G436P, G436R, G436K, G436H, G436E, et G436D montrent un courant résiduel après 800 ms supérieur à 0,9). Il est intéressant de noter que des mutations de cette glycine sont associées au syndrome de Timothy, qui a pour symptôme principal de graves arythmies cardiaques (Splawski, Timothy et al. 2005).

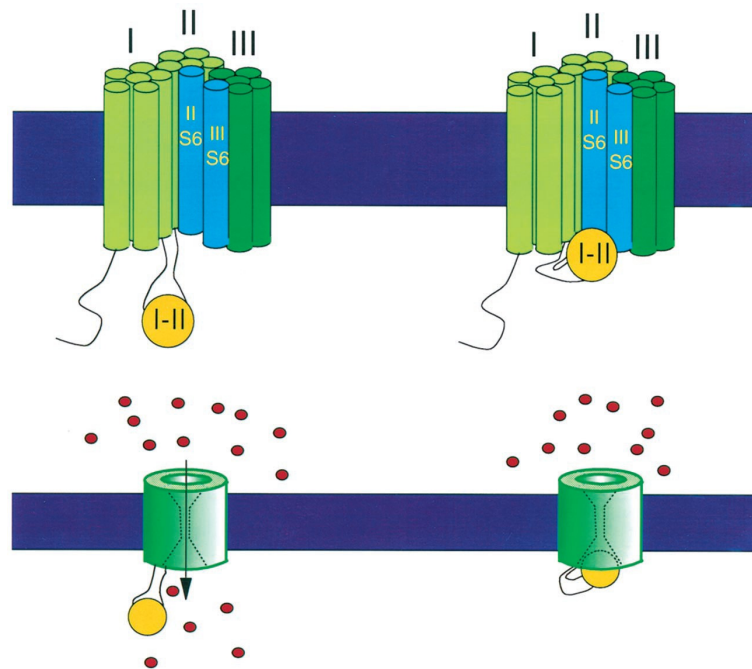


Figure 15 : Modèle proposé de l'inactivation de type « Hinged-Lid » pour les canaux HVA.

Selon l'action de la boucle reliant les domaines I et II (la boucle I-II) ainsi que des segments IIS6 et IIIS6 sur l'inactivation dépendante du voltage, il serait possible de croire qu'une partie de la boucle I-II formerait un pivot qui permettrait la région « Ball and Chain » à se loger dans l'ouverture intracellulaire du pore en interagissant au moins avec les segments DIIS6 et DIIIS6 du canal $Ca_v2.3$, ce qui bloquerait le passage des ions (figure inspirée de Stotz, Hamid et al. 2000).

L'étude de chimères des canaux $Ca_v1.2$, $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.3$ a permis à plusieurs groupes de montrer que le domaine I joue un rôle déterminant lors de l'inactivation (Parent, Gopalakrishnan et al. 1995; Spaetgens and Zamponi 1999; Bernatchez, Berrou et al. 2001). Ces observations tendent à montrer deux mécanismes d'inactivation, soit par

les boucles intracellulaires (N-type), soit par le pore (C-type). La boucle I-II demeure cependant, dans les canaux de type HVA, la région la plus importante en ce qui concerne la VDI. Il est important de mentionner qu'il puisse être nécessaire pour la protéine de passer par l'état ouvert pour s'inactiver. La transition C – I n'est pas observée pour plusieurs canaux, tel que CaV1.2. Dans ce cas, l'inactivation est forcément liée à l'activation de la protéine (**Figure 13**).

1.2.4.3 L'activation des canaux calciques

1.2.4.3.1 *Le senseur du voltage S4*

Bien que les mécanismes d'activation des canaux K_V soient amplement étudiés, un nombre relativement faible de travaux sur les canaux calciques sont publiés. Les mécanismes moléculaires et atomiques régissant l'activation en demeure donc moins connus que pour les canaux potassiques et sodiques. Dans les canaux de type Ca_V (HVA et LVA), tout comme dans les canaux potassiques et sodiques, l'hélice S4 de chaque domaine contient 4 à 5 résidus chargés positivement (**Figure 6**), suggérant que cette hélice sert aussi de senseur de voltage. Lors d'une dépolarisation, ces résidus se déplaceraient sous l'effet de la dépolarisation membranaire, causant ainsi l'ouverture du canal.

Le mécanisme d'activation des canaux calciques semble présenter quelques différences et être plus complexe que celui des canaux potassiques. Alors que plusieurs canaux potassiques se composent d'une même sous-unité répétée quatre fois, soit un homo-tétramère, les canaux calciques se composent d'une sous-unité formée par quatre domaines ayant des séquences primaires différentes. Cette différence structurale confère une certaine asymétrie aux canaux calciques qui pourrait impliquer une participation inégale des quatre hélices S4 à l'activation.

De plus, alors que dans les canaux de type K_v , il est nécessaire que tous les S4 bougent pour laisser passer le courant (Zagotta and Aldrich 1990), il a été montré que certains canaux calciques peuvent s'ouvrir avant le mouvement de tous les S4 (Marks and Jones 1992; Lacinova, Klugbauer et al. 2002). Puisque chaque domaine des canaux calciques contient des résidus différents, il est raisonnable de penser que leurs contributions aux changements de conformation induits par le voltage ne sont pas égales.

Plusieurs observations sur l'inactivation des canaux Ca_v semblent aussi aller dans cette direction. En effet, cette hypothèse est appuyée par une série d'expériences sur les canaux calciques de type T (Ca_v3) qui montre que ces canaux atteignent leur maximum d'inactivation à un potentiel où seulement la moitié des canaux sont ouverts. Ceci suggère que certains senseurs ne sont pas ou peu impliqués dans le processus d'inactivation dépendante du voltage (Frazier, Serrano et al. 2001). Des résultats semblables ont été observés dans les canaux sodiques, où il fut montré que le domaine IV est très fortement couplé à l'inactivation (Chen, Santarelli et al. 1996). Une étude sur l'impact des résidus arginines dans les hélices S4 de $Ca_v3.1$ a montré que l'effet obtenu par la neutralisation de la première arginine de chaque S4 est très dépendant du domaine dans lequel elle se trouve (Kurejova, Lacinova et al. 2007). Cela dit, les effets sur les courbes d'activation et d'inactivation des canaux où un domaine avait été neutralisé variaient grandement selon le domaine étudié. Ces résultats semblent donc indiquer que les senseurs de voltage opèrent indépendamment les uns des autres.

Il n'y a pas eu, à ce jour, d'étude systématique sur l'importance de la participation de chaque segment S4 sur l'activation des canaux calciques, probablement à cause de l'ampleur de la tâche. Cependant, les travaux effectués pour déterminer l'importance relative de chaque senseur ne semblent pas montrer de règle générale pour tous les canaux de type

Ca_v. Le groupe de Beam a montré qu'il ne suffit que de transférer le domaine I de Ca_v1.1 dans Ca_v1.2 pour faire passer ce dernier d'une activation lente à une activation rapide, qui est caractéristique de Ca_v1.1 (Tanabe, Adams et al. 1991). Cette étude fut plus tard approfondie pour montrer que l'hélice S3 et la boucle S3-S4 sont critiques dans la différence de cinétiques d'activation de ces deux protéines (Nakai, Adams et al. 1994). En 1997, le même groupe a montré que les domaines I et III occupent un rôle important dans la dépendance au voltage et le temps d'activation, alors que les domaines II et IV auraient moins d'impact. À l'opposé, d'autres études par chimère entre Ca_v3.1 et Ca_v1.2 suggèrent que les domaines I, III et IV sont critiques pour la différence de la dépendance au voltage de ces deux canaux (Li, Stevens et al. 2004), tandis que le groupe de Zamponi a montré que les éléments déterminants du potentiel d'activation des canaux LVA se trouvent dans les domaines I et IV (Hamid, Peloquin et al. 2006). Il faut cependant noter que dans plusieurs cas, les changements observés sur les propriétés biophysiques ne sont que de l'ordre de quelques mV (inférieur à 10 mV), ce qui rend l'interprétation des résultats très délicate. De plus, il est très difficile de découpler le mouvement des quatre hélices S4 de manière à isoler le rôle d'une seule hélice, ce qui, encore une fois, rend difficile l'interprétation des résultats. Malgré tout, ces travaux suggèrent une grande complexité dans l'étude des mécanismes d'activation des canaux calciques.

1.2.4.3.2 La porte d'activation

L'activation des canaux de type Ca_v peut être vue comme un processus comprenant plusieurs étapes. Tout d'abord, le mouvement du senseur de voltage, suivi de la transmission de ce mouvement à la porte d'activation, soient les segments S6, pour terminer avec l'ouverture du pore (Bezanilla 2000). Plusieurs efforts ont été faits au cours des dernières années pour caractériser la région responsable de la troisième étape, soit le pore du canal. En effet, plusieurs études par mutations ont démontré

que cette région, formée par les segments S6, est un point très sensible dans l'activation et l'inactivation (Raybaud, Dodier et al. 2006). Tout d'abord, il fut observé sur le canal calcique de type L rétinale $Ca_v1.4$ que la mutation I745T sur l'allèle CACNA1F cause d'importantes déficiences visuelles (Hemara-Wahanui, Berjukow et al. 2005). Des mutations correspondantes à I745T (hélice S6 du domaine II) furent testées dans d'autres canaux calciques. Il fut montré que la mutation I781T dans $Ca_v1.2$ cause le même effet (Hohaus, Beyl et al. 2005), tout comme la mutation I701G dans $Ca_v2.3$ (Wall-Lacelle, Hossain et al. 2011). Il fut par la suite observé que l'environnement de cette isoleucine s'avère important. En effet, le motif LAIA fut identifié comme crucial pour l'activation. Les mutations en proline de ces quatre résidus dans $Ca_v2.3$ ont induit des changements similaires au niveau du gating de la protéine, soit un déplacement vers la gauche de la courbe d'activation, un ralentissement des cinétiques d'activation et de désactivation ainsi que d'importantes variations dans la dépendance au voltage de l'inactivation (Raybaud, Baspinar et al. 2007). Ces observations semblent indiquer une stabilisation de l'état ouvert lorsque les résidus hydrophobes LAIA sont remplacés par des résidus plus hydrophiles. Une autre étude plus récente met en évidence le rôle important du domaine II dans le canal $Ca_v2.3$ lors de son activation. Il a été démontré que la Leu-596 se trouvant dans la boucle intracellulaire reliant les segments S4 et S5 du domaine II, ainsi que l'Ile-701 du segment S6 du même domaine sont étroitement couplées de manière énergétique lors de l'activation du canal (Wall-Lacelle, Hossain et al. 2011).

Bien que les effets les plus spectaculaires aient été observés dans le domaine II, les autres domaines montrent aussi une sensibilité aux mutations des résidus de l'hélice S6. Il fut effectivement observé, suite à une étude de mutagenèse sur la séquence VAVIM, présente dans le segment IVS6 et conservée à travers les différents canaux calciques, que

la mutation en glycine de chacun de ces résidus a d'importants effets sur les propriétés d'activation et d'inactivation. En effet, la courbe d'inactivation de ces mutations est déplacée de -20 à -30 mV, selon les mutations étudiées. Le potentiel d'activation de ces mutations est aussi déplacé de -5 à -20 mV, quoique cet effet soit moins important que les déplacements de l'ordre de -40 mV observés pour le domaine II, qui est aussi le seul domaine à montrer une augmentation significative de la constante de temps de désactivation. Les mutations des segments IS6 et IIS6 ont montré des effets semblables mais beaucoup plus modérés sur l'activation et l'inactivation, mais aucun changement sur la désactivation. Ces observations permettent deux conclusions. Dans un premier temps, les mutations de la région distale des hélices S6 de $Ca_v2.3$ semblent avoir pour effet la stabilisation de l'état ouvert. De plus, les effets différents observés pour chacun des quatre domaines viennent appuyer l'hypothèse que, dans les canaux calciques, les quatre senseurs au voltage ont une contribution différente à l'ouverture du pore.

C'est l'hydrophobicité des résidus 699 à 702 (motif LAIA, IIS6) et 1718 à 1722 (motif VAVIM, IVS6) identifiés dans $Ca_v2.3$ qui contrôle l'activation voltage-dépendante. En effet, lorsqu'on effectue une série de mutations dans les domaines II, III et IV de $Ca_v2.3$ (Raybaud, Baspinar et al. 2007) ainsi qu'à la position 781 dans le domaine II de $Ca_v1.2$ (Hering, Beyl et al. 2008), il existe une relation positive entre l'indice d'hydrophobicité du résidu utilisé et le changement dans le potentiel de mi-activation du canal. Ces résultats semblent indiquer que les chaînes latérales de ces acides aminés sont dans un environnement hydrophobe lorsque le canal se trouve dans sa conformation fermée ou que ces résidus sont dans un milieu aqueux dans l'état ouvert, ce qui stabilise la configuration ouverte avec des résidus hydrophiles. Des modèles créés par homologie avec $K_v1.2$ dans l'état ouvert montrent que cet environnement pourrait être créé par l'interaction entre les différentes

hélices S6. Plusieurs algorithmes prévoient un alignement des résidus PVPVIV impliqués dans l'activation du canal $K_v1.2$, avec les séquences LAIA et VAVIM (**Figure 16**).

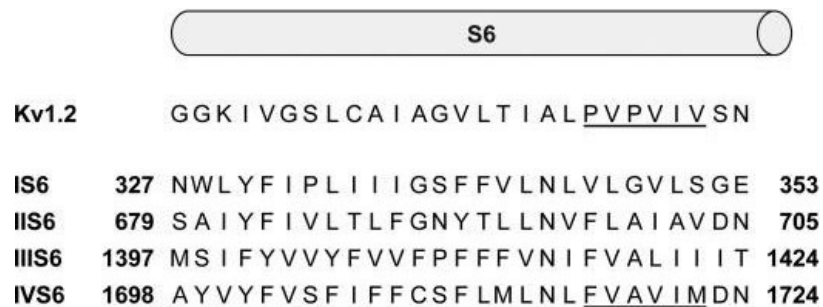


Figure 16 : L'alignement proposé des quatre segments S6 du canal $Ca_v2.3$ avec le segment S6 du canal $K_v1.2$. (figure inspirée de Wall-Lacelle, Hossain et al. 2011).

Les observations faites sur les segments S4 et S6 permettent d'élaborer un modèle simplifié du mécanisme d'activation des canaux Ca_v . Le groupe de Hering propose qu'on puisse considérer ces canaux comme étant formés de deux parties distinctes. Le senseur au voltage peut se trouver soit dans l'état au repos où il bloque le pore dans sa conformation fermée ou l'état activé qui permet mais n'oblige pas l'ouverture du pore. Le pore peut se trouver dans les états fermé ou ouvert. Le canal a donc accès à quatre combinaisons d'états différents, soit repos/fermé (R), activé/fermé (A), ouvert (O) et repos/ouvert (D) (**Figure 17**). L'étape reliant le mouvement du senseur de voltage S4 à l'ouverture du pore demeure encore inconnu.

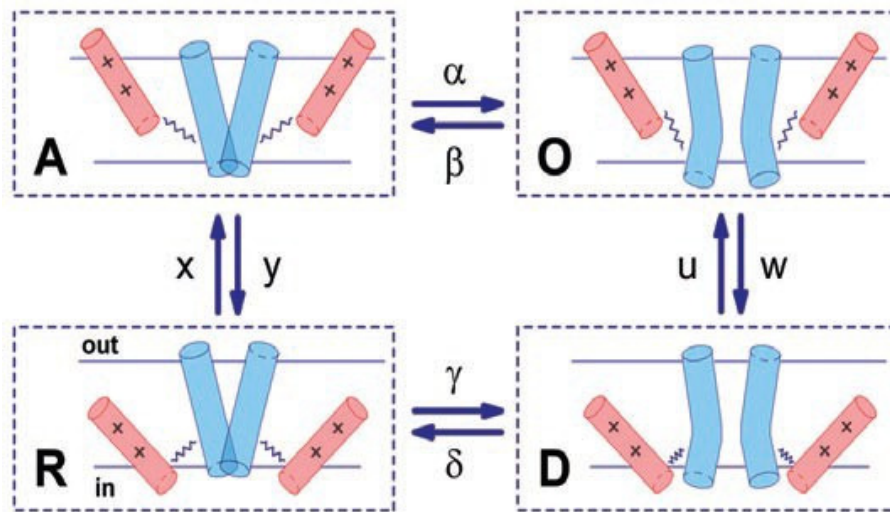


Figure 17 : Représentation schématique des états de transition des canaux VGCC.

Selon ce modèle, l'activation d'un canal est déterminée par deux processus distincts : le mouvement du senseur de voltage (en rouge) et l'ouverture du pore (en bleu). Chaque processus peut se trouver dans deux états. Tandis que le senseur de voltage peut se trouver en état de repos (baissé) ou activé (monté), le pore peut se trouver dans l'état ouvert ou fermé. Le canal a donc accès à quatre combinaisons d'états possibles : (R) le senseur de voltage bloque le pore qui est déjà fermé sur lui-même; (A) le senseur de voltage s'active et débloque le pore qui reste fermé sur lui-même; (O) le pore est ouvert et laisse passer les ions; (D) le senseur de voltage désactivé, bloque le pore qui reste ouvert. Les constantes d'ouverture et de fermeture du pore α , β , γ et δ sont indépendantes du voltage tandis que les constantes du senseur de voltage x , y , u et w dépendent du voltage (figure inspirée de Hering, Beyl et al. 2008).

1.3 Hypothèses et objectifs de recherche

Le site principal d'interaction avec $Ca_v\beta$ qui se trouve sur $Ca_v\alpha_1$ et une séquence de 18 résidus dans la boucle intracellulaire I-II appelée AID (« α interaction domain ») (Pragnell, De Waard et al. 1994). L'affinité de l'ordre du nanomolaire entre l'hélice AID et la sous-unité $Ca_v\beta$ est surtout assurée par une paire d'acides aminés WI qui projettent vers $Ca_v\beta$ (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). Les mutations ponctuelles des résidus WI dans la partie C-terminale de l'AID diminuent de 1000 fois l'affinité de $Ca_v\beta_2a$ pour $Ca_v1.2$ (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) tout en diminuant son adressage membranaire (Bourdin, Marger et al. 2010).

Relativement peu de travaux sont effectués afin d'élucider les déterminants moléculaires dans $Ca_v\beta$ qui sont nécessaires pour maintenir l'adressage membranaire et la modulation de « gating » des canaux calciques HVA. Il est compris que la partie N-terminale de la sous-unité auxiliaire joue un rôle prédominant dans les cinétiques d'inactivation, soit directement en interagissant avec $Ca_v\alpha_1$ (Olcese, Qin et al. 1994; Jangsangthong, Kuzmenkina et al. 2010), soit indirectement à travers la palmitoylation dans le cas de $Ca_v\beta_2a$ (Restituito, Cens et al. 2000). Des structures cristallines en 3-D à haute résolution témoignent d'un arrangement des sous-unités $Ca_v\beta$ composées de cinq domaines distincts, soient une extrémité N-terminale, un domaine SH3, une région HOOK, un domaine GK et une extrémité C-terminale (article, FIGURE- 5A) (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004). Le domaine GK semble être suffisant pour conférer les propriétés d'activation (Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2008; Chen, He et al. 2009; Dresviannikov, Page et al. 2009). Ce domaine comprend les déterminants structurels du domaine de liaison ABP (« α -binding pocket »)

qui sont distribués entre les hélices α_3 , α_6 , α_7 et α_9 , et les feuillets β_9 et β_{10} (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008).

À l'exception de quelques travaux (Maltez, Nunziato et al. 2005; Butcher, Leroy et al. 2006; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008), peu d'études essaient d'établir systématiquement une corrélation entre la liaison à haute affinité de $Ca_v\beta$ et ses deux rôles qui consistent à moduler les propriétés de « gating » ainsi que l'adressage membranaire du canal. Alors que l'interaction entre $Ca_v\beta$ et $Ca_v\alpha_1$ est nécessaire pour le ciblage membranaire de $Ca_v\alpha_1$, il reste à déterminer si une liaison de l'ordre du nanomolaire de $Ca_v\beta$ sur le motif AID de $Ca_v\alpha_1$ est requise pour permettre à $Ca_v\beta$ d'accomplir les deux rôles. De plus, alors que la liaison de $Ca_v\beta$ sur le domaine AID de $Ca_v\alpha_1$ est très bien caractérisée (Berrou, Klein et al. 2002; Berrou, Dodier et al. 2005; Leroy, Richards et al. 2005; Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2008; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008; Bourdin, Marger et al. 2010), peu d'études établissent le lien entre les résidus dans le domaine GK de $Ca_v\beta$ qui sont cruciaux pour le ciblage membranaire et la modulation du canal.

Des complications émergent lors des études fonctionnelles effectuées avec le système d'expression recombinant d'ovocytes de *Xenopus* (Chen, Li et al. 2004; McGee, Nunziato et al. 2004; Richards, Leroy et al. 2007; Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2008; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008; Miranda-Laferte, Gonzalez-Gutierrez et al. 2011), incluant celles effectuées dans notre laboratoire (Berrou, Klein et al. 2002; Berrou, Dodier et al. 2005), car des sous-unités $Ca_v\beta$ endogènes stimuleraient l'expression de mutants incapables d'interagir. La présence de la sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ vient compliquer davantage l'interprétation des données dans d'autres études. De plus, l'utilisation de la sous-unité $Ca_v\beta_2a$ dans plusieurs études est une sous-unité atypique étant donné que son extrémité N-terminale possède un site de palmitoylation (Chien,

Carr et al. 1996) qui ancre la sous-unité à la membrane et ainsi, pourrait compenser pour l'interruption de l'interaction à haute affinité. En effet, la sous-unité $Ca_v\beta 2a$ palmitoylée était encore capable de moduler les propriétés biophysiques de $Ca_v 2.2 W391A$ dans les ovocytes de *Xenopus*, témoignant le fait que l'ancrage membranaire permis par sa palmitoylation peut substituer dans certains cas, l'interaction à haute affinité avec le « linker » I-II (Leroy, Richards et al. 2005). Dans ce travail, nous avons systématiquement étudié le rôle de domaines structurels de $Ca_v\beta 3$ dans l'adressage membranaire ainsi que dans la modulation des propriétés de « gating » du canal HVA $Ca_v 2.3$ suite à l'expression des sous-unités dans le système recombinant des cellules HEKT.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Techniques de biologie moléculaire

2.1.1 Matériel utilisé

L'ADNc codant pour la protéine de type sauvage (wt pour « wild type») $Ca_v2.3$ dans le vecteur pcDNA3 (humain, GenBank L27745) nous a été donné par le Dr. Toni Schneider (**Tableau IV**).

Tableau IV : Les différentes sous-unités utilisées.

Sous-unité	Numéro GenBank	Espèce	Vecteur	Antibiotique de sélection
$Ca_v2.3$	L27745	humain	pcDNA3	Ampicilline
$Ca_v\alpha2b\delta$	NM_000722	humain	pCMV-Tag 5A	Kanamycine
			pEGFP-C2	
$Ca_v\beta1a$	M25817	lapin	pCMV-Tag 5A	
$Ca_v\beta1b$	NM_017346	rat	pCMV-Tag 5A	
$Ca_v\beta2a$	M80545	rat	pCMV-Tag 5A	
$Ca_v\beta3$	M88751	rat	pCMV-Tag 5A	
$Ca_v\beta4$	L02315	rat	pCMV-Tag 5A	
CaM	M27319	humain	pMT21	

2.1.2 Mutagenèse dirigée

Les mutations introduites dans les différentes sous-unités sont effectuées par la technique de mutagenèse dirigée « Polymerase Chain Reaction » (PCR) à l'aide de la trousse QuickChange™ XL (Stratagene, La Jolla, CA). Les amorces sens et anti-sens utilisées (Invitrogen, Carlsbad, CA) sont constituées de 33 nucléotides, contenant la mutation désirée au milieu du fragment. Le produit de PCR obtenu est alors digéré pendant 2 heures à 37°C par l'enzyme DpnI fournie dans la trousse

QuickChange™ XL afin de dégrader l'ADN parental méthylé et hémiméthylé. L'intégrité et le poids moléculaire du produit de PCR sont ensuite vérifiés sur gel d'agarose 1% (m/v, solubilisée dans une solution de tampon Tris-acétate 10 mM, EDTA 1 mM). Tous les gels d'agarose 1% contiennent du bromure d'éthidium, un intercalant qui permet de visualiser les bandes formées par l'ADN en présence de lumière ultraviolette.

Le produit de PCR est par la suite amplifié par des bactéries compétentes X-10 Gold fournies avec la trousse QuickChange™ XL. Ces bactéries ont une efficacité de 5×10^9 cfu/ μ g d'ADN pUC (cfu signifie « Colony-Forming Unit »). Les bactéries sont initialement incubées pendant 10 minutes sur glace avec du β -mercaptoéthanol pour augmenter l'efficacité de la transformation. Le produit de PCR est alors ajouté et le mélange incubé pendant 30 minutes sur glace. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique de 30 secondes à 42°C. Le milieu de culture NZY+ Broth (MgCl₂ 125 mM, MgSO₄ 12.5 mM, glucose 20 mM dans du milieu LB Broth (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO)) est alors ajouté et le mélange est incubé sous agitation pendant une heure à 37°C. Le produit final est alors étalé sur une boîte de Petri contenant du LB Agar (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) avec l'antibiotique de sélection approprié.

Suite à une incubation de 16 à 18 heures à 37°C, trois à six colonies sont repiquées séparément dans du milieu LB avec l'antibiotique de sélection approprié (dans un rapport de 4 μ L d'antibiotique par 1 mL de milieu). Une incubation sous agitation pendant 16 à 18 heures à 37°C permet d'amplifier l'ADN qui est ensuite extrait à l'aide de la trousse QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Mississauga, Ont). Les clones obtenus sont séquencés à l'aide de l'appareil DNA analyser ABI 3730 (IRIC, Université de Montréal). Un clone contenant la mutation désirée est alors sélectionné pour subir une deuxième étape de mutagenèse dirigée s'il y a lieu, ou pour être amplifié par des bactéries ultra-compétentes DH5 α . Dans ce cas, l'ADN est ajouté aux bactéries et le mélange est

incubé pendant 20 minutes sur glace, après quoi un choc thermique de 30 secondes à 42°C est effectué. Du milieu de culture LB Broth est alors ajouté et le mélange est incubé sous agitation pendant une heure à 37°C. Le produit final est étendu sur une boîte de LB Agar contenant l'antibiotique de sélection approprié. Les bactéries sont incubées à 37°C entre 16 et 18 heures.

Des colonies sont alors repiquées dans du milieu LB avec l'antibiotique de sélection approprié (dans un rapport de 2 µL d'antibiotique par 1 mL de milieu). Une incubation sous agitation pendant 16 à 18 heures à 37°C permet d'amplifier l'ADN qui est ensuite extrait à l'aide de la trousse QIAprep® Spin Midiprep Kit (Qiagen, Mississauga, Ont). L'ADNc isolé sous forme de plasmide est ensuite dosé (260 nm) et transfecté dans des cellules HEKT.

2.1.3 Insertion de l'épitope HA

L'hémagglutinine HA (« human influenza hemagglutinin ») est un peptide avec la séquence primaire YPYDVPDYA. L'insertion de cet épitope dans la séquence primaire des protéines d'intérêts permet de les analyser et les visualiser par des méthodes d'immunohistochimie. Pour être accessible du côté extracellulaire, l'épitope HA doit être inséré dans une boucle extracellulaire du canal Ca_v2.3 (**Figure 18**).

Les positions prédites des six segments transmembranaires sont déterminées par le logiciel SOSUI (SOSUI engine ver. 1.11) disponible en libre accès et développé par l'Université de Nagoya au Japon. L'épitope HA est ainsi inséré entre les acides aminés méthionine (M) 120 et sérine (S) 121 qui se situent, selon la prédiction du logiciel SOSUI (

Tableau V), sur la boucle extracellulaire reliant les segments transmembranaires S1 et S2 du domaine I. Ce site a été choisi parce que les autres boucles extracellulaires possibles interviendraient directement ou indirectement dans les processus électrophysiologiques du canal. En effet, la boucle entre le S3 et le S4 relie deux segments transmembranaires qui forment la machinerie du senseur de voltage. La boucle reliant S5 à S6 est liée directement au filtre de sélectivité et elle se situe entre deux segments transmembranaires qui forment le pore et qui jouent un rôle dans son ouverture et fermeture (la porte du canal).

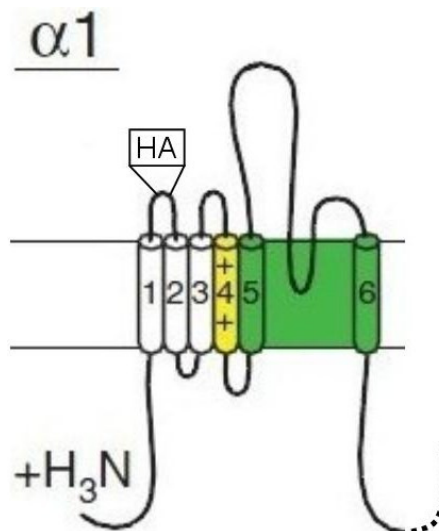


Figure 18 : Position de l'épitope HA dans le canal $Ca_v2.3$.

Représentation de la structure secondaire prédite du domaine I du canal calcique $Ca_v2.3$. L'épitope HA est inséré sur la boucle extracellulaire qui relie les segments S1 et S2 du domaine I. Les segments qui forment le pore et qui interviennent dans l'ouverture du pore ainsi que le filtre de sélectivité sont en vert. Le senseur du voltage est en jaune.

L'insertion de l'épitope HA a été effectuée en 2009 par Dr Benoîte Bourdin par mutagenèse dirigée en trois étapes selon le protocole décrit précédemment. Neuf acides nucléiques sont introduits à la fois, donc trois acides aminés.

Tableau V : Localisation prédite des segments transmembranaires du domaine I du canal calcique Ca_v2.3.

Segment transmembranaire	Extrémité N-terminale	Région transmembranaire	Extrémité C-terminale	longueur
S1	90	PFEYMILATIIANCIVLALAEQH	111	22
S2	130	YFIGIFCFEAGIKIVALGFIFHK	152	23
S3	159	GWNVMDFIVVLSGILATAGTHF	180	22
S4	195	LRPLKLVSGIPSLQIVLKSIMKA	217	23
S5	224	IGLLFFAILMFAIIGLEFYSGK	246	23
S6	287	DGITQFDNILFAVLTVFQCITME	309	23

Tableau V : Analyse de la séquence primaire du canal Ca_v2.3 par le logiciel SOSUI permet de prédire l'emplacement des six segments transmembranaires du domaine I. L'épitope HA composé de neuf acides aminés est inséré dans la boucle extracellulaire reliant les segments S1 et S2, entre les acides aminés M120 et S121. Il faut noter que l'extrémité N-terminale de la protéine ainsi que l'extrémité C-terminale, c'est-à-dire la boucle entre les domaines I et II, sont intracellulaires.

2.1.4 Délétions des domaines fonctionnels de la sous-unité auxiliaire Ca_vβ3

La délétion des résidus 170-175 (Δ 170-175) et 175-180 (Δ 175-180) de la sous-unité Ca_vβ3 est réalisée par la technique de mutagenèse dirigée en une seule étape telle que décrite précédemment, en choisissant des amorces qui outrepassaient les 18 nucléotides.

Pour les délétions excédant six résidus (18 nucléotides), c'est-à-dire Δ 57-123, Δ 122-169, Δ 122-175, Δ 57-180, Δ 180-364 et la délétion du segment N terminal de la construction Ca_vβ3 58-362, les fragments d'ADNc ont été clivés par l'enzyme de restriction NotI (New England Bio Labs Inc. Cat#R0189L) selon les instructions du fabricant. Les sites NotI du vecteur pCMV-Tag 5A sont éliminés par mutagenèse dirigée en respectant le cadre de lecture. L'absence de sites de restriction NotI dans la sous-unité Ca_vβ3 est confirmée par le logiciel Cutter [<http://www.justbio.com/index.php?page=cutter>]. L'enzyme NotI reconnaît

le palindrome GC[▼]GGCCGC et clive les deux brins d'ADN à l'endroit où se situe la flèche.

Deux sites de restriction NotI sont insérés par mutagenèse dirigée de part et d'autre des segments à être enlevés. L'ADNc est ensuite digéré par l'enzyme NotI selon les instructions du fabricant. Les fragments obtenus sont séparés sur un gel d'agarose 1%. La bande avec le poids moléculaire recherché est incisée du gel et l'ADNc y est extrait avec la trousse QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Mississauga, Ont) en suivant les instructions du fabricant. L'analyse de la qualité de l'isolation et de l'extraction du fragment d'intérêt ainsi que son dosage sont faits par le biais d'un autre gel d'agarose 1%. Les extrémités cohésives de l'ADNc sont ensuite liguées avec l'ADN ligase T4 (New England Bio Labs Inc. Cat#M0202S) selon les instructions du fabricant. Des bactéries MAX Efficiency DH5 α (Invitrogen, Cat#18258-012) sont transformées avec l'échantillon d'ADNc ligué ainsi qu'avec un échantillon d'ADNc n'ayant pas subi la ligation. Ce dernier sert de témoin pour juger l'efficacité de la ligation (il devrait y avoir moins de colonies bactériennes en absence de ligation). Les bactéries sont étalées sur des boîtes de Petri contenant de la kanamycine comme antibiotique de sélection. Suite à une incubation de 16 à 18 heures à 37°C, des colonies isolées sont mises en culture pour amplifier l'ADNc qui est ensuite extrait et séquencé selon les protocoles décrits précédemment (voir section 2.1.2). Le clone qui contient la délétion désirée subit une dernière étape de mutagenèse dirigée pour retirer le site de restriction NotI qui se crée lors de la ligation des extrémités cohésives, ce qui rétablit le cadre de lecture (voir section 2.1.2).

La délétion du segment C terminal de la construction Ca ν β 3 58-362 se fait par l'insertion d'un codon non-sens TAG entre les acides aminés aux positions 362 et 363.

2.2 Culture cellulaire et transfection des cellules

2.2.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire HEK293T (ou HEKT pour « Human Emryonic Kidney-T antigen ») (ATCC, Manassas, VA) est utilisée pour les expériences de « patch clamp » et d'immunobuvardage de type Western. Cette lignée est appelée T car ces cellules sont transfectées avec le gène codant pour la protéine SV40 T-antigen (« Simian vacuolating Virus 40 »). Cette dernière permet la réplication épisomale de plasmides transfectés qui contiennent l'origine de réplication SV40. Ceci rend possible l'amplification de plasmides et l'expression de gènes d'intérêts par les cellules HEKT.

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes de Petri (100 mm x 20 mm) (Corning incorporated, Lowell, MA), contenant 10 mL de milieu de culture. Le milieu de base est le milieu DMEM-HG (« Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose ») (Invitrogen, Burlington, ON) additionné de 10% de FBS (« Fetal Bovine Serum ») inactivé par la chaleur (Origine : États-Unis ; Invitrogen, Burlington, ON) et de pénicilline (10 unités/mL) ainsi que de streptomycine (10 µg/mL) afin d'éviter les risques de contamination bactérienne des échantillons. L'antibiotique de sélection généticine (Geneticin® Selective Antibiotic, Invitrogen, Burlington, ON) (40 µg/mL) sert à cultiver la lignée cellulaire HEKT exprimant de manière stable la sous-unité Cavβ3. Cette sous-unité est dans le vecteur pCMV-Tag5a et confère la résistance à la généticine (G418).

Les cellules sont cultivées dans des plats de culture pendant une période maximale de trois mois ou jusqu'à concurrence de 30 passages. Les cellules sont divisées lorsqu'elles atteignent une confluence de 85-95%. Dans ce cas, le milieu est retiré et les cellules sont lavées avec 2-3 mL de milieu trypsine-EDTA 0,05% (Invitrogen, Burlington, ON) avant

d'être détachées par 1,5 mL du même milieu en étant incubées à 37°C pendant 5 minutes. L'ajout de 8,5 mL de milieu DMEM-HG permet de resuspendre les cellules dans un volume totalisant 10 mL. Les cellules sont ensuite comptées à l'hémacymètre avant d'êtreensemencées selon la densité nécessaire. Les cellules sont cultivées dans des incubateurs maintenus à 37°C avec un taux de CO₂ de 5%. Les cellules HEKT transfectées de manière stable avec la sous-unité Cavβ3 sont cultivées constamment avec l'antibiotique de sélection généticine, sauf au moment de la transfection.

2.2.2 Transfection des cellules HEKT

Les cellules ayant atteint 80-90% de confluence sont transfectées dans des boîtes de Petri de 35 mm en absence d'antibiotique. Les cellules sont transfectées à l'aide de la lipofectamine (Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent, Invitrogen, Burlington, ON). L'ADNc intègre les sphères de liposomes contenues dans la solution de lipofectamine. Les liposomes fusionnent avec la membrane plasmique, permettant ainsi l'intégration des ADNc dans les cellules. 4 µg de chaque plasmide à être transfecté (pour les expériences de « patch-clamp », seulement 0,2 µg du témoin de transfection, soit le vecteur pEGFP, est transfecté) sont ajoutés à 250 µL de milieu Opti-Mem qui est préchauffé à 37°C (Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (1X), Invitrogen, Burlington, ON). En parallèle, 10 µL de lipofectamine sont ajoutés à 250 µL de milieu Opti-Mem. Les deux mélanges sont mis à incuber pendant 5 minutes à température ambiante. Les deux solutions ainsi obtenues sont mélangées puis la solution résultante est incubée 20 minutes à température ambiante. Le mélange est ajouté aux cellules en culture qui sont ensuite incubées 24 heures dans des incubateurs maintenus à 37°C avec un taux de CO₂ de 5%.

2.3 Immunobuvardage de type Western

2.3.1 Lysat cellulaire

Toutes les étapes du lysat cellulaire se font à 4°C. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS-CM et lysées directement sur le plat de culture avec 100 µL de tampon de lyse. Le lysat est incubé pendant 30 minutes sous agitation, puis soniqué pendant 20 secondes. Le produit de la sonication est ensuite centrifugé 30 minutes à 13 000 rpm (centrifugeuse de table) et le surnageant contenant les protéines est prélevé. Les protéines sont ensuite dosées grâce à la trousse BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, États-Unis) en suivant les instructions du fabricant.

2.3.2 Gel SDS-PAGE

Les protéines sont séparées par migration à travers un gel dénaturant SDS-PAGE (« Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis ») en fonction de leur masse molaire. Le gel est constitué d'un gel de séparation 8% acrylamide/bisacrylamide précédé d'un gel d'entassement 5% acrylamide/bisacrylamide. La migration se fait pendant 2 heures à 120 V. Dix à 40 µg de protéines dans du tampon de Laemmli sont chargées par puits.

2.3.3 Transfert

Les protéines sont transférées (à 100 V pendant 2 heures) sur des membranes de nitrocellulose Hybond C (Amersham Biosciences, Piscataway). Afin d'évaluer la qualité du transfert et du chargement des protéines, la membrane est traitée au rouge ponceau. Ce dernier est un colorant qui interagit avec les protéines de façon réversible. Cette coloration est réalisée sur chaque membrane de nitrocellulose immédiatement après le transfert. La membrane est recouverte avec la

solution de rouge ponceau, puis agité 2 à 3 minutes. Le rinçage avec de l'eau 18,2 MΩ retire tout le colorant qui n'a pas interagi avec les protéines et révèle les nombreuses protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4 °C sous agitation dans une solution de blocage (PBS contenant 5% de lait).

2.3.4 Immunomarquage

L'hybridation avec l'anticorps primaire rat-anti-Ca_vβ3 (Invitrogen, 1:5000 ou 1:10 000) se fait dans la solution de blocage sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. L'hybridation avec l'anticorps secondaire chèvre-anti-rat conjugué à la peroxydase HRP (« Horseradish Peroxidase ») (Jackson, 1:10 000) se fait dans la solution de blocage sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Chaque étape d'hybridation est suivie de trois lavages de 10 minutes de la membrane avec la solution PBS + 0,1 % Tween20.

2.3.5 Révélation par chimioluminescence

Finalement, les protéines sont détectées par chimioluminescence grâce à la trousse Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, États-Unis). Le réactif de chimioluminescence est utilisé pour détecter les protéines liées à l'anticorps secondaire conjugué à une molécule HRP. L'enzyme HRP catalyse l'émission de lumière à partir de l'oxydation du luminol (ECL). La lumière émise laisse une empreinte sur un film Kodak (Kodak Biomax Film, Sigma-Aldrich®, Oakville, ON).

2.4 FACS (« Fluorescence Activated Cell Sorting »)

La cytométrie de flux est une technique qui permet de mesurer simultanément de multiples caractéristiques physiques d'une cellule. Ainsi, il est possible de déterminer sa taille relative (FSC pour « Forward Scatter

»), sa granularité relative (SSC pour « Side Scatter ») et l'intensité de la fluorescence émise (FI pour « Fluorescence Intensity »). L'appareil de FACS utilise un laser et les cellules passent une par une devant le faisceau. Selon la lumière réémise (qui détermine à la fois les paramètres FI et SSC) et la lumière transmise (qui détermine le paramètre FSC), les cellules vont pouvoir être triées selon leur propriété. Notre but ayant été de quantifier le canal $Ca_v2.3$ à la membrane, nous avons utilisé uniquement les résultats du paramètre FI. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules sont dissociées avec 400 μ L de Trypsine-EDTA 0,05% et resuspendues dans 1 mL de milieu DMEM-HG (10% FBS) sans antibiotique. Elles sont centrifugées à 400 x g pendant 5 minutes puis lavées une fois avec 1 mL du PBS 1X. Après le lavage, les cellules sont resuspendues dans 600 μ L de PBS, desquels on prélève 150 μ L pour y ajouter 1,5 μ L d'anticorps anti-HA couplé au fluorophore FITC (« Fluoresceine Iso Thio Cyanate ») (Monoclonal anti-HA FITC produit chez la souris) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Une agitation sur orbitron pendant 45 minutes à l'obscurité permet l'hybridation entre les protéines. L'échantillon est ensuite centrifugé 5 min à 400 x g et le surnageant est jeté. Les cellules sont rincées trois fois avec 1 mL de PBS et le culot final est resuspendu dans 500 μ L et transféré dans des tubes spéciaux pour l'analyse au FACS (Tubes de 5 mL, référence : 352054) (BD Biosciences, San Jose, CA).

L'appareil de FACS utilisé est le FACSCalibur (quatre couleurs) du département de microbiologie et d'immunologie de l'Université de Montréal. Les mesures sont effectuées par monsieur Serge Sénéchal, agent de recherche du laboratoire de cytométrie de flux.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel Origin. Les données de FACS représentent les moyennes \pm SEM d'au moins trois séries d'expériences indépendantes.

Les données de FACS sont obtenues à partir des graphiques représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence. Deux populations sont déterminées : M1 et M2. La population M1 est obtenue à partir de la mesure de cellules non transfectées et n'ayant pas été incubées avec l'anticorps anti-HA couplé au FITC. Pour toutes les autres mesures, M1 est constante et M2, déterminée à partir de M1, constitue alors la population de cellules fluorescentes (**Figure 19**).

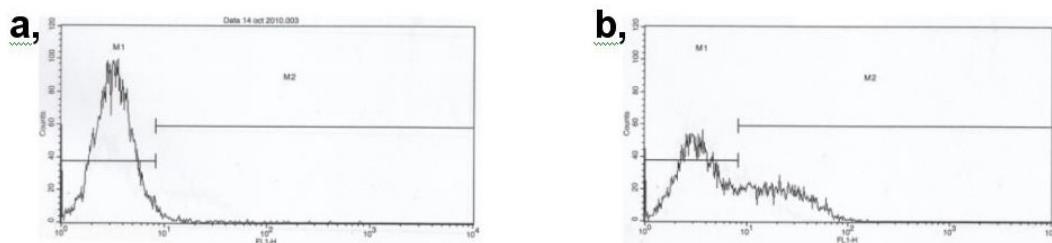


Figure 19 : Graphiques obtenus suite à l'analyse des échantillons en FACS.

Les graphiques représentent le nombre de cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence. **a**, Contrôle négatif où la présence d'une seule population de cellules est détectée, ce qui permet de positionner les marqueurs M1 et M2. **b**, Présence de deux populations de cellules est détecté. 10 000 cellules sont comptées par échantillon.

2.5 *Électrophysiologie*

2.5.1 Enregistrements des données

Les cellules HEKT sont transfectées tel que mentionné à la section 2.2.2. 24 heures après la transfection, les cellules sont resuspendues pour être mises en culture à une densité suffisamment faible pour obtenir des cellules isolées au jour deux.

Les expériences de « patch-clamp » sont faites 48 heures après la transfection, en configuration cellule entière et en utilisant l'amplificateur Axopatch 200-B (Molecular devices, Union City, CA, USA). La résistance

des électrodes se situe entre 2 à 4 M Ω et elles sont remplies avec une solution contenant (en mM) : 140 CsCl; 0,6 NaGTP; 3 MgATP; 10 EGTA; 10 Hepes. Le pH de la solution est ajusté à 7,3 avec du NaOH. Les enregistrements se font directement dans les boîtes de Petri. Les cellules baignent dans une solution saline de Earle modifiée qui contient (en mM) : 135 NaCl; 20 TEACl; 2 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 Hepes. Le pH de la solution est ajusté à 7,3 avec du KOH. Le logiciel PClamp Clampex 10,2 couplé au système d'acquisition Digidata 1440A (Molecular Devices, Union City, USA) est utilisé pour l'acquisition et l'analyse de données. La compensation pour la capacitance de la pipette et de la cellule ainsi que la compensation pour la résistance en série sont appliquées jusqu'à 80% en utilisant la fonction de compensation de l'amplificateur. La capacitance de la cellule est estimée en mesurant la constante de temps du déclin du courant provoqué par un pulse dépolarisant de 10 mV appliqué sur une cellule à partir un potentiel de repos de -100 mV. Une série de pulses de 150 ms est appliquée à partir d'un potentiel de repos de -100 mV à une fréquence de 0,2 Hz, de -80 à +60 mV à des intervalles de 5 mV. Les données sont enregistrées à une fréquence de 5 kHz et filtrées à 1 kHz. Les expériences sont effectuées à la température ambiante (20 – 22 °C).

2.5.2 Analyse des données

Le paramètre r_{50} représente le courant résiduel enregistré 50 ms après l'atteinte du maximum de courant entrant. Les paramètres d'activation sont estimés à partir des courbes des densités de courant (pA/pF) en fonction du voltage (V). Le potentiel de mi-activation $E_{0,5,act}$ est estimé à partir du lissage de la courbe pA/pF-V selon l'équation de Boltzmann. L'énergie libre d'activation ΔG_{act} est calculée en utilisant l'équation suivante :

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

où ΔG_{act} : énergie libre d'activation (énergie de Gibbs d'activation), z : paramètre de pente, F : constante de Faraday, $E_{0.5,act}$: potentiel de mi-activation

2.6 Modélisation par homologie (par Pierre-Olivier Demers-Giroux)

La séquence primaire de la région AID du canal $Ca_v2.3$ est alignée avec celle du canal $Ca_v1.2$ (58% d'homologie) en utilisant l'outil d'alignement T-coffee [<http://www.tcoffee.org>] (Notredame, Higgins et al. 2000). Le modèle moléculaire du domaine AID de $Ca_v2.3$ lié à $Ca_v\beta3$ est obtenu avec le logiciel Modeller 9v4 [<http://salilab.org/modeller>] en utilisant les coordonnées moléculaires de $Ca_v1.2$ lié à $Ca_v\beta3$ (1VYT.pdb) (Chen, Li et al. 2004). Cinquante modèles sont produits. Les incompatibilités avec les restrictions spatiales sont minimisées en utilisant l'algorithme MPDF (« molecular protein density function ») dans Modeller. Le modèle avec le score MPDF le moins élevé est utilisé pour cette étude.

3 RÉSULTATS (par article)

La section des résultats est présentée par l'article intitulé « *A Quartet of Leucine residues in the Guanylate Kinase Domain of $Ca_v\beta$ Determines the Plasma Membrane Density of the $Ca_v2.3$ channel* ». Ce dernier est publié dans la revue scientifique *The Journal of Biological Chemistry*.

Toutes les expériences d'électrophysiologie et les analyses de données subséquentes sont effectuées par Behzad Shakeri, en plus d'une participation dans les expériences de biologie moléculaire. Cette participation inclut la production des différents mutants de $Ca_v\beta3$ et les expériences de FACS.

Dr Benoîte Bourdin a complété les expériences de biologie moléculaire, c'est-à-dire la production des différents mutants de $Ca_v\beta3$, les expériences de FACS et les immunobuvardages de type Western. Les images de modélisation par homologie sont produites par Pierre-Olivier Demers-Giroux et Dr Rémy Sauvé. La conception du projet, la rédaction de l'article ainsi que la composition des figures sont effectuées par Dr Lucie Parent.

A Quartet of Leucine residues in the Guanylate Kinase Domain of $\text{Ca}_v\beta$
Determines the Plasma Membrane Density of the $\text{Ca}_v2.3$ channel *

Behzad Shakeri[#], Benoîte Bourdin[#], Pierre-Olivier Demers-Giroux, Rémy Sauvé, and Lucie Parent

Département de Physiologie and the Membrane Protein Research Group,
Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada

[#] Authors have contributed equally to the manuscript

*Running title: Leucine residues in the GK domain of $\text{Ca}_v\beta$

To whom correspondence should be addressed: Lucie Parent, Dépt Physiol,
Université de Montréal, P.O. Box 6128, Downtown Station, Montréal, Qué, H3C
3J7, Canada.

Keywords: Calcium channels, protein density, gating, homology modeling,
electrophysiology, flow cytometry

Background: $\text{Ca}_v\beta$ subunits stimulate cell-surface expression of $\text{Ca}_v2.3$ channels.

Results: Out of 33 positions and domains tested, Leucine mutants in the Guanylate Kinase domain of $\text{Ca}_v\beta3$ decreased significantly the surface protein density of $\text{Ca}_v2.3$.

Conclusion: Leucine residues are responsible for the functional modulation by $\text{Ca}_v\beta$.

Significance: A quartet of Leucine residues forms the hydrophobic pocket surrounding the Alpha-Interacting-Domain of $\text{Ca}_v2.3$.

3.1 Summary

$\text{Ca}_v\beta$ subunits are formed by a Src homology-3 (SH3) domain and a guanylate kinase-like (GK) domain connected through a variable HOOK-domain. Complete deletion of the SH3 domain (75 residues) as well as deletion of the HOOK domain (47 residues) did not alter plasma membrane density of $\text{Ca}_v2.3$ nor its typical activation gating. In contrast, 6-residue deletions in the GK domain disrupted cell surface trafficking and functional expression of $\text{Ca}_v2.3$. Mutations of residues known to carry nanomolar-affinity binding in the GK domain of $\text{Ca}_v\beta$ (P175A, P179A, M195A, M196A, K198A, S295A, R302G, R307A, E339G, N340G, and A345G) did not significantly alter cell surface targeting or gating modulation of $\text{Ca}_v2.3$. Nonetheless, mutations of a quartet of leucine residues (either single or multiple mutants) in the $\alpha3$, $\alpha6$, $\beta10$, and $\alpha9$ regions of the GK domain were found to significantly impair cell surface density of $\text{Ca}_v2.3$ channels. Furthermore, the normalized protein density of $\text{Ca}_v2.3$ was nearly abolished with the quadruple $\text{Ca}_v\beta3$ Leu mutant L200G/ L303G/ L337G/ L342G. Altogether, our observations suggest that the

four Leucine residues in $\text{Ca}_V\beta 3$ form a hydrophobic pocket surrounding key residues in the Alpha-Interacting-Domain of $\text{Ca}_V 2.3$. This interaction appears to play an essential role in conferring $\text{Ca}_V\beta$ -induced modulation of the protein density of $\text{Ca}_V\alpha 1$ subunits in $\text{Ca}_V 2$ channels.

Les sous-unités auxiliaires $\text{Ca}_V\beta$ sont formées par un domaine SH3 (« Src homology-3 ») connecté à un domaine GK (« guanylate kinase-like ») par le biais d'un domaine variable HOOK. La délétion complète du domaine SH3 (75 résidus) ainsi que la délétion du domaine HOOK (47 résidus) n'ont pas modifié la densité membranaire de $\text{Ca}_V 2.3$ ni ses propriétés d'activation. Cependant, la délétion de six résidus dans le domaine GK interrompt l'expression membranaire et l'expression fonctionnelle de $\text{Ca}_V 2.3$. La mutation de résidus connus pour avoir une affinité de liaison de l'ordre du nanomolaire dans le domaine GK de $\text{Ca}_V\beta$ (P175A, P179A, M195A, M196A, K198A, S295A, R302G, R307A, E339G, N340G et A345G) n'a pas modifié de manière significative l'adressage membranaire de $\text{Ca}_V 2.3$. Les mutations de quatre résidus leucine (soient des mutations simples, soient des mutations multiples) dans les régions $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 10$ et $\alpha 9$ du domaine GK ont grandement réduit la densité membranaire du canal $\text{Ca}_V 2.3$. De plus, la densité protéique normalisée du canal $\text{Ca}_V 2.3$ a été pratiquement abrogée avec le quadruple mutant leucine $\text{Ca}_V\beta 3$ L200G/L303G/L337G/L342G. Somme toute, nos observations suggèrent que les quatre résidus leucine dans $\text{Ca}_V\beta 3$ forment une pochette hydrophobe qui entoure les résidus clés dans le domaine « Alpha-Interacting-Domain » de $\text{Ca}_V 2.3$. Cette interaction semble jouer un rôle essentiel dans la modulation $\text{Ca}_V\beta$ -dépendante de la densité membranaire de la sous-unité $\text{Ca}_V\alpha 1$ dans les canaux $\text{Ca}_V 2$.

3.2 Introduction and hypothesis

Voltage-dependent Ca^{2+} channels (Ca_V) are membrane proteins that play a key role in promoting Ca^{2+} influx in response to membrane depolarization in excitable cells. The total Ca^{2+} influx through Ca_V proteins is controlled by the single-channel conductance, the probability that the channel is open at a given time and voltage, what is also referred to as gating, and the number of proteins expressed at the membrane. Modulating any of these parameters could be used to alter Ca^{2+} influx and prevent excitable cells from Ca^{2+} overload.

Voltage-gated Ca^{2+} channels form oligomeric complexes that are classified according to the structural properties of the pore-forming $\text{Ca}_V\alpha 1$ subunit. The primary structures for 10 distinct $\text{Ca}_V\alpha 1$ subunits (Snutch and Reiner 1992; Zhang,

Randall et al. 1993; Birnbaumer, Campbell et al. 1994; Cribbs, Lee et al. 1998; Perez-Reyes, Cribbs et al. 1998; Randall and Benham 1999; Catterall 2000) are classified into three main subfamilies according to their high-voltage activated gating (HVA Ca_v1 and Ca_v2) or low-voltage activated gating (LVA Ca_v3). In HVA Ca_v1 and Ca_v2 channels, auxiliary subunits include a cytoplasmic $\text{Ca}_v\beta$ subunit, a mostly extracellular $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ subunit, and calmodulin constitutively bound to the C-terminus of $\text{Ca}_v\alpha1$ (Carl, Felix et al. 1995; Gao, Puri et al. 1997; Peterson, DeMaria et al. 1999; Catterall 2000; Dai, Hall et al. 2009) (for review see (Dolphin 2009)).

There are four subfamilies of $\text{Ca}_v\beta$ s, each with multiple splicing isoforms and unique modulatory functions (Van Petegem and Minor 2006; Buraei and Yang 2010). Auxiliary $\text{Ca}_v\beta$ subunits modulate activation gating as well as inactivation kinetics of the main $\text{Ca}_v\alpha1$ subunits of HVA Ca_v1 and Ca_v2 channels (Parent, Schneider et al. 1997; Gao, Chien et al. 1999; Bichet, Cornet et al. 2000; Leroy, Richards et al. 2005; Takahashi, Miriyala et al. 2005; Butcher, Leroy et al. 2006; Bourdin, Marger et al. 2010; Altier, Garcia-Caballero et al. 2011). They also promote cell surface expression in part by preventing protein ubiquitination and degradation of the protein by the ERAD complex (Bichet, Cornet et al. 2000; Leroy, Richards et al. 2005; Butcher, Leroy et al. 2006; Altier, Garcia-Caballero et al. 2011; Waithe, Ferron et al. 2011).

The principal $\text{Ca}_v\alpha1$ - $\text{Ca}_v\beta$ interaction site on the pore-forming $\alpha1$ subunit is a conserved 18 residue sequence in the I-II loop called the α interaction domain (AID) (Pragnell, De Waard et al. 1994). The nanomolar affinity between the AID helix and the $\text{Ca}_v\beta$ protein has been thoroughly investigated (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). It is primarily secured by the projection of the conserved Tryptophan and Isoleucine (WI) pair of residues onto the $\text{Ca}_v\beta$ fold (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004). Single point mutations of the C-terminal WI residues on the AID decreased by a 1000-

fold the affinity of the $\text{Ca}_v\beta 2$ for $\text{Ca}_v1.2$ (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) and decreased its cell surface density (Bourdin, Marger et al. 2010).

Less is known in regard to the molecular determinants in $\text{Ca}_v\beta$ that control protein density at the plasma membrane and modulate the activation gating of the channel. It is understood that the N-terminus plays a predominant role in modulating inactivation kinetics, either directly by interacting with the $\text{Ca}_v\alpha 1$ (Olcese, Qin et al. 1994; Jangsangthong, Kuzmenkina et al. 2010) and/or indirectly through palmitoylation for $\text{Ca}_v\beta 2a$ (Restituito, Cens et al. 2000). High-resolution 3-D crystal structures have shown that $\text{Ca}_v\beta$ subunits consist of five distinct domains: the N-terminus, a Src homology 3 (SH3) domain, a HOOK region, a guanylate kinase (GK) domain, and the C-terminus (Fig 3A) (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004). The GK core module appears to be sufficient to confer the activation properties (Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2008; Chen, He et al. 2009; Dresviannikov, Page et al. 2009). The latter includes the structural determinants of the α -binding pocket (ABP) that are distributed among $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, and $\alpha 9$ helices and $\beta 9$ and $\beta 10$ sheets (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008).

With some notable exceptions (Maltez, Nunziato et al. 2005; Butcher, Leroy et al. 2006; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008), few studies have systematically attempted to correlate $\text{Ca}_v\beta$ high-affinity binding with the modulation of channel gating and trafficking. Whereas interaction between $\text{Ca}_v\beta$ and $\text{Ca}_v\alpha 1$ is required for the trafficking of $\text{Ca}_v\alpha 1$ to the plasma membrane, it remains to be seen whether nanomolar binding of $\text{Ca}_v\beta$ to the AID motif of $\text{Ca}_v\alpha 1$ is required to carry both roles. Furthermore, whereas the binding of $\text{Ca}_v\beta$ on the AID of $\text{Ca}_v\alpha 1$ has been well characterized (Berrou, Klein et al. 2002; Berrou, Dodier et al. 2005; Leroy, Richards et al. 2005; Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2008; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008; Bourdin, Marger et al.

2010), few concur on the GK residues in $\text{Ca}_v\beta$ that determine protein density at the plasma membrane and contribute to channel modulation.

Complications have arisen in functional studies performed with the *Xenopus* recombinant system (Chen, Li et al. 2004; McGee, Nunziato et al. 2004; Richards, Leroy et al. 2007; Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2008; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008; Miranda-Laferte, Gonzalez-Gutierrez et al. 2011), including our own (Berrou, Klein et al. 2002; Berrou, Dodier et al. 2005), since endogenous $\text{Ca}_v\beta$ s (Tareilus, Roux et al. 1997) are likely to boost expression of non-interacting mutants. The presence of the $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ subunit in some experiments could complicate data interpretation. In addition, the $\text{Ca}_v\beta 2a$ subunit used in most studies is an atypical subunit with a N-terminal palmitoylation site (Chien, Carr et al. 1996) that anchors it to the membrane and could offset the disruption of the high-affinity interaction site. Indeed, the palmitoylated $\text{Ca}_v\beta 2a$ was still able to modulate the biophysical properties of $\text{Ca}_v 2.2$ W391A in *Xenopus* oocytes, indicating that the plasma membrane anchoring afforded by its palmitoylation can substitute in some cases for high affinity interaction with the I–II linker (Leroy, Richards et al. 2005).

In this work we have systematically addressed the role of the structural domains of $\text{Ca}_v\beta 3$ in regard to protein density and channel function after recombinant expression of HVA $\text{Ca}_v 2.3$ in HEK293 cells. Selective deletion of the SH3 and HOOK structural domains did not significantly alter the cell surface density or the channel functional modulation by $\text{Ca}_v\beta$. More surprisingly, mutations of residues in the GK domain that were previously identified as underlying the affinity to HVA $\text{Ca}_v\alpha 1$ (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) caused little change in the cell surface density of $\text{Ca}_v 2.3$ or in the channel activation gating. Nonetheless, point mutations within a quartet of leucine residues in the $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 10$, and $\alpha 9$ regions of the GK domain significantly decreased cell surface density. Altogether our results suggest that affinity interaction in the micro- to nano- molar range is sufficient to carry the typical $\text{Ca}_v\beta$ -induced

hyperpolarizing shift in the channel activation gating in the presence of overexpressed $\text{Ca}_v\beta$ subunits. Furthermore, we have identified a quartet of leucine residues in the GK domain of $\text{Ca}_v\beta 3$ that play a critical role in promoting surface plasma density of $\text{Ca}_v 2.3$.

3.3 Experimental procedures

Recombinant DNA techniques. The human $\text{Ca}_v 2.3$ (Genbank™ accession L27745) (Pereverzev, Leroy et al. 2002), the rat $\text{Ca}_v\beta 3$ (Genbank™ accession M88751) (Castellano, Wei et al. 1993), the rat brain $\text{Ca}_v\alpha 2\beta\delta-1$ (Genbank™ accession NM_000722) (Williams, Feldman et al. 1992) were used. All subunits were subcloned in commercial vectors under the control of the CMV promoter as explained earlier (Bourdin, Marger et al. 2010). Some electrophysiological experiments were performed with the pGFP- $\text{Ca}_v\alpha 2\delta 1$ clone where $\text{Ca}_v\alpha 2\delta-1$ was subcloned in peGFP-C2 vector (Clontech,) between the *SacI* and *Sall* sites.

The hemagglutinin (HA) epitope tag (YPYDVPDYA) was inserted in the first extracytoplasmic predicted loop in Domain I at position 367 (nt) for $\text{Ca}_v 2.3$. The biophysical properties of the HA-tagged $\text{Ca}_v\alpha 1$ subunit of $\text{Ca}_v 2.3$ expressed in HEKT cells with the auxiliary $\text{Ca}_v\beta 3$ subunit were found not to be significantly different from the wild-type $\text{Ca}_v 2.3$ channel expressed under the same conditions (Table I). $\text{Ca}_v\beta 3$ deletion mutants were produced as described elsewhere (Bourdin, Marger et al. 2010). The $\text{Ca}_v\beta 3$ 58-362 fragment was used previously in (Bourdin, Marger et al. 2010). The boundaries of the five domains/regions of the rat $\text{Ca}_v\beta 3$ are: N-terminus: Met¹-Pro⁵⁹; SH3 domain: Val⁶⁰-Ser¹²³ and Pro¹⁷⁰-Pro¹⁷⁵; HOOK region: Pro¹²⁰-Pro¹⁶⁹; GK domain: Ser¹⁷⁶-Thr³⁶⁰; C-terminus: His³⁶¹-Tyr⁴⁸⁴ (see Fig 5A).

Cell culture and transfections. HEK293T or HEKT were grown in Dulbecco's high-glucose minimum essential medium (DMEM-HG) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin-streptomycin at 37°C under 5% CO₂ atmosphere as described elsewhere (Bourdin, Marger et al. 2010). RT-PCR

conducted in these cells failed to highlight the presence of $\text{Ca}_v\beta$ and $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ auxiliary subunits (Yasuda, Chen et al. 2004). HEKT cells (80% confluence) were transiently transfected with similar amounts of DNA (4 μg each or 12 μg total): HA- $\text{Ca}_v2.3$, $\text{Ca}_v\beta3$, $\text{Ca}_v\alpha2\delta-1$, or empty vector pCMVTag5 in 10 μL Lipofectamin 2000 (*Qiagen, Mississauga, ON, Canada*) using a DNA:lipid ratio of 1:2.5 as described elsewhere (Bourdin, Marger et al. 2010). Transfection rate of the control peGFP plasmid was estimated to be $66 \pm 2 \%$ ($n = 8$) as assessed by flow cytometry from the fluorescence of the green fluorescent protein (GFP). Preliminary tests showed that $\text{Ca}_v2.3$ protein expression peaked 24-30 h after transfection.

Quantification of $\text{Ca}_v2.3$ surface expression with FACS. FACS experiments were conducted and analyzed as described elsewhere. Briefly, 24 to 28 hours after transfection, cells were harvested and stained with the anti-HA FITC conjugate (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at room temperature for 45 min. A maximum of 10000 cells resuspended in standard Phosphate Buffer Saline (PBS) were counted using a FACScalibur® flow cytometer (*Becton Dickinson*) with a FITC filter (530 nm) at the Flow cytometry facility located in the Department of Microbiology of the Université de Montréal. The level of background fluorescence was adjusted with cells incubated in the absence of the fluorophore. The parameters of the M1 region were set from Gaussian distribution of the fluorescence intensity obtained in the absence of the FITC antibody. The M2 region was calculated from the Gaussian distribution observed in the higher decades of the fluorescence log scale in the presence of the FITC antibody. The cell fluorescence intensity, and by extension the cell surface expression of the HA tag, was estimated from the M2 peak value (Suppl Fig S2 of (Bourdin, Marger et al. 2010)). Three control conditions were always carried out for each series of experiments: a) non transfected HEKT cells with anti-HA FITC antibody; b) HEKT cells transfected with HA- $\text{Ca}_v2.3$ without $\text{Ca}_v\beta3$ WT; c) HEKT cells transfected with HA- $\text{Ca}_v2.3$ WT and $\text{Ca}_v\beta3$ WT. Peak fluorescence values obtained for the control conditions were compared with previous measures for internal consistency. Each novel mutant and/or experimental condition was

conducted in triplicate and sometimes repeated over two weeks. Experiments performed in the 24-28 hr range after transfection yielded M2 values with an experimental variation lower than 10% between samples and between series of experiments. In any case, a maximum of 10% variation in the measure of fluorescence was tolerated. All control conditions were pooled and reported in Tables 3 and 4.

Patch-clamp experiments in HEKT cells. Whole-cell voltage-clamp recordings were performed 30 h after transfection using the methods described above in the presence of the peGFP vector (0.2 μ g) as a control for transfection. Patch-clamp experiments were carried out with the Axopatch 200-B amplifier (*Molecular Devices*). Electrodes were filled with a solution containing (in mM): 140 CsCl; 0.6 NaGTP; 3 MgATP; 10 EGTA; 10 Hepes; titrated to pH 7.3 with NaOH. Pipette resistance ranged from 2 to 4 M Ω . Cells were bathed in a modified Earle's saline solution (in mM): 135 NaCl; 20 TEACl; 2 CaCl₂; 1 MgCl₂; 10 Hepes, titrated to pH 7.3 with KOH. PClamp software Clampex 10.2 coupled to a Digidata 1440A acquisition system (*Molecular Devices*,) was used for on-line data acquisition and analysis. Pipette and cell capacitance cancellation and series resistance compensation were applied (up to 80%) using the cancellation feature of the amplifier. Cellular capacitance was estimated by measuring the time constant of current decay evoked by a 10 mV depolarizing pulse applied to the cell from a holding potential of -100 mV. A series of 150 ms-voltage pulses were applied from a holding potential of -100 mV at a frequency of 0.2 Hz, from -80 to +60 mV at 5 mV intervals. Unless stated otherwise, data were sampled at 5 kHz and filtered at 1 kHz. Experiments were performed at room temperature (20 – 22°C). Activation parameters were estimated from the peak I-V curves obtained for each channel combination and are reported as the mean of individual measurements \pm S.E.M as described elsewhere (Wall-Lacelle, Hossain et al. 2011). Briefly, the I-V relationships were normalized to the maximum amplitude and were fitted to a Boltzmann equation with $E_{0.5,act}$ being the mid-potential of activation. The free energy of activation was calculated using the mid-activation potential by equation:

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

where z is the effective charge displacement during activation, and T , F , and R have their usual meaning (Yifrach and MacKinnon 2002). The r_{50} ratio is defined as the ratio of peak whole-cell currents remaining 50 ms later (I_{50ms} / I_{Peak}). It has been used elsewhere to estimate inactivation kinetics of $Ca_v2.3$ (Raybaud, Baspinar et al. 2007; Wall-Lacelle, Hossain et al. 2011; Kamp, Shakeri et al. 2012).

For each novel mutant tested, the biophysical parameters of $Ca_v2.3$ WT + $Ca_v\beta3$ WT were measured the same day under the same experimental conditions from the transfection protocol up to the bath solutions. Experiments performed under the same conditions yielded peak current densities $\pm 15\%$ between samples and between series of experiments. All experiments were pooled and reported in Tables 1 and 2.

Western Blots. Protein expression of all constructs was confirmed by Western blotting in total cell lysates as previously described (Bourdin, Marger et al. 2010) using the following primary antibodies: anti- $Ca_v2.3$ (Alomone, 1:250), anti-HA (Covance Biotechnology, Québec, Canada) (1:500), anti- $Ca_v\beta3$ (Alomone, 1:5000), and anti GAPDH (Sigma, 1:10000).

Homology modeling. The primary sequence of the AID region from $Ca_v2.3$ was aligned with the similar regions in $Ca_v1.2$ (58% identity) by using T-COFFEE (Notredame, Higgins et al. 2000). The computer-based molecular model of the AID from $Ca_v2.3$ in complex with $Ca_v\beta3$ was obtained with Modeller 9v4 using the molecular coordinates of $Ca_v1.2$ with $Ca_v\beta3$ (1VYT.pdb) (Chen, Li et al. 2004). Fifty models were generated. Violations of spatial restraints were minimized using the molecular protein density function (MPDF) algorithm in Modeller. The model with the lowest MPDF was used for this study.

3.4 Results

Alpha-interacting domain and cell surface expression of Ca_v2.3

Co-expression of Ca_v2.3 with Ca_vβ3 increased whole-cell currents in HEKT cells from -6 ± 1 pA/pF (n = 18) (Table 1) for the wild-type Ca_v2.3 channel expressed alone to a current density of -18 ± 2 pA/pF (n = 49) for Ca_v2.3 + Ca_vβ3. Similar results were obtained for the HA-tagged Ca_v2.3 channels (Table 1). Co-expression with Ca_vα2δ-1 subunit further increased whole-cell currents to -65 ± 5 pA/pF (n = 95) (Fig 1A-B, Table 2) confirming that Ca_vα2δ-1 increases whole-cell current density of HVA Ca_v1 and Ca_v2 channels (Parent, Schneider et al. 1997; Bourdin, Marger et al. 2010). The increase in cell current density was accompanied by an apparent acceleration of the inactivation kinetics with τ_{50} values decreasing from 0.38 ± 0.01 (n = 49) to 0.25 ± 0.01 (n = 95) at +10 mV in the presence of Ca_vα2δ-1 (Fig 1C) but failed to significantly shift the mid-potential of activation ($E_{0.5,act}$) toward negative potentials (Tables 1-2), an observation that was also reported elsewhere (Yasuda, Chen et al. 2004).

Flow cytometry assays carried out with the HA-tagged Ca_v2.3 in the stable Ca_vβ3 confirmed that Ca_vβ is the critical auxiliary subunit in stimulating the plasma membrane density of Ca_v2.3 (Fig 1D). Roughly 40% of the cells transfected with HA-Ca_v2.3 and Ca_vβ3 were fluorescent suggesting that a substantial fraction of Ca_v2.3 proteins remained in cytoplasmic compartments as noted for Ca_v1.2 (Bourdin, Marger et al. 2010; Altier, Garcia-Caballero et al. 2011). Ca_vβ1a, Ca_vβ1b, and Ca_vβ4 isoforms were as proficient as Ca_vβ3 in chaperoning Ca_v2.3 to the membrane but the palmitoylated Ca_vβ2a did not appear to be as powerful as the other Ca_vβ subunits (Fig 2, Tables 1 and 3).

There was no significant increase in cell fluorescence when overexpressing Ca_vα2δ-1 or calmodulin wild-type alone with Ca_v2.3 (Table 3). Since the whole-cell current density results from the $NPo\Delta i$ product where N is the number of proteins at the membrane, Po is the open channel probability and Δi is the single channel conductance, these data suggest that Ca_vα2δ-1 improves the open

channel probability rather than increasing the number of channels at the membrane as shown for $\text{Ca}_v1.2$ (Bourdin, Marger et al. 2010; Altier, Garcia-Caballero et al. 2011). The strong functional modulation by $\text{Ca}_v\alpha2\delta-1$ contrasts with its milder effects on the total $\text{Ca}_v2.3$ protein density, especially when compared with the robust increase conferred by $\text{Ca}_v\beta3$ (Fig 3).

To examine which AID residues (Fig 4A) are required to promote cell surface expression of $\text{Ca}_v2.3$, conserved and nonconserved residues in the AID were mutated and functionally expressed in HEKT cells. Cell surface expression were maintained with $\text{Ca}_v2.3$ G382A, Y383A, and Y383F (Fig 4B-C) although the cell surface density decreased significantly for Y383G. The $\text{Ca}_v\beta3$ -modulation of activation gating and inactivation kinetics of Y383F and Y383A mutants was not significantly different from $\text{Ca}_v2.3$ WT (Fig 4D, Table 1). Nonetheless, W386A failed to migrate to the plasma membrane. Hence only the most severe reduction in the binding affinity as seen with W386A (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) was found to disrupt plasma membrane density.

Isothermal titration calorimetry (ITC) assays (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) showed that the mutation of the non conserved arginine residue (R384) located between the GY and WI in the AID helix increased the binding affinity of the $\text{Ca}_v2.3$ peptide for $\text{Ca}_v\beta2a$ with a K_d decreasing from 54 nM to 8.6 nM. $\text{Ca}_v2.3$ R384M and R384L mutations did however not significantly influence the number of $\text{Ca}_v2.3$ proteins at the membrane nor did it alter the $\text{Ca}_v\beta3$ modulation of channel gating (Fig 4, Table 1).

The SH3 and HOOK domains of $\text{Ca}_v\beta$ are not essential for $\text{Ca}_v\beta$ -mediated modulation

We next addressed the importance of the different structural domains of $\text{Ca}_v\beta$ in the $\text{Ca}_v\beta$ -induced modulation of cell surface density and channel gating of $\text{Ca}_v2.3$. Co-expression with the SH3-HOOK-GK fragment of $\text{Ca}_v\beta3$ (in aa 58-362) boosted cell surface expression and generated whole-cell currents with biophysical parameters not significantly different from the wild-type version of

Ca_vβ3 (Fig 5, Table 1) suggesting that the C-terminal does not contribute significantly to functional modulation in contrast to results obtained with Ca_vβ2a (Takahashi, Miriyala et al. 2005).

Dissection of the SH3-HOOK-GK fragment (57-362) along structural boundaries yielded truncated constructs Ca_vβ ΔNSH3 (Δ57-123), Ca_vβ ΔHOOK (Δ122-169), Ca_vβ Δβ5 sheet (Δ170-175) (formally part of the SH3) and Ca_vβ ΔGK (Δ180-364) (Fig 6). Except for the latter construct, each Ca_vβ construct increased surface density of Ca_v2.3 (Fig 7, Table 4) and produced channels with typical voltage-dependent activation gating (Table 1). The integrity of the Ca_vβ deletion constructs were confirmed by Western blots (*Data not shown*).

The SH3 domain was shown to support channel endocytosis (Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2007) and to promote calpain-mediated Ca_vβ3 proteolysis through a PEST-like motif (Sandoval, Oviedo et al. 2006). Deletion of the N-terminal of SH3 domain (Δ57-123), deletion of the six-residue β5 strand (Δ170-175 or ΔPYDVVP, formerly known as the β-interaction domain or BID (De Waard, Scott et al. 1996)), or deletion of both regions (ΔSH3) yielded channels with robust peak current density and typical voltage-dependent activation gating in the absence and in the presence of Ca_vα2δ-1 as a background subunit (Fig 7, Tables 1-2). Deletion of the HOOK domain (Δ122-169 and Δ122-175) in Ca_vβ3 did not alter significantly any of the biophysical parameters (activation potential, peak current density, and inactivation kinetics) (Fig 7, Table 1). In contrast, small 6-residue deletions in the GK domain with Ca_vβ3 Δβ6 or Δ175-180 and Ca_vβ3 Δ195-200 failed to promote cell surface density of Ca_v2.3 channels (Fig 7B).

Mutations of Leucine residues in the GK domain decrease plasma membrane density

A mutational analysis was thus carried to seek out single residues in the GK domain that are responsible for modulation of gating and cell surface density of Ca_v2.3. We focused on residues of Ca_vβ3 that were highly likely to interact with W386 and I387 residues in Ca_v2.3 (Berrou, Klein et al. 2002) based upon the changes in the energetics of interaction between the AID peptide from Ca_v1.2 and Ca_vβ2a (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) as well as from the predictions of the homology model (Fig 6). To note, the GK domains of Ca_vβ2a and Ca_vβ3 are well conserved with more than 87% identity in this stretch of 188 amino acids. Residues in Ca_vβ3 were either substituted by glycine to minimize side-chain interactions or substituted with alanine to preserve the α-helicoidal structure.

Nearly 20 point mutations were tested in the GK domain of Ca_vβ3 namely in the β6 sheet (P175A, P175G, P179A, and P179G); in the α3 helix (M195A, M196A, K198A, and L200G); in the β9 sheet (S295A); in the α6 helix (R302G, L303G, R307A, R307G, and R307K); in the β10 sheet (E339G, L337G, N340G); and in the α9 helix (L342G and A345G). All Ca_vβ3 mutations produced functional Ca_v2.3 channels (Tables 1, 2, and 4). Most notably, Ca_vβ3 P175A (β6), Ca_vβ3 M196A (α3), Ca_vβ3 S295A (β9), Ca_vβ3 R302G (α6), and Ca_vβ3 E339G (β10) behaved like Ca_vβ3 WT. These Ca_vβ mutants stimulated cell surface density, boosted whole-cell peak current density, and imparted the small but significant negative shift in the activation potential of Ca_v2.3 (Tables 1, 2, and 4).

Mutations at position R307 (R307A, R307G, and R307K) in the α6 helix significantly increased peak current densities as compared with Ca_vβ3 WT (Tables 1 and 2). In addition, the Ca_vβ3 R307 mutants decreased the inactivation kinetics, suggesting that the open state was stabilized by these mutants. These effects were observed despite a documented decrease in the affinity of the equivalent R356A mutation in Ca_vβ2a (equivalent to R307 in Ca_vβ3) with a K_d increasing from 5 to 345 nM (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008).

In contrast, point mutations of four Leucine residues (L200G, L303G, L337G, and L342G) significantly decreased cell surface density of $\text{Ca}_v2.3$ by $\approx 50\text{-}60\%$ (Fig 8). The 3-D homology model suggests that the four Leucine residues in $\text{Ca}_v\beta3$ could form a hydrophobic pocket surrounding $\text{Ca}_v2.3$ W386 and $\text{Ca}_v2.3$ I387 (Fig 9). To note, the strongest effects were observed with $\text{Ca}_v\beta3$ L303G that is predicted to interact with I387 in $\text{Ca}_v2.3$. Multiple point mutations were constructed to test the hypothesis that the four Leucine residues form a single interaction site. The double, triple, and quadruple $\text{Ca}_v\beta3$ mutants L200G/ L303G; L200G/ L303G/ L347G; and L200G/ L303G/ L337G/ L342G $\text{Ca}_v\beta3$ mutants all ablated cell surface density of $\text{Ca}_v2.3$ (Table 4). Furthermore, the peak current densities measured with these $\text{Ca}_v\beta3$ mutants were not statistically different ($p > 0.1$) than the densities measured in the absence of $\text{Ca}_v\beta3$ (Table 1-2). Finally, the normalized protein density of $\text{Ca}_v2.3$ measured in membrane lysates was significantly decreased with $\text{Ca}_v\beta3$ L303G as compared with $\text{Ca}_v\beta3$ WT but was nearly abolished with the quadruple $\text{Ca}_v\beta3$ Leucine mutant L200G/ L303G/ L337G/ L342G (Fig 10). In the context where the fluorescence level measured in our FACS assay results from the net balance between anterograde and retrograde trafficking, this observation suggests that the decreased protein density at the plasma membrane could result from a decrease in the $\text{Ca}_v2.3$ total protein density.

3.5 Discussion

There is considerable interest in identifying molecules that modulate protein-protein interactions in vivo. In this regard, specifically modulating the interaction of $\text{Ca}_v\beta$ with HVA Ca_v channels could be a strategy to design new HVA Ca_v agonists and antagonists. Residues of $\text{Ca}_v\beta$ carrying nanomolar-affinity binding onto the $\text{Ca}_v\alpha1$ of $\text{Ca}_v1.2$ have been identified from high-resolution 3-D crystal structures and isothermal calorimetry assays (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). Although mutations of residues in $\text{Ca}_v\alpha1$ abolishing the protein-protein interaction are incompatible with $\text{Ca}_v1.2$ function (Van Petegem,

Duderstadt et al. 2008; Bourdin, Marger et al. 2010), there has been some divergence regarding the functional importance of the domains in $\text{Ca}_v\beta$ subunits (Chen, Li et al. 2004; McGee, Nunziato et al. 2004; Richards, Leroy et al. 2007; Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2008; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008; Miranda-Laferte, Gonzalez-Gutierrez et al. 2011). The range of approaches and recombinant systems could explain in part the diverse conclusions. We have thus systematically addressed the role of $\text{Ca}_v\beta$ in channel function based upon the structural data currently available. Our results show that protein-protein affinity measured in vitro may not be the only predictor of channel modulation especially in the context where $\text{Ca}_v\beta$ subunits control surface density and prevent degradation of $\text{Ca}_v\alpha 1$ subunits from $\text{Ca}_v 1$ and $\text{Ca}_v 2$ channels by the ERAD complex.

Site occupancy is sufficient to modulate protein density and gating

It is well understood that high-affinity binding of $\text{Ca}_v\beta$ onto the AID motif appears to be a pre-requisite for both $\text{Ca}_v\beta$ -induced modulation of gating and $\text{Ca}_v\beta$ -stimulated plasma membrane trafficking of $\text{Ca}_v\alpha 1$ (Altier, Dubel et al. 2002; Cohen, Foell et al. 2005; Leroy, Richards et al. 2005; Bourdin, Marger et al. 2010). In our hands, mutations within the AID of $\text{Ca}_v 2.3$ that were shown to moderately increase (R384M and R384L) or decrease (G382A, Y383A, and Y383F) binding affinity (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) did not alter the $\text{Ca}_v\beta 3$ modulation of cell surface density and hyperpolarization of gating. $\text{Ca}_v\beta$ mutations or $\text{Ca}_v 2.3$ mutations (Y383A) that moderately reduced the number of $\text{Ca}_v 2.3$ proteins at the membrane produced channels with biophysical properties (peak current density, activation gating, and inactivation kinetics) similar to $\text{Ca}_v 2.3$ WT + $\text{Ca}_v\beta 3$ WT control channels. This result is remarkably reminiscent to the Y383S mutation in $\text{Ca}_v 2.2$ that decreased the affinity of $\text{Ca}_v\beta 1b$ binding to the I-II linker of $\text{Ca}_v 2.2$ from a $K_d = 14$ nM to $K_d = 329$ nM while preserving its effect on current density and cell surface expression in HEKT cells (Butcher, Leroy et al. 2006).

Nonetheless, complete disruption of this interaction with Ca_v2.3 W386A, Ca_vβ3 Δ175-180, or Ca_vβ3 Δ195-200 abrogated cell surface labelling of Ca_v2.3 which evidently translated in the absence of function. This is a surprising observation given that the reverse observation was reported in the *Xenopus* expression system. AID-deficient Ca_v2.3 channels migrated to the plasma membrane but were not functionally modulated by Ca_vβ when expressed in *Xenopus* oocytes. (Berrou, Klein et al. 2002; Berrou, Dodier et al. 2005). It certainly raises questions about the transposition of data from *Xenopus* oocytes to mammalian cells.

Partial deletions of the GK domain of Ca_vβ3 disrupt plasma membrane density of Ca_v2.3

The deletion of the HOOK region and thus the absence of intramolecular coupling between the SH3 and GK in Ca_vβ did not impact significantly the voltage-dependent activation gating or the inactivation kinetics of Ca_v2.3 despite the report that the variable HOOK domain plays a role in the inactivation kinetics of Ca_vβ2a (Richards, Leroy et al. 2007). Our observation also seems to contradict a previous report that strong SH3-GK intramolecular coupling conferred by short linkers (< 3 aa) confers fast inactivation kinetics (Takahashi, Miriyala et al. 2005; Chen, He et al. 2009). It also disagrees with the observation that the β5 sheet in the SH3 domain of Ca_vβ2a plays an important role in the modulation of Ca_v2.1 channels (Chen, He et al. 2009). Discrepancies can be attributed to the idiosyncrasy of the Ca_vβ2a subunit and/or the *Xenopus* expression system used in those studies. In our hands, complete deletion of the SH3 or the HOOK domains in Ca_vβ3 failed to abrogate either its chaperone function or its modulation of channel gating.

Leucine residues in the GK domain of Ca_vβ3 determine cell surface density of Ca_v2.3

Close to 20 point mutations were performed in the GK domain of Ca_vβ3. The majority of the mutations did not alter the Ca_vβ-induced stimulation of cell surface density and hyperpolarization of gating despite a documented decrease in

the binding affinity (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). Among the $\text{Ca}_v\beta$ mutations herein tested, four mutations (M196A, L303G, R307A, and L342G) were expected to decrease significantly the binding affinity of $\text{Ca}_v\beta_3$ to $\text{Ca}_v2.3$ (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). $\text{Ca}_v\beta_2\text{a}$ M245A (equivalent to $\text{Ca}_v\beta_3$ M196A) yielded a 200-fold decrease in the affinity for $\text{Ca}_v1.2$ (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) with the K_d increasing from 5 nM to 1.1 μM . Nonetheless, whole-cell currents of $\text{Ca}_v2.3$ obtained in the presence of $\text{Ca}_v\beta_3$ M196A were not significantly different than those obtained with $\text{Ca}_v\beta_3$ WT both in terms of peak current density, voltage-dependence of activation, and inactivation kinetics. In contrast, mutations of Leucine residues at positions 200, 303, 337, and 342 (either individually or in combination) significantly reduced the modulation of $\text{Ca}_v2.3$ function and its cell surface density when compared with $\text{Ca}_v\beta_3$ WT. Remarkably, the affinities measured between the AID peptide of $\text{Ca}_v1.2$ and the $\text{Ca}_v\beta_2$ mutants L352A and L392A (equivalent to $\text{Ca}_v\beta_3$ L303 and L342) were ≈ 20 -fold lower than for $\text{Ca}_v\beta_2$ WT but still 100-fold higher than with $\text{Ca}_v\beta_2$ M245A (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). Our functional screen thus discriminated residues in $\text{Ca}_v\beta_3$ that were initially believed to behave similarly based upon their binding energies.

It remains possible that the binding affinities of the $\text{Ca}_v2.3 + \text{Ca}_v\beta_3$ complex cannot be simply extrapolated from the in vitro binding energies measured with $\text{Ca}_v\beta_2\text{a}$ bound onto the AID peptides from $\text{Ca}_v1.2$ channels (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). A recent study performed with larger peptides (≈ 30 -40 residues) points to important structural differences between the highly conserved I-II linkers of $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v2.2$ (Almagor, Chomsky-Hecht et al. 2012).

With these reservations in mind, our results altogether suggest that nanomolar protein-protein affinity may not be the sole determinant of the modulation of $\text{Ca}_v\alpha_1$ channel function by $\text{Ca}_v\beta$. Given that $\text{Ca}_v2.3$ W386A was not measured at the membrane but that $\text{Ca}_v\beta_3$ M196A sustained surface density of

Ca_v2.3 proteins, it can be concluded that functional modulation occurs in the nano- to micro-molar range. Even with a moderate affinity, “occupancy of the AID site” could be sufficient to carry the Ca_vβ-induced modulation of channel function in HVA Ca_v1 and Ca_v2 channels (Butcher, Leroy et al. 2006). In this scheme, occupancy of the AID site by Ca_vβ could either unmask retention signals for protein targeting or mask ubiquitination sites on the Ca_vα1 subunit and prevents its degradation by the proteasome.

3.6 Conclusion

Mutations of four Leucine residues (L200, L303, L337, and L342) each expected to moderately decrease binding affinity, significantly decreased the cell surface density of Ca_v2.3 protein. Simultaneous mutations of the four Leucine residues completely abolished surface and total protein density of Ca_v2.3. We propose that these four Leucine residues form a hydrophobic pocket that is required to promote van der Waals interactions with W386 and I387 (WI pair) in the AID region of Ca_v2.3. Hence, the four Leucine residues in the GK domain of Ca_vβ3 and the WI pair in the AID of Ca_v2.3 appear to be essential determinants in the modulation of high voltage-activated calcium channel function by Ca_vβ auxiliary subunits.

3.7 Footnotes

We thank Dr Toni Schneider (University of Cologne, Cologne, Germany) for the human Ca_v2.3 clone in the pcDNA3 vector; M. Serge Sénéchal and Dr Jacques Thibodeau (Dept of Microbiology and Immunology, Université de Montréal) for their help with the fluorescence-activated cell sorting experiments and analysis; M. Guillaume Roussel for preliminary experiments; Ms Julie Verner for cell culture; M. Michel Brunette for expert technical assistance, and M. Claude Gauthier for artwork. This work was completed with grant MOP13390 from the Canadian Institutes of Health Research and a grant from the Canadian Heart and Stroke Foundation to L. P.

3.8 Figures

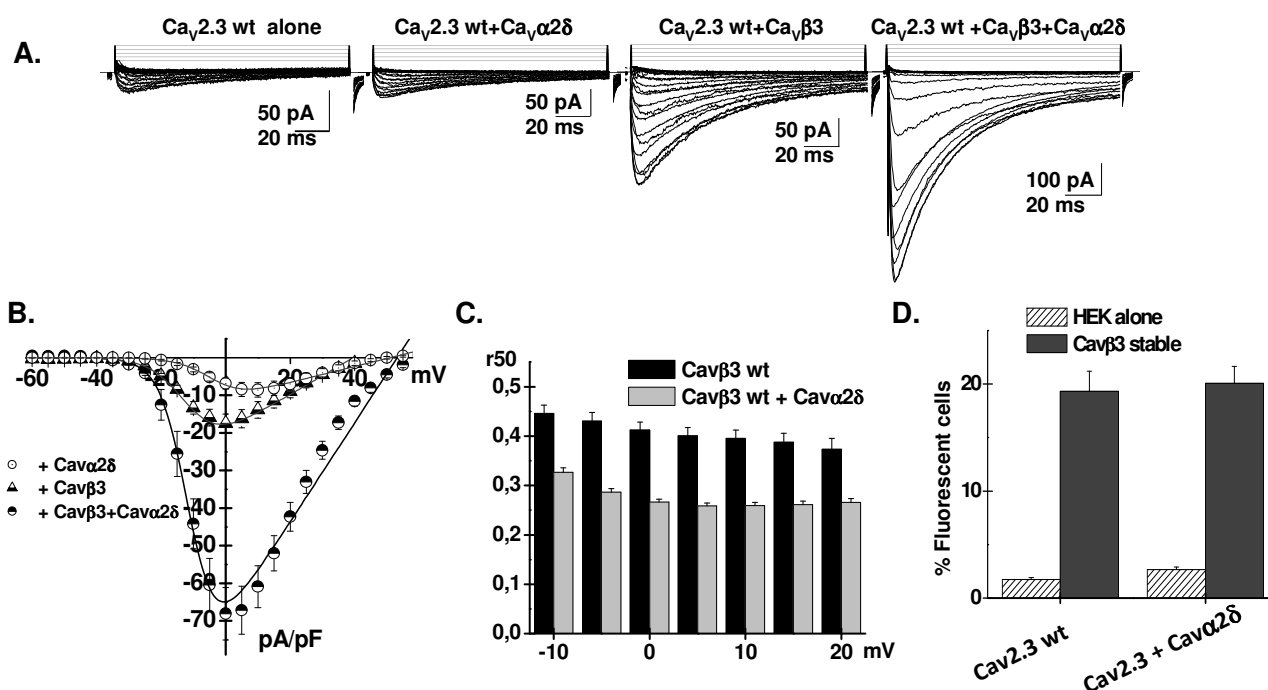


FIGURE- 1 : $Ca_V\beta3$ stimulated whole-cell currents and cell surface density of $Ca_V2.3$.

A. Whole-cell current traces recorded after the transient expression of the $Ca_V2.3$ WT channel in HEKT cells. Charge carrier was $2 \text{ mM } Ca^{2+}$. From left to right: $Ca_V2.3$ WT alone, $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\alpha2\delta$, $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\beta3$, and $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\beta3$ + $Ca_V\alpha2\delta$. A series of 150-ms voltage pulses were applied between -80 mV and $+60 \text{ mV}$ (5-mV steps) from a holding potential of -100 mV .

B. Peak current densities are plotted as a function of applied voltage. Channels $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\beta3 \pm Ca_V\alpha2\delta$ showed a typical voltage-dependent activation with a mean current density of $-6 \pm 1 \text{ pA/pF}$ ($n = 18$) for $Ca_V2.3$ WT alone as compared with a current density of $-18 \pm 2 \text{ pA/pF}$ ($n = 49$) obtained after transient overexpression of $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\beta3$. Overexpression of $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\beta3$ + $Ca_V\alpha2\delta$ increased the mean current density to $-65 \pm 5 \text{ pA/pF}$ ($n = 95$). $Ca_V\beta3$ hyperpolarized the activation potential of $Ca_V2.3$ from $E_{0.5, act} = -5 \pm 1 \text{ mV}$ ($n = 18$) for $Ca_V2.3$ alone to $E_{0.5, act} = -10.7 \pm 0.3 \text{ mV}$ ($n=49$) for $Ca_V2.3$ + $Ca_V\beta3$ channels. Numerical values can be found in Table I.

C. The r_{50} values (the fraction of peak whole-cell currents remaining after a 50 ms pulse) are shown \pm S.E.M. from -10 to $+20 \text{ mV}$ for $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\beta3$ and $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\beta3$ + $Ca_V\alpha2\delta$ (from left to right on the bar graph). The r_{50} values of $Ca_V2.3$ WT + $Ca_V\beta3 \pm Ca_V\alpha2\delta$ were significantly different at $p < 0.0001$ at all voltages.

D. HA-tagged $Ca_V2.3$ WT was expressed transiently either in the HEKT cell line or in the stable $Ca_V\beta3$ cell line. Cell surface expression of HA- $Ca_V2.3$ WT was determined in intact cells by flow cytometry using the anti-HA FITC conjugate antibody. The histogram

shows the number of fluorescent cells as a function of the experimental conditions. Cell autofluorescence (HEKT no Ab) was < 1% throughout and the addition of the FITC did not significantly increase the level of fluorescence in HEKT cells (not shown). As seen, only co-expression with $\text{Ca}_V\beta 3$ significantly promoted membrane expression of $\text{Ca}_V 2.3$ ($p < 0.001$). Co-expression of $\text{Ca}_V 2.3$ with $\text{Ca}_V\alpha 2\delta$ -1 did not alter the number of $\text{Ca}_V 2.3$ at the membrane as compared to control conditions ($p > 0.1$). Co-expression with both auxiliary subunits did not further improve the membrane expression of $\text{Ca}_V 2.3$ as compared with the $\text{Ca}_V 2.3$ + $\text{Ca}_V\beta 3$ condition. Numerical values can be found in Tables I, 2, and 3.

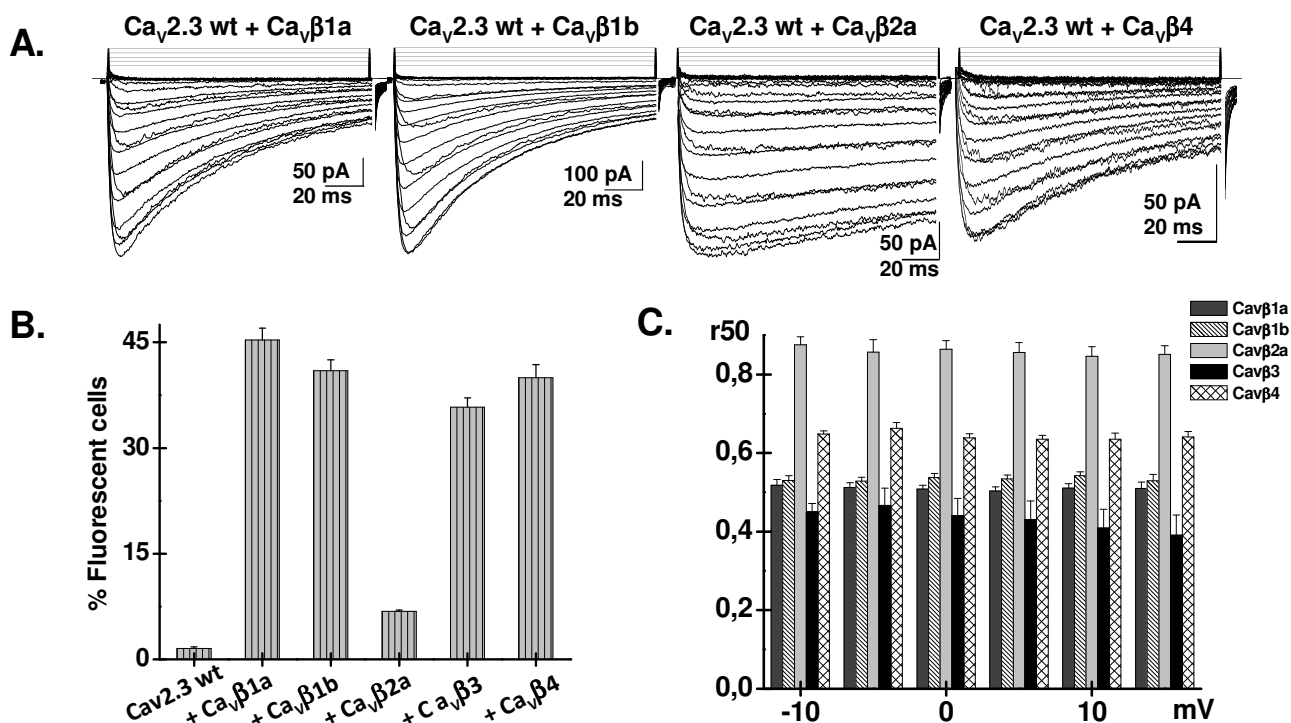


FIGURE- 2 : $\text{Ca}_V\beta$ isoforms stimulated whole-cell currents and cell surface density of $\text{Ca}_V 2.3$.

A. $\text{Ca}_V 2.3$ WT was expressed transiently in the presence of $\text{Ca}_V\beta$ isoforms. Whole-cell current traces recorded after the transient expression of the $\text{Ca}_V 2.3$ WT channel in the presence of $\text{Ca}_V\beta 1a$, $\text{Ca}_V\beta 1b$, $\text{Ca}_V\beta 2a$, and $\text{Ca}_V\beta 4$ isoforms in HEKT cells. Charge carrier was 2 mM Ca^{2+} . $\text{Ca}_V\alpha 2\delta$ was omitted. **B.** Cell surface expression of HA- $\text{Ca}_V 2.3$ WT was determined in intact cells by flow cytometry using the anti-HA FITC conjugate antibody. The histogram shows the number of fluorescent cells as a function of the $\text{Ca}_V\beta$ isoforms. **C.** The r_{50} values indicate that inactivation kinetics were significantly slower for $\text{Ca}_V 2.3$ + $\text{Ca}_V\beta 2a$. Numerical values are shown in Tables I, 2, 3.

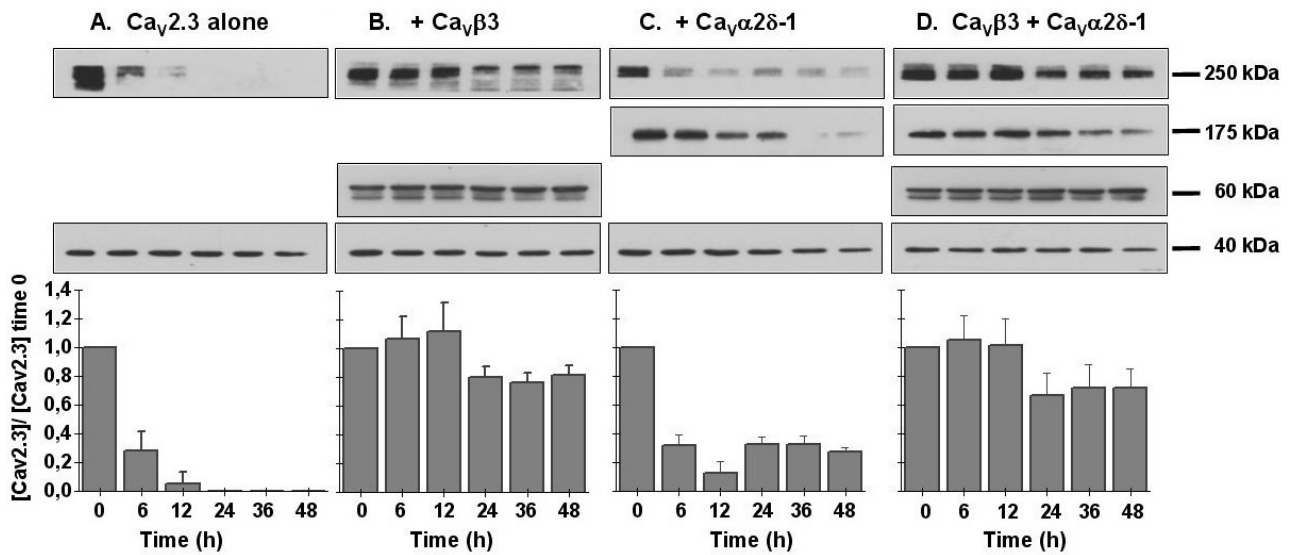


FIGURE- 3 : Cav α 2 δ -1 mildly improves half-life of Cav2.3 upon arrest of cellular protein synthesis.

HEKT cells were transiently transfected simultaneously with the indicated constructions. Exactly 24 h after transfection, subconfluent cells were incubated with cycloheximide (100 μ g/ml) for up to 48 h, to block *de novo* protein synthesis. At the indicated time points (0 h or no cycloheximide, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h), cell lysates were prepared and fractionated by SDS-PAGE (10 %), followed by immunoblotting to visualize Cav_v2.3 (Alomone, 1:250), Cav_vβ3 (Invitrogen, 1:1000), Cav_vα2 δ -1 (Alomone, 1:250) and GAPDH (Sigma, 1:10000). The protein density of Cav_v2.3 in total membrane lysates was expressed relative to GAPDH and normalized to the protein density measured at time 0. The transient increase in Cav_v2.3 protein density measured at 6 h and 12 h in the presence of Cav_vβ3 was not statistically significant ($p > 0.01$). As seen, Cav_vβ3 was more effective than Cav_vα2 δ -1 in preventing the degradation of Cav_v2.3 but Cav_vα2 δ -1 increased the lifetime of Cav_v2.3 as compared to the same protein expressed alone. The histograms were produced using values obtained from 2 different series of experiments and estimated with Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). **A.** HA-Cav_v2.3 with the mock vector. **B.** HA-Cav_v2.3 with Cav_vβ3. **C.** HA-Cav_v2.3 with Cav_vα2 δ -1. **D.** HA-Cav_v2.3 with Cav_vβ3 and Cav_vα2 δ -1. Molecular mass of Cav_v2.3 is 250 kDa; Cav_vα2 δ -1 is 175 kDa; Cav_vβ3 is 60 kDa; and GAPDH is 40 kDa.

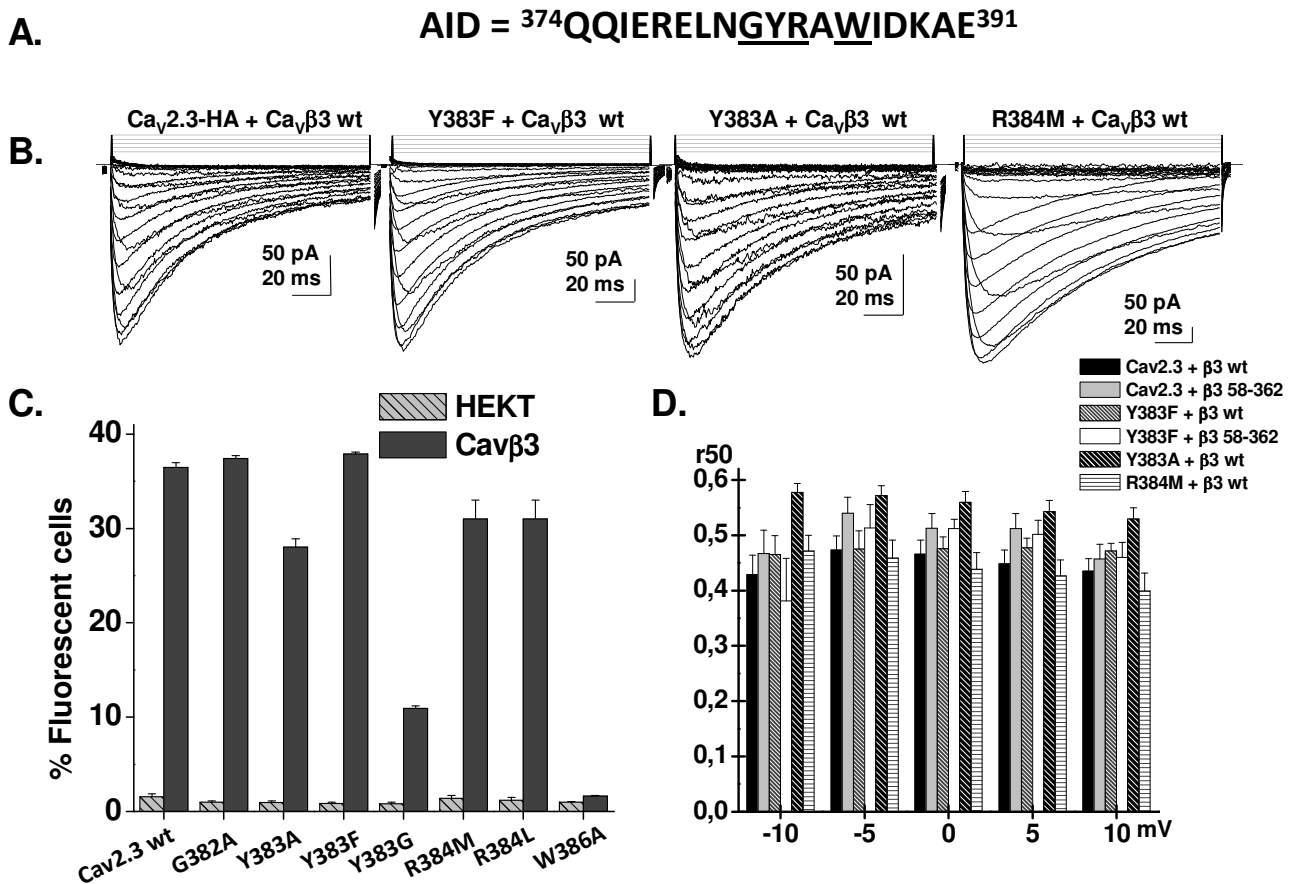


FIGURE- 4 : Single point mutants W386A and Y383G are found to disrupt plasma membrane targeting.

A. Primary sequence of the AID locus in the I-II linker of $\text{Ca}_v2.3$. The residues that were mutated are underlined. **B.** HA-tagged $\text{Ca}_v2.3$ WT and mutants were expressed transiently with $\text{Ca}_v\beta3$ WT + $\text{Ca}_v\alpha2\delta-1$. Whole-cell currents were recorded in a 2 mM Ca^{2+} solution. From left to right, typical whole cell current traces obtained for HA- $\text{Ca}_v2.3$ WT, HA- $\text{Ca}_v2.3$ Y383F, HA- $\text{Ca}_v2.3$ Y383A and HA- $\text{Ca}_v2.3$ R384M. **C.** HA-tagged $\text{Ca}_v2.3$ was expressed transiently in the HEKT cell line (hatched bars) or in the stable $\text{Ca}_v\beta3$ cell line (dark gray bars). Cell surface expression of $\text{Ca}_v2.3$ WT and mutants was determined in intact cells by flow cytometry using the anti-HA FITC conjugate antibody. The pattern of cell surface expression decreased in that order HA- $\text{Ca}_v2.3$ WT \approx G382A \approx Y383F $>$ R384M \approx R384L \approx Y383A $>$ Y383G \gg W386A for the transiently overexpressed $\text{Ca}_v\beta3$. **D.** The r50 values for $\text{Ca}_v2.3$ mutants expressed with $\text{Ca}_v\beta3$ WT and alternatively the $\text{Ca}_v\beta3$ fragment 58-362 (SH3-HOOK-GK). The r50 values measured for the channel combinations displayed in panel B were not significantly different between 0 and +10 mV ($p > 0.05$).

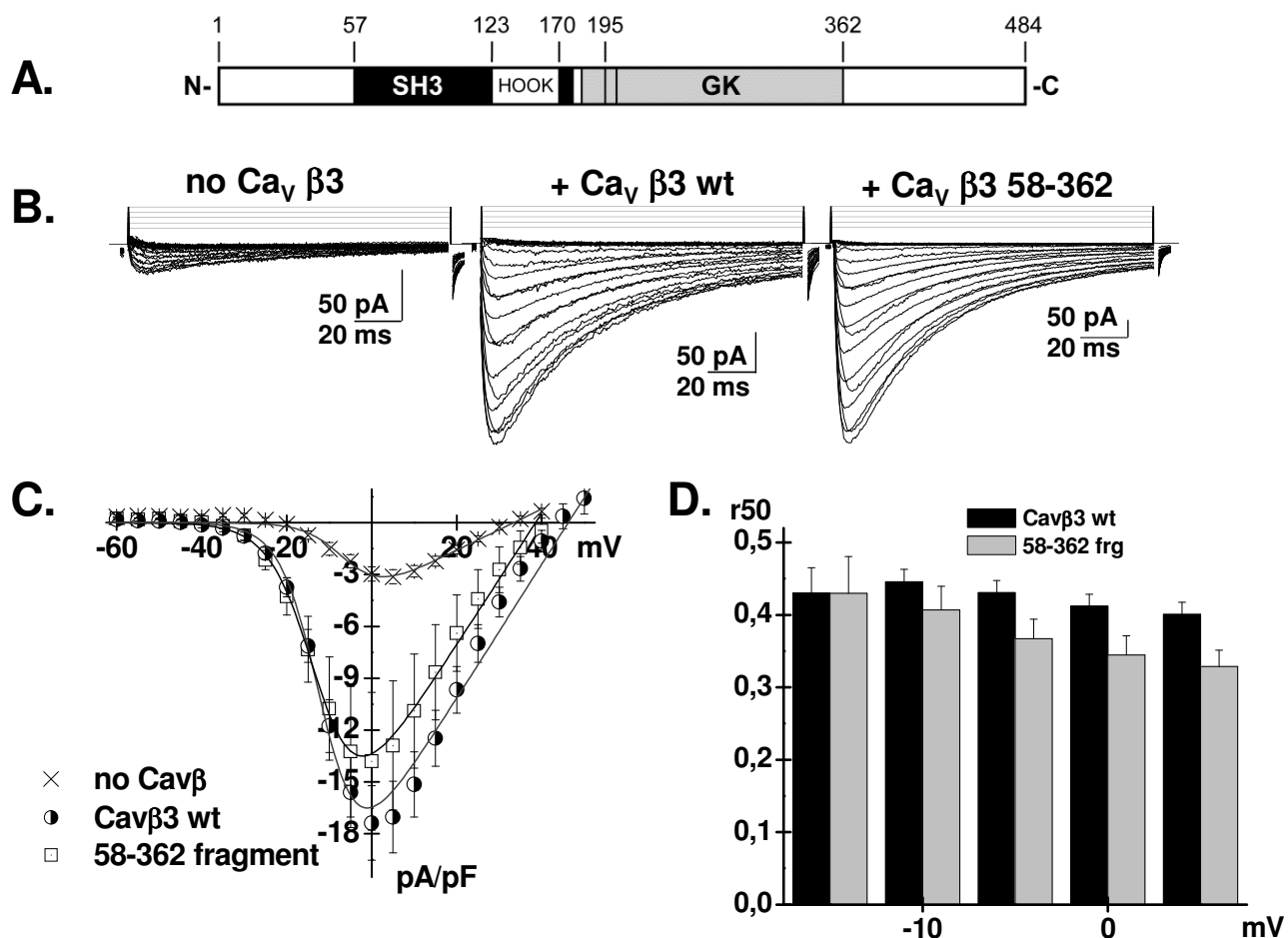


FIGURE- 5 : C-terminal of Cav β 3 does not contribute significantly to functional modulation of Cav α 2.3.

A. Schematic diagram of the domain organization of the Cav β 3 subunit based on the crystal structure adapted from (Chen, Li et al. 2004) and used in (Bourdin, Marger et al. 2010). **B.** Typical whole cell current traces were obtained for Cav α 2.3 WT in the presence of a 2 mM Ca $^{2+}$ solution. Cav α 2 δ -1 was omitted. From left to right: no Cav β 3, Cav β 3 WT, Cav β 3 fragment 58-362. **C.** Peak current densities are plotted as a function of applied voltage. Cav α 2.3 WT + Cav β 3 WT and Cav α 2.3 WT + Cav β 3 58-362 showed a similar typical voltage-dependent activation with a > 5-fold increase in peak current densities as compared with Cav α 2.3 WT in the absence of Cav β 3. Numerical values are shown in Table I. **D.** The r50 values are shown \pm S.E.M. from -15 to +5 mV for Cav α 2.3 WT + Cav β 3 and Cav α 2.3 WT + Cav β 3 58-362 (from left to right on the bar graph). The r50 values of Cav α 2.3 WT + Cav β 3 and Cav α 2.3 WT + Cav β 3 58-362 were significantly not different at $p > 0.01$ at all voltages.

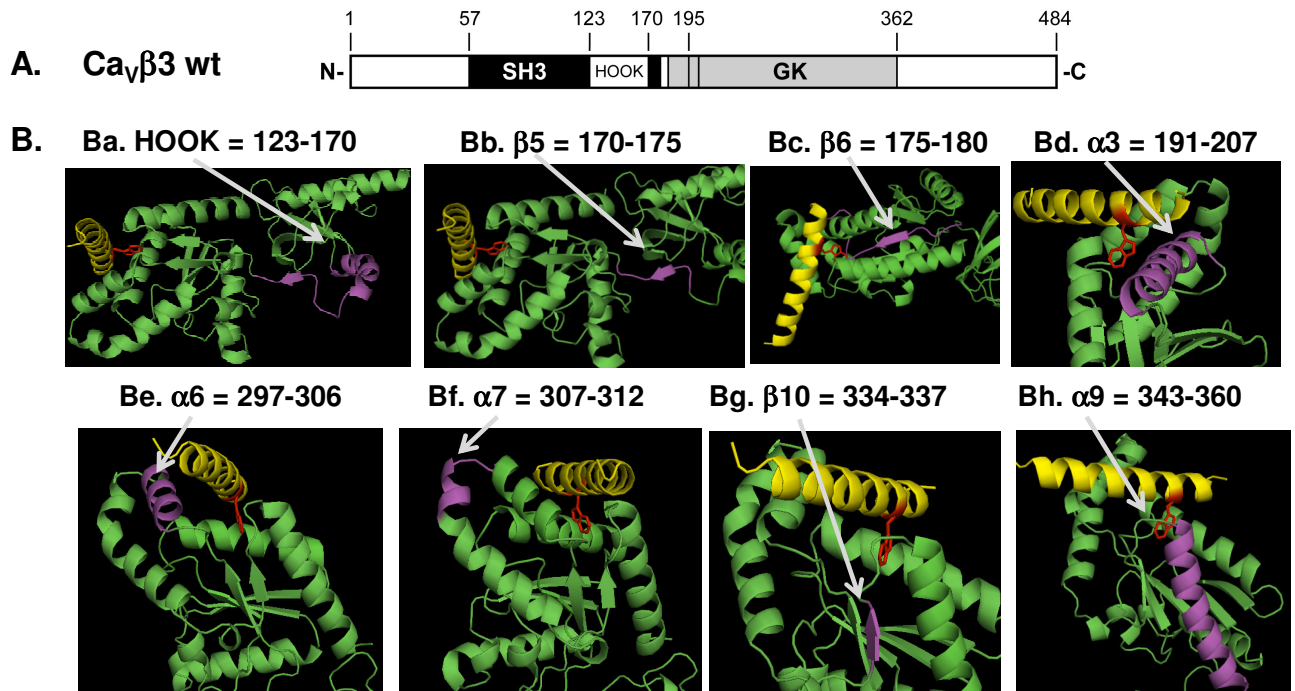


FIGURE- 6 : Homology model of AID from $\text{Ca}_v2.3$ in complex with $\text{Ca}_v\beta 3$.

A. Schematic diagram of the domain organization of the $\text{Ca}_v\beta 3$ subunit based on the crystal structure adapted from (Chen, Li et al. 2004) and used in (Bourdin, Marger et al. 2010). **B.** Homology model of AID from $\text{Ca}_v2.3$ in complex with $\text{Ca}_v\beta 3$ highlighting structural regions in $\text{Ca}_v\beta 3$ and the number of amino acids marking the boundaries of the regions herein studied. The AID from $\text{Ca}_v2.3$ is shown as a yellow helix with the side-chain of W386 protruding in red. In each panel, the region of interest is shown in violet. **Ba.** $\text{Ca}_v\beta 3$ HOOK (123-170). **Bb.** $\text{Ca}_v\beta 3$ $\beta 5$ sheet (170-175). **Bc.** $\text{Ca}_v\beta 3$ $\beta 6$ sheet (175-180). **Bd.** $\text{Ca}_v\beta 3$ $\alpha 3$ helix (191-207). **Be.** $\text{Ca}_v\beta 3$ $\alpha 6$ helix (297-306). **Bf.** $\text{Ca}_v\beta 3$ $\alpha 7$ helix (307-312). **Bg.** $\text{Ca}_v\beta 3$ $\beta 10$ sheet (334-337). **Bh.** $\text{Ca}_v\beta 3$ $\alpha 9$ helix (343-360). The figure was produced using PyMol (DeLano Scientific).

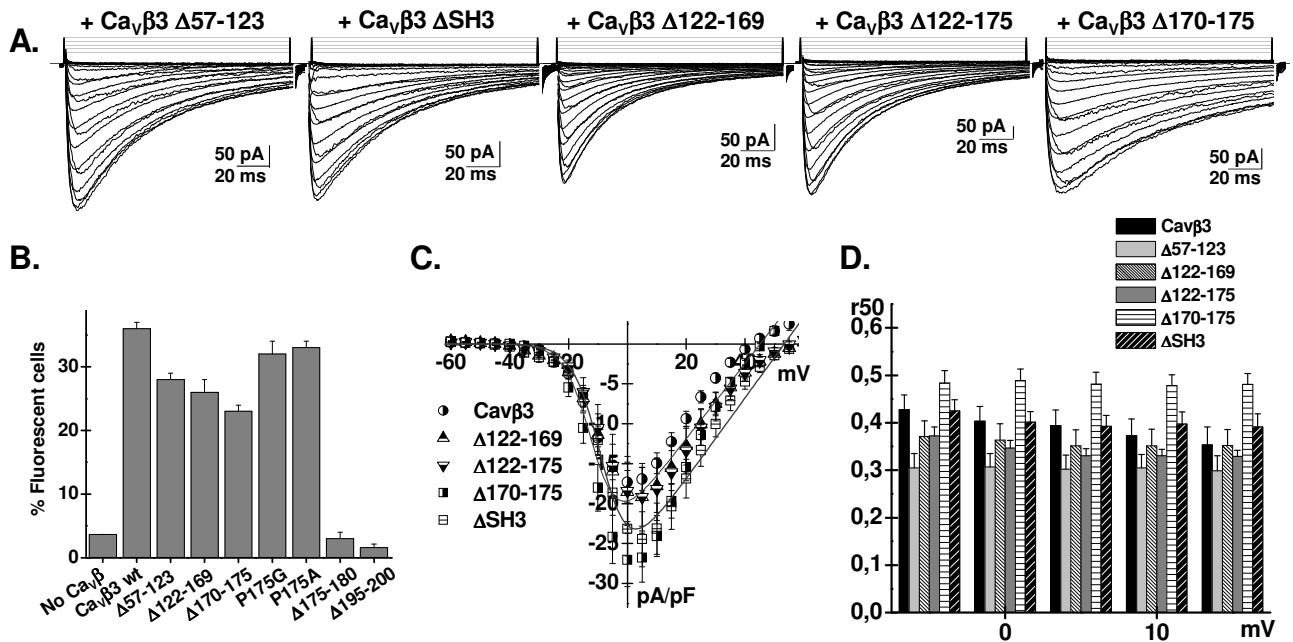


FIGURE- 7 : Dissection of the SH3-HOOK-GK fragment along structural boundaries.

A. Typical whole cell current traces were recorded in a 2 mM Ca^{2+} solution for $\text{Ca}_V2.3$ WT in the presence of $\text{Ca}_V\beta3$ deleted mutants. $\text{Ca}_V\alpha2\delta$ was omitted. From left to right: $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta57-123$ (ΔNSH3), $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta57-123$ $\Delta170-175$ (ΔSH3), $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta122-169$ (ΔHOOK), $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta122-175$ ($\Delta\text{HOOK} + \Delta\beta5$ sheet), and $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta170-175$ ($\Delta\beta5$ sheet). **B.** Cell surface density of HA-tagged $\text{Ca}_V2.3$ WT + $\text{Ca}_V\beta3$ WT or mutants was estimated by a flow cytometry assay using the anti-HA FITC conjugate antibody. Co-expression with $\text{Ca}_V\beta3$ deleted mutants $\Delta57-123$, $\Delta122-169$, and $\Delta170-175$ as well as point mutations P175G and P175A in the $\beta5$ sheet of $\text{Ca}_V\beta3$ promoted the cell surface expression of $\text{Ca}_V2.3$ to > 70-90% of the level obtained with $\text{Ca}_V\beta3$ WT. In contrast, there was no significant increase in the surface expression with $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta175-180$ and $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta195-200$ as compared with $\text{Ca}_V2.3$ in the absence of $\text{Ca}_V\beta3$ (see Table IV). **C.** Mean peak current densities as a function of voltage are shown for $\text{Ca}_V2.3$ with either $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta57-123$ $\Delta170-175$ (ΔSH3), $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta122-169$ (ΔHOOK), $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta122-175$ ($\Delta\text{HOOK} + \Delta\beta5$ sheet), or $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta170-175$ ($\Delta\beta5$ sheet). $\text{Ca}_V\beta3$ deleted constructs successfully increased peak current densities without any significant change in the activation potential as compared with $\text{Ca}_V2.3$ WT + $\text{Ca}_V\beta3$ WT. **D.** The r_{50} values are shown \pm S.E.M. from -5 to +15 mV for $\text{Ca}_V2.3$ WT + $\text{Ca}_V\beta3$ WT and $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta57-123$, $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta122-169$, $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta122-175$, $\text{Ca}_V\beta3$ $\Delta170-175$, and $\text{Ca}_V\beta3$ ΔSH3 ($\Delta57-123$ $\Delta170-175$). Inactivation kinetics were significantly slower for the $\Delta170-175$ ($p < 0.0001$) at all voltages as compared with $\text{Ca}_V2.3$ WT + $\text{Ca}_V\beta3$ WT. Numerical values are shown in Table I.

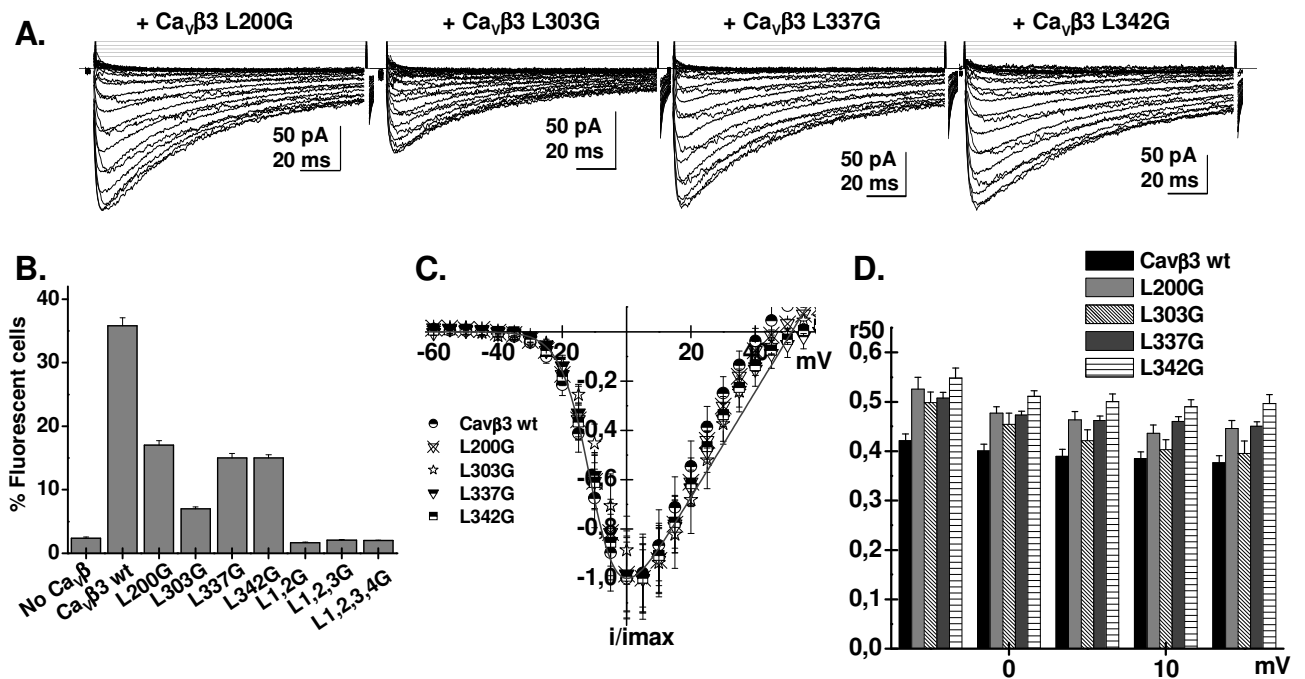


FIGURE- 8 : Mutations of Leucine residues in the GK domain decrease plasma membrane targeting.

A. Typical whole cell current traces were recorded in a 2 mM Ca^{2+} solution for $\text{Ca}_v2.3$ WT in the presence of the $\text{Ca}_v\beta3$ mutants. $\text{Ca}_v\alpha2\delta-1$ was omitted. From left to right: $\text{Ca}_v\beta3$ L200G, $\text{Ca}_v\beta3$ L303G, $\text{Ca}_v\beta3$ L337G, and $\text{Ca}_v\beta3$ L342G. **B.** HA-tagged $\text{Ca}_v2.3$ was expressed transiently in the HEKT cell line with $\text{Ca}_v\beta3$ mutants. Cell surface expression was determined in intact cells by flow cytometry. $\text{Ca}_v\beta3$ mutants L200G (L1), L303G (L2), L337G (L3), and L342G (L4) curtailed membrane protein expression by 50-60%. Multiple mutations L200G/L303G (L1,2G), L200G/L303G/L337G (L1,2,3G), and L200G/L303G/L337G/L342G (L1,2,3,4G) abolished the $\text{Ca}_v\beta$ stimulation of cell surface density (see Table IV). **C.** Normalized peak current densities are plotted as a function of applied voltage. All $\text{Ca}_v\beta3$ mutants produced $\text{Ca}_v2.3$ currents with similar voltage-dependent activation (see Table I). **D.** The r_{50} values are shown \pm S.E.M. from -10 to +20 mV for $\text{Ca}_v2.3$ WT in the presence of $\text{Ca}_v\beta3$ WT, $\text{Ca}_v\beta3$ L200G, $\text{Ca}_v\beta3$ L303G, $\text{Ca}_v\beta3$ L337G, and $\text{Ca}_v\beta3$ L342G (from left to right on the bar graph). Inactivation kinetics were significantly slower for $\text{Ca}_v\beta3$ L342G at all voltages ($p < 0.01$).

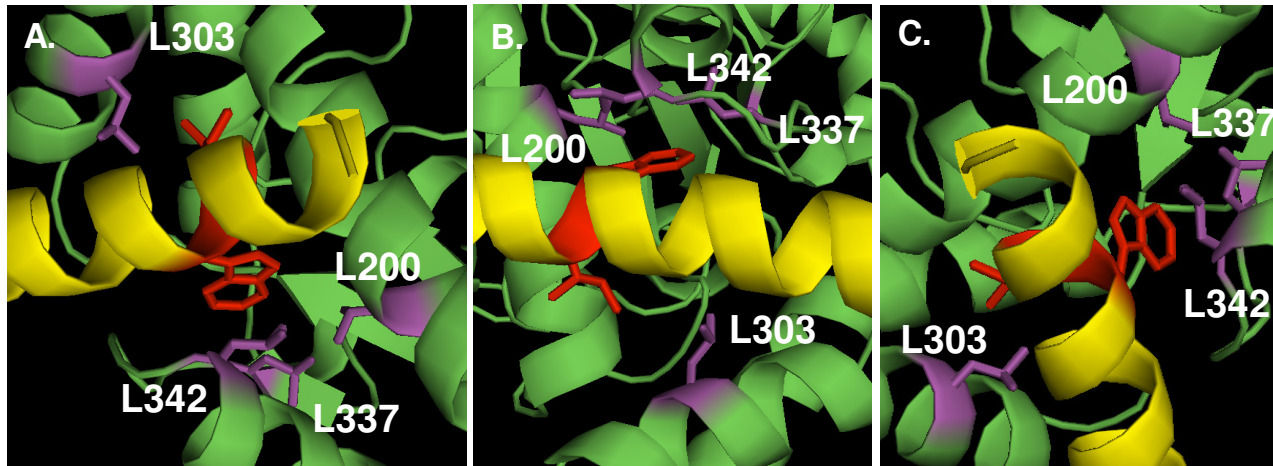


FIGURE- 9 : Homology model of AID from $\text{Ca}_v2.3$ in complex with $\text{Ca}_v\beta3$ highlighting the quartet of leucine residues in $\text{Ca}_v\beta3$ surrounding the AID helix in three different orientations.

Homology model of the 18-residue long AID region from $\text{Ca}_v2.3$ in complex with $\text{Ca}_v\beta3$. The quartet of leucine residues in $\text{Ca}_v\beta3$ surrounding the AID helix is shown in three different orientations. The $\text{Ca}_v\beta3$ subunit is in green and the AID helix is shown in yellow with the protruding side chains of $\text{Ca}_v2.3$ W386 and I387 shown in red and the side-chains of the four leucine residues displayed in violet. **A.** With the AID region shown horizontally and $\text{Ca}_v2.3$ W386A facing down. **B.** With the AID region shown horizontally and $\text{Ca}_v2.3$ W386A facing up. **C.** With the AID region shown vertically.

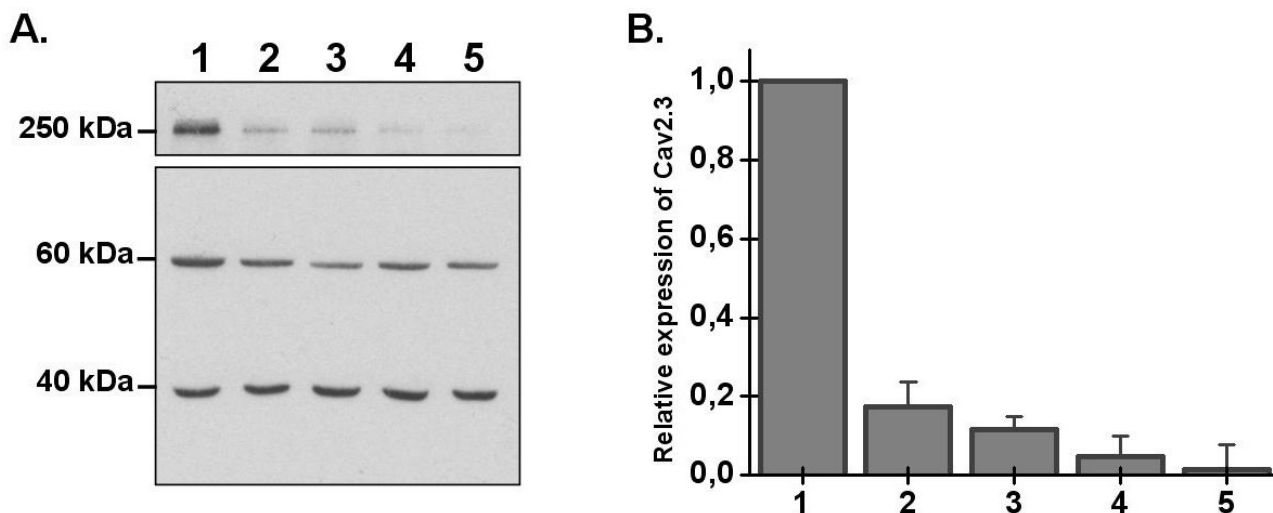


FIGURE- 10 : Ca_v2.3 protein density decreased with Ca_vβ3 Leu mutants.

A. Representative western blot analyses of HEKT cells transiently co-transfected with pCDNA3-Ca_v2.3-HA and pCMV-Tag5-Ca_vβ3 WT and mutants using anti-Ca_v2.3 (Alomone, 1:500), anti-Ca_vβ3 (Invitrogen, 1:10 000), and anti-GAPDH (Sigma, 1:10000) antibodies. Each lane was loaded with 20 μg of protein. Lane 1: Ca_v2.3-HA + Ca_vβ3 WT. Lane 2: Ca_v2.3-HA + Ca_vβ3 L303G. Lane 3 : Ca_v2.3-HA + Ca_vβ3 L200G/ L303G. Lane 4: Ca_v2.3-HA + Ca_vβ3 L200G/ L303G/ L337G. Lane 5: Ca_v2.3-HA + Ca_vβ3 L200G/ L303G/ L337G/ L342G. **B.** Protein density of Ca_v2.3 was normalized using GAPDH as an internal loading control and estimated using Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Maximum density was obtained for Ca_v2.3 and Ca_vβ3. The histogram was produced using values obtained from 2 different gels.

3.9 Tables

TABLE I : Biophysical properties of $\text{Ca}_v2.3$ channels in the absence of $\text{Ca}_v\alpha2\delta-1$

$\text{Ca}_v2.3$ WT in HEKT cells With 2 mM Ca^{2+} no $\text{Ca}_v\alpha2\delta-1$	Electrophysiological Properties			
	$E_{0.5,act}$ (mV)	ΔG_{act} (kcal mol⁻¹)	Peak density (pA/pF)	r50 at +10 mV
No auxiliary subunit	-5 ± 1 (18)	-0.6 ± 0.1 (18)	-6 ± 1 (18)	N.D.
+ $\text{Ca}_v\beta3$	-10.7 ± 0.3 (49)	-1.32 ± 0.05 (49)	-18 ± 2 (49)	0.38 ± 0.01 (49)
+ $\text{Ca}_v\beta1a$	-10.5 ± 0.5 (6)	-1.2 ± 0.1 (6)	-35 ± 4 (6)	0.51 ± 0.01 (6)
+ $\text{Ca}_v\beta1b$	-12.2 ± 0.6 (12)	-1.6 ± 0.2 (12)	-68 ± 14 (12)	0.54 ± 0.01 (12)
+ $\text{Ca}_v\beta2a$	-11.4 ± 0.6 (6)	-1.3 ± 0.1 (6)	-33 ± 4 (6)	0.85 ± 0.02 (6)
+ $\text{Ca}_v\beta4$	-12.1 ± 0.6 (7)	-1.5 ± 0.1 (7)	-21 ± 2 (7)	0.64 ± 0.02 (7)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ M196A	-7.9 ± 0.3 (22)	-0.90 ± 0.04 (22)	-14 ± 1 (22)	0.43 ± 0.01 (22)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ M195A	-12 ± 1 (9)	-1.5 ± 0.1 (9)	-24 ± 5 (9)	0.53 ± 0.01 (9)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ K198A	-11.6 ± 0.6 (10)	-1.4 ± 0.1 (10)	-13 ± 2 (10)	0.30 ± 0.01 (10)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ L200G	-9.8 ± 0.6 (7)	-1.16 ± 0.08 (7)	-18 ± 2 (7)	0.44 ± 0.02 (7)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ L303G	-7.2 ± 0.5 (7)	-0.82 ± 0.06 (7)	-17 ± 2 (7)	0.40 ± 0.02 (7)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ L337G	-9.3 ± 0.5 (8)	-1.2 ± 0.1 (8)	-19 ± 6 (8)	0.46 ± 0.01 (8)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ L342G	-10.1 ± 0.5 (8)	-1.27 ± 0.07 (8)	-15 ± 3 (8)	0.49 ± 0.01 (8)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ L200G/ L303G	-7.8 ± 0.6 (10)	-1.0 ± 0.1 (10)	-9 ± 1 (10)	0.40 ± 0.03 (10)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ L200G/ L303G/ L337G	-7.9 ± 0.5 (12)	-1.0 ± 0.1 (12)	-6.2 ± 0.8 (12)	0.48 ± 0.03 (12)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ L200G/ L303G/ L337G/ L342G	-9.1 ± 0.7 (11)	-1.1 ± 0.1 (11)	-5.7 ± 0.5 (11)	0.45 ± 0.02 (11)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ R307G	-15 ± 1 (10)	-2.0 ± 0.1 (10)	-66 ± 11 (10)	0.53 ± 0.01 (10)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ Δ57-123	-10 ± 1 (12)	-1.2 ± 0.1 (12)	-38 ± 9 (12)	0.36 ± 0.03 (12)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ Δ57-180	-9 ± 1 (6)	-1.0 ± 0.1 (6)	-7 ± 1 (6)	0.37 ± 0.06 (6)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ Δ170-175 (ΔPYDVVP)	-10 ± 1 (14)	-1.1 ± 0.1 (14)	-22 ± 6 (14)	0.48 ± 0.02 (14)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ Δ57-123 Δ170-175 (ΔSH3)	-8 ± 1 (12)	-0.9 ± 0.1 (12)	-24 ± 3 (12)	0.40 ± 0.03 (12)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ Δ175-180	-7.7 ± 0.5 (12)	-1.0 ± 0.1 (12)	-7.1 ± 0.8 (12)	0.42 ± 0.04 (12)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ Δ122-169	-9.5 ± 0.5 (11)	-0.95 ± 0.07 (11)	-19 ± 3 (11)	0.35 ± 0.03 (11)
+ $\text{Ca}_v\beta3$ Δ122-175	-7.6 ± 0.5 (11)	-0.85 ± 0.07 (11)	-19 ± 4 (11)	0.33 ± 0.01 (11)

+ Ca_vβ3 58-362	-13 ± 1 (10)	-1.4 ± 0.1 (10)	-13 ± 4 (10)	0.31 ± 0.03 (10)
+ Ca_vβ3 Δ180-364	-8.6 ± 0.5 (9)	-1.1 ± 0.1 (9)	-7 ± 1 (9)	0.42 ± 0.05 (9)
HA-Ca_v2.3 WT + Ca_vβ3 WT	-12 ± 1 (5)	-1.3 ± 0.1 (5)	-14 ± 2 (5)	0.46 ± 0.03 (9)
HA-Y383F + Ca_vβ3 WT	-9 ± 1 (9)	-1.0 ± 0.1 (9)	-21 ± 4 (9)	0.47 ± 0.01 (9)
HA-Y383A + Ca_vβ3 WT	-7.8 ± 0.3 (11)	-0.75 ± 0.05 (11)	-9 ± 1 (11)	0.53 ± 0.02 (11)
HA-R384L + Ca_vβ3 WT	-12 ± 1 (5)	-1.7 ± 0.2 (4)	-13 ± 2 (4)	0.36 ± 0.03 (5)
HA-R384M + Ca_vβ3 WT	-16 ± 2 (5)	-1.4 ± 0.1 (5)	-22 ± 2 (5)	0.41 ± 0.04 (5)

TABLE I. Ca_v2.3 wild-type or HA-Ca_v2.3 channels were expressed in HEKT cells with Ca_vβ3 WT or constructs. Biophysical parameters were measured in the presence of a physiological saline containing 2 mM Ca²⁺ as described elsewhere (Bourdin, Marger et al. 2010). Ca_vα2δ-1 was omitted. Activation properties (E_{0.5,act} and ΔGact) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation. The data are shown with the mean ± S.E.M. of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses.

TABLE II : Biophysical properties of Ca_v2.3 channels in the presence of Ca_vα2δ-1

Ca _v 2.3 in HEKT cells 2 mM Ca ²⁺	Electrophysiological Properties			
	E _{0.5,act} (mV)	ΔG act (kcal mol ⁻¹)	Peak I _{Ca} density (pA/pF)	r50 at +10 mV
+ Ca _v α2δ-1	-4.0 ± 0.7 (10)	-0.44 ± 0.07 (10)	-12 ± 2 (10)	0.43 ± 0.02 (9)
+ Ca _v β3 WT + Ca _v α2δ-1	-9.1 ± 0.2 (95)	-1.3 ± 0.1 (95)	-65 ± 5 (95)	0.25 ± 0.01 (95)
+ Ca _v β3 P175A + Ca _v α2δ-1	-9.5 ± 0.9 (8)	-1.6 ± 0.3 (8)	-82 ± 21 (8)	0.30 ± 0.01 (8)
+ Ca _v β3 M196A + Ca _v α2δ-1	-8.6 ± 0.8 (9)	-1.1 ± 0.1 (9)	-41 ± 9 (9)	0.39 ± 0.02 (9)
+ Ca _v β3 M195A + Ca _v α2δ-1	-10 ± 1 (8)	-1.6 ± 0.3 (8)	-157 ± 25 (8)	0.41 ± 0.01 (8)
+ Ca _v β3 K198A + Ca _v α2δ-1	-7.7 ± 0.2 (9)	-0.97 ± 0.04 (9)	-56 ± 9 (9)	0.26 ± 0.01 (9)
+ Ca _v β3 L200G + Ca _v α2δ-1	-8.6 ± 0.5 (11)	-1.02 ± 0.07 (11)	-43 ± 6 (11)	0.29 ± 0.02 (11)
+ Ca _v β3 S295A + Ca _v α2δ-1	-8.1 ± 0.5 (10)	-1.6 ± 0.3 (10)	-71 ± 12 (10)	0.33 ± 0.01 (10)
+ Ca _v β3 R302G + Ca _v α2δ-1	-8.1 ± 0.3 (11)	-1.1 ± 0.1 (11)	-67 ± 11 (11)	0.36 ± 0.01 (11)
+ Ca _v β3 L303G + Ca _v α2δ-1	-5.3 ± 0.5 (8)	-0.60 ± 0.06 (8)	-47 ± 10 (8)	0.34 ± 0.03 (8)
+ Ca _v β3 R307G + Ca _v α2δ-1	-10.6 ± 0.6 (9)	-1.5 ± 0.1 (9)	-128 ± 20 (9)	0.44 ± 0.01 (9)
+ Ca _v β3 R307A + Ca _v α2δ-1	-13 ± 1 (10)	-1.7 ± 0.2 (10)	-98 ± 21 (10)	0.40 ± 0.02 (10)
+ Ca _v β3 R307K + Ca _v α2δ-1	-12.1 ± 0.7 (10)	-1.7 ± 0.2 (10)	-130 ± 28 (10)	0.38 ± 0.01 (10)
+ Ca _v β3 L337G + Ca _v α2δ-1	-6.5 ± 0.6 (8)	-0.80 ± 0.09 (8)	-82 ± 10 (8)	0.33 ± 0.02 (8)
+ Ca _v β3 E339G + Ca _v α2δ-1	-6.3 ± 0.6 (10)	-0.78 ± 0.08 (10)	-67 ± 12 (10)	0.43 ± 0.01 (10)
+ Ca _v β3 L342G + Ca _v α2δ-1	-7.2 ± 0.4 (8)	-0.90 ± 0.07 (8)	-78 ± 19 (8)	0.39 ± 0.01 (8)
+ Ca _v β3 L200G/ L303G + Ca _v α2δ-1	-7.1 ± 0.7 (11)	-0.9 ± 0.1 (11)	-10 ± 2 (11)	0.34 ± 0.04 (11)
+ Ca _v β3 L200G/ L303G/ L337G + Ca _v α2δ-1	-6.6 ± 0.7 (11)	-0.81 ± 0.09 (11)	-10 ± 2 (11)	0.41 ± 0.03 (11)
+ Ca _v β3 L200G/ L303G/ L337G/ L342G + Ca _v α2δ-1	-8.2 ± 0.5 (12)	-0.94 ± 0.07 (12)	-9 ± 1 (12)	0.37 ± 0.04 (12)
+ Ca _v β3 Δ57-123 (ΔNSH3) + Ca _v α2δ-1	-8.4 ± 0.5 (9)	-1.1 ± 0.1 (9)	-117 ± 16 (9)	0.24 ± 0.01 (9)
+ Ca _v β3 Δ57-180 + Ca _v α2δ-1	-5.3 ± 0.7 (9)	-0.6 ± 0.1 (9)	-9 ± 1 (9)	0.43 ± 0.03 (9)
+ Ca _v β3 Δ122-169 + Ca _v α2δ-1	-5 ± 1 (9)	-0.6 ± 0.1 (9)	-38 ± 7 (9)	0.19 ± 0.01 (9)

+ Ca_vβ3 Δ122-175 + Ca_vα2δ-1	-5.6 ± 0.7 (10)	-0.6 ± 0.1 (10)	-32 ± 7 (10)	0.22 ± 0.01 (10)
+ Ca_vβ3 Δ175-180 + Ca_vα2δ-1	-3.4 ± 0.5 (9)	-0.36 ± 0.05 (9)	-14 ± 2 (9)	0.45 ± 0.02 (9)
+ Ca_vβ3 Δ57-123 Δ170-175 (ΔSH3) + Ca_vα2δ-1	-6.6 ± 0.7 (13)	-0.9 ± 0.2 (13)	-74 ± 15 (13)	0.27 ± 0.01 (13)

TABLE II. Ca_v2.3 wild-type channels were expressed in HEKT cells with Ca_vβ3 WT or constructs with Ca_vα2δ-1. Biophysical parameters were measured in the presence of a physiological saline containing 2 mM Ca²⁺ as described elsewhere (Bourdin, Marger et al. 2010). Activation properties ($E_{0.5,act}$ and ΔG_{act}) were estimated from the mean I-V relationships and fitted to a Boltzmann equation. The data are shown with the mean \pm S.E.M. of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses.

TABLE III : Fluorescent-activated cell sorting analysis of Ca_v2.3

CONSTRUCTS TRANSIENT EXPRESSION	Fluorescence in HEKT (%)	Fluorescence in Ca_vβ3 stable (%)
Cells no Ab	0.22 ± 0.01 (33)	0.21 ± 0.02 (28)
Cells with Ab	0.5 ± 0.1 (35)	0.6 ± 0.1 (30)
HA-Ca_v1.2 WT	3.8 ± 0.5 (15)	27 ± 1 (18)
HA-Ca_v1.2 WT + Ca_vβ3	26 ± 1 (56)	n.d.
HA-Ca_v2.3 WT	1.7 ± 0.1 (31)	20 ± 1 (30)
HA-Ca_v2.3 WT + Ca_vβ3	36.3 ± 0.08 (46)	n.d.
HA-Ca_v2.3 G382A	35 ± 1 (3)	19 ± 1 (7)
HA-Ca_v2.3 Y383A	27 ± 1 (3)	4.9 ± 0.6 (7)
HA-Ca_v2.3 Y383F	37 ± 1 (3)	13 ± 1 (7)
HA-Ca_v2.3 Y383G	12 ± 1 (3)	4.0 ± 0.3 (7)
HA-Ca_v2.3 R384M	32 ± 2 (3)	19 ± 1 (6)
HA-Ca_v2.3 R384L	31 ± 2 (3)	18 ± 1 (3)
HA-Ca_v2.3 W386A	1,2 ± 0.2 (3)	1.5 ± 0.3 (7)
HA-Ca_v2.3 WT + Ca_vβ1a	45 ± 2 (3)	n.d.
HA-Ca_v2.3 WT + Ca_vβ1b	41 ± 2 (3)	n.d.
HA-Ca_v2.3 WT + Ca_vβ2a	9 ± 1 (5)	n.d.
HA-Ca_v2.3 WT + Ca_vβ4	40 ± 2 (3)	n.d.
HA-Ca_v2.3 WT + Ca_vβ3 + Ca_vα2δ-1	34 ± 2 (6)	n.d.
HA-Ca_v2.3 WT + Ca_vα2δ-1	1.2 ± 0.2 (7)	21 ± 1 (5)
HA-Ca_v2.3 WT + CaM	1.5 ± 0.2 (9)	n.d.
HA-Ca_v2.3 WT + CaM₁₂₃₄	1.2 ± 0.2 (9)	n.d.

TABLE III. FACS results obtained after the transient transfection of HA-Ca_v2.3 WT in either HEKT control cells or stable Ca_vβ3 cells. One day (24-28 hrs) after transfection, cells were incubated with anti-HA FITC conjugate (10 μg/mL) at room temperature for 45 min. FACS separation of FITC positive cells was performed on a FACScalibur® flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) and fluorescence was quantified using the CellQuest software (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). The results are reported in percentage values of cells in higher quadrant. Data were pooled from experiments carried out over a period of 12 months. The data are shown with the mean ± SEM of the individual experiments and the number of experiments appears in parentheses. n.d. not determined.

TABLE IV : Fluorescent-activated cell sorting analysis of Ca_vβ3 constructs

CA _v β CONSTRUCTS	Fluorescence (%)		
	MEAN	SEM	n
Transient expression HA-CA _v 2.3 IN HEKT CELLS			
Ca _v β3 WT	36.3	0.8	46
Δ57-123 (ΔNSH3)	26	1	6
Δ57-180 (ΔSH3)	2.9	0.4	3
Δ180-364 (ΔGK)	1.4	0.4	5
Δ54-362 (ΔSH3-GK)	3	1	3
Δ170-175 (ΔPYDVVP)	23	2	7
Δ170-175 Δ180-364 (ΔPYDVVPΔGK)	3	1	3
Δ170-175 Δ57-123 (ΔPYDVVPΔNSH3)	25	2	8
Δ195-200 (ΔMMQKAL)	1.6	0.6	5
ΔHOOK (Δ122-169)	24	2	4
ΔHOOKΔPYDVVP (Δ122-175)	22	1	4
ΔPSMRPV (Δ175-180)	3	0.8	3
P175A	33	1.5	3
P175G	32	2.4	3
P179A	29	0.7	3
P179G	30	0.7	3
M195A	37	0.3	5
M196A	22	0.7	9
K198A	41	0.4	4
L200G	18	0.7	3
S295A	37	1.5	4
R302G	43	1.1	4
L303G	8	0.2	7
R307A	27	1.1	3
R307G	33	1.6	3
R307K	33	0.6	3
L337G	16	0.7	6
E339G	21	1.3	3
N340G	33	1	3
L342G	16	0.5	6
A345G	20.2	0.7	3
L200G/L303G	1.7	0.1	3
L200G/ L303G/ L337G	2.1	0.1	3
L200G/ L303G/ L337G/ L342G	2.5	0.1	3

TABLE IV. FACS results obtained after the transient transfection of Cav2.3-HA WT in HEKT cells. One day (24-28 hrs) after transfection, cells were incubated with anti-HA FITC conjugate (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at room temperature for 45 min. FACS separation of FITC positive cells was performed on a FACScalibur® flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) and fluorescence was quantified using the CellQuest software (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). The results are reported in percentage values of cells in the higher quadrant of fluorescence. Data were pooled from experiments carried out over a period of 12 months. The data are shown with the mean \pm SEM of the individual experiments and the number of experiments n appears in the last column.

4 DISCUSSION

4.1 Une affinité de l'ordre du μM est suffisante pour moduler le « gating » ainsi que l'adressage membranaire

Il a été démontré, selon les analyses en titrage calorimétrique isotherme (ITC - « Isothermal Titration Calorimetry »), que la mutation des résidus clefs dans le domaine AID du canal $\text{Ca}_v2.3$ change de manière modérée l'affinité de ce domaine pour la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ (Butcher, Leroy et al. 2006; Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). Les mutants R384M et R384L du canal $\text{Ca}_v2.3$ augmentent l'affinité pour la sous-unité $\text{Ca}_v\beta3$ mais ne produisent pas de modifications ni sur la modulation de l'adressage membranaire du canal par la sous-unité auxiliaire, ni sur la modulation des propriétés de « gating » par $\text{Ca}_v\beta3$. Des résultats semblables sont obtenus avec les mutants G382A, Y383A et Y383F qui produisent une diminution de l'affinité du canal pour $\text{Ca}_v\beta3$. Cependant, l'adressage membranaire des mutants Y383A et Y383G est significativement diminué (article, FIGURE- 4). Ce phénomène est aussi observé dans le canal $\text{Ca}_v2.2$ où la mutation Y383S dans le « linker » I-II du canal produit une diminution de l'affinité pour la sous-unité $\text{Ca}_v\beta1b$ tout en préservant l'effet de la sous-unité auxiliaire sur la densité de courant et sur l'expression membranaire du canal dans les cellules HEK293 (Butcher, Leroy et al. 2006).

Nos résultats suggèrent également que la modulation $\text{Ca}_v\beta3$ -dépendante des propriétés de « gating » du canal est une fonction bien plus robuste que la fonction de chaperon de cette sous-unité auxiliaire. Les mutations dans $\text{Ca}_v\beta3$ (article, FIGURE- 7 et FIGURE- 8) ou dans $\text{Ca}_v2.3$ (article, FIGURE- 4) qui réduisent la densité de canaux à la membrane jusqu'à $\approx 50\%$ produisent des canaux avec des propriétés biophysiques

(densité de courant maximale, propriété d'activation, cinétique d'inactivation) comparables au contrôle $Ca_v\beta 3wt + Ca_v2.3wt$. En effet, la diminution de l'adressage membranaire de $Ca_v2.3$ ne s'est jamais traduite en une modification de la modulation $Ca_v\beta 3$ -dépendante des propriétés de « gating » du canal. Ainsi, toute adressage membranaire du canal $Ca_v2.3$ qui dépasse le seuil, soit deux fois la densité de canaux à la membrane en absence de $Ca_v\beta 3$, produit une modulation des courants comparable au contrôle.

La perte complète d'interaction entre les deux protéines avec $Ca_v2.3 W386A$ (article, FIGURE- 4), $Ca_v\beta 3 \Delta 175-180$ et $Ca_v\beta 3 \Delta 195-200$ (article, FIGURE- 7) rompt l'adressage membranaire de $Ca_v2.3$ et ceci se traduit par une absence de fonction. C'est un résultat surprenant étant donné que l'expression du canal $Ca_v2.3$ où le domaine AID est clivé, en absence de la sous-unité $Ca_v\beta 3$ produit un canal fonctionnel à la membrane d'ovocytes de *Xenopus*. Cependant, dans ces conditions, on remarque une absence de modulation $Ca_v\beta 3$ -dépendante (Berrou, Klein et al. 2002; Berrou, Dodier et al. 2005). Cette divergence soulève des questions quant à la validité des transpositions de données obtenues à partir d'ovocytes de *Xenopus* vers les cellules de mammifères et justifie la promotion d'expériences dans les cellules natives.

4.2 Des délétions partielles dans le domaine GK de $Ca_v\beta 3$ rompent l'adressage membranaire de $Ca_v2.3$

Le domaine HOOK est une boucle qui permet un couplage intramoléculaire entre les domaines SH3 et GK de la sous-unité $Ca_v\beta$. Selon certains travaux, cette région jouerait un rôle dans les cinétiques d'inactivation de $Ca_v\beta 2a$ (Richards, Leroy et al. 2007). Cependant, nos résultats montrent que la délétion du domaine HOOK de $Ca_v\beta 3$ (article, FIGURE- 7), et conséquemment l'ablation du couplage intramoléculaire entre SH3 et GK, ne produit pas d'impact significatif sur l'activation

dépendante du voltage du canal $Ca_v2.3$. Nos résultats semblent également contredire le rôle attribué au feuillet $\beta 5$ du domaine SH3 (article, FIGURE- 7) de $Ca_v\beta 2a$ qui interviendrait dans la modulation du canal $Ca_v2.1$ (Chen, He et al. 2009). Ces divergences peuvent être attribuées aux propriétés structurales particulières de $Ca_v\beta 2a$ qui, contrairement aux autres isoformes $Ca_v\beta$, est ancré à la membrane, sans oublier l'utilisation du système d'expression *Xenopus* dans ces expériences. Selon nos données, l'ablation des domaines SH3 ou HOOK n'a pas interrompu la fonction chaperon ni la modulation $Ca_v\beta 3$ -dépendante du « gating » du canal $Ca_v2.3$.

4.3 Des résidus leucine dans le domaine GK de $Ca_v\beta 3$ favorisent l'adressage membranaire de $Ca_v2.3$

Parmi les 19 mutations ponctuelles effectuées dans le domaine GK de $Ca_v\beta 3$ (article, FIGURE- 7 et FIGURE- 8), la majorité d'entre elles n'a pas altéré la densité de $Ca_v2.3$ à la membrane (article, tableau TABLE IV), ni l'hyperpolarisation du « gating » (article, tableau TABLE I), et ceci, malgré une diminution de l'affinité de liaison entre les deux sous-unités (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008). Trois comportements différents sont observés pour les mutations ponctuelles où une diminution plus importante de l'affinité est prévue entre $Ca_v\beta 3$ et le peptide AID du canal $Ca_v2.3$.

Tout d'abord, les courants obtenus avec $Ca_v2.3$ en présence de $Ca_v\beta 3$ M196A ne sont pas significativement différents de ceux obtenus en présence de $Ca_v\beta 3$ wt (article, tableaux TABLE I et TABLE II), et cela en terme de densité de courant maximale, de dépendance au voltage lors de l'activation et de cinétiques d'activation. Dans le cas de $Ca_v\beta 2a$ M245A (l'équivalent de M196A dans $Ca_v\beta 3$) une diminution de 200 fois de l'affinité a été observée pour le canal $Ca_v1.2$ (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008), avec une augmentation de la constante K_d de 5 nM à 1.1 μ M. De

plus, malgré une diminution de l'affinité protéine-protéine (> 50 fois) pour les différents mutants $\text{Ca}_v\beta 3$ R307, la densité maximale de courant du canal $\text{Ca}_v 2.3$ a significativement augmenté (article, tableaux TABLE I et TABLE II) sans aucun changement dans la densité de canaux $\text{Ca}_v 2.3$ à la membrane (article, tableau TABLE IV). La diminution de ΔG_{act} ainsi que des cinétiques d'inactivation observées avec $\text{Ca}_v\beta 3$ R307G suggèrent que ce mutant stabilise le canal dans l'état ouvert malgré, ou grâce à, une interaction affaiblie.

En deuxième lieu, les mutations dans $\text{Ca}_v\beta 3$ qui réduisent la densité du canal $\text{Ca}_v 2.3$ à la membrane ($\text{Ca}_v\beta 3$ L200G, L303G, L337G et L342G) sont capables de moduler le « gating » aussi bien que $\text{Ca}_v\beta 3$ wt (article, FIGURE- 8). Les densités maximales de courant obtenues avec $\text{Ca}_v\beta 3$ L303G ne sont pas significativement différentes de celles obtenues avec $\text{Ca}_v\beta 3$ wt. Les affinités de liaison pour les mutations équivalentes dans $\text{Ca}_v\beta 2a$ (L352A et L392A) diminuent grandement l'affinité mais pas aussi intensément que M245A (20 fois et 40 fois, respectivement).

En troisième lieu, la robustesse de la modulation $\text{Ca}_v\beta$ -dépendante de l'adressage membranaire ainsi que de l'activation est aussi documentée pour $\text{Ca}_v\beta 2a$ (Chen, He et al. 2009). Dans ces expériences, les mutations simultanées de sept résidus dans $\text{Ca}_v\beta 2a$ (F92, H94, R107, V109, Y406, K408 et T410 ($\alpha 9$) en alanine) situées dans les domaines SH3 et GK ont accéléré les cinétiques d'inactivation du canal $\text{Ca}_v 1.2$ sans modifier la dépendance au voltage du « gating », ni l'adressage membranaire du canal.

Selon nos observations, le « gating » du canal $\text{Ca}_v 2.3$ par la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ aurait atteint un niveau plateau avec la concentration obtenue suite à l'expression transitoire de $\text{Ca}_v\beta 3$ dans les cellules HEKT. Dans les ovocytes de *Xenopus*, où il est possible de calibrer le ratio d'ARNc, une augmentation de plus de cinq fois de la concentration des mutants de

Ca ν β 2a peut compenser en partie pour la baisse de l'affinité (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008).

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons systématiquement étudié le rôle des domaines structuraux de $Ca_v\beta_3$ dans l'adressage membranaire ainsi que dans la modulation des propriétés de « gating » du canal HVA $Ca_v2.3$ suite à l'expression des sous-unités dans le système recombinant des cellules HEKT.

Nos résultats démontrent que la modulation fonctionnelle et l'adressage membranaire sont tous les deux conservés lors d'une perturbation modérée de l'affinité entre le domaine AID du canal $Ca_v2.3$ et la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta_3$. Les délétions sélectives des domaines structuraux SH3 et HOOK de $Ca_v\beta_3$ n'ont pas modifié de manière significative le ciblage membranaire ni les propriétés de « gating » du canal $Ca_v2.3$. Les mutations des résidus dans le domaine GK qui étaient préalablement considérés porteurs d'une forte affinité pour le domaine AID de la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008) ont occasionné très peu de changement dans l'adressage membranaire et les cinétiques d'activation.

Cependant, des mutations ponctuelles de quatre résidus leucine situés dans les régions α_3 , α_6 , β_{10} et α_9 du domaine GK ont considérablement diminué le ciblage du canal $Ca_v2.3$.

Ainsi, nos résultats tendent à suggérer qu'une affinité d'interaction qui serait de l'ordre de micro à nanomolaire serait suffisante pour permettre à la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta_3$ d'hyperpolariser l'activation du canal $Ca_v2.3$. De plus, nous avons identifié quatre résidus leucine dans le domaine GK de $Ca_v\beta_3$ qui interviennent dans l'adressage membranaire de $Ca_v2.3$. L'adressage membranaire ainsi que la modulation des propriétés de gating semblent ne pas être contrôlés exclusivement par l'affinité de liaison entre $Ca_v\beta$ et $Ca_v\alpha_1$.

Il y a plusieurs perspectives de recherche qui pourrait s'ébaucher grâce aux résultats obtenus. Entre autre, le rôle prépondérant des résidus leucine dans la sous-unité $Ca_v\beta_3$ pourrait être vérifié dans l'interaction avec d'autres canaux calciques HVA. De plus, il serait intéressant d'étudier le rôle que les résidus leucine joueraient dans la dégradation des canaux HVA par la voie des protéasomes.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Adams, B. A. and K. G. Beam (1990). "*Muscular dysgenesis in mice: a model system for studying excitation-contraction coupling.*" FASEB J **4**(10): 2809-2816.
- Almagor, L., O. Chomsky-Hecht, A. Ben-Mocha, D. Hendin-Barak, N. Dascal and J. A. Hirsch (2012). "*The role of a voltage-dependent Ca²⁺ channel intracellular linker: a structure-function analysis.*" J Neurosci **32**(22): 7602-7613.
- Alters, S. (2000). Biology : understanding life. Boston, Jones and Barlette Publishers.
- Altier, C., S. J. Dubel, C. Barrere, S. E. Jarvis, S. C. Stotz, R. L. Spaetgens, J. D. Scott, V. Cornet, M. De Waard, G. W. Zamponi, J. Nargeot and E. Bourinet (2002). "*Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79.*" J Biol Chem **277**(37): 33598-33603.
- Altier, C., A. Garcia-Caballero, B. Simms, H. You, L. Chen, J. Walcher, H. W. Tedford, T. Hermosilla and G. W. Zamponi (2011). "*The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels.*" Nat Neurosci **14**(2): 173-180.
- Antzelevitch, C., G. D. Pollevick, J. M. Cordeiro, O. Casis, M. C. Sanguinetti, Y. Aizawa, A. Guerchicoff, R. Pfeiffer, A. Oliva, B. Wollnik, P. Gelber, E. P. Bonaros, Jr., E. Burashnikov, Y. Wu, J. D. Sargent, S. Schickel, R. Oberheiden, A. Bhatia, L. F. Hsu, M. Haissaguerre, R. Schimpf, M. Borggreffe and C. Wolpert (2007). "*Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death.*" Circulation **115**(4): 442-449.
- Arikkath, J. and K. P. Campbell (2003). "*Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex.*" Curr Opin Neurobiol **13**(3): 298-307.
- Barrett, C. F. and R. W. Tsien (2008). "*The Timothy syndrome mutation differentially affects voltage- and calcium-dependent inactivation of CaV1.2 L-type calcium channels.*" Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2157-2162.
- Beam, K. G., C. M. Knudson and J. A. Powell (1986). "*A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells.*" Nature **320**(6058): 168-170.
- Bernatchez, G., L. Berrou, Z. Benakezouh, J. Ducay and L. Parent (2001). "*Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca(V)2.3 channel.*" Biochim Biophys Acta **1514**(2): 217-229.
- Bernatchez, G., D. Talwar and L. Parent (1998). "*Mutations in the EF-hand motif impair the inactivation of barium currents of the cardiac alpha1C channel.*" Biophys J **75**(4): 1727-1739.

- Berridge, M., P. Lipp and M. Bootman (1999). "Calcium signalling." Curr Biol **9**(5): R157-159.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.
- Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Berrou, L., Y. Dodier, A. Raybaud, A. Tousignant, O. Dafi, J. N. Pelletier and L. Parent (2005). "The C-terminal residues in the alpha-interacting domain (AID) helix anchor CaV beta subunit interaction and modulation of CaV2.3 channels." J Biol Chem **280**(1): 494-505.
- Berrou, L., H. Klein, G. Bernatchez and L. Parent (2002). "A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels." Biophys J **83**(3): 1429-1442.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.
- Bezánilla, F. (2000). "The voltage sensor in voltage-dependent ion channels." Physiol Rev **80**(2): 555-592.
- Bezánilla, F. (2002). "Voltage sensor movements." J Gen Physiol **120**(4): 465-473.
- Bichet, D., V. Cornet, S. Geib, E. Carlier, S. Volsen, T. Hoshi, Y. Mori and M. De Waard (2000). "The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit." Neuron **25**(1): 177-190.
- Bidaud, I., A. Mezghrani, L. A. Swayne, A. Monteil and P. Lory (2006). "Voltage-gated calcium channels in genetic diseases." Biochim Biophys Acta **1763**(11): 1169-1174.
- Birnbaumer, L., K. P. Campbell, W. A. Catterall, M. M. Harpold, F. Hofmann, W. A. Horne, Y. Mori, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe and et al. (1994). "The naming of voltage-gated calcium channels." Neuron **13**(3): 505-506.
- Boitano, S., E. R. Dirksen and M. J. Sanderson (1992). "Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate." Science **258**(5080): 292-295.
- Bootman, M. D., T. J. Collins, C. M. Peppiatt, L. S. Prothero, L. MacKenzie, P. De Smet, M. Travers, S. C. Tovey, J. T. Seo, M. J. Berridge, F. Ciccolini and P. Lipp (2001). "Calcium signalling--an overview." Semin Cell Dev Biol **12**(1): 3-10.
- Borsotto, M., J. Barhanin, R. I. Norman and M. Lazdunski (1984). "Purification of the dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca²⁺ channel from skeletal muscle transverse tubules using (+) [3H]PN 200-110." Biochem Biophys Res Commun **122**(3): 1357-1366.
- Bourdin, B., F. Marger, S. Wall-Lacelle, T. Schneider, H. Klein, R. Sauve and L. Parent (2010). "Molecular determinants of the CaVbeta-

- induced plasma membrane targeting of the CaV1.2 channel.* J Biol Chem **285**(30): 22853-22863.
- 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**(5): 407-415.
- Brice, N. L., N. S. Berrow, V. Campbell, K. M. Page, K. Brickley, I. Tedder and A. C. Dolphin (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**(4): 749-759.
- Buraei, Z. and J. Yang (2010). *"The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels."* Physiol Rev **90**(4): 1461-1506.
- Butcher, A. J., J. Leroy, M. W. Richards, W. S. Pratt and A. C. Dolphin (2006). *"The importance of occupancy rather than affinity of CaV(beta) subunits for the calcium channel I-II linker in relation to calcium channel function."* J Physiol **574**(Pt 2): 387-398.
- Carafoli, E. and C. B. Klee (1999). Calcium as a cellular regulator. New York, Oxford University Press.
- Carafoli, E., L. Santella, D. Branca and M. Brini (2001). *"Generation, control, and processing of cellular calcium signals."* Crit Rev Biochem Mol Biol **36**(2): 107-260.
- Carbone, E. and H. D. Lux (1984). *"A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones."* Nature **310**(5977): 501-502.
- Carl, S. L., K. Felix, A. H. Caswell, N. R. Brandt, W. J. Ball, Jr., P. L. Vaghy, G. Meissner and D. G. Ferguson (1995). *"Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium."* J Cell Biol **129**(3): 673-682.
- 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**(5): 3450-3455.
- Catterall, W. A. (1996). *"Molecular properties of sodium and calcium channels."* J Bioenerg Biomembr **28**(3): 219-230.
- Catterall, W. A. (2000). *"Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels."* Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-555.
- Catterall, W. A. (2011). *"Voltage-gated calcium channels."* Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(8): a003947.
- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch and J. Striessnig (2005). *"International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels."* Pharmacol Rev **57**(4): 411-425.
- Chang, C. F., L. M. Gutierrez, C. Mundina-Weilenmann and M. M. Hosey (1991). *"Dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal*

- muscle. II. Functional effects of differential phosphorylation of channel subunits.* J Biol Chem **266**(25): 16395-16400.
- Chen, L. Q., V. Santarelli, R. Horn and R. G. Kallen (1996). "A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels." J Gen Physiol **108**(6): 549-556.
- Chen, Y. H., L. L. He, D. R. Buchanan, Y. Zhang, A. Fitzmaurice and J. Yang (2009). "Functional dissection of the intramolecular Src homology 3-guanylate kinase domain coupling in voltage-gated Ca²⁺ channel beta-subunits." FEBS Lett **583**(12): 1969-1975.
- Chen, Y. H., M. H. Li, Y. Zhang, L. L. He, Y. Yamada, A. Fitzmaurice, Y. Shen, H. Zhang, L. Tong and J. Yang (2004). "Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels." Nature **429**(6992): 675-680.
- Chien, A. J., K. M. Carr, R. E. Shirokov, E. Rios and M. M. Hosey (1996). "Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel function." J Biol Chem **271**(43): 26465-26468.
- Cibulsky, S. M. and W. A. Sather (2003). "Control of ion conduction in L-type Ca²⁺ channels by the concerted action of S5-6 regions." Biophys J **84**(3): 1709-1719.
- Cohen, R. M., J. D. Foell, R. C. Balijepalli, V. Shah, J. W. Hell and T. J. Kamp (2005). "Unique modulation of L-type Ca²⁺ channels by short auxiliary beta1d subunit present in cardiac muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(5): H2363-2374.
- 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 alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family." Circ Res **83**(1): 103-109.
- Curtis, B. M. and W. A. Catterall (1984). "Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules." Biochemistry **23**(10): 2113-2118.
- Curtis, B. M. and W. A. Catterall (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**(8): 2528-2532.
- Curtis, B. M. and W. A. Catterall (1986). "Reconstitution of the voltage-sensitive calcium channel purified from skeletal muscle transverse tubules." Biochemistry **25**(11): 3077-3083.
- Dafi, O., L. Berrou, Y. Dodier, A. Raybaud, R. Sauve and L. Parent (2004). "Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to CaV1.2." Biophys J **87**(5): 3181-3192.

- Dai, S., D. D. Hall and J. W. Hell (2009). "Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels." Physiol Rev **89**(2): 411-452.
- Davies, A., I. Kadurin, A. Alvarez-Laviada, L. Douglas, M. Nieto-Rostro, C. S. Bauer, W. S. Pratt and A. C. Dolphin (2010). "The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1654-1659.
- De Jongh, K. S., C. Warner and W. A. Catterall (1990). "Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene." J Biol Chem **265**(25): 14738-14741.
- de Leon, M., Y. Wang, L. Jones, E. Perez-Reyes, X. Wei, T. W. Soong, T. P. Snutch and D. T. Yue (1995). "Essential Ca(2+)-binding motif for Ca(2+)-sensitive inactivation of L-type Ca2+ channels." Science **270**(5241): 1502-1506.
- De Waard, M., V. E. Scott, M. Pragnell and K. P. Campbell (1996). "Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca2+ channels." FEBS Lett **380**(3): 272-276.
- Dolmetsch, R. (2003). "Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus." Sci STKE **2003**(166): PE4.
- Dolphin, A. C. (2009). "Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits." Curr Opin Neurobiol **19**(3): 237-244.
- Dostal, D. E. and K. M. Baker (1998). "Angiotensin and endothelin: messengers that couple ventricular stretch to the Na+/H+ exchanger and cardiac hypertrophy." Circ Res **83**(8): 870-873.
- Dresviannikov, A. V., K. M. Page, J. Leroy, W. S. Pratt and A. C. Dolphin (2009). "Determinants of the voltage dependence of G protein modulation within calcium channel beta subunits." Pflugers Arch **457**(4): 743-756.
- Dunlap, K., J. I. Luebke and T. J. Turner (1995). "Exocytotic Ca2+ channels in mammalian central neurons." Trends Neurosci **18**(2): 89-98.
- Elbaz, A., J. Vale-Santos, K. Jurkat-Rott, P. Lapie, R. A. Ophoff, B. Bady, T. P. Links, C. Piussan, A. Vila, N. Monnier and et al. (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**(2): 374-380.
- Ellis, S. B., M. E. Williams, N. R. Ways, R. Brenner, A. H. Sharp, A. T. Leung, K. P. Campbell, E. McKenna, W. J. Koch, A. Hui and et al. (1988). "Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel." Science **241**(4873): 1661-1664.
- 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**(3): 533-535.
- Ferreira, G., E. Rios and N. Reyes (2003). "Two components of voltage-dependent inactivation in Ca(v)1.2 channels revealed by its gating currents." *Biophys J* **84**(6): 3662-3678.
- Fletcher, C. F., C. M. Lutz, T. N. O'Sullivan, J. D. Shaughnessy, Jr., R. Hawkes, W. N. Frankel, N. G. Copeland and N. A. Jenkins (1996). "Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects." *Cell* **87**(4): 607-617.
- Fox, A. P., M. C. Nowycky and R. W. Tsien (1987). "Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones." *J Physiol* **394**: 149-172.
- Frazier, C. J., J. R. Serrano, E. G. George, X. Yu, A. Viswanathan, E. Perez-Reyes and S. W. Jones (2001). "Gating kinetics of the alpha1I T-type calcium channel." *J Gen Physiol* **118**(5): 457-470.
- Gao, T., A. J. Chien and M. M. Hosey (1999). "Complexes of the alpha1C and beta subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels." *J Biol Chem* **274**(4): 2137-2144.
- Gao, T., T. S. Puri, B. L. Gerhardstein, A. J. Chien, R. D. Green and M. M. Hosey (1997). "Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes." *J Biol Chem* **272**(31): 19401-19407.
- Gomez-Ospina, N., F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu and R. Dolmetsch (2006). "The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor." *Cell* **127**(3): 591-606.
- Gonzalez-Gutierrez, G., E. Miranda-Laferte, A. Neely and P. Hidalgo (2007). "The Src homology 3 domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction." *J Biol Chem* **282**(4): 2156-2162.
- Gonzalez-Gutierrez, G., E. Miranda-Laferte, D. Nothmann, S. Schmidt, A. Neely and P. Hidalgo (2008). "The guanylate kinase domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels suffices to modulate gating." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(37): 14198-14203.
- Guénard, H. (2001). *Physiologie humaine sous la dir. de Hervé Guénard ill. de Corinne Boudon*. Rueil-Malmaison, Pradel.
- Hagiwara, S., S. Ozawa and O. Sand (1975). "Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish." *J Gen Physiol* **65**(5): 617-644.
- Hamid, J., J. B. Peloquin, A. Monteil and G. W. Zamponi (2006). "Determinants of the differential gating properties of Cav3.1 and Cav3.3 T-type channels: a role of domain IV?" *Neuroscience* **143**(3): 717-728.
- Hardingham, G. E., F. H. Cruzalegui, S. Chawla and H. Bading (1998). "Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals." *Cell Calcium* **23**(2-3): 131-134.

- Hatakeyama, S., M. Wakamori, M. Ino, N. Miyamoto, E. Takahashi, T. Yoshinaga, K. Sawada, K. Imoto, I. Tanaka, T. Yoshizawa, Y. Nishizawa, Y. Mori, T. Niidome and S. Shoji (2001). "Differential nociceptive responses in mice lacking the $\alpha(1B)$ subunit of N-type $Ca(2+)$ channels." Neuroreport **12**(11): 2423-2427.
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stuhmer, K. Imoto and S. Numa (1992). "Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations." Nature **356**(6368): 441-443.
- Hemara-Wahanui, A., S. Berjukow, C. I. Hope, P. K. Dearden, S. B. Wu, J. Wilson-Wheeler, D. M. Sharp, P. Lundon-Treweek, G. M. Clover, J. C. Hoda, J. Striessnig, R. Marksteiner, S. Hering and M. A. Maw (2005). "A *CACNA1F* mutation identified in an X-linked retinal disorder shifts the voltage dependence of *Cav1.4* channel activation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(21): 7553-7558.
- Hering, S., S. Beyl, A. Stary, M. Kudrnac, A. Hohaus, H. R. Guy and E. Timin (2008). "Pore stability and gating in voltage-activated calcium channels." Channels (Austin) **2**(2): 61-69.
- Hockerman, G. H., B. Z. Peterson, B. D. Johnson and W. A. Catterall (1997a). "Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 361-396.
- Hockerman, G. H., B. Z. Peterson, E. Sharp, T. N. Tanada, T. Scheuer and W. A. Catterall (1997b). "Construction of a high-affinity receptor site for dihydropyridine agonists and antagonists by single amino acid substitutions in a non-L-type Ca^{2+} channel." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14906-14911.
- Hohaus, A., S. Beyl, M. Kudrnac, S. Berjukow, E. N. Timin, R. Marksteiner, M. A. Maw and S. Hering (2005). "Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal disorder." J Biol Chem **280**(46): 38471-38477.
- Holmkvist, J., D. Tojjar, P. Almgren, V. Lyssenko, C. M. Lindgren, B. Isomaa, T. Tuomi, G. Berglund, E. Renstrom and L. Groop (2007). "Polymorphisms in the gene encoding the voltage-dependent $Ca(2+)$ channel *Ca (V)2.3 (CACNA1E)* are associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion." Diabetologia **50**(12): 2467-2475.
- Hoshijima, M., R. Knoll, M. Pashmforoush and K. R. Chien (2006). "Reversal of calcium cycling defects in advanced heart failure toward molecular therapy." J Am Coll Cardiol **48**(9 Suppl 1): A15-23.
- Huber, I., E. Wappl, A. Herzog, J. Mitterdorfer, H. Glossmann, T. Langer and J. Striessnig (2000). "Conserved Ca^{2+} -antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain." Biochem J **347 Pt 3**: 829-836.
- Hulme, J. T., M. Ahn, S. D. Hauschka, T. Scheuer and W. A. Catterall (2002). "A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C terminus of the skeletal muscle

- Ca²⁺ channel and modulates its function.* J Biol Chem **277**(6): 4079-4087.
- Ino, M., T. Yoshinaga, M. Wakamori, N. Miyamoto, E. Takahashi, J. Sonoda, T. Kagaya, T. Oki, T. Nagasu, Y. Nishizawa, I. Tanaka, K. Imoto, S. Aizawa, S. Koch, A. Schwartz, T. Niidome, K. Sawada and Y. Mori (2001). *Functional disorders of the sympathetic nervous system in mice lacking the alpha 1B subunit (Cav 2.2) of N-type calcium channels.* Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5323-5328.
- Jangsangthong, W., E. Kuzmenkina, I. F. Khan, J. Matthes, R. Hullin and S. Herzig (2010). *Inactivation of L-type calcium channels is determined by the length of the N terminus of mutant beta(1) subunits.* Pflugers Arch **459**(3): 399-411.
- Jay, S. D., S. B. Ellis, A. F. McCue, M. E. Williams, T. S. Vedvick, M. M. Harpold and K. P. Campbell (1990). *Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle.* Science **248**(4954): 490-492.
- Jing, X., D. Q. Li, C. S. Olofsson, A. Salehi, V. V. Surve, J. Caballero, R. Ivarsson, I. Lundquist, A. Pereverzev, T. Schneider, P. Rorsman and E. Renstrom (2005). *CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release.* J Clin Invest **115**(1): 146-154.
- Jun, K., E. S. Piedras-Renteria, S. M. Smith, D. B. Wheeler, S. B. Lee, T. G. Lee, H. Chin, M. E. Adams, R. H. Scheller, R. W. Tsien and H. S. Shin (1999). *Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit.* Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15245-15250.
- Kamatchi, G. L., R. Franke, C. Lynch, 3rd and J. J. Sando (2004). *Identification of sites responsible for potentiation of type 2.3 calcium currents by acetyl-beta-methylcholine.* J Biol Chem **279**(6): 4102-4109.
- Kamp, M. A., B. Shakeri, E. E. Tevoufouet, A. Krieger, M. Henry, K. Behnke, S. Herzig, J. Hescheler, K. Radhakrishnan, L. Parent and T. Schneider (2012). *The C-terminus of human Ca(v)2.3 voltage-gated calcium channel interacts with alternatively spliced calmodulin-2 expressed in two human cell lines.* Biochim Biophys Acta.
- Kang, M. G. and K. P. Campbell (2003). *Gamma subunit of voltage-activated calcium channels.* J Biol Chem **278**(24): 21315-21318.
- Klockner, U., J. H. Lee, L. L. Cribbs, A. Daud, J. Hescheler, A. Pereverzev, E. Perez-Reyes and T. Schneider (1999). *Comparison of the Ca²⁺ currents induced by expression of three cloned alpha1 subunits, alpha1G, alpha1H and alpha1I, of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels.* Eur J Neurosci **11**(12): 4171-4178.
- Klugbauer, N., L. Lacinova, E. Marais, M. Hobom and F. Hofmann (1999). *Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit.* J Neurosci **19**(2): 684-691.

- Klugbauer, N., E. Marais and F. Hofmann (2003). "Calcium channel *alpha2delta* subunits: differential expression, function, and drug binding." J Bioenerg Biomembr **35**(6): 639-647.
- Koschak, A., D. Reimer, D. Walter, J. C. Hoda, T. Heinzle, M. Grabner and J. Striessnig (2003). "Cav1.4alpha1 subunits can form slowly inactivating dihydropyridine-sensitive L-type Ca²⁺ channels lacking Ca²⁺-dependent inactivation." J Neurosci **23**(14): 6041-6049.
- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, H. Glossmann, S. Hering and J. Striessnig (1998). "Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca²⁺ channel kinetics." J Biol Chem **273**(10): 5586-5590.
- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, A. Koschak, H. Glossmann, S. Stenirri, P. Carrera and J. Striessnig (2000). "Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca(2+) channel kinetics." J Biol Chem **275**(13): 9239-9243.
- Krieger, A., K. Radhakrishnan, A. Pereverzev, S. A. Siapich, M. Banat, M. A. Kamp, J. Leroy, U. Klockner, J. Hescheler, M. Weiergraber and T. Schneider (2006). "The molecular chaperone hsp70 interacts with the cytosolic II-III loop of the Cav2.3 E-type voltage-gated Ca²⁺ channel." Cell Physiol Biochem **17**(3-4): 97-110.
- Kurejova, M., L. Lacinova, M. Pavlovicova, M. Eschbach and N. Klugbauer (2007). "The effect of the outermost basic residues in the S4 segments of the Ca(V)3.1 T-type calcium channel on channel gating." Pflugers Arch **455**(3): 527-539.
- Lacinova, L. (2005). "Voltage-dependent calcium channels." Gen Physiol Biophys **24 Suppl 1**: 1-78.
- Lacinova, L., N. Klugbauer and F. Hofmann (2002). "Gating of the expressed Cav3.1 calcium channel." FEBS Lett **531**(2): 235-240.
- Leroy, J., A. Pereverzev, R. Vajna, N. Qin, G. Pfitzer, J. Hescheler, C. O. Malecot, T. Schneider and U. Klockner (2003). "Ca²⁺-sensitive regulation of E-type Ca²⁺ channel activity depends on an arginine-rich region in the cytosolic II-III loop." Eur J Neurosci **18**(4): 841-855.
- Leroy, J., M. W. Richards, A. J. Butcher, M. Nieto-Rostro, W. S. Pratt, A. Davies and A. C. Dolphin (2005). "Interaction via a key tryptophan in the I-II linker of N-type calcium channels is required for beta1 but not for palmitoylated beta2, implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties." J Neurosci **25**(30): 6984-6996.
- Li, J., L. Stevens, N. Klugbauer and D. Wray (2004). "Roles of molecular regions in determining differences between voltage dependence of activation of CaV3.1 and CaV1.2 calcium channels." J Biol Chem **279**(26): 26858-26867.
- Llinas, R. and Y. Yarom (1981). "Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances." J Physiol **315**: 549-567.

- Llinas, R. R., M. Sugimori and B. Cherksey (1989). "Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel." Ann N Y Acad Sci **560**: 103-111.
- Lorenzon, N. M. and K. G. Beam (2000). "Calcium channelopathies." Kidney Int **57**(3): 794-802.
- Lu, Z. J., A. Pereverzev, H. L. Liu, M. Weiergraber, M. Henry, A. Krieger, N. Smyth, J. Hescheler and T. Schneider (2004). "Arrhythmia in isolated prenatal hearts after ablation of the Cav2.3 (alpha1E) subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels." Cell Physiol Biochem **14**(1-2): 11-22.
- Maltez, J. M., D. A. Nunziato, J. Kim and G. S. Pitt (2005). "Essential Ca(V)beta modulatory properties are AID-independent." Nat Struct Mol Biol **12**(4): 372-377.
- Mansergh, F., N. C. Orton, J. P. Vessey, M. R. Lalonde, W. K. Stell, F. Tremblay, S. Barnes, D. E. Rancourt and N. T. Bech-Hansen (2005). "Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina." Hum Mol Genet **14**(20): 3035-3046.
- Marks, T. N. and S. W. Jones (1992). "Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. An allosteric model for calcium channel activation and dihydropyridine agonist action." J Gen Physiol **99**(3): 367-390.
- McGee, A. W., D. A. Nunziato, J. M. Maltez, K. E. Prehoda, G. S. Pitt and D. S. Bredt (2004). "Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits." Neuron **42**(1): 89-99.
- McKeown, L., P. Robinson and O. T. Jones (2006). "Molecular basis of inherited calcium channelopathies: role of mutations in pore-forming subunits." Acta Pharmacol Sin **27**(7): 799-812.
- Meyers, M. B., T. S. Puri, A. J. Chien, T. Gao, P. H. Hsu, M. M. Hosey and G. I. Fishman (1998). "Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels." J Biol Chem **273**(30): 18930-18935.
- Miranda-Laferte, E., G. Gonzalez-Gutierrez, S. Schmidt, A. Zeug, E. G. Ponimaskin, A. Neely and P. Hidalgo (2011). "Homodimerization of the Src homology 3 domain of the calcium channel beta-subunit drives dynamin-dependent endocytosis." J Biol Chem **286**(25): 22203-22210.
- Mitra, R. and M. Morad (1986). "Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(14): 5340-5344.
- Mori, M. X., C. W. Vander Kooij, D. J. Leahy and D. T. Yue (2008). "Crystal structure of the CaV2 IQ domain in complex with Ca²⁺/calmodulin: high-resolution mechanistic implications for channel regulation by Ca²⁺." Structure **16**(4): 607-620.
- Muller, Y. L., R. L. Hanson, C. Zimmerman, I. Harper, J. Sutherland, S. Kobes, C. International Type 2 Diabetes 1q, W. C. Knowler, C.

- Bogardus and L. J. Baier (2007). "Variants in the Ca V 2.3 (alpha 1E) subunit of voltage-activated Ca²⁺ channels are associated with insulin resistance and type 2 diabetes in Pima Indians." Diabetes **56**(12): 3089-3094.
- Nakai, J., B. A. Adams, K. Imoto and K. G. Beam (1994). "Critical roles of the S3 segment and S3-S4 linker of repeat I in activation of L-type calcium channels." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 1014-1018.
- Newcomb, R., B. Szoke, A. Palma, G. Wang, X. Chen, W. Hopkins, R. Cong, J. Miller, L. Urge, K. Tarczy-Hornoch, J. A. Loo, D. J. Dooley, L. Nadasdi, R. W. Tsien, J. Lemos and G. Miljanich (1998). "Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*." Biochemistry **37**(44): 15353-15362.
- Newton, P. M., C. J. Orr, M. J. Wallace, C. Kim, H. S. Shin and R. O. Messing (2004). "Deletion of N-type calcium channels alters ethanol reward and reduces ethanol consumption in mice." J Neurosci **24**(44): 9862-9869.
- Notredame, C., D. G. Higgins and J. Heringa (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." J Mol Biol **302**(1): 205-217.
- Nowycky, M. C., A. P. Fox and R. W. Tsien (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." Nature **316**(6027): 440-443.
- Obermair, G. J., P. Tuluc and B. E. Flucher (2008). "Auxiliary Ca(2+) channel subunits: lessons learned from muscle." Curr Opin Pharmacol **8**(3): 311-318.
- Olcese, R., N. Qin, T. Schneider, A. Neely, X. Wei, E. Stefani and L. Birnbaumer (1994). "The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation." Neuron **13**(6): 1433-1438.
- Olivera, B. M., G. P. Miljanich, J. Ramachandran and M. E. Adams (1994). "Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins." Annu Rev Biochem **63**: 823-867.
- Opatowsky, Y., C. C. Chen, K. P. Campbell and J. A. Hirsch (2004). "Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain." Neuron **42**(3): 387-399.
- Ophoff, R. A., G. M. Terwindt, M. N. Vergouwe, R. van Eijk, P. J. Oefner, S. M. Hoffman, J. E. Lamerdin, H. W. Mohrenweiser, D. E. Bulman, M. Ferrari, J. Haan, D. Lindhout, G. J. van Ommen, M. H. Hofker, M. D. Ferrari and R. R. Frants (1996). "Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4." Cell **87**(3): 543-552.

- Parent, L. and M. Gopalakrishnan (1995). "Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca^{2+} channel." Biophys J **69**(5): 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**(2): 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**(2): 127-140.
- Patil, P. G., D. L. Brody and D. T. Yue (1998). "Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels." Neuron **20**(5): 1027-1038.
- Pereverzev, A., J. Leroy, A. Krieger, C. O. Malecot, J. Hescheler, G. Pfitzer, U. Klockner and T. Schneider (2002). "Alternate splicing in the cytosolic II-III loop and the carboxy terminus of human E-type voltage-gated Ca^{2+} channels: electrophysiological characterization of isoforms." Mol Cell Neurosci **21**(2): 352-365.
- Perez-Reyes, E. (2003). "Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels." Physiol Rev **83**(1): 117-161.
- 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**(6670): 896-900.
- Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, J. P. Adelman and D. T. Yue (1999). "Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels." Neuron **22**(3): 549-558.
- Platzer, J., J. Engel, A. Schrott-Fischer, K. Stephan, S. Bova, H. Chen, H. Zheng and J. Striessnig (2000). "Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels." Cell **102**(1): 89-97.
- 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**(6466): 67-70.
- Qin, N., D. Platano, R. Olcese, J. L. Costantin, E. Stefani and L. Birnbaumer (1998). "Unique regulatory properties of the type 2a Ca^{2+} channel beta subunit caused by palmitoylation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4690-4695.
- Qin, N., S. Yagel, M. L. Momplaisir, E. E. Codd and M. R. D'Andrea (2002). "Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit." Mol Pharmacol **62**(3): 485-496.
- Randall, A. and C. D. Benham (1999). "Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca^{2+} channels." Mol Cell Neurosci **14**(4-5): 255-272.

- Randall, A. and R. W. Tsien (1995). "Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons." *J Neurosci* **15**(4): 2995-3012.
- Raybaud, A., E. E. Baspinar, F. Dionne, Y. Dodier, R. Sauve and L. Parent (2007). "The role of distal S6 hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of CaV2.3 channels." *J Biol Chem* **282**(38): 27944-27952.
- Raybaud, A., Y. Dodier, P. Bissonnette, M. Simoes, D. G. Bichet, R. Sauve and L. Parent (2006). "The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated Ca²⁺ channels." *J Biol Chem* **281**(51): 39424-39436.
- Restituto, S., T. Cens, C. Barrere, S. Geib, S. Galas, M. De Waard and P. Charnet (2000). "The [beta]2a subunit is a molecular groom for the Ca²⁺ channel inactivation gate." *J Neurosci* **20**(24): 9046-9052.
- Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." *FASEB J* **11**(5): 331-340.
- Richards, M. W., J. Leroy, W. S. Pratt and A. C. Dolphin (2007). "The HOOK-domain between the SH3 and the GK domains of Cavbeta subunits contains key determinants controlling calcium channel inactivation." *Channels (Austin)* **1**(2): 92-101.
- Ringer, S. (1883a). "A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart." *J Physiol* **4**(1): 29-42 23.
- Ringer, S. (1883b). "A third contribution regarding the Influence of the Inorganic Constituents of the Blood on the Ventricular Contraction." *J Physiol* **4**(2-3): 222-225.
- Rios, E. and G. Pizarro (1991). "Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle." *Physiol Rev* **71**(3): 849-908.
- Rousset, M., T. Cens, S. Restituto, C. Barrere, J. L. Black, 3rd, M. W. McEnery and P. Charnet (2001). "Functional roles of gamma2, gamma3 and gamma4, three new Ca²⁺ channel subunits, in P/Q-type Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus oocytes*." *J Physiol* **532**(Pt 3): 583-593.
- Saegusa, H., Y. Matsuda and T. Tanabe (2002). "Effects of ablation of N- and R-type Ca(2+) channels on pain transmission." *Neurosci Res* **43**(1): 1-7.
- Sandoval, A., N. Oviedo, A. Tadmouri, T. Avila, M. De Waard and R. Felix (2006). "Two PEST-like motifs regulate Ca²⁺/calpain-mediated cleavage of the Cavbeta3 subunit and provide important determinants for neuronal Ca²⁺ channel activity." *Eur J Neurosci* **23**(9): 2311-2320.
- Sather, W. A. and E. W. McCleskey (2003). "Permeation and selectivity in calcium channels." *Annu Rev Physiol* **65**: 133-159.
- Seisenberger, C., V. Specht, A. Welling, J. Platzner, A. Pfeifer, S. Kuhbandner, J. Striessnig, N. Klugbauer, R. Feil and F. Hofmann (2000). "Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the

- L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse.* J Biol Chem **275**(50): 39193-39199.
- Singer, D., M. Biel, I. Lotan, V. Flockerzi, F. Hofmann and N. Dascal (1991). "The roles of the subunits in the function of the calcium channel." Science **253**(5027): 1553-1557.
- Snutch, T. P. and P. B. Reiner (1992). "Ca²⁺ channels: diversity of form and function." Curr Opin Neurobiol **2**(3): 247-253.
- Spaetgens, R. L. and G. W. Zamponi (1999). "Multiple structural domains contribute to voltage-dependent inactivation of rat brain alpha(1E) calcium channels." J Biol Chem **274**(32): 22428-22436.
- Splawski, I., K. W. Timothy, N. Decher, P. Kumar, F. B. Sachse, A. H. Beggs, M. C. Sanguinetti and M. T. Keating (2005). "Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(23): 8089-8096; discussion 8086-8088.
- Splawski, I., K. W. Timothy, L. M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P. J. Schwartz, R. M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S. G. Priori, M. C. Sanguinetti and M. T. Keating (2004). "Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism." Cell **119**(1): 19-31.
- Stanley, E. F. (1997). "The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face." Trends Neurosci **20**(9): 404-409.
- Stewart, S. L., K. Hogan, H. Rosenberg and J. E. Fletcher (2001). "Identification of the Arg1086His mutation in the alpha subunit of the voltage-dependent calcium channel (CACNA1S) in a North American family with malignant hyperthermia." Clin Genet **59**(3): 178-184.
- 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**(32): 24575-24582.
- Stotz, S. C. and G. W. Zamponi (2001). "Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca(2+) channels." Trends Neurosci **24**(3): 176-181.
- Striessnig, J. (2009). "An oily competition: role of beta subunit palmitoylation for Ca²⁺ channel modulation by fatty acids." J Gen Physiol **134**(5): 363-367.
- Sutton, K. G., J. E. McRory, H. Guthrie, T. H. Murphy and T. P. Snutch (1999). "P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A." Nature **401**(6755): 800-804.
- Takahashi, M., M. J. Seagar, J. F. Jones, B. F. Reber and W. A. Catterall (1987). "Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5478-5482.

- Takahashi, S. X., J. Miriyala, L. H. Tay, D. T. Yue and H. M. Colecraft (2005). "A CaVbeta SH3/guanylate kinase domain interaction regulates multiple properties of voltage-gated Ca²⁺ channels." J Gen Physiol **126**(4): 365-377.
- Takei, T., H. Saegusa, S. Zong, T. Murakoshi, K. Makita and T. Tanabe (2003). "Increased sensitivity to halothane but decreased sensitivity to propofol in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel." Neurosci Lett **350**(1): 41-45.
- Tanabe, T., B. A. Adams, S. Numa and K. G. Beam (1991). "Repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium channel activation kinetics." Nature **352**(6338): 800-803.
- Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose and S. Numa (1987). "Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle." Nature **328**(6128): 313-318.
- 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**(5): 1703-1708.
- Tomita, S., L. Chen, Y. Kawasaki, R. S. Petralia, R. J. Wenthold, R. A. Nicoll and D. S. Brecht (2003). "Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins." J Cell Biol **161**(4): 805-816.
- Tottene, A., S. Volsen and D. Pietrobon (2000). "alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties." J Neurosci **20**(1): 171-178.
- Triggle, D. J. (1999). "The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca²⁺ channels." Eur J Pharmacol **375**(1-3): 311-325.
- Van Petegem, F., F. C. Chatelain and D. L. Minor, Jr. (2005). "Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca²⁺/calmodulin complex." Nat Struct Mol Biol **12**(12): 1108-1115.
- Van Petegem, F., K. A. Clark, F. C. Chatelain and D. L. Minor, Jr. (2004). "Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain." Nature **429**(6992): 671-675.
- Van Petegem, F., K. E. Duderstadt, K. A. Clark, M. Wang and D. L. Minor, Jr. (2008). "Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaValpha1 AID-CaVbeta interaction site that is critical for channel modulation." Structure **16**(2): 280-294.
- Van Petegem, F. and D. L. Minor, Jr. (2006). "The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation." Biochem Soc Trans **34**(Pt 5): 887-893.

- Waithe, D., L. Ferron and A. C. Dolphin (2011). "Stargazin-related protein gamma(7) is associated with signalling endosomes in superior cervical ganglion neurons and modulates neurite outgrowth." J Cell Sci **124**(Pt 12): 2049-2057.
- Waithe, D., L. Ferron, K. M. Page, K. Chaggar and A. C. Dolphin (2011). "Beta-subunits promote the expression of Ca(V)2.2 channels by reducing their proteasomal degradation." J Biol Chem **286**(11): 9598-9611.
- Walker, D., D. Bichet, K. P. Campbell and M. De Waard (1998). "A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 1A subunit." J Biol Chem **273**(4): 2361-2367.
- Walker, D. and M. De Waard (1998). "Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function." Trends Neurosci **21**(4): 148-154.
- Wall-Lacelle, S., M. I. Hossain, R. Sauve, R. Blunck and L. Parent (2011). "Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)2.3 calcium channel." J Biol Chem **286**(31): 27197-27205.
- Wei, J. and G. P. Hemmings (2006). "A further study of a possible locus for schizophrenia on the X chromosome." Biochem Biophys Res Commun **344**(4): 1241-1245.
- Wheeler, D. B., A. Randall and R. W. Tsien (1994). "Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission." Science **264**(5155): 107-111.
- 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**(1): 71-84.
- Wu, X. S., H. D. Edwards and W. A. Sather (2000). "Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated Ca²⁺ channel." J Biol Chem **275**(41): 31778-31785.
- Yamakage, M. and A. Namiki (2002). "Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review." Can J Anaesth **49**(2): 151-164.
- Yasuda, T., L. Chen, W. Barr, J. E. McRory, R. J. Lewis, D. J. Adams and G. W. Zamponi (2004). "Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells." Eur J Neurosci **20**(1): 1-13.
- Yellen, G. (1998). "The moving parts of voltage-gated ion channels." Q Rev Biophys **31**(3): 239-295.
- Yifrach, O. and R. MacKinnon (2002). "Energetics of pore opening in a voltage-gated K(+) channel." Cell **111**(2): 231-239.
- Yoshii, M., A. Tsunoo and T. Narahashi (1988). "Gating and permeation properties of two types of calcium channels in neuroblastoma cells." Biophys J **54**(5): 885-895.

- Zagotta, W. N. and R. W. Aldrich (1990). "Voltage-dependent gating of Shaker A-type potassium channels in *Drosophila* muscle." J Gen Physiol **95**(1): 29-60.
- Zamponi, G. W. (2005). Voltage-gated calcium channels. Georgetown, Tex. New York, N.Y., Landes Bioscience/Eurekah.com ; Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Zamponi, G. W., P. Lory and E. Perez-Reyes (2010). "Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy." Pflugers Arch **460**(2): 395-403.
- Zeitz, C., R. Minotti, S. Feil, G. Matyas, F. P. Cremers, C. B. Hoyng and W. Berger (2005). "Novel mutations in *CACNA1F* and *NYX* in Dutch families with X-linked congenital stationary night blindness." Mol Vis **11**: 179-183.
- Zhang, J. F., P. T. Ellinor, R. W. Aldrich and R. W. Tsien (1994). "Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels." Nature **372**(6501): 97-100.
- Zhang, J. F., A. D. Randall, P. T. Ellinor, W. A. Horne, W. A. Sather, T. Tanabe, T. L. Schwarz and R. W. Tsien (1993). "Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons." Neuropharmacology **32**(11): 1075-1088.
- Zhang, Z., Y. He, D. Tuteja, D. Xu, V. Timofeyev, Q. Zhang, K. A. Glatter, Y. Xu, H. S. Shin, R. Low and N. Chiamvimonvat (2005). "Functional roles of *Cav1.3(alpha1D)* calcium channels in atria: insights gained from gene-targeted null mutant mice." Circulation **112**(13): 1936-1944.
- Zhuchenko, O., J. Bailey, P. Bonnen, T. Ashizawa, D. W. Stockton, C. Amos, W. B. Dobyns, S. H. Subramony, H. Y. Zoghbi and C. C. Lee (1997). "Autosomal dominant cerebellar ataxia (*SCA6*) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel." Nat Genet **15**(1): 62-69.
- 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**(6732): 159-162.
- Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, R. W. Tsien and H. Reuter (2000). " Ca^{2+} -sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca^{2+} channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(alpha)1C subunit." J Biol Chem **275**(28): 21121-21129.
- Zuhlke, R. D. and H. Reuter (1998). " Ca^{2+} -sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3287-3294.

