

Université de Montréal

Étude de l'organisation du système de transduction du signal
de l'endothéline dans le myocyte ventriculaire

par

Benoit Boivin

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biochimie

21 juillet 2005

©Benoit Boivin, 2005



W

4

U58

2006

v. 028

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude de l'organisation du système de transduction du signal
de l'endothéline dans le myocyte ventriculaire

présentée par:

Benoit Boivin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

D^r Nikolaus Heveker

président rapporteur

D^r Bruce Gordon Allen

directeur de recherche

D^r Simone Chevalier

membre du jury

D^r Stéphane Laporte

arbitre externe

RÉSUMÉ

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide contribuant à l'hypertrophie du myocarde. L'ET-1 agit via la liaison de deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) localisés à la membrane plasmique: ET_AR et ET_BR. Au niveau du cardiomyocyte, l'effet hypertrophique des ETR survient suite à l'activation des protéines kinases C (PKC) et de la cascade des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK). L'objectif de la présente thèse était d'étudier l'organisation et la localisation subcellulaire des composantes impliquées dans la transduction du signal de l'ET-1 contribuant au processus hypertrophique des cardiomyocytes adultes.

La présence d'un pool membranaire de PKC amorcées mais inactives a été détectée dans les cardiomyocytes adultes. Nous avons émis l'hypothèse qu'une dose physiologique d'ET-1 pourrait activer ce pool d'enzymes membranaires alors qu'une dose hypertrophique d'ET-1 causerait plutôt la translocation de l'enzyme vers les membranes et ainsi contribuer à l'action hypertrophique de l'hormone. Dans les cardiomyocytes intacts, toutes les doses d'ET-1 causaient la translocation de nPKC_e vers la fraction non-soluble. Par contre, l'ET-1 diminuait la présence et l'activité des PKC associées aux membranes. Ceci démontre que l'ET-1 régule le pool des PKC associées à la membrane. Cependant, ces résultats ne permettent pas de faire la distinction entre la signalisation physiologique de la signalisation hypertrophique de l'hormone.

Suite à deux études récentes portant sur les effets intracellulaires de l'ET-1 dans les cellules endothéliales vasculaires (Bkaily et coll., 2000; Sanchez et coll., 2002), nous avons examiné la localisation des ETR intracellulaires dans les cardiomyocytes adultes. La présence d'ETR a été détectée au niveau des noyaux des cardiomyocytes adultes. L'ET_AR était principalement localisé à la membrane plasmique de surface et des tubules-T, et une faible proportion était localisé aux membranes nucléaires. En contrepartie, la majorité des ET_BR étaient localisés aux noyaux. Par essais de liaisons

à l' [¹²⁵I]ET-1, le ratio ET_AR:ET_BR a été évalué à 3:1 dans les noyaux isolés de cœurs de rats adultes. La fonctionnalité des récepteurs nucléaires a été établie en démontrant qu'ils altéraient l'incorporation de ³²P de protéines nucléaires, et qu'ils provoquaient une augmentation transitoire de Ca²⁺ dans les noyaux isolés.

La localisation des ETR en divers compartiments cellulaires contribue à l'organisation de la voie de signalisation de l'ET-1. Les ETR ont été observés aux cavéoles (Chun et coll., 1994; Yamaguchi et coll., 2003). Or, leur localisation dans les cavéoles de cellules musculaires formées de cavéolines-3 n'a jamais été étudié. La localisation des ETR aux cavéoles et la présence de signalosomes préassemblés composés des protéines impliquées dans l'activation des MAPK ont été étudiées dans les cardiomyocytes adultes. Bien que la plupart des protéines étudiées étaient isolées dans des microsomes de propriété physique similaire aux cavéoles cardiaques, seules les protéines G $\alpha_{q/11}$, G α_{13} , G β et nPKC ϵ colocalisaient avec la cavéoline-3 en microscopie confocale. Donc, l'absence de colocalisation de la cavéoline-3 avec les protéines de la voie de signalisation des ETR suggère l'absence de signalosome préassemblé localisé aux cavéoles dans les cardiomyocytes adultes.

En conclusion, notre étude a permis de mieux comprendre l'organisation complexe de la transduction du signal de l'ET-1 et d'identifier une cible nucléaire de l'endothéline dans les cardiomyocytes. Ces résultats permettent d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels l'ET-1 peut causer l'hypertrophie des cardiomyocytes adultes.

Mots clés: Endothéline, hypertrophie, cœur, RCPG, MAPK, PKC, cavéole.

SUMMARY

ET-1 is a peptide involved in cardiac hypertrophy. ET-1 is thought to act through two plasmalemmal GPCRs: ET_AR and ET_BR. At the cardiomyocyte level, ETRs mediate their hypertrophic effect through the activation of PKCs and the MAPK cascade. The aim of the present study was to investigate the organization and subcellular localization of the ET-1 signal transduction components implicated in the adult cardiomyocyte hypertrophic process.

A pool of triggered but inactive membrane-associated PKCs was detected in adult rat cardiomyocytes. We hypothesized that low concentrations of ET-1 would activate the membrane-associated pool, whereas higher concentrations of ET-1 would cause translocation of the enzyme to membranes. Both high and low concentrations of ET-1 caused cytosolic nPKC ϵ to translocate to the particulate fraction in intact cardiomyocytes. In contrast, ET-1 decreased both total and active PKCs in the plasma membrane. Our results demonstrate that ET-1 regulates a pool of membrane-associated PKCs. However, they refute the hypothesis whereby activation of that membrane-bound pool can distinguish physiologic and hypertrophic signaling.

Two recent studies on intracellular effects of ET-1 in vascular endothelial cells (Bkaily et coll., 2000; Sanchez et coll., 2002) led us to investigate whether ETRs exist intracellularly within adult rat cardiomyocytes. Indeed, ETRs were detected on adult cardiomyocyte nuclei. ET_AR were primarily on surface and T-tubules plasma membrane, and to a lesser extent on the nuclear membranes. However, ET_BR localized primarily to the nuclei. The ET_AR:ET_BR ratio was approximated to 3:1 by specific [¹²⁵I]ET-1 binding on nuclei isolated from heart. Furthermore, nuclear ETRs were found to be functional, since addition of ET-1 to isolated nuclei increased ³²P incorporation into nuclear proteins and caused a transient increase in nuclear Ca²⁺ concentration. Hence, adult cardiomyocytes nuclei possess functional ETRs.

Besides the localization of ETRs on nuclear membranes, their presence in caveolar lipid rafts has previously been reported in other cell types (Chun et coll., 1994; Yamaguchi et coll., 2003), and offers a potential superior level of organization of this signaling pathway. However, in cardiomyocytes, caveolae are coated with a muscle-specific subtype of caveolin: caveolin-3. We investigated whether components of the ET-1 pathway leading to MAPK activation localize to caveolae and constitute preformed signalosomes. Although most proteins of the ET-1 signaling pathway were isolated in microsomes possessing similar physical properties as cardiac caveolae, confocal microscopy revealed that only $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{13}$, $G\beta$ and nPKC ϵ colocalized with caveolin-3 in intact cardiomyocytes. The lack of detectable colocalization of caveolin-3 with proteins within the ET-1 post-receptor signaling system argues against the presence of a preformed, caveolae-associated signalosome in adult myocytes.

In conclusion, the present study led us to increase our comprehension of the complex organization of the ET-1 signal transduction machinery and to identify a nuclear target of ET-1 in cardiac myocyte. These findings allow a better understanding of the mechanisms whereby ET-1 can cause cardiomyocyte hypertrophy.

Key words: Endothelin, hypertrophy, heart, GPCR, MAPK, PKC, caveolae.

TABLE DES MATIÈRES

Section	Page
Résumé	iii
Summary	v
Table des matières	vii
Liste des tables	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xvi
1. Introduction	1
1.1 Physiologie cardiaque	1
1.1.1 Historique de la pathophysiologie cardiovasculaire	1
1.1.2 Rôle et structure du cœur	2
1.1.3 Rôle des différents types cellulaires dans la fonction cardiaque ...	3
1.1.4 Rôle et structure des myocytes contractiles	5
1.1.5 Hyperplasie et hypertrophie du myocarde	6
1.1.6 Le cœur comme organe endocrine	7
1.2 Le système à endothéline	8
1.2.1 Les isoformes de l'endothéline	8
1.2.2 Les enzymes de conversion de l'endothéline.	9
1.2.3 L'endothéline au niveau cardiaque	12
1.2.4 Caractéristiques générales des récepteurs à l'endothéline	13
1.2.5 Les récepteurs à l'endothéline dans le myocarde	15
1.2.6 Pharmacologie moléculaire des récepteurs à l'endothéline	16
1.2.7 Localisation et dimérisation des récepteurs à l'endothéline	18
1.3 Transduction du signal de l'endothéline	20

1.3.1	Effecteurs des récepteurs à l'endothéline	20
1.3.2	Endothéline, Gq et hypertrophie	22
1.3.3	Activation des MAP kinases	23
1.3.4	La famille des PKC	26
1.3.5	PKC, un modèle d'activation par translocation	27
1.3.6	Régulation de PKC	30
1.3.7	Isoformes de PKC dans le myocarde	33
1.4	Organisation de la signalisation post-réceptorielle de l'endothéline.	35
1.4.1	Organisation des MAP kinases et de PKC par des protéines échafauds	35
1.4.2	Modules préassemblés: interactions, régulations et rôles potentiels.	39
1.4.3	Signalisation dans les radeaux lipidiques	42
1.5	Problématique	45
1.6	Objectifs du projet de recherche	46
2.	Article #1	48
2.1	Abstract	50
2.2	Introduction	51
2.3	Materials and methods	53
2.4	Results	58
2.5	Discussion	62
2.6	Acknowledgements	67
2.7	Bibliography	68
2.8	Figure legends	72
2.9	Figures	76
3.	Article #2	81
3.1	Summary	83
3.2	Introduction	84

3.3	Experimental procedures	87
3.4	Results	95
3.5	Discussion	103
3.6	Acknowledgments	108
3.7	Bibliography	109
3.8	Figure legends	117
3.9	Figures	122
4.	Article #3	131
4.1	Summary	133
4.2	Introduction	134
4.3	Materials and methods	137
4.4	Results	142
4.5	Discussion	152
4.6	Acknowledgments	156
4.7	Bibliography	158
4.8	Figure legends	167
4.9	Figures	172
5.	Discussion	179
6.	Conclusion	193
7.	Bibliographie	195

LISTE DES TABLES

Table #	Description	Page
I	Classification des protéines kinases de la superfamille AGC	32
II	Effect of PMA and Bis upon the relative rates of phosphate incorporation into peptide ϵ and MBP ₃₋₁₄ by membrane- associated PKC	74

LISTE DES FIGURES

Figure #	Description	Page
1	Structures principales du cœur humain	3
2	Maturation des prépro-endothélines	10
3	Structure primaire de l'ET _A R humain	15
4	Effecteurs impliqués dans la signalisation de l'endothéline	21
5	Voie de signalisation impliquée dans l'hypertrophie cardiaque induite par l'ET-1	25
6	Structure des domaines des sous-familles de PKC	26
7	Modèle d'activation par translocation des PKC	27
8	Modèle d'activation des PKC associées aux membranes	30
Article # 1		
1	The cofactor-dependence of membrane-associated PKC activity is affected by the nature of the substrate	76
2	ET-1 and PMA produce different patterns of PKC activation	77
3	ET-1 and PMA trigger different patterns of PKC ϵ translocation . . .	78
4	Effect of ET-1 concentration upon the translocation of membrane- associated PKC ϵ	79
5	PMA- and ET-1-stimulate the translocation of PKC ϵ from the cytosolic to the particulate fraction	80
Article # 2		
1	Localization of endothelin receptors in canine cardiac membranes .	122
2	Confocal immunofluorescent images of the distribution of the endothelin ET _A receptor subtype in adult rat ventricular myocytes .	123
3	Confocal immunofluorescent images of the distribution of the endothelin ET _B receptor subtype in adult rat ventricular myocytes .	124

Figure #	Description	Page
4	Endothelin receptor immunoreactivity in isolated cardiac nuclei . . .	126
5	[¹²⁵ I]ET-1 binding to isolated cardiac nuclei and displacement by nonradioactive peptides	127
6	[¹²⁵ I]IRL-1620 binding to isolated cardiac nuclei	128
7	The effect of endothelin receptor agonists on protein phosphorylation in isolated nuclei	129
8	Effects of endothelin receptor agonists on Ca ²⁺ transients in isolated cardiac nuclei	130
Article # 3		
1	Endothelin signalling pathway	172
2	Localization of caveolins in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes	173
3	Localization of endothelin receptors in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes	174
4	Localization of heterotrimeric GTP-binding proteins in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes	175
5	Localization of phospholipase C-β1 and protein kinase C-ε in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes	176
6	Localization of GTP-binding proteins of the Ras subfamily in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes	177
7	Localization of protein kinases from the ERK cascade in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes	178

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc:	Acide déoxyribonucléique complémentaire
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
aPKC:	PKC atypique
ARNds:	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
AT ₁ R:	Récepteurs de type 1 à l'angiotensine
β ₂ AR:	Récepteurs β ₂ adrénergiques
BET:	Grosse endothéline
Ca ²⁺ :	ions calcium
Cav:	Cavéoline
cPKC:	PKC conventionnelle
DAG:	Diacylglycérol
ECE:	Enzyme de conversion de endothéline
Erk1/2:	Protéine kinase régulée par signaux extracellulaires
ET:	Endothéline
ET _A R:	Sous-type A des récepteurs à l'endothéline
ET _B R:	Sous-type B des récepteurs à l'endothéline
ET _C R:	Sous-type C des récepteurs à l'endothéline
ETR:	Récepteur à l'endothéline
GDP:	Guanosine-diphosphate
GMPc:	Guanosine-monophosphate cyclique
GTP:	Guanosine-triphosphate
HSP:	Protéine de choc thermique
InsP ₃ :	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP ₃ R:	Récepteur à InsP ₃

LISTE DES ABRÉVIATIONS (suite)

JNK ^{MAPK} :	Kinase N-terminale de cJun
KSR:	Kinase suppresseur de Ras
MAPK:	Protéine kinase activé par les mitogènes
MAPKK:	MAPK kinase
MAPKKK:	MAPK kinase kinase
Mek1/2:	MAPK-Erk kinase 1/2
MK:	Kinase activée par MAPK
MKP:	MAP kinase phosphatase
MP1:	Partenaire de Mek 1
NHE:	Échangeur Na/H
nPKC:	PKC nouvelle
PAK:	Kinase activée par p21
Pep-ε:	Substrat peptidique dérivé du pseudosubstrat de nPKCε
PH:	Homologie plekstrine
PKC:	Protéine kinase C
PLA ₂ :	Phospholipase A ₂
PLC:	Phospholipase C
PLD:	Phospholipase D
PMA:	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PP:	Protéine phosphatase
PRK:	Kinase apparentée aux PKCs
Protéine-G:	Protéines hétérotrimériques dépendantes du nucléotide guanosine
Pser/thrKinase:	Protéine kinase à sérine/théonine
PtdIns(4,5)P ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PTP:	Phosphotyrosine protéine phosphatase

LISTE DES ABRÉVIATIONS (suite)

PtyrKinase:	Protéine tyrosine kinase
RACK:	Récepteur à kinase-C activée
RCPG:	Récepteurs couplés aux protéines-G
RE:	Réticulum endoplasmique
RICK:	Recepteurs à kinase-C inactive
Tubules-T:	Tubules transverses

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement mon superviseur le D^r Bruce Allen qui a été un véritable mentor et ami ces dernières années. Je tiens spécialement à le remercier de m'avoir donné ma chance et de m'avoir laissé une grande liberté intellectuelle tout en m'appuyant de son expertise technique. Les nombreuses discussions étaient stimulantes et elles sûrent nourrir ma curiosité.

Je tiens aussi à remercier spécialement le D^r Terence Hébert pour son amitié, sa générosité et avec qui les discussions furent toutes aussi intéressantes, et ce à de nombreux sujets. Certains collègues et amis, nommément D^r Stéphane Pelletier, M. Louis Villeneuve, D^r Nadia Abdelaziz, M^{me} Louise Paquet, M^{me} Annie Tremblay, D^r Frédéric Massicotte, D^r Pascal Amireault, M^{me} Malika Hasnaoui et D^r Anne-Marie Bleau ont aussi eu leur rôle à jouer dans l'élaboration de ces travaux et ils ont su rendre ces dernières années agréables par leur présence.

Je tiens à remercier la Fondation de la Recherche en Santé du Québec et le Fond de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui m'ont supporté financièrement pendant mes études graduées.

Finalement, je tiens à remercier les membres du laboratoire, ma famille et mes proches qui m'ont enduré et encouragé ces dernières années. J'ose espérer qu'ils se reconnaîtront.

« On doit croire à la raison tant que ses démonstrations s'accordent avec les faits perçus par les sens; mais lorsque le fait apparaîtra assez prouvé par eux, il faudra leur accorder plus de créance qu'à la raison. »

Aristote

1. INTRODUCTION

1.1 PHYSIOLOGIE CARDIAQUE

1.1.1 Historique de la pathophysiologie cardiovasculaire

Depuis le concept du cœur comme siège de la conscience selon la doctrine Ayurvédique à celui de fournaise du sang émis par Galien, notre conception du cœur comme pompe musculaire éjectant le sang a des origines somme toute récentes dans l'histoire de la médecine (Sournia, 1992). C'est d'abord William Harvey (1578-1657), dans son ouvrage de 1628, *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*¹, qui décrit le premier le système circulatoire sanguin. Puis, de ces observations initiales découle l'œuvre du père de l'anatomopathologie moderne, Giovanni Battista Morgagni (1682-1771), *De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis libri quinque*², publiée en 1761. Les écrits de Morgagni enrichissent la médecine et la cardiologie de l'époque par les 700 descriptions anatomiques de cas cliniques. En ce sens, l'importance de Morgagni en cardiologie tient principalement à ce qu'il fût le premier à reconnaître et à associer le processus adaptatif de l'hypertrophie cardiaque en conséquence aux divers paradigmes de pathologie anatomique et de physiologie circulatoire (Katz, 1998). L'hypertrophie cardiaque fût subséquemment décrite et divisée en deux anomalies morphologiques distinctes nommées anévrismes « actif » et « passif » par Jean Nicolas Corvisart (1755-1821). Ces cardiomyopathies, dont il sera question plus tard, sont désormais nommées hypertrophie cardiaque adaptative et hypertrophie dilatée. La suite des événements menant à la caractérisation de la défaillance cardiaque survient

¹ Études anatomiques sur le mouvement du cœur et du sang chez les animaux

² Le siège et les causes des maladies démontrés par l'anatomie

principalement au vingtième siècle. Tout d'abord, il y a l'avènement de l'hémodynamie cardiaque (Wiggers, 1928), puis la compréhension du rôle du calcium dans le processus de contraction du cœur défaillant. Ces dernières études biochimiques et biophysiques ont eu lieu vers la fin des années 1960 (Spann et coll., 1967). Au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle, une compréhension génétique et moléculaire de l'hypertrophie cardiaque a introduit le dernier paradigme, encore valide à ce jour, celui de cardiomyopathies qui se développent en conséquence à des facteurs génétiques ou environnementaux induisant un patron d'expression de protéines qui participent au développement de la maladie.

1.1.2 Rôle et structure du cœur

Le cœur est une pompe musculaire qui éjecte le sang et le propulse dans l'appareil circulatoire. Il permet l'apport en nutriments, hormones et seconds messagers ainsi que le retrait de déchets des organes irrigués. Le muscle cardiaque (myocarde) jouant un rôle primordial, tous les aspects relatifs à sa fonction comme la taille, l'utilisation d'énergie ou le couplage excitation-contraction en sont régulés de façon efficace. Le cœur est composé de quatre chambres distinctes: l'oreillette droite, l'oreillette gauche, le ventricule droit et le ventricule gauche (Fig. 1). De ces cavités, seules les oreillettes communiquent avec les ventricules, et elles en sont séparées par les valves auriculo-ventriculaires. L'oreillette droite est séparée du ventricule droit par la valve tricuspide, alors que la valve mitrale est située entre les cavités de l'oreillette et du ventricule gauche (Grant, 1965; Katz, 2001).

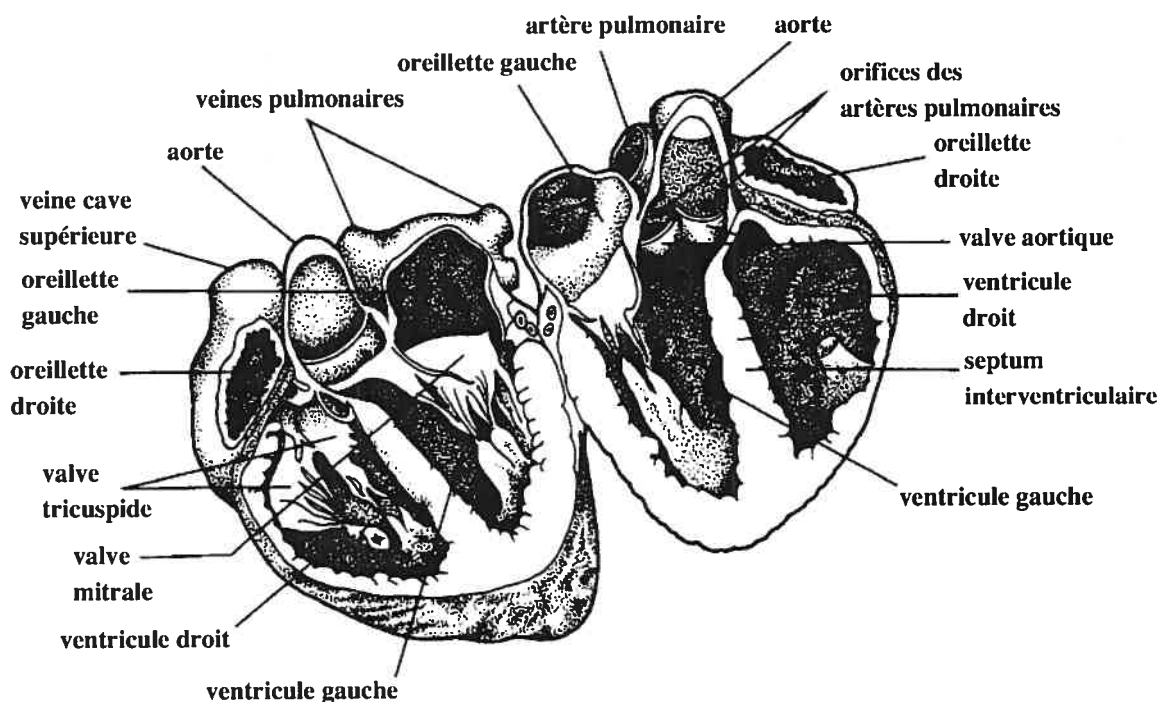


Figure 1. Structures principales du cœur humain. (Adapté de Katz, A.M., 2001)

1.1.3 Rôle des différents types cellulaires dans la fonction cardiaque

La contraction cardiaque est initiée par les cellules *pacemakers* situées au nœud sino-auriculaire. La contraction est donc amorcée par les oreillettes. S'ensuit une étape de dépolarisation plus lente lors de la transition *via* les cellules du nœud auriculo-ventriculaire, puis les ventricules se contractent à leur tour suite à la propagation de l'influx électrique par les jonctions-gap des disques intercalaires des cellules musculaires cardiaques (myocytes cardiaques, cardiomyocytes) (Bers, 1991).

Le cœur est composé de plusieurs types cellulaires distincts. Les cavités auriculaires et ventriculaires sont couvertes d'une couche de cellules, dites de l'endocarde, sous laquelle sont situées des couches de collagène et de fibres élastiques ainsi qu'une couche rudimentaire de cellules de muscle lisse. La surface

cardiaque est, quant à elle, couverte d'une couche cellulaire dite de l'épicaarde, sous laquelle se trouve une couche de tissu conjonctif similaire à celle située sous l'endocarde. C'est entre ces deux couches que se situe le myocarde. Celui-ci est composé des myocytes, de fibroblastes, de cellules de muscle lisse vasculaire et de cellules endothéliales. Bien que les myocytes cardiaques représentent près de la totalité de la masse cardiaque, ils ne composent environ que le tiers des cellules du cœur (Katz, 2001; McNutt et coll., 1974).

Il existe plusieurs phénotypes de myocytes. Le cœur est principalement composé de trois types de cardiomyocytes: les myocytes auriculaires, les myocytes ventriculaires et les myocytes formant la fibre excitatrice et conductrice. Les plus abondants sont les myocytes contractiles des oreillettes et des ventricules. Parmi ceux-ci, il est possible de distinguer les myocytes des oreillettes, plus petit en diamètre que ceux des ventricules. La fonction contractile des myocytes est présentée plus en détails à la section 1.1.4. Les autres myocytes composant la fibre excitatrice dictent la rythmicité des dépolarisations à la source de la zone *pacemaker* du nœud sino-auriculaire. Ces myocytes forment un anneau de cellules se dépolarisant spontanément, localisé à la jonction de la veine cave supérieure et de l'oreillette droite. Les cardiomyocytes *pacemakers* dictent le rythme cardiaque et contribuent peu à la force de contraction puisqu'ils possèdent peu de myofilaments contractiles (myofibrilles). Les fibres conductrices, ou fibres de Purkinje, forment le faisceau d'His et les ramifications des faisceaux vers les ventricules. Leur rôle est celui de conducteurs rapides de la dépolarisation du nœud auriculo-ventriculaire vers les ventricules. Comme les myocytes *pacemakers*, ces cellules possèdent peu de myofibrilles et ne participent pas à la force de contraction (Bers, 1991; Guyton et coll., 1996; Katz, 2001).

1.1.4 Rôle et structure des myocytes contractiles

La contraction des chambres du cœur survient grâce à la diffusion ordonnée des potentiels d'action à travers le myocarde. Chacune des vagues d'excitation électrique se répand rapidement au long des membranes plasmiques des myocytes adjacents, déclenchant la relâche d'ions calcium du réticulum sarcoplasmique stimulant *de facto* la contraction des myofibrilles des myocytes contractiles. L'intégration électrique et mécanique de chaque cardiomyocyte est accomplie par les jonctions-gap des disques intercalaires. Ce sont ces régions spécialisées de la membrane plasmique qui lient les cardiomyocytes en un syncytium continu et permettent une diffusion relativement libre d'ions et donc du potentiel d'action. Les myofibrilles, organisées en striations régulières, sont composées de filaments d'actine et de myosine qui s'entrecroisent de façon à glisser les uns sur les autres lors de la contraction. Le cardiomyocyte se contracte environ trois milliards de fois lors d'une vie moyenne (Severs, 2000). Ceci explique que la majeure partie de ce type de cardiomyocyte soit composée de myofibrilles et de mitochondries (Katz, 2001). Outre ces deux composantes importantes des myocytes contractiles, il y a aussi la membrane plasmique et son prolongement intracellulaire formant un système de tubules transverses (tubules-T) permettant de séparer le cytosol du milieu extracellulaire. Le système de tubules-T est intimement lié aux membranes intracellulaires du réticulum sarcoplasmique. Finalement, la présence de deux noyaux est une caractéristique intéressante des cardiomyocytes ventriculaires adultes (Katz, 2001; Severs, 2000).

1.1.5 Hyperplasie et hypertrophie du myocarde

Il existe deux types de croissance possible pour le myocarde. Le premier type de croissance survient lors du développement embryonnaire. Dans ce cas, des cellules provenant du mésoderme s'engagent dans une voie menant à la lignée des cellules du muscle cardiaque et ultimement à la formation du tube cardiaque primordial (Harvey, 2002; Olson, 2001). Avant le neuvième jour embryonnaire, le tube cardiaque est une structure possédant des oreillettes et des ventricules minces et indistincts. Par la suite, la prolifération de cellules cardiaques, spécifique au développement embryonnaire, complète la septation. C'est au moment de la septation, dont la croissance cellulaire est caractéristique de l'hyperplasie, que sont formées des chambres cardiaques distinctes. Ensuite, différentes phases de prolifération des cardiomyocytes donnent lieu à l'épaississement des parois cardiaques. À cette étape de prolifération, les cellules souches du myocarde se spécialisent en différents types cellulaires mentionnés à la section 1.1.3: des myocytes contractiles, pulsatiles, conducteurs, de même qu'en cellules dites de transition entre les myocytes des fibres et les myocytes contractiles (Olson et coll., 2003). Cette phase initiale de prolifération diminue progressivement au cours des dernières phases de la gestation et s'achève définitivement à la naissance (MacLellan et coll., 2000). Il est intéressant de noter que l'hyperplasie survenant *in utero* est classique dans la mesure où la cytokinèse et la karyokinèse ont lieu simultanément, tandis qu'une seconde phase de synthèse d'ADN est aussi détectée 4 à 6 jours *post-partum*, et correspond à une phase de binucléation des cardiomyocytes (Soonpaa et coll., 1996). Il est généralement admis qu'après cette première phase de prolifération, les cardiomyocytes sortent du cycle cellulaire et deviennent des cellules différenciées terminales. À ce jour, le processus de retrait du cycle cellulaire demeure incompris. Cependant, le dogme selon lequel toutes les cellules cardiaques sont retirées du cycle

cellulaire a récemment été remis en question par la découverte de cellules souches cardiaques (Anversa et coll., 1998a; Anversa et coll., 1998b).

L'hypertrophie est la seconde forme de croissance du myocarde. Elle est caractérisée par une augmentation de la masse cardiaque. Contrairement à la première phase d'hyperplasie, l'hypertrophie est un phénomène adaptatif survenant lorsque les cardiomyocytes sont continuellement exposés à une augmentation des stimuli de leur environnement tels que le stretch mécanique provoqué par une surcharge hémodynamique, et/ou à la suite d'une plus grande exposition à des facteurs neurohormonaux. De tels stimuli augmentent le contenu protéique des cardiomyocytes sans toutefois qu'il y ait cytokinèse ou karyokinèse (Hunter et coll., 1999a; Swynghedauw, 1999). À cet égard, l'augmentation en contenu protéique des cardiomyocytes est caractérisée par le retour d'un patron d'expression protéique de type embryonnaire (Chien et coll., 1993; Schiaffino et coll., 1989). Par ailleurs, en accord avec la loi de Laplace, les protéines exprimées à cette étape contribuent temporairement, par l'augmentation du nombre d'unités contractiles (Schreiber et coll., 1970), à réduire le stress imposé à la paroi cardiaque lorsqu'il y a augmentation de la charge de travail (Swynghedauw, 1999). Ainsi, l'augmentation de la masse cardiaque est le reflet de l'hypertrophie au niveau du cardiomyocyte.

1.1.6 Le cœur comme organe endocrine

Le cœur est non seulement une pompe, mais également un organe endocrine. Il est entre autre capable de produire les peptides natriurétiques (Marie et coll., 1976), l'angiotensine II (Lindpaintner et coll., 1990), l'aldostérone (Silvestre et coll., 1998), les catécholamines (Bristow et coll., 1992; Chidsey et coll., 1966), l'ET-1 (Yorikane et coll., 1993), la bradykinine (Baumgarten et coll., 1993), le facteur de croissance transformant- β (Takahashi et coll., 1994) et la cardiotropine-1 (Ishikawa et coll.,

1996). Manifestement, certaines de ces hormones participent à l'hypertrophie du cardiomyocyte (Swynghedauw, 1999). Cependant, puisque l'hypertrophie peut survenir lorsque les récepteurs adrénergiques sont antagonisés ou à la suite d'une sympathectomie (Cooper et coll., 1985), il est probable que le stretch mécanique soit lui-même responsable de l'hypertrophie cardiaque causée par une surcharge hémodynamique. À cet égard, il est intéressant de souligner que plusieurs des facteurs de croissance ci-mentionnés, dont l'ET-1 (Arai et coll., 1995; Yamazaki et coll., 1996a), sont régulés à la hausse lors de stretch ou de surcharges hémodynamiques (Ruwhof et coll., 2000; Sadoshima et coll., 1997; Swynghedauw, 1999).

1.2 LE SYSTÈME À ENDOTHÉLINE

1.2.1 Les isoformes de l'endothéline

L'endothéline a tout d'abord été caractérisée comme agent peptidergique provenant de l'endothélium dont la présence dans le milieu de culture causait une contraction lente et durable des cellules musculaires lisses (Hickey et coll., 1985; Rubanyi et coll., 1994; Yanagisawa et coll., 1988b). Par l'analyse de séquences génomiques de l'humain, trois gènes codant pour trois précurseurs d'endothélines distinctes ont été identifiés (Inoue et coll., 1989a; Inoue et coll., 1989b). Chez l'humain, les gènes de l'ET-1, ET-2 et ET-3 sont respectivement localisés sur le chromosome 6, 1 et 20 (Arinami et coll., 1991). La famille des endothélines est synthétisée sous forme de prépro-peptides de grandes tailles (c.à.d. ET-1: 203 acides aminés) qui sont clivés au niveau de sites dibasiques par des endopeptidases de type furine de la famille des subtilisines (Blais et coll., 2002) pour former un pro-peptide

de 37-41 acides aminés 140 fois moins actif que la forme mature de l'endothéline (Fig. 2). Les formes pro-peptidiques des endothélines, ou BET (*Big-Endothelin*), sont ensuite clivées en peptides matures au niveau du résidu tryptophane, conservé dans les trois BET en position 21 par des métalloendopeptidases membranaires à zinc de la superfamille des néprilysines nommées enzymes de conversion de l'endothéline (ECE) (Hooper, 1994; Pinet, 2004; Rubanyi et coll., 1994). Les trois endothélines sont composées de 21 acides aminés, de deux ponts disulfures en amino-terminal et d'une région carboxy-terminale hydrophobe. Les isopeptides possèdent des résidus identiques en dix positions dont quatre résidus cystéines (positions 1, 3, 11 et 15), un acide aspartique (position 8 et 18), un acide glutamique (position 10), une histidine (position 16), une isoleucine (position 20), ainsi qu'un tryptophane (position 21).

1.2.2 Les enzymes de conversion de l'endothéline

Le précurseur prépro-ET-1 (212 a.a.) est régulé par clivages successifs en pro-ET-1 (38 a.a.) et en un peptide de 21 acides aminés possédant un effet vasomoteur: l'ET-1. À ce jour, trois enzymes de conversion ont été identifiées: l'ECE-1 (Shimada et coll., 1994; Xu et coll., 1994), l'ECE-2 (Emoto et coll., 1995) et l'ECE-3 (Hasegawa et coll., 1998a). L'ECE-1 et l'ECE-2 possèdent plus d'affinité envers la BET-1 qu'envers les BET-2 et BET-3 alors que ECE-3 possède plus d'affinité envers la BET-3 (D'Orléans-Juste et coll., 2003; Hasegawa et coll., 1998a). L'ECE-1 a une activité peptidasique optimale à pH neutre (Xu et coll., 1994). Elle est exprimée dans un grand nombre de cellules, notamment les cellules endothéliales (Takahashi et coll., 1995), les cellules du muscle lisse (Hioki et coll., 1991), les cellules neuronales (Barnes et coll., 1997), ainsi que dans les cardiomyocytes (Ergul et coll., 2000). De

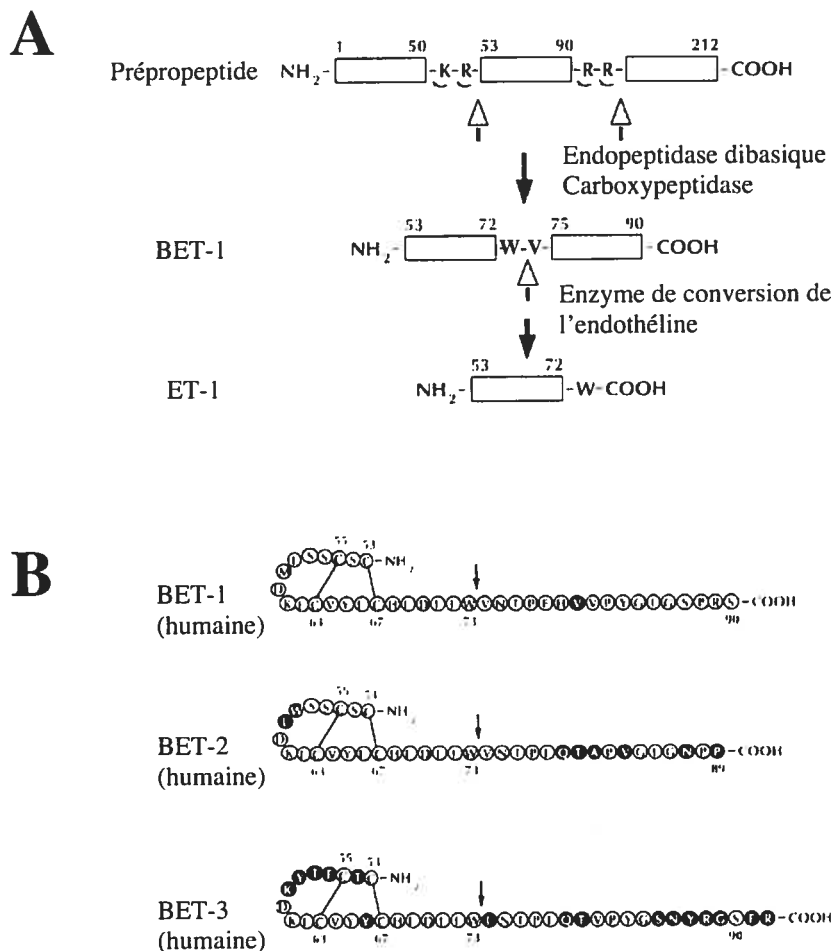


Figure 2. Maturation des prépro-endothélines. A) Le prépropeptide-ET-1 humain de 212 acides aminés est clivé à deux sites par une endopeptidase dibasique (flèches, en haut), suivi par l'action d'une carboxypeptidase (petites flèches courbées) pour obtenir la pro-ET-1, ou BET-1 (*big*-ET-1) (au centre). BET-1 est ensuite clivée par l'ECE (flèche) entre le lien Tryptophane⁷³ (W⁷³) et Valine⁷⁴ (V⁷⁴) afin d'obtenir un peptide-ET-1 de 21 acides aminés (53-73). B) Les séquences d'acides aminés des trois isoformes humaines de l'endothéline. Les flèches indiquent le site de clivage de l'ECE. (● représente les acides aminés différents de la séquence originalement identifiée chez le porc (Yanagisawa et coll., 1988a; Yanagisawa et coll., 1988b)) (Adapté de Rubanyi, G.M., 1994)

plus, quatre variants d'épissages de l'ECE-1 humaine ont été mis en évidence: ECE-1a (Shimada et coll., 1995), ECE-1b (Shimada et coll., 1995), ECE-1c (Schweizer et coll., 1997) et ECE-1d (Valdenaire et coll., 1999). Les délétions sont toutes localisées en région amino-terminale et dictent possiblement la localisation cellulaire de l'enzyme. En effet, il a été démontré que les deux isoformes de plus grande taille, soit l'ECE-1b et l'ECE-1d, pouvaient former des dimères et influencer la localisation des deux autres isoformes aux endosomes de recyclages ainsi qu'aux endosomes tardifs (Muller et coll., 2003).

L'ECE-2 est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, les astrocytes et les macrophages (Davenport et coll., 2000). L'ARNm de l'ECE-2 a aussi été détectée dans le cœur en développement au niveau du mésenchyme de l'endocarde (Yanagisawa et coll., 2000). Comme dans le cas de l'ECE-1, quatre variants d'épissage ont été mis en évidence: ECE-2a-1, ECE-2a-2, ECE-2b-1, et ECE-2b-2. Ces isoformes épissées en région amino-terminale possèdent une localisation subcellulaire distincte (Ikeda et coll., 2002).

L'ECE-3 a été purifiée de microsomes de l'iris bovins (Hasegawa et coll., 1998b) mais elle n'a jamais été clonée. Cependant, il est intéressant de noter que des souris doublement invalidées pour les gènes de l'ECE-1 et de l'ECE-2 peuvent encore produire un niveau similaire d'endothélines matures (Yanagisawa et coll., 2000). Ces résultats supposent la présence d'une troisième isoforme d'ECE ou encore une redondance de sélectivité de substrat de la part d'autres endopeptidases. Dans le même ordre d'idée, d'autres enzymes apparentées aux ECEs ont récemment été identifiées (Ikeda et coll., 1999; Lee et coll., 1999; Schweizer et coll., 1999). Pour l'heure, ces enzymes n'ont pas de rôle déterminé mais elles pourraient avoir un rôle compensatoire chez les souris doublement invalidées ECE-1^{-/-} et ECE-2^{-/-}.

1.2.3 L'endothéline au niveau cardiaque

Bien que les cellules endothéliales soient la principale source d'ET-1 *in vivo* et que l'ET-1 ait initialement été identifiée comme un agent peptidergique vasoconstricteur très puissant (Hickey et coll., 1985), la présence d'un système à endothéline complexe émerge au niveau du myocyte cardiaque. Tel que mentionné à la section 1.1.6, l'ET-1 est présente dans le cœur (Yorikane et coll., 1993) et au niveau du cardiomyocyte (Arai et coll., 1995; Yamazaki et coll., 1996a). L'ET-2 est la moins étudiée des endothélines. Néanmoins, il a été rapporté qu'elle était aussi présente dans les tissus cardiovasculaires et qu'elle pouvait provoquer la vasoconstriction d'une façon aussi puissante que l'ET-1 dans les artères et les veines (Maguire et coll., 1995). L'ET-3, quant à elle, n'est pas synthétisée dans les cellules endothéliales, mais sa présence a été détectée dans le plasma sanguin (Matsumoto et coll., 1994) et dans d'autres tissus dont le cœur et le cerveau (Davenport, 2002).

Chacun de ces peptides possède un large spectre d'activités pharmacologiques dans divers tissus (Rubanyi et coll., 1994). Dans le cœur, l'ET-1 agit comme agent inotrope positif (Baydoun et coll., 1989; Firth et coll., 1990; Kelly et coll., 1990), chronotrope positif (Ishikawa et coll., 1988), prolonge le potentiel d'action (Watanabe et coll., 1989a; Watanabe et coll., 1989b), et peut mener au remodelage cardiaque lors de l'hypertrophie (Concas et coll., 1989; Ishikawa et coll., 1988; Kelly et coll., 1990; Lovenberg et coll., 1990; Moravec et coll., 1989; Shubeita et coll., 1990; Simonson et coll., 1991), l'infarctus du myocarde (Nguyen et coll., 1998) et la défaillance cardiaque congestive (Cody et coll., 1992).

Tout comme les cellules endothéliales, les myocytes possèdent deux voies de relâche de l'endothéline. Dans les myocytes néonataux, et dans les myocytes ventriculaires adultes, la relâche d'ET-1 se produit de façon constitutive (Suzuki et coll., 1993; Thomas et coll., 1996), et peut être régulée rapidement (c.-à-d. <10 min.)

en réponse à un stretch cyclique (Yamazaki et coll., 1996b) ou à la suite d'une stimulation électrique (Thomas et coll., 1996). Il est intéressant de noter que deux des variants d'épissage de l'ECE-1, soit l'ECE-1a et l'ECE-1c, sont non seulement présents dans les cardiomyocytes adultes (Ergul et coll., 2000), mais aussi que l'expression de l'ECE-1c est quintuplée dans les myocytes de cœurs défailants (Ergul et coll., 2000). De telles observations suggèrent que les myocytes cardiaques, comme les cellules endothéliales, possèdent un système local de synthèse, de maturation, d'entreposage et de relâche de l'endothéline (Russell et coll., 2000). Dans le cas des cellules endothéliales, l'ET-1 est entreposée dans les vésicules de Weibel-Palade (Russell et coll., 1998), mais de telles vésicules d'entreposage n'ont pas encore été identifiées dans les cardiomyocytes.

1.2.4 Caractéristiques générales des récepteurs à l'endothéline

Actuellement, deux sous-types de récepteurs aux endothélines ont été clonés chez les mammifères (Arai et coll., 1990; Sakurai et coll., 1990). Le sous-type A des récepteurs à l'endothéline, les ET_AR, sont principalement exprimés par les cellules de muscle lisse et leur stimulation cause une vasoconstriction prolongée (Seo et coll., 1994). Le sous-type B des récepteurs à l'endothéline, les ET_BR, est quant à lui majoritairement exprimé par les cellules endothéliales et leur stimulation cause une vasodilatation transitoire (de Nucci et coll., 1998). Les ETR sont des récepteurs qui possèdent sept régions hydrophobes composés de 20-27 acides aminés: ils appartiennent donc à la super famille des récepteurs membranaires à sept domaines transmembranaires pouvant coupler les protéines-G hétérotrimériques (RCPG). Basé sur leur homologie de structure avec les autres membres de la superfamille des RCPG, les ETR, comme la majorité des RCPG, font partie des récepteurs de classe A. Les deux sous-types d'ETR possèdent une homologie de séquence de 59 % (Fig. 3)

(Rubanyi et coll., 1994). Les ETR démontrent également quelques variations de séquence entre les espèces. Par exemple, la séquence diffère de 9 % entre l'ET_AR chez l'humain et le rat, tandis que l'ET_BR varie de 12 % entre ces deux mêmes espèces (Davenport, 2002). Chez l'humain, le gène de l'ET_AR est localisé sur le chromosome 4, alors que le gène de l'ET_BR est localisé sur le chromosome 11 (Rubanyi et coll., 1994). Un troisième sous-type ET_CR a également été cloné chez la grenouille *Xenopus laevis* (Karne et coll., 1993). Toutefois, à ce jour, aucune technique de biologie moléculaire et aucun essai de liaison n'a permis l'identification d'un tel récepteur chez les mammifères (Davenport, 2002).

Les ETR sont pharmacologiquement distincts. L'ET_AR possède une sélectivité de ligand qui diffère de celle de l'ET_BR. De fait, l'ET_AR est sélectif pour ET-1 ≥ ET-2 > ET-3, alors que l'ET_BR ne possède aucune sélectivité envers ses agonistes. Ainsi, l'ET-3 est un agoniste sélectif envers l'ET_BR. De plus, il est aussi possible de distinguer les sous-types d'ETR par l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques spécifiques (Allen et coll., 2003; Sokolovsky, 1991). D'une façon générale, la liaison de l'agoniste induit un changement de conformation du récepteur qui perturbe une forte interaction ionique entre les troisième et sixième passages transmembranaires (Ballesteros et coll., 2001; Shapiro et coll., 2002) ce qui facilite l'activation de la protéine-G hétérotrimérique. Quant aux ETR, ils peuvent coupler différentes protéines-G hétérotrimériques (Jouneaux et coll., 1994; Kitamura et coll., 1999; Okamoto et coll., 1997; Takagi et coll., 1995), et ce d'une façon différente selon le ligand utilisé (Shraga-Levine et coll., 2000). En général, les ETR possèdent des affinités envers leurs ligands respectifs dans l'ordre du nanomolaire (Rubanyi et coll., 1994). Cependant, un site de haute affinité (c.-à-d. picomolaire) a aussi été rapporté, et ces récepteurs possédant ce site de haute affinité sont différemment couplés aux voies de signalisation (Sokolovsky et coll., 1992). Finalement, des essais

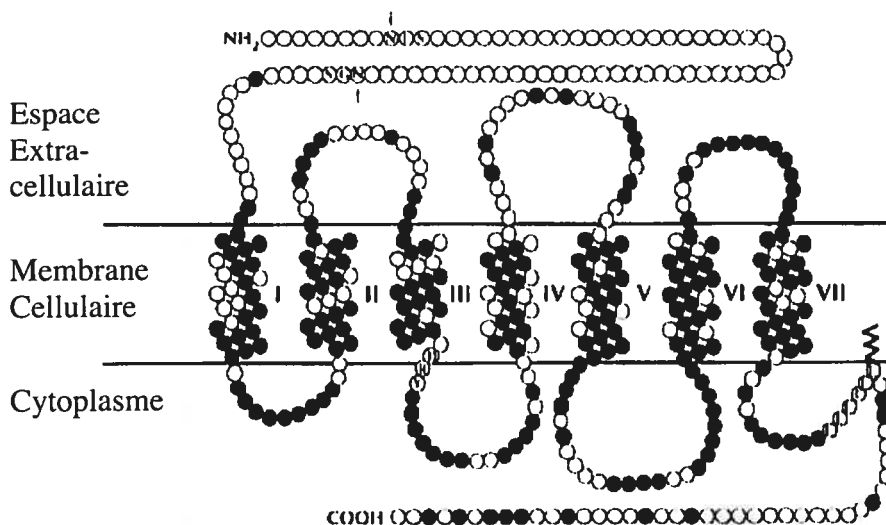


Figure 3. Structure primaire de l'ET_AR humain. Le récepteur est constitué d'un domaine amino-terminal extracellulaire, de sept domaines transmembranaires (chiffres romains) et d'un domaine carboxy-terminal intracellulaire. ● représentent les résidus conservés dans la séquence de l'ET_BR. Il y a deux sites de glycosylation qui sont indiqués en amino-terminal (flèches) ainsi qu'un site de myristoylation en carboxy-terminal. (Adapté de Rubanyi, G.M., 1994)

de liaison indiquent que l'ET-1 se lie à ses récepteurs avec une constante de dissociation (K_d) de 0,52 nM, et qu'il y a environ $2,10 \times 10^5$ sites de liaison sur les cardiomyocytes de rats adultes (Allen et coll., 2003).

1.2.5 Les récepteurs à l'endothéline dans le myocarde

Les deux sous-types de récepteurs, ET_AR et ET_BR, sont présents dans le cœur (Arai et coll., 1990; Hosoda et coll., 1991; Molenaar et coll., 1993; Sakurai et coll., 1990). Dans le cœur humain, les deux sous-types sont exprimés à des niveaux similaires (Molenaar et coll., 1993). Par ailleurs, même si les deux sous-types des ETR ont également été détectés dans des préparations membranaires de ventricules

de rats (Hochoer et coll., 1999; Thibault et coll., 1995), la présence des ET_BR demeure controversée au niveau des cardiomyocytes de rats adultes. De fait, des essais de liaison avec l' [¹²⁵I]ET-1 sur des cardiomyocytes de rats adultes, ainsi que sur des cardiomyocytes de rats néonataux mis en culture ont révélé que la quasi-totalité de la liaison était déplacée par un antagoniste à l'ET_AR (Fareh et coll., 1996; Hilal-Dandan et coll., 1994). De plus, bien que l'ARNm de l'ET_AR et de l'ET_BR soit présent dans le cœur de rat adulte, l'ARNm de l'ET_BR n'a pu être détecté dans les myocytes de rats néonataux mis en culture (Hilal-Dandan et coll., 1997). Cependant, il est intéressant de noter qu'une étude récente effectuée par le D^r Allen et ses collaborateurs (2003) avance la présence des deux sous-types d'ETR à la surface des cardiomyocytes adultes intacts, et ce dans une proportion de 4:1 pour ET_AR et ET_BR, respectivement (Allen et coll., 2003). En bref, la présence controversée du sous-type ET_BR semble être en partie causée par l'utilisation de modèles expérimentaux différents.

1.2.6 Pharmacologie moléculaire des récepteurs à l'endothéline

Plusieurs mécanismes contribuent aux nombreuses activités pharmacologiques de l'ET-1. Manifestement, celles-ci sont en partie expliquées par l'expression de plus d'un sous-type d'ETR dans un même type cellulaire. Cependant, d'autres pistes s'imposent. En principe, le poids moléculaire de la protéine ET_AR, déterminé selon la séquence initialement clonée à partir de l'ADNc de poumon bovin, est de 427 acides aminés, soit environ 47 kDa (Arai et coll., 1990) et la séquence de l'ET_BR cloné de l'ADNc de poumon de rat est de 415 acides aminés, ce qui donne lieu à une protéine d'environ 46 kDa (Sakurai et coll., 1990). Toutefois, la présence d'ETR de masse variable (Angelova et coll., 1997; Curtis et coll., 2001; Nambi et coll., 1997; Shraga-Levine et coll., 1998) suppose fortement la présence de variants d'épissage,

de récepteurs clivés, glycosylés, palmitoylés, phosphorylés ou nitrosylés. La présence de ces récepteurs pourrait expliquer en partie ces différentes activités de l'ET-1. Il a donc été rapporté qu'un variant d'épissage de l'ET_BR, nommé ET_BR-svr, possède un couplage différent à ses effecteurs (Elshourbagy et coll., 1996). De même, une étude a montré que l'ET-1 pouvait provoquer le clivage de l'extrémité amino-terminale de l'ET_BR. Dans le cas de cette modification post-traductionnelle du récepteur, la troncation crée un récepteur dont le couplage semble identique mais dont l'expression de surface est perturbée (Grantcharova et coll., 2002). Il existe une hypothèse selon laquelle la diversité des voies de signalisation activées par l'endothéline peut aussi être causée par des modifications covalentes altérant la structure tertiaire des ETR (Stannard et coll., 2003). Dans cet ordre d'idée, une première étude faisait état de deux sites d'affinité à l'ET-1 (c.-à-d. nanomolaire et picomolaire) et proposait que ces deux sites étaient également sensibles à l'ET-1, ET-2 et ET-3 (Sokolovsky et coll., 1992). La présence de ces deux sites d'affinités a subséquentement été attestée pour les deux sous-types de récepteurs. De plus, il a été démontré qu'ils reflétaient le niveau de glycosylation des récepteurs: les sites de plus faible affinité sont perturbés par la déglycosylation des récepteurs (Shraga-Levine et coll., 1998). De plus, il est intéressant de souligner que les ET_BR «de haute et de basse affinité» sont différemment couplés aux voies de signalisation intracellulaire (Sokolovsky et coll., 1992). Quant aux autres modifications covalentes, il a été rapporté que la liaison de l'acide palmitique à un résidu cystéine de la région carboxy-terminale cytosolique (c.-à-d. palmitoylation : ET_AR :Cys³⁸⁵, ET_BR :Cys⁴⁰², Cys⁴⁰³, Cys⁴⁰⁵) créant une quatrième boucle cytosolique, est nécessaire à l'ET_AR afin de coupler une protéine-Gq hétérotrimérique (Kawanabe et coll., 2002) ainsi qu'au couplage de Gq et Gi dans le cas d'ET_BR (Okamoto et coll., 1997). La palmitoylation des ETR a donc une incidence sur leur signalisation intracellulaire (Cramer et coll., 2001; Kawanabe et coll., 2002; Okamoto et coll., 1997). La palmitoylation a

également une incidence sur la localisation du récepteur (Section 1.4.2). Tel que mentionné ci-haut, la phosphorylation différente des sous-types d'ETR peut également représenter une cause potentielle de la pharmacologie complexe des ETR. En ce sens, il a été rapporté que la phosphorylation rapide et lente d'ET_BR et d'ET_AR, respectivement, dicte la rapidité de leur inactivation et de leur internalisation (Cramer et coll., 1997; Cramer et coll., 1998; Freedman et coll., 1997). Finalement, les ETR peuvent aussi être nitrosylés en tyrosine mais le rôle de cette modification demeure incompris à ce jour (Bouso et coll., 1992).

1.2.7 Localisation et dimérisation des récepteurs à l'endothéline

De concert ou indépendamment des modifications sus-mentionnées, la localisation subcellulaire et la dimérisation des ETR ont aussi été proposées comme causes possibles de la signalisation complexe de l'endothéline. Bien qu'encore mal défini, le concept de RCPG localisés en différents compartiments subcellulaires représente vraisemblablement un niveau d'organisation supérieur du système à endothéline. Notamment, une étude récente du D^r Walker et ses collaborateurs (2003) démontre que ce sont les ET_AR localisés aux tubules-T qui sont responsables de l'effet inotrope positif de l'endothéline (Robu et coll., 2003). La présence de RCPG a aussi été démontrée au niveau d'autres membranes internes. Par exemple, les récepteurs de type 1 à l'angiotensine II (AT₁R) (Booz et coll., 1992; Chen et coll., 2000; Lu et coll., 1998; Zhuo et coll., 2002), les récepteurs adrénergiques (Buu et coll., 1993), les récepteurs aux prostaglandines (Bhattacharya et coll., 1998; Bhattacharya et coll., 1999; Gobeil et coll., 2002), les récepteurs du facteur d'activation plaquettaire (Marrache et coll., 2002), les récepteurs glutamates métabotropiques (O'Malley et coll., 2003), les récepteurs à l'acide phosphatidique (Gobeil et coll., 2003a) de même que les récepteurs à l'apeline (Lee et coll., 2004)

sont présents au niveau des membranes nucléaires. Par ailleurs, les récepteurs GPR30 aux estrogènes (Revankar et coll., 2005) et les récepteurs GABA_B1 sont localisés au réticulum endoplasmique (RE) (Jones et coll., 1998; Margeta-Mitrovic et coll., 2000; White et coll., 1998). À l'exception des récepteurs adrénérgiques nucléaires et des récepteurs GABA_B1 qui nécessitent une association au GABA_B2 afin d'assurer leur acheminement à la surface cellulaire et leur fonctionnalité (Buu et coll., 1993; Jones et coll., 1998; Margeta-Mitrovic et coll., 2000; Marshall et coll., 1999; White et coll., 1998), il a été démontré que ces récepteurs intracellulaires étaient fonctionnels. Compte tenu de ces considérations, un résultat d'une étude récente effectuée par le D^r Bkaily et ses collaborateurs (2000) mérite d'être souligné. Cette brève étude démontre qu'une microinjection cytosolique d'ET-1 cause une augmentation de calcium nucléaire dans les cellules endothéliales vasculaires (Bkaily et coll., 2000). À la lumière de ce qui précède, la présence d'ETR intracellulaires est possible.

L'hétérodimérisation des récepteurs GABA_B1 et GABA_B2, qui leur permet d'être acheminés à la membrane plasmique, suggère que certains récepteurs dimérisent dès leur biosynthèse. Ils agiraient à titre de chaperons moléculaires afin d'être conforme au contrôle de qualité exercé au RE sur les protéines mal repliées et les complexes protéiques mal formés (Angers et coll., 2002; Reddy et coll., 1998). D'autres exemples similaires ont aussi été rapportés pour les récepteurs V2 à la vasopressine (Morello et coll., 2001) ainsi que pour les récepteurs CCR5 [(Benkirane et coll., 1997), revu dans (Angers et coll., 2002)]. Pharmacologiquement, la dimérisation ou l'oligomérisation des récepteurs permettrait également d'expliquer certains résultats de coopérativité de liaison positive ou négative qui ne résultent pas du couplage aux protéines-G (Chidiac et coll., 1997; Green et coll., 1997; Wreggett et coll., 1995) et représente donc une source potentielle de diversité pharmacologique (Salahpour et coll., 2000). En effet, deux études récentes démontrent que l'entité hétérodimérique

formée par les récepteurs δ - et κ -opioïdes dans un premier cas (Jordan et coll., 1999), et β_1 - et β_2 -adrénergiques dans un second cas (Lavoie et coll., 2003; Lavoie et coll., 2002) possède des propriétés de liaison au ligand ainsi qu'une signalisation différente de ces mêmes récepteurs exprimés seuls. Dans cet ordre d'idées, la formation induite-par-le-ligand d'un homodimère $ET_A R$ (Angelova et coll., 1997), de même que la présence d'homodimères et d'hétérodimères constitutifs d'ETR ont été démontrées (Gregan et coll., 2004a; Gregan et coll., 2004b). À ce jour, la seule fonction attribuée à cet état d'organisation des ETR réside dans une variation de l'internalisation des hétérodimères selon la sélectivité du ligand (Gregan et coll., 2004a). Deux patrons d'internalisation sont observés pour les hétérodimères. Dans un premier cas l'ET-1 induit une internalisation des hétérodimères, qui est classiquement attribuée à l' $ET_A R$, par la voie de recyclage de la transferrine (Bremnes et coll., 2000). Dans le cas d'un ligand sélectif pour $ET_B R$, l'internalisation induite cible les hétérodimères vers les lysosomes afin d'être dégradés (Bremnes et coll., 2000; Gregan et coll., 2004a). Donc, une fonction de l'hétérodimérisation pourrait être de cibler l' $ET_B R$ en surface puisqu'il est généralement admis que ce récepteur internalise constitutivement vers les lysosomes (Bremnes et coll., 2000; Oksche et coll., 2000).

1.3 TRANSDUCTION DU SIGNAL DE L'ENDOTHÉLINE

1.3.1 Effecteurs des récepteurs à l'endothéline

L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur, mais également un agent mitogénique (Rubanyi et coll., 1994). Aux sections 1.2.6 et 1.2.7, il a été question des diverses modifications et des niveaux d'organisation pouvant conférer aux ETR plusieurs effets pharmacologiques. Cependant, le lien entre la plupart de ces

modifications et la signalisation des ETR demeure en très grande partie inconnus à ce jour. Il est généralement accepté que l'état initial et la localisation membranaire des récepteurs dicteront quelle(s) voie(s) de signalisation seront activées après la liaison du ligand au récepteur (Insel, 2003). Quant aux ETR, plusieurs facteurs contribuent à la diversité des réponses à l'ET-1, dont l'expression de plus d'un sous-type de récepteur dans un même type cellulaire de même que leur capacité à coupler différentes protéines-G hétérotrimériques (Jouneaux et coll., 1994; Kitamura et coll., 1999; Okamoto et coll., 1997; Sokolovsky, 1993; Takagi et coll., 1995) en fonction du ligand utilisé (Shraga-Levine et coll., 2000). Ainsi, les ETR participent à l'activation d'une pléthore d'effecteurs, tels que schématisés à la figure 4, dont la phospholipase C (PLC) (Ambar et coll., 1993; Clerk et coll., 1997; Hilal-Dandan et coll., 1994; Hilal-Dandan et coll., 1992), la phospholipase D (PLD) (Ambar et coll., 1993; Clerk et coll., 1997; Liu et coll., 1992), la phospholipase A₂ (PLA₂) (Husain et coll., 1998), les ions calcium (Ca²⁺) cytosolique (Pollock et coll., 1995; Vanheugten et coll., 1996), l'échangeur Na/H (NHE) (Ballard et coll., 1996), la production d'adenosine monophosphate cyclique (AMPC) (Hilal-Dandan et coll., 1992), la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Fujitani et coll., 1993) ainsi que l'activation de protéines tyrosines kinases (Sadoshima et coll., 1995; Simonson et coll., 1993) et de protéines sérines/thréonines kinases (Bogoyevitch et coll., 1994; Bogoyevitch et coll., 1993a; Shubeita et coll., 1990).

1.3.2 Endothéline, Gq et hypertrophie

Tel que mentionné, l'hypertrophie cardiaque est caractérisée par un retour au phénotype embryonnaire ainsi que par une augmentation du nombre d'unités

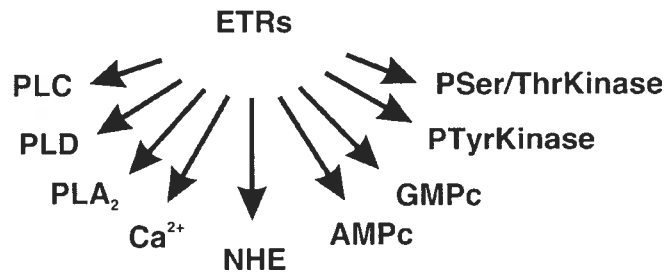


Figure 4. Effecteurs impliqués dans la signalisation de l'endothéline (Voir la section 1.3.3 pour de plus amples détails). PTyrKinase et PSer/thrKinase sont respectivement les abréviations de "protéines tyrosines kinases" et de "protéines sérines/thréonines kinases".

contractiles (Hunter et coll., 1999b; Swynghedauw, 1999). Dans les cardiomyocytes, l'effet mitogénique de l'endothéline, mais également d'autres facteurs paracrines comme l'angiotensine II ou la phényléphrine, tient au fait que leurs récepteurs respectifs peuvent provoquer l'activité GTPasique d'une protéine-Gq hétérotrimérique (Fuller et coll., 1990; Shubeita et coll., 1990). En 1994, une étude menée par l'équipe du Dr Lefkowitz a permis d'établir pour la première fois un lien de causalité, *in vivo*, entre les RCPGq des cardiomyocytes et l'hypertrophie cardiaque (Milano et coll., 1994). La surexpression d'un mutant constitutivement actif du récepteur α_{1B} -adrénergique de façon cardio-spécifique a permis d'exclure les effets confondants extra-cardiaques et de proposer le modèle actuel d'hypertrophie cardiaque induit par la voie de signalisation de G α q. Conformément à ce modèle, une autre étude a rapporté que des souris transgéniques surexprimant la protéine G α q dans le cœur présentaient de forts signes d'hypertrophie ventriculaire (D'Angelo et coll., 1997; Dorn et coll., 1999a). Il est désormais établi que la voie de signalisation en aval de la protéine-Gq hétérotrimérique impliquée dans le processus hypertrophique correspond à la voie de la cascade des MAP kinases culminant en l'activation de Erk 1/2 (*Extracellular-signal regulated protein kinase*) (Bogoyevitch et coll., 1996; Clerk et coll., 1999; Dorn et coll., 1999a; Sugden, 2001).

1.3.3 Activation des MAP kinases

Classiquement, les récepteurs couplés aux protéines-Gq hétérotrimériques activent la PLC- β qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) en inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) et diacylglycérol (DAG), tel que schématisé à la figure 5 (Rhee, 2001). Ces seconds messagers participent ensuite à l'activation des protéines kinases C (PKC). La liaison de l'InsP₃ et du Ca²⁺ au récepteur tétramérique IP₃R localisé au niveau du RE cause une relâche de Ca²⁺ dans le cytosol (Berridge, 1993; Bosanaca et coll., 2004). Enfin, la présence de DAG au niveau de la membrane plasmique et de Ca²⁺ libre dans le cytosol permettent la translocation et l'activation de deux classes de PKC. Ces deux classes sont les PKC classiques et nouvelles (c.-à-d. cPKC, nPKC) (Sugden et coll., 1997). Cette activation de plusieurs membres des PKC est essentielle à l'activation de la cascade des MAP kinases. Le rôle attribué aux PKC dans l'activation de cette cascade en trois modules serait indirectement relié à l'activation du premier niveau de cette cascade: celui des MAPK kinase kinases (MAPKKK : A-Raf, B-Raf, Raf-1) (Clerk et coll., 2004). En effet, basé sur l'hypothèse selon laquelle Ras est un effecteur de PKC (Marais et coll., 1998; Schonwasser et coll., 1998), un modèle a été développé par l'équipe du D^r Sugden. Il propose des rôles complémentaires pour différentes isoformes de PKC au niveau de l'activation des protéines-G monomériques de la famille Ras (Chiloeches et coll., 1999). Il a été démontré que l'activité enzymatique de cPKC α rendait Ras compétente à un éventuel chargement en GTP, alors que l'activation de nPKC ϵ était directement requise pour le chargement en GTP de Ras. À ce point, Raf s'associe à GTP-Ras à la membrane plasmique mais demeure inactif. L'événement pouvant activer Raf à la membrane plasmique est débattu depuis déjà plus d'une décennie (Chong et coll., 2003; Marais et coll., 1997; Stokoe et coll., 1994). Le modèle du D^r Sugden propose la nPKC δ comme joueur essentiel lors de

l'activation de Raf à la suite de son recrutement à la membrane plasmique. Raf, ainsi que d'autres protéines sérine/thréonines kinases de type MAPKKK, sont régulées de façon complexe car ces protéines représentent un point d'intégration de plusieurs voies de signalisation différentes. L'activation de Raf nécessite des interactions intra- et inter-moléculaires de même qu'une phosphorylation directe [Revu dans (Chong et coll., 2003)]. Dans un premier temps, l'activation de Raf implique sa liaison à Ras-GTP par la région amino-terminale composée du domaine de liaison à Ras ainsi que du domaine riche en cystéine (Vojtek et coll., 1993), causant *de facto* sa translocation à la membrane plasmique. L'activité de Raf est aussi régulée par sa phosphorylation. L'activation de Ras provoque la phosphorylation de Raf sur les résidus S338, Y341, T491 et S494 (c.-à-d. selon la séquence c-Raf) par les protéines kinases PAK (S338) (Chaudhary et coll., 2000), Src et JAK (Y341) (Fabian et coll., 1993; Winston et coll., 1995; Xia et coll., 1996), et possiblement par la cPKC α sur le résidu S499 (Kolch et coll., 1993). Les protéines kinases phosphorylant les deux autres sites sont encore inconnues à ce jour (Chong et coll., 2003). Ces phosphorylations activatrices permettent aux protéines kinases Raf d'activer par phosphorylation leur unique substrat identifié: Mek1/2 (MAPK-Erk Kinase). Mek 1 et Mek 2 représentent les MAPK kinases (MAPKK) de la cascade en trois modules (Marais et coll., 1996). Les protéines kinases Mek1/2 sont phosphorylées et activées par Raf ainsi que par d'autres MAPKKK telles que Mos, Tpl2, Mekk1, Mekk2 et Mekk3 (Fanger et coll., 1997) sur deux résidus sérines adjacents (e.g. S218, S222). Comme les autres membres des MAPKK, Mek1/2 possède une activité protéine kinase à double spécificité thréonine et tyrosine, ce qui confère une grande spécificité à la cascade. Cette spécificité est obtenue par le motif Thr-X-Tyr dans la boucle d'activation des MAPK [Revu dans (Widmann et coll., 1999)]. Dans le cas de la cascade culminant par les MAPK Erk1/2, Mek1/2 reconnaît et phosphoryle les résidus thréonines 183 et tyrosines 185 dans le motif unique Thr-Gly-Tyr de Erk1/2 [c.-à-d. selon la séquence

de Erk2 de rat (Ahn et coll., 1991)]. Finalement, la double phosphorylation de ces deux résidus de la boucle d'activation de Erk1/2 augmente son activité spécifique par un facteur de 600,000 (Prowse et coll., 2001). Donc, l'hypertrophie provoquée par l'ET-1 s'effectue au moyen de deux sous-types d'ETR, les protéines-Gq hétérotrimériques, la phospholipase C β , les cPKC α et nPKC δ et - ϵ , les protéines-G monomériques Ras ainsi que par la cascade des MAP kinases composées de Raf, Mek et Erk (Fig. 5).

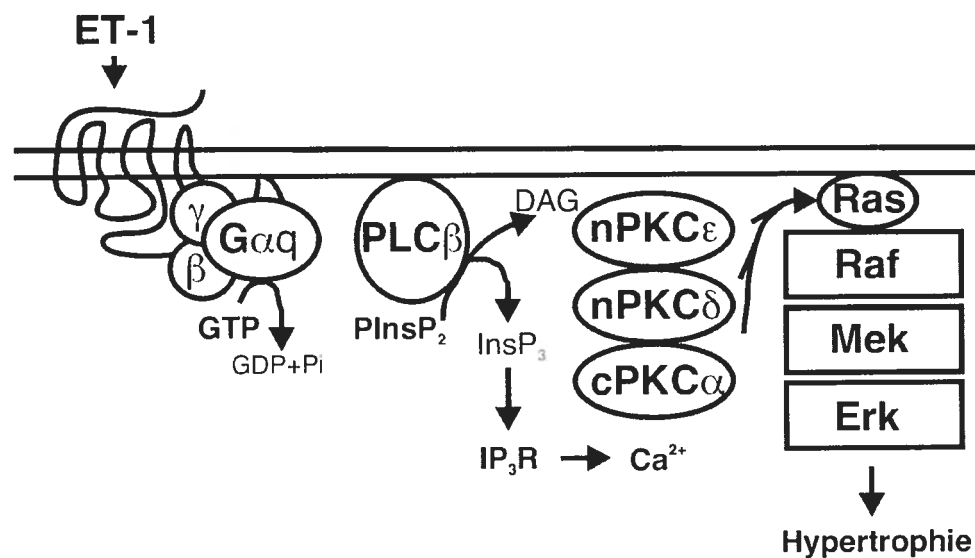


Figure 5. Voie de signalisation entraînant l'hypertrophie cardiaque induite par l'ET-1. (Voir la section 1.3.3 pour de plus amples détails). Le texte en caractères non-gras est utilisé pour identifier les produits d'hydrolyse. Abréviations supplémentaires: Gαq(βγ), Protéine-Gq hétérotrimérique.

1.3.4 La famille des PKC

La PKC est l'une des premières protéines kinases à avoir été identifiée. Son activité a originalement été observée dans les cerveaux de rats et définie comme une protéine kinase pouvant phosphoryler les histones (Inoue et coll., 1977). À ce jour,

quelques douze gènes distincts codant pour différentes isoformes de PKC ont été identifiés [Revu dans (Mellor et coll., 1998)]. En raison de la structure des isoformes ainsi que des co-facteurs nécessaires à leur activation, la famille des PKC de la superfamille des protéines kinases AGC (Table I), de type II, [Revu dans (Hanks et coll., 1995)] a été séparée en quatre classes: conventionnelles (cPKC) (α , β I, β II et γ), nouvelles (nPKC) (δ , ϵ , η et θ), atypiques (aPKC) (ζ et ι/λ) et kinases apparentées aux PKC (PRK: *PKC-related kinases*) (1, 2 et 3) (Mellor et coll., 1998) (Fig. 6).

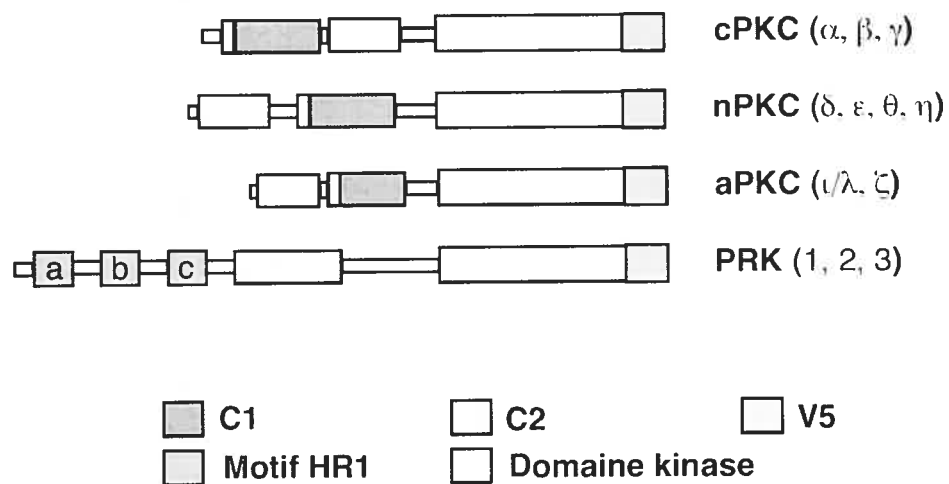


Figure 6. Structure des domaines des sous-familles de PKC. Comparaison schématique de l'architecture protéique des sous-groupes de la superfamille des PKC (Adapté de Mellor, H. 1998).

Comme l'avaient remarqué le D^r Nishizuka et ses collaborateurs (1979) en caractérisant la première isoforme de cette famille (Takai et coll., 1979), les PKC sont régulées par la présence de lipides anioniques. Cependant, de ces quatre classes, seules les cPKC et les nPKC sont activées par la présence de DAG. Dans les cardiomyocytes, la PLC- β et la PLD sont responsables de la production de DAG au moyen de l'hydrolyse du PtdIns(4,5)P₂ lors de l'activation des ETR (Clerk et coll.,

1997). De plus, l'agent mitogénique phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) est également un activateur de ces PKC (Castagna et coll., 1982) et sa liaison fait concurrence à la liaison du DAG au domaine C1 (Sharkey et coll., 1985).

1.3.5 PKC, un modèle d'activation par translocation

En général, l'activation des isozymes composant les deux sous-classes sensibles au DAG, les cPKC et les nPKC, est caractérisée par une translocation à une région membranaire composée de lipides anioniques et de DAG. Le lipide anionique le plus efficace à activer des PKC est la phosphatidylsérine, mais d'autres phospholipides anioniques ou acides gras peuvent aussi participer à l'activation des PKC [(Kaibuchi et coll., 1981; Takai et coll., 1979), revu dans (Newton, 1997)]. Cependant, le processus causant la translocation des PKC à ces régions spécialisées n'est que partiellement élucidé. Une séquence d'événements survenant lors de l'activation de ces PKC a tout de même été proposée (Fig. 7) (Newton et coll., 1998). L'hypothèse de départ stipule que l'enzyme mature et catalytiquement compétente est inactive lorsqu'elle est localisée dans le cytosol (Keranen et coll., 1995; Orr et coll., 1994b; Parekh et coll., 2000). Cette inactivation est causée par le repliement de l'enzyme sur elle-même: le site catalytique est stériquement bloqué par une séquence autoinhibitrice (c.-à-d. le pseudosubstrat) localisée en amino-terminal du domaine C1 (House et coll., 1987). Toutes les isoformes de la famille des PKC possèdent un site d'autoinhibition correspondant au site consensus de phosphorylation (Kennelly et coll., 1991; Woodgett et coll., 1986) dont le résidu phosphorylable (p. ex., sérine ou thréonine) est remplacé par un résidu alanine. Survient ensuite un signal extracellulaire activant l'enzyme. L'activation de PKC résulte de sa liaison aux membranes contenant des phospholipides acides et le DAG, un événement accompli par deux modules de ciblage aux membranes: les domaines C1 et C2. L'interaction

de ces deux domaines à la membrane provoque un changement conformationnel dégageant le site actif du pseudosubstrat (Newton, 1997).

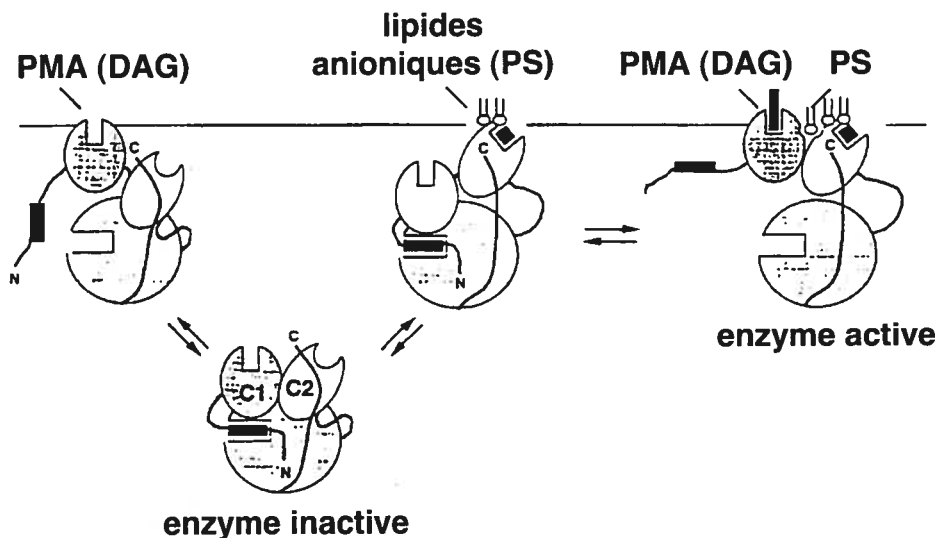


Figure 7. Modèle d'activation par translocation des PKC. (Voir la section 1.3.5 pour de plus amples détails) (Adapté de Newton, A.C. 1998)

Toutefois, les deux classes de PKC nécessitent des co-facteurs différents afin de pouvoir être activées. En effet, la liaison des cPKC aux lipides anioniques, au moyen de leur domaine C2, nécessite la présence d'ions Ca^{2+} (Shao et coll., 1996). Les cPKC sont donc particulièrement sensibles aux InsP_3 et aux ions Ca^{2+} relâchés des réserves intracellulaires, alors que le domaine C2 partiellement conservé des nPKC peut lier les lipides anioniques en absence de Ca^{2+} (Newton, 1995; Sossin et coll., 1993). Les PKC possèdent tout de même une affinité minimale envers les membranes possédant des phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine, même en absence de DAG. Bien que cette affinité crée un certain équilibre entre la forme cytosolique et la forme membranaire de l'enzyme, c'est la présence de DAG ou de PMA et leur liaison au domaine C1 qui augmente l'affinité du domaine C2 des

cPKC pour la phosphatidylsérine en diminuant la concentration de Ca^{2+} requise à la liaison (Castagna et coll., 1982; Takai et coll., 1979). Donc, selon ce modèle, les PKC sont activées lorsqu'elles sont transloquées aux membranes puisque le site catalytique de l'enzyme est libéré du pseudosubstrat (Farrar et coll., 1985; Kraft et coll., 1983; Newton et coll., 1998). Cependant, quelques groupes ont également suggéré que l'activité des PKC associées aux membranes pouvait être augmentée sans l'avènement d'une translocation de l'enzyme présente dans le cytosol (Halsey et coll., 1987; Pelech et coll., 1990b). De plus, contrairement à l'hypothèse selon laquelle l'enzyme inactivée est cytosolique, il a aussi été démontré qu'une réserve de l'enzyme inactive, localisée à la membrane plasmique, pouvait être activée par le DAG, des analogues du DAG, le PMA ainsi que par des facteurs de croissance (p. ex., le facteur de croissance de l'épiderme, le facteur de croissance de fibroblaste, et l'interleukine-2) à de plus faibles concentrations que celles nécessaires à la translocation de l'enzyme (Chakravarthy et coll., 1994). Ces résultats intéressants appuient fortement l'hypothèse selon laquelle les membranes de cellules non-stimulées possèdent une réserve de PKC inactives pouvant être activées par des stimuli physiologiques (Bell, 1986) (Fig. 8).

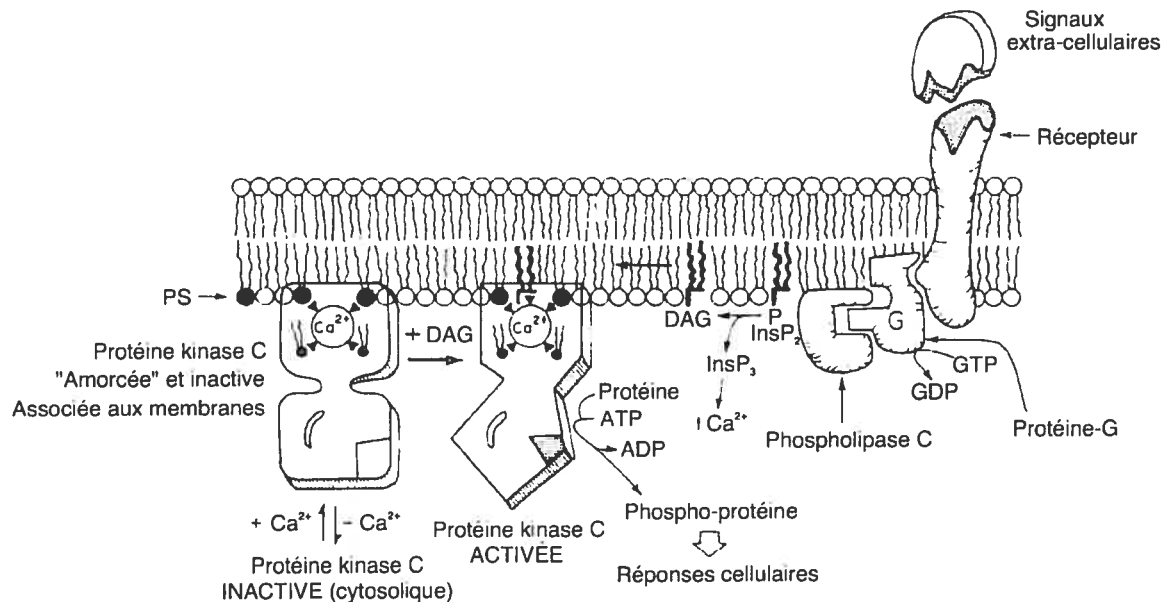


Figure 8. Modèle d'activation des PKC associées aux membranes. (Voir la section 1.3.5 pour de plus amples détails) (Adapté de Bell, R.M. 1986)

1.3.6 Régulation de PKC

Outre la translocation aux membranes, d'autres mécanismes tels que la protéolyse, la phosphorylation, et les interactions protéines-protéines régulent aussi les fonctions des PKC. L'étude des PKC a commencé avec la description d'une kinase à histone provenant du cerveau activée par une protéolyse limitée en présence de fortes concentrations de Ca^{2+} (Inoue et coll., 1977). Puis la même équipe a établi un lien entre l'hydrolyse du $\text{PIns}(4,5)\text{P}_2$ et l'activation de PKC (Kishimoto et coll., 1980). Une fois son activation par les seconds messagers Ca^{2+} et DAG bien établie, il a également été observé que la phosphorylation des PKC était nécessaire à leur activité (Borner et coll., 1988; Borner et coll., 1989). En effet, l'une des premières études portant sur la PKC a démontré que cette enzyme était initialement synthétisée sous forme de précurseur inactif et non phosphorylé (Borner et coll., 1989). De

même, il a aussi été rapporté que la protéine purifiée était inactivée suite à une co-incubation avec une protéine phosphatase (Pears et coll., 1992).

En se basant sur les structures établies de la protéine kinase A (PKA) (Knighton et coll., 1991), la protéine kinase dépendante des cyclines (cdk2) (De Bondt et coll., 1993) et la MAPK Erk 2 (Zhang et coll., 1994), un motif commun d'activation des protéines kinases a été établi (Taylor et coll., 1994). Ce motif, nommé boucle d'activation, situé en carboxy-terminal du site actif est présent dans les protéines kinases de la superfamille AGC, dont les PKC sont membres (Table I) (Hanks et coll., 1995). Ce site correspond à la thréonine 500 de la séquence de cPKC β II [(Orr et coll., 1994b), revu dans (Newton, 2002; Parekh et coll., 2000)]. PDK-1 a récemment été identifiée comme étant la protéine kinase phosphorylant le site de la boucle d'activation des protéines kinases de la superfamille des kinases AGC (Newton, 2002). PDK-1 peut phosphoryler la boucle d'activation des cPKC (Dutil et coll., 1998) et des nPKC (Cenni et coll., 2002; Le Good et coll., 1998).

D'autres phosphorylations sont aussi nécessaires à l'activation des PKC. Notamment, un site d'autophosphorylation en thréonine 642 (Flint et coll., 1990) sur le motif en coude (c.-à-d. *turn motif*), ainsi qu'en carboxy-terminal sur le résidu sérine 660 du domaine hydrophobe situé dans la partie V5 [c.-à-d. selon la séquence de cPKC β II (Keranen et coll., 1995; Tsutakawa et coll., 1995)]. La protéine kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 660 des nPKCs est encore inconnue. Cependant, une activité kinase faisant partie d'un complexe protéique composé de aPKC ζ et mTOR, présentant une activité spécifique envers ce résidu du motif hydrophobe des nPKC, a été partiellement purifiée (Ziegler et coll., 1999). Quant aux cPKC, comme pour le site thréonine 642, cette phosphorylation en sérine 660 serait également un phénomène intramoléculaire (Behn-Krappa et coll., 1999; Flint et coll., 1990). Ces trois phosphorylations, nécessaires à l'obtention de PKC catalytiquement compétentes, se produisent rapidement à la membrane à la suite de la

synthèse des PKC (Sonnenberg et coll., 2001) car de faibles interactions permettent aux PKC de lier les membranes dans une conformation ouverte et accessible aux PKC kinases (Dutil et coll., 2000).

TABLE I.

Classification des protéines kinases de la superfamille AGC

AGC-I.	(PKA, PKG) Famille des protéines kinases régulées par des nucléotides cycliques
AGC-II.	(PKC/PRK) Famille des protéines kinases activées par le diacylglycérol et dépendantes de phospholipides (PKC)
AGC-III.	(PKB) Famille des protéines kinases apparentées aux PKA et PKC
AGC-IV.	(β ARK/GRK) Famille de protéines kinases phosphorylant les RCPG
AGC-V.	(Sch9, Ykr2, Ypk 1) Famille de protéines kinases de levures apparentées aux AGC
AGC-VI.	(p70 ^{S6K} , RSK) Famille de protéines kinases phosphorylant la protéine ribosomale S6
AGC-VII.	Famille Dbf2/20 de levures
AGC-VIII.	Famille PVPK1 de plantes à fleurs

Division de la superfamille des protéines kinases AGC en familles distinctes dérivé d'un arbre phylogénétique basé sur l'alignement de la séquence d'acides aminés du domaine kinase (Adapté de Hanks, S.K. 1995)

1.3.7 Isoformes de PKC dans le myocarde

Il y a déjà plus de 25 ans qu'une étude effectuée par le D^r Wrenn et ses collaborateurs révélait la présence des PKC dans le cœur (Kuo et coll., 1980). Il a longtemps été convenu que les PKC étaient les principaux récepteurs des esters de phorbol, et qu'en conséquence les PKC jouaient un rôle dans la prolifération, la différenciation, la survie et la transformation des cellules [Revu dans (Yang et coll., 2003)]. Il a été avancé que les PKC jouaient un rôle clé dans le maintien de l'équilibre entre la croissance normale et pathophysiologique (Nishizuka, 1995). Cependant, les cardiomyocytes adultes étant des cellules amitotiques, les esters de phorbol ont un effet hypertrophique (Starksen et coll., 1986).

Henrich et Simpson ont été les premiers à observer une augmentation d'activité PKC aux membranes de cardiomyocytes néonataux à la suite de la stimulation de récepteurs couplés à une protéine-Gq: les récepteurs α_{1B} -adrénergiques (Henrich et coll., 1988). Cette observation fut rapidement confirmée dans les cardiomyocytes adultes fraîchement isolés (Kaku et coll., 1991). Une fois l'activité détectée, les études d'expression des isoformes de la famille des PKC ont surtout été effectuées avec des cardiomyocytes néonataux et des cardiomyocytes adultes fraîchement isolés (Clerk et coll., 1994; Kohout et coll., 1993; Steinberg et coll., 1995). De plus, des approches immunologiques et moléculaires ont été appliquées à l'étude de l'expression des isoformes des PKC à différentes étapes de l'ontogenèse du rat (Goldberg et coll., 1996; Rybin et coll., 1994). Parmi les cPKC et les nPKC, les isoformes α , δ et ϵ ont été détectées de façon constante aux différents stades du développement et ce, par différentes équipes de recherche. Ces trois isoformes ont été détectées dans les cœurs de fœtus (Rybin et coll., 1994), dans les cœurs néonataux (Clerk et coll., 1995; Rybin et coll., 1994), dans les cardiomyocytes néonataux (Puceat et coll., 1994) ainsi que dans les cœurs adultes (Clerk et coll., 1995) et les

cardiomyocytes adultes (Kohout et coll., 1993; Puceat et coll., 1994; Clerk et coll., 1995). Cependant, quelques études soulèvent la possibilité d'un patron d'expression différent des isoformes de PKC dans le cœur. En effet, deux études effectuées par le D^r Katz et ses collaborateurs (1997) révèlent la présence de l'isoforme cPKC β dans les cardiomyocytes de rats adultes (Wientzek et coll., 1997) et le cœur bovin (Allen et coll., 1991) alors que la présence de cPKC α est parfois contestée dans les cardiomyocytes de rats adultes (Bogoyevitch et coll., 1993b; Rybin et coll., 1994)³. Il est probable que l'isoforme cPKC β soit présente dans le cœur du rat puisqu'elle est retrouvée dans le cœur humain normal (Shin et coll., 2000) et malade (Strasser et coll., 1996). Aussi, sa surexpression dans le cœur de souris cause l'hypertrophie ventriculaire (Wakasaki et coll., 1997). Finalement, l'isoforme nPKC ϵ est la plus abondante au niveau du cœur adulte (Bogoyevitch et coll., 1993b; Steinberg et coll., 1995).

En ce qui concerne l'activation des différentes isoformes des PKC dans les cardiomyocytes, le PMA cause une translocation soutenue des isoformes α , δ et ϵ du cytosol vers les membranes. La translocation survient en moins d'une minute (Bogoyevitch et coll., 1993b; Clerk et coll., 1995; Puceat et coll., 1994; Rybin et coll., 1994). En revanche, lorsque les cardiomyocytes sont mis en présence d'agonistes physiologiques tels que l'endothéline ou la phényléphrine, ces agonistes causent une translocation rapide mais transitoire des isoformes δ et ϵ (Clerk et coll., 1994; Puceat et coll., 1994). En principe, cette translocation transitoire des isoformes δ et ϵ correspond à la première phase d'hydrolyse du PtdIns(4,5)P₂ survenant environ 15 secondes après la stimulation à l'ET-1 (Clerk et coll., 1997). De plus, la translocation des PKC aux membranes en réponse à un stimulus physiologique est

³ Afin de créer un consensus pour les études qui suivent, nous tenons à préciser que les isoformes cPKC α , nPKC δ et nPKC ϵ ont été détectées dans les cardiomyocytes de rats adultes (Boivin et Allen, résultats non publiés)

suivie d'un retour rapide de l'enzyme au cytoplasme (Feng et coll., 1998b). Ce processus appelé « translocation inverse » nécessite probablement l'autophosphorylation des PKC (Feng et coll., 1998a). Dans les cardiomyocytes néonataux en culture soumis à une stimulation à l'ET-1, les isoformes nPKC δ et nPKC ϵ sont détectées dans la fraction cytosolique de nouveau après une période de 21 minutes (Clerk et coll., 1994). De plus, il a également été observé par microscopie confocale que la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine-Gq (c.-à-d. α_{1B} -adrénergique) cause la translocation des isoformes nPKC δ et nPKC ϵ à la région périnucléaire et aux myofibrilles des myocytes néonataux (Disatnik et coll., 1994). Cette observation a été confirmée pour l'isoforme nPKC ϵ dans les cardiomyocytes adultes (Huang et coll., 1997).

1.4 ORGANISATION DE LA SIGNALISATION POST-RÉCEPTORIELLE DE L'ENDOTHÉLINE

1.4.1 Organisation des MAP kinases et de PKC par des protéines échafauds

Les réponses intracellulaires à différents stimuli sont uniques. Cependant, ces réponses utilisent souvent les mêmes effecteurs: les protéines kinases, les protéines phosphatases ou autres. Il apparaît désormais que cette orchestration spatiale et temporelle soit principalement accomplie par des interactions protéines-protéines (Bauman et coll., 2002; Pawson et coll., 1997). Quelques exemples de protéines impliquées dans l'échafaudage de complexes protéiques, de modules préassemblés, de même qu'une localisation en des régions cellulaires précises ont été rapportés pour les composantes de la voie des MAPK. Parmi celles-ci mentionnons les β -arrestines, la kinase KSR (*Kinase Suppressor of Ras*), la MP-1 (*Mek partner 1*), les 14-3-3, les

RACK (*Receptors for activated C-kinase*) et les RICK (*Receptors for inactive C-kinase*).

Parmi les protéines régulant l'activité de la voie des MAPK, les β -arrestines (c.-à-d. β -arrestine-1 et -2) présentent un intérêt unique puisque ces protéines sont impliquées dans plusieurs processus différents, notamment la désensibilisation des RCPG, l'endocytose des RCPG ainsi que l'échafaudage de plusieurs protéines de signalisation (Luttrell et coll., 2002). Les β -arrestines sont ubiquitaires (Attramadal et coll., 1992; Lohse et coll., 1990) et participent à l'endocytose des ETR (Bremnes et coll., 2000; Oakley et coll., 2000; Paasche et coll., 2001). Puisque les β -arrestines s'associent aux ETR phosphorylés ainsi qu'au module des MAPK après une stimulation, les β -arrestines confèrent une régulation spatiale et temporelle à la signalisation des MAPK (Luttrell et coll., 2002; Luttrell et coll., 2001). Cependant, l'activation initiale des MAPK par les ETR ne nécessite pas une interaction aux β -arrestines (Cramer et coll., 2001).

La kinase KSR est une protéine échafaud qui interagit avec plusieurs composantes de la cascade des MAPK, dont Raf-1, Mek1/2 et Erk1/2 (Morrison, 2001). Des études récentes semblent indiquer que KSR possède un pseudodomaine kinase inactif et sert de protéine échafaud pour la voie de Ras plutôt qu'une protéine kinase en soi (Nguyen et coll., 2002; Roy et coll., 2002). Toutefois, le rôle de l'activité kinase intrinsèque de la KSR a récemment été proposé comme faisant partie intégrante de la voie des MAPK (Xing et coll., 2004). Bien que KSR ne soit pas exprimée de façon ubiquitaire (Therrien et coll., 1995), il a été démontré par la technique d'interférence par ARNs que sa présence était nécessaire à l'activation de Erk1/2 par Ras (Roy et coll., 2002). Ceci suppose que ce processus varie selon le type cellulaire étudié. Finalement, puisque la KSR n'est pas exprimée dans le cœur, il est fort possible qu'une autre protéine exerce cette fonction essentielle dans ce tissu.

Dans la voie des MAPK, la protéine MP1 sert d'échafaud exclusivement pour Mek1 et Erk1, ce qui par le fait même augmente l'activité de Erk1 (Schaeffer et coll., 1998). Un partenaire de MP1, p14, a aussi récemment été découvert. Le complexe MP1-p14 cible Mek1 et Erk1 à la surface cytoplasmique des lysosomes où p14 est localisé (Wunderlich et coll., 2001). Comme pour KSR, il a été démontré par la technique d'interférence par ARNs que son absence résulte en une signalisation défectueuse (Teis et coll., 2002).

Les protéines 14-3-3 sont une famille de protéines ubiquitaires liant les résidus phospho-sérines et phospho-thréonines des protéines (Muslin et coll., 1996; Wilker et coll., 2004). Cette famille de protéines est impliquée dans plusieurs processus dont le contrôle du cycle cellulaire (Hermeking et coll., 1997), la coordination de la signalisation des intégrines (Han et coll., 2001), la prévention de l'apoptose (Xing et coll., 2000) et l'activation des MAPKs (Clark et coll., 1997; Takihara et coll., 2000). La liaison de 14-3-3 à Raf-1 a initialement été découverte grâce à un système double hybride (Freed et coll., 1994; Fu et coll., 1994). Cette interaction avec c-Raf-1 semble s'effectuer principalement par la région aminoterminal de Raf (Force et coll., 1994). C-Raf-1 possède au moins quatre sites de liaison dont les sérines 259 et 621 (Morrison et coll., 1993; Muslin et coll., 1996), la sérine 223 (Dumaz et coll., 2003) ainsi qu'un quatrième site localisé entre les résidus 136-187 (Clark et coll., 1997). Généralement, la liaison des protéines 14-3-3 aux motifs phospho-sérines et phospho-thréonines protège ces sites contre les phosphatases (Conklin et coll., 1995). Cependant, dans le cas de cRaf-1, différentes équipes ont trouvé que la liaison de 14-3-3 à Raf pouvait augmenter l'activité protéine kinase de Raf, l'annuler ou encore n'avoir aucun effet sur elle (Fantl et coll., 1994; Freed et coll., 1994; Irie et coll., 1993; Michaud et coll., 1995). Il est intéressant de noter que la localisation cytosolique de Mek et Erk est régulée par leur liaison à KSR qui est maintenue dans le cytosol par un mécanisme impliquant sa liaison à 14-3-3

(Muller et coll., 2001). De plus, la déphosphorylation partielle de Raf et de KSR a comme effet de modifier l'interaction de ces protéines avec les 14-3-3, de favoriser l'interaction de Mek à Raf, ainsi que de stabiliser l'activité protéine kinase de Raf (Ory et coll., 2003).

Bien que les 13 membres de la famille des PKC possèdent une relative sélectivité de substrat (Hofmann, 1997), l'observation initiale selon laquelle une fois activées, les PKC transloquent à la fraction non-soluble (Kraft et coll., 1983) a été raffinée par des études de microscopie (Disatnik et coll., 1994; Lehel et coll., 1995; Mochly-Rosen et coll., 1990). Au moins quatre classes de protéines interagissant avec les PKC ont été identifiées. Les deux premières classes sont des substrats (Hyatt et coll., 1994) et les HSP (Gao et coll., 2002). Cependant, la liaison de ces deux classes de protéines aux PKC est dépendante du ciblage de l'enzyme.

Les RACK et les RICK forment les deux autres classes des protéines interagissant et ciblant les PKC (Mochly-Rosen et coll., 1998). Ces protéines lient les PKC en un site distinct de celui de la liaison au substrat. RACK1 est une protéine de 36-kDa comportant de nombreux domaines WD40, initialement identifiée lors d'un criblage de protéines pouvant lier la protéine cPKC β II activée (Mochly-Rosen et coll., 1991; Ron et coll., 1994). Effectivement, les deux membres de cette famille, soit RACK1 et RACK2/ β 'COP, permettent aussi de cibler et d'augmenter l'activité des PKC activées (Csukai et coll., 1997; Mochly-Rosen et coll., 1991). Par ailleurs, il faut de noter que RACK2/ β 'COP ne lie que nPKC ϵ , conférant un mécanisme de régulation spécifique à cette enzyme (Csukai et coll., 1997). Il a également été observé que l'élaboration de peptides interagissant avec la région C2 non conservée de nPKC ϵ a permis d'inhiber (Johnson et coll., 1996) ou de causer la translocation cytosol-membrane spécifique de cette enzyme en compétitionnant au niveau de son interaction avec RACK1 (Dorn et coll., 1999b). Quant aux RICK, ce concept demeure incertain et nécessite davantage de recherches, car, à ce jour, seule la

protéine InaD appartient à cette classe d'interacteurs. Chez la *Drosophile*, InaD relie la PKC inactivée au complexe protéique composé d'un canal calcique, de la calmoduline et de la PLC β (Tsunoda et coll., 1997). En bref, les récepteurs à PKC participent non seulement à l'organisation d'un module de signalisation (Huang et coll., 2005; Mochly-Rosen et coll., 1998; Nery et coll., 2004; Rigas et coll., 2003) mais aussi à l'organisation spatiale des PKC (Mochly-Rosen et coll., 1998; Osmanagic-Myers et coll., 2004). De plus, des études récentes ont mis en évidence la translocation de RACK, suggérant l'implication de cette famille de protéines dans le processus de translocation des PKC (Ron et coll., 1999; Tardif et coll., 2002). Finalement, la nPKC ϵ a été reliée au processus hypertrophique cardiaque. RACK1 est associé à nPKC ϵ dans les lysats de cœurs hypertrophiés (Mochly-Rosen et coll., 2000) et la compétition par MURF-1 inhibe la translocation de nPKC ϵ de même que l'activité de Erk1/2 et l'hypertrophie des cardiomyocytes (Arya et coll., 2004).

Bien que ces protéines aient toutes le potentiel de réguler la voie de signalisation menant à l'activation de Erk, une telle orchestration reste cependant à être étudiée dans le contexte d'une stimulation à l'endothéline dans les cardiomyocytes adultes.

1.4.2 Modules préassemblés: interactions, régulations et rôles potentiels

Outre l'interaction transitoire de complexes enzymes-substrats et les interactions impliquant de tierces protéines, d'autres interactions intrinsèques au module des MAPK ont aussi été caractérisées (Tanoue et coll., 2002a). Par exemple, Mek1 interagit avec Erk par sa région amino-terminale hors de son domaine catalytique (Fukuda et coll., 1997b). De même, Erk interagit aussi avec MKP-3 et MK-1 (Camps et coll., 1998; Smith et coll., 1999). Ces interactions dictées par l'interaction entre les domaines de liaison sont nommées «interactions d'amarrages».

Un tel motif d'amarrage a été identifié pour les protéines interagissant avec les MAP kinases et Erk (Tanoue et coll., 2003). Ce domaine est caractérisé par une séquence d'acides aminés chargés positivement flanqués d'acides aminés hydrophobes et confère une spécificité d'interaction à la cascade (Tanoue et coll., 2002b; Xu et coll., 2001). Erk interagit au moyen de ce domaine avec MKP-3 et MK-1 mais n'interagit pas avec les protéines phosphatases de $p38^{\text{MAPK}}$ et JNK^{MAPK} (p. ex., MKP-5, MKP-7 et Hvh-5) ou avec MK-2, une protéine kinase en aval de $p38^{\text{MAPK}}$ (Muda et coll., 1998; Smith et coll., 2000; Smith et coll., 1999; Tanoue et coll., 1999; Tanoue et coll., 2001). Dans ce cas, l'interaction avec la phosphatase MKP-3 régule l'activité de Erk alors que l'interaction avec la protéine kinase MK-1 contribue à la spécificité de la cascade. Collectivement, l'interaction transitoire du complexe enzyme-substrat ainsi que les interactions d'amarrage régulent la spécificité enzymatique dans la cascade des MAP kinases (Tanoue et coll., 2003).

Par ailleurs, ces interactions d'amarrage peuvent aussi contribuer à la spécificité de la signalisation en régulant la localisation cellulaire. Il a été observé que l'interaction de Mek1 à Erk par le domaine localisé en amino-terminal régule la localisation cytosolique de Erk par le biais du signal d'export nucléaire de Mek1 (Fukuda et coll., 1997a). Une interaction similaire de Erk avec la PTP-SL contribue aussi à la localisation cytoplasmique de Erk (Blanco-Aparicio et coll., 1999).

Ces sites d'amarrage présents dans les molécules d'interaction et les MAP kinases peuvent être régulés par compétition avec d'autres protéines interagissant avec le même site (Tanoue et coll., 2003) mais il y a aussi quelques exemples de rétro-contrôle régulant la stabilité de ces complexes. Ainsi, la kinase Raf a initialement été décrite comme faisant partie intégrante d'un complexe protéique d'une masse apparente de 300-500 kDa, composé entre autres de Ras, Mek et des chaperones moléculaires (Wartmann et coll., 1994). Comme il en a précédemment été question, l'interaction de KSR avec Raf et 14-3-3 est régulée par phosphorylation

(Ory et coll., 2003). Or, dans un premier temps, la déphosphorylation de KSR et Raf dépend de la présence constitutive des sous-unités catalytiques de PP2A et de l'association de la sous-unité catalytique lors d'une stimulation (Ory et coll., 2003). Dans un second temps, Erk exerce un rétro-contrôle sur Raf, et l'hyperphosphorylation de Raf régule la stabilité du complexe ainsi que sa liaison à Ras (Dougherty et coll., 2005; Wartmann et coll., 1997). Cette hyperphosphorylation de Raf est un exemple de rétro-contrôle négatif régulant indirectement sa présence à la membrane en déstabilisant le complexe. La protéine Raf hyperphosphorylée lie ensuite la protéine phosphatase PP2A et la prolyl isomérase Pin1, nécessaires à la déphosphorylation et à l'inactivation de Raf (Dougherty et coll., 2005).

D'autres exemples de complexes protéiques mettant en jeu des protéines de la voie de signalisation de l'ET-1 pourraient aussi s'avérer importants. À cet égard, et tel que décrit à la section 1.3.3, la stimulation des PKC mène à l'activation de Ras et à la formation d'un complexe Ras-Raf contenant une forme active de Raf (Marais et coll., 1998). Dans ce modèle, l'interaction Ras-Raf est nécessaire à l'activation de Raf. Or, un module composé de N-Ras, cRaf-1 et nPKC ϵ a été isolé et étudié dans des cellules de fibroblastes au repos. Dans ce module, Raf est inactivé et peut être activée lorsque le complexe isolé est mis en présence d'ester de phorbol (Hamilton et coll., 2001).

Finalement, nPKC ϵ joue un rôle dans les stimuli cardioprotecteurs (Ping et coll., 1999; Ping et coll., 1997) possiblement au moyen d'une interaction avec Erk1/2 au niveau de la mitochondrie (Baines et coll., 2002). L'interaction pourrait s'avérer importante mais il est encore incertain qu'elle soit directe.

Bien qu'il ne manque pas de théories sur les fonctions potentielles des protéines échafauds, une étude récente du D' Lim et ses collègues (2003) confirme que ces protéines agissent en tant que régulateurs dynamiques des réseaux de signalisation *in vivo* (Park et coll., 2003). Pour arriver à ces résultats, les auteurs ont utilisé les

protéines échafauds des MAPK de levure, Ste5 et Pbs2 qui coordonnent respectivement la signalisation du facteur- α pour induire l'accouplement et l'osmo-régulation lors d'une forte osmolarité. Ste5 et Pbs2 ont été modifiées de façon à lier de nouvelles molécules complètement différentes des protéines endogènes interagissant avec ces protéines échafauds. Non seulement ces protéines modifiées pouvaient-elles induire la formation de nouveaux complexes protéiques, mais ces complexes étaient fonctionnels puisqu'ils respectaient la signalisation prédite et provoquaient une réponse phénotypique. Donc, en changeant les propriétés de l'échafaud, les auteurs ont été en mesure de reprogrammer l'assemblage de complexes et d'induire des réponses qui étaient inexistantes dans ce réseau de signalisation. Cette étude démontre d'une façon élégante la spécificité des protéines échafauds et leur capacité d'agir comme point central d'un réseau de signalisation.

1.4.3 Signalisation dans les radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane plasmique enrichis en glycosphingolipides et en cholestérol (Sargiacomo et coll., 1993). Ils sont caractérisés par leur insolubilité en présence de détergents non-ioniques à 4 °C ainsi que par leur faible coefficient de sédimentation dans un gradient de sucrose (Smart et coll., 1995). Les cavéoles, une sous-classe de radeaux lipidiques, sont des invaginations de la membrane plasmique en forme de flasque (Yamada, 1955) dont la structure est conférée par diverses protéines membranaires telles que les cavéolines (Fra et coll., 1995; Rothberg et coll., 1992). Les cavéoles peuvent être stables et ancrées à la membrane plasmique par le squelette d'actine cortical (Thomsen et coll., 2002) ou encore, former des vésicules faisant partie d'un système unique d'endocytose-exocytose (Anderson, 1998; Pelkmans et coll., 2002). Les cavéoles jouent aussi un rôle dans la régulation du taux de cholestérol cellulaire (Ikonen et

coll., 2000) et dans la signalisation intracellulaire (Anderson, 1998; Lisanti et coll., 1994; Razani et coll., 2002).

À ce jour, six produits géniques de la cavéoline ont été détectés chez les mammifères (c.-à-d. cavéoline-1 α , -1 β , -2 α , 2 β , -2 γ et -3). Les cavéolines-1 et -2 sont exprimées dans plusieurs types cellulaires différents alors que l'expression de la cavéoline-3 est restreinte aux muscles (Tang et coll., 1996). Plusieurs méthodes de purification des cavéoles, basées sur la présence de la cavéoline, ont été développées. Les méthodes de fractionnement subcellulaire ont montré que les fractions enrichies en cavéoline-1 sont également enrichies en protéines modifiées par des lipides, en molécules de signalisation ainsi qu'en récepteurs [Revu dans (Anderson, 1998; Razani et coll., 2002)]. Donc, les cavéoles pourraient fonctionner en signalosome: un tel niveau d'organisation serait avantageux pour la cellule car une meilleure organisation permettrait d'augmenter l'efficacité de la signalisation mais aussi de réduire la signalisation croisée non-spécifique.

Une protéine interagit avec les microdomaines lipidiques pour plusieurs raisons. Le niveau d'organisation des radeaux lipidiques conféré par la présence de glycosphingolipides, de cholestérol et de sphingomyéline en fait une région membranaire possédant une plus faible fluidité et favorise l'accumulation de protéines acylées, prenylées ou liées à une molécule de glycosylphosphatidylinositol (Anderson, 1998; Schroeder et coll., 1994). Toutefois, bien que les groupements acyls ou prenyls soient également hydrophobes, la structure irrégulière des chaînes prenyls pourrait les exclure des radeaux lipidiques (Melkonian et coll., 1999). La localisation aux cavéoles peut également avoir lieu par une interaction protéine-protéine avec le domaine d'échafaudage des cavéolines (Razani et coll., 2002). Ce sont donc les cinétiques des interactions protéines-protéines, lipides-protéines directes et les interactions lipides-protéines indirectes, par une modification lipidique

covalente, qui dictent la probabilité d'interaction avec les radeaux lipidiques et les cavéoles.

Bien que l'on ne sache pas si les ETR interagissent avec les cavéoles formées par la cavéoline-3, il a été rapporté que les ET_AR ainsi que les ET_BR colocalisaient avec la cavéoline-1 lors de fractionnements cellulaires effectués avec des cellules de mammifère (c.-à-d. COS-1, HEK293) et d'insecte (Sf9) (Chun et coll., 1994; Yamaguchi et coll., 2003). D'autres interacteurs de la voie de signalisation des ETR ont aussi été associés aux cavéoles dans certaines études. Tel que mentionné à la section 1.2.4, les ETR peuvent coupler différentes protéines G-hétérotrimériques. Généralement, les ET_ARs peuvent coupler G_q et G_s alors que les ET_BR peuvent coupler G_q ou G_i (Aramori et coll., 1992; Takagi et coll., 1995). Puisque les sous-unités α peuvent être N-myristoylées et/ou palmitoylées, et que les sous-unités γ peuvent être prenylées (Chen et coll., 2001), il est possible que certains complexes de protéines-G hétérotrimériques soient localisés dans un sous-type de radeau lipidique. De plus, il a été démontré que G α_s -GDP pouvait interagir avec la cavéoline-1 (Okamoto et coll., 1998). Cette interaction participerait au processus de désensibilisation hétérologue en empêchant la réassociation du complexe hétérotrimérique. Bien qu'aucune interaction directe de la PLC- β avec les radeaux lipidiques n'ait été démontrée à ce jour, quelques pistes pointent dans cette direction. En effet, le domaine PH (*Plekstrin homology*) de PLC- β , situé en amino-terminal de la protéine, peut lier le PtdIns(4,5)P₂ (Runnels et coll., 1996) dont certains radeaux lipidiques sont enrichis (Liu et coll., 1998; Pike et coll., 1996). Tel que mentionné précédemment, l'hydrolyse du PtdIns(4,5)P₂ en DG ainsi qu'en InsP₃ permet l'activation des PKC. Or, il a été attesté que l'isoforme majeure des PKC dans les cardiomyocytes, soit nPKC ϵ , transloquait aux cavéoles à la suite d'une longue stimulation à l'ET-1 (Rybin et coll., 1999). Il en est de même pour un autre interacteur de la signalisation post-réceptorielle de l'ET-1: les protéines-G

monomériques Ras. Ces protéines-G peuvent être farnesylées et palmitoylées, suggérant une interaction potentielle avec les radeaux lipidiques (Hancock et coll., 1989; Newman et coll., 1993). L'interaction de GDP-Ras avec la cavéoline et leur partition dans les cavéoles ont d'ailleurs été l'objet d'une récente revue par Lisanti et collaborateurs (Okamoto et coll., 1998). Enfin, il a été mentionné précédemment que l'activation de la MAPKKK Raf requérait une association à Ras et une translocation à la membrane plasmique afin de pouvoir ensuite propager l'activation à la cascade culminant en l'activation de Erk1/2. Cette interaction aurait lieu dans les cavéoles (Chong et coll., 2003).

1.5 PROBLÉMATIQUE

Plusieurs études soulignent désormais le rôle important que joue l'ET-1 dans le processus hypertrophique du myocarde. Ces études démontrent que l'hypertrophie implique un système local de synthèse, d'entreposage et de relâche de l'ET-1. Il est également établi que les cibles de ce système autocrine, paracrine et potentiellement intracrine de l'ET-1 sont les deux récepteurs aux endothélines, soit les sous-types ET_AR et ET_BR. L'activation de ces récepteurs, par la liaison à l'ET-1, enclenche une série d'événements moléculaires menant éventuellement à l'activation de Erk. Or, l'activation de cette voie de signalisation est essentielle à l'hypertrophie des cardiomyocytes adultes. Cependant, bien que les protéines qui participent à l'activation de Erk soient relativement bien identifiées, l'orchestration spacio-temporelle permettant la grande diversité des réponses cellulaires à l'ET-1 reste à ce jour, au mieux, conceptuelle. De plus, l'ultrastructure complexe du cardiomyocyte adulte présente un modèle pouvant elle-même contribuer à l'organisation de la transduction du signal de l'ET-1 *in vivo*. Donc, cette étude portant sur l'organisation des

composantes de la voie de signalisation de l'ET-1 dans le modèle du cardiomyocyte adulte et dans le cœur adulte a comme objectif de mieux comprendre le rôle de la localisation subcellulaire des composantes de cette voie de signalisation dans l'hypertrophie du myocarde.

1.6 HYPOTHÈSES DU PROJET DE RECHERCHE

Nous avons étudié l'organisation du système de transduction du signal de l'ET-1 dans les cardiomyocytes et les cœurs adultes. Les objectifs de cette étude sont les suivants:

- 1) Déterminer si différents pools de PKC sont activés par les récepteurs de l'ET-1. L'activation de différents pools de PKC (c.-à-d. cytosolique ou membranaire) par différentes doses d'ET-1 pourrait potentiellement permettre de différencier les réponses physiologiques des réponses hypertrophiques de l'ET-1.
- 2) Identifier et caractériser la/les cible(s) intracellulaire(s) de l'ET-1. Des cibles intracellulaires à l'ET-1 pourraient expliquer l'entrée d'ions calcium au noyau en présence d'ET-1 cytosolique. De telles cibles intracellulaires pourraient aussi représenter des senseurs de l'ET-1 lorsque celle-ci est traduite en surabondance lors de stress cardiaques.
- 3) Étudier si les cavéoles participent à l'organisation d'un signalosome formé des composantes de la cascade de signalisation de l'ET-1 menant à l'activation de Erk1/2 dans les cardiomyocytes adultes. La présence de tels signalosomes aux cavéoles

pourrait en partie contribuer à la diversité de signaux cellulaires observés lors de stimulations à l'ET-1.

2. ARTICLE #1

Un pool de PKC associées à la membrane a été observé dans quelques types cellulaires. Ce pool d'enzyme pouvait être activé par des doses de facteurs de croissance ne causant pas la translocation de l'enzyme (Chakravarthy et coll., 1994). Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'activation des PKC ne nécessitait pas la translocation de l'enzyme vers les membranes dans les cardiomyocytes adultes. Nous avons proposé que l'activation de ce pool membranaire de PKC, par des doses physiologiques d'ET-1, pouvait différencier la signalisation physiologique de la signalisation hypertrophique de l'ET-1.

Regulation of membrane-bound PKC in adult cardiac ventricular myocytes

Benoit Boivin[‡] and Bruce G. Allen^{‡§*}

Cell. Signal. 2003 Feb;15(2):217-224.

[‡] Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de Recherche, 5000 rue Bélanger est, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

[§] Departments of Medicine and Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, PQ, Canada, H3C 3J7

* Address for Correspondence: Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de Recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec H1T 1C8. Telephone: (514) 376-3330 (3591). FAX: (514) 376-1355. XXXXXXXXXX

Running Title: PKC regulation in myocyte membranes

Keywords: Heart, adult ventricular myocytes, protein kinase C, membranes, translocation, endothelin-1.

ABSTRACT

Activation of protein kinase C (PKC) is thought to involve translocation to the particulate fraction. The present study demonstrates a membrane-associated, inactive pool of PKC in adult rat ventricular myocytes. Membranes were isolated from stimulated (phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), endothelin-1 (ET-1)) or control myocytes and PKC activity determined in the absence (active PKC) or presence (total PKC) of PMA. An inactive, PMA-responsive, pool of PKC was detected. In intact myocytes, PMA or ET-1 induced a translocation of PKC ϵ from the cytosol into the particulate fraction. In contrast, ET-1 decreased both total and active PKC in the membranes: this decrease was associated with a loss of PKC ϵ immunoreactivity. PMA increased the amount of membrane-associated, inactive PKC. Our results demonstrate the presence of a membrane-associated pool of PKC in cardiac myocytes that is differentially modulated by ET-1 or PMA.

Abbreviations:

Bis, bisindolylmaleimide I; DMSO, dimethylsulfoxide; DG, 1,2-diacylglycerol; DTT, dithiothreitol; ET-1, endothelin-1; MBP, myelin basic protein; PKC, protein kinase C; PKI, cyclic AMP-dependent protein kinase inhibitory peptide, PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PVDF, polyvinyl difluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBST, Tris-buffered saline containing Tween-20; TX-100, Triton X-100.

INTRODUCTION

Cardiac hypertrophy is a compensatory increase in myocardial mass that occurs when cardiac myocytes are continuously exposed to increased external stimuli such as mechanical stretch, induced by a hemodynamic overload, or increases in neurohormonal factors (reviewed in (1,2)). Both concentric and eccentric hypertrophies are characterized by the re-establishment of an embryonic phenotype and an increase in contractile units (1,3). Paracrine transmitters, including endothelin-1 (ET-1), norepinephrine and angiotensin II, which bind to seven-transmembrane G protein-coupled receptors (GPCRs) and activate a heterotrimeric guanine nucleotide-binding regulatory protein (G protein), G_q , have been implicated in the induction of hypertrophy in cardiac myocytes (4,5). In its GTP-bound state, $G\alpha_q$ activates phospholipase C- β (PLC- β) which, in turn, hydrolyses phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to form two second messengers, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) and 1,2-diacylglycerol (DG). The binding of IP_3 to its receptor results in the release of Ca^{2+} from intracellular stores. The increase in membrane DG leads to the activation of protein kinase C (PKC). Phosphorylation of PKC by PKC-kinase(s) is a post-translational modification that is essential for the production of a mature, catalytically competent, form of the enzyme that is capable of participating in signal transduction (6,7). Upon receptor-mediated activation, catalytically competent PKC translocates from the cytosol to the particulate fraction where it is thought to bind a 'receptor for activated C-kinase' (RACK (8)) and access DG, phosphatidylserine, and subcellular targets (9,10). The translocation of PKC to the plasma membrane in response to physiological stimuli is followed by a rapid return of PKC back to the cytoplasm (11), a process referred to as reverse translocation and thought to require autophosphorylation (12,13). It has been reported that the substrate itself can modulate PKC's catalytic activity (14,15). Studies also suggest the presence of both active and inactive pools of membrane-bound PKC that are distinct from membrane-

inserted PKC (16,17). This membrane-bound pool of PKC can be stimulated by either agonists that produce DG or phorbol ester (17). Hence, it is possible that low concentrations of agonist activate a pool of membrane-associated, inactive PKC whereas high concentrations of agonist induce the recruitment of PKC from the cytoplasm to the membrane. This model may explain physiological versus pathological signaling mediated by PKC. In the present study, we demonstrate the presence of an inactive, membrane-bound form of PKC in adult cardiac myocytes that can be modulated by the ET-1 signaling pathway and by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and the nature of this modulation differs. In addition, the nature of the phosphate acceptor influences the degree to which the kinase is activated in the absence of stimulation, suggesting that colocalization of PKC with particular substrates, by either translocation of PKC or of the substrate itself, may be sufficient to induce PKC-mediated phosphorylation of these substrate proteins.

MATERIALS AND METHODS

Materials: [γ - 32 P]ATP was from Amersham Pharmacia Biotech. Membrane-grade (reduced) Triton X-100, leupeptin, and PMSF were from Roche Molecular Biochemicals. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis reagents, PVDF, and Bradford protein assay reagents were from Bio-Rad. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and bisindolylmaleimide I (Bis) were from Calbiochem. Myelin Basic Protein peptide (MBP₃₋₁₄, amino acid sequence 3 AQKRPSQRSKYL¹⁴), a peptide corresponding to the pseudosubstrate of PKC ϵ with an alanine to serine substitution (peptide ϵ , amino acid sequence ERMRPRKQGSVRRRV), and a cAMP-dependant protein kinase inhibitor peptide (PKI, amino acid sequence TTYADFIASGRTGRRNAITHD) were from the University of Calgary Peptide Synthesis Core Facility. Endothelin-1 was from American Peptide Company Inc. Anti-PKC α (monoclonal MC5) was from Amersham, anti-PKC ϵ (*sc-214-G*) was from Santa Cruz Biotechnology Inc, and anti-PKC δ (13197-017) from Gibco BRL. HRP-conjugated secondary antibodies were from Jackson Laboratories. Western blot chemiluminescence reagent Renaissance Plus was from NEN. All other reagents were of analytical grade or best grade available. NanoPure grade water was used throughout these studies.

Isolation of Cardiac Ventricular Myocytes: Male Sprague-Dawley rats (150-200 g) were injected intraperitoneally with 500 U of heparin and anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg). Calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated as described previously (18) and resuspended in 5 ml Jokliks MEM buffer containing 0.5 mM CaCl₂. The preparation provided 8-12 million cells/heart with 80-85% viability, as assessed by counting quiescent cells with rod-shaped morphology.

Isolation of Membranes from Ventricular Myocytes: Myocytes were isolated, divided into 1 ml aliquots in 1.5 ml microcentrifuge tubes and used immediately.

PMA and ET-1 were added directly to the cell suspensions from 1000-fold stock solutions prepared in either 100% DMSO (PMA) or distilled water (ET-1). Cells were incubated in the presence of agonists at room temperature and under gas (95% O₂: 5% CO₂) for 15 sec, 30 sec, 1 min, 3 min, 5 min and 10 min. Cells were then chilled at 0°C for 1 min, centrifuged for 5 min at 3,000 rpm (600g) and 5°C, and resuspended in 1.0 ml of ice-cold buffer B (10 mM Na-Hepes pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.1% β-mercaptoethanol, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 25 μg/ml leupeptin, and 5 mM DTT). Note that this buffer contains neither metal ion chelators (EDTA or EGTA) nor detergents. All subsequent steps were carried out on ice or at 5°C. Cells were disrupted by sonication (3 x 10 sec at an amplitude of 15% using a microprobe) with a Sonic & Materials Inc. sonicator (Model VCX 400). Nuclei and unbroken cells were sedimented by centrifugation at 3,000 rpm (600g) for 5 min. Membrane and cytosolic fractions were then separated by centrifugation at 100,000g for 60 min in a Beckman Ti 90 rotor. The resulting pellets, containing the cell membranes, were resuspended in 250 μl of buffer B.

Determination of Membrane-Associated PKC Activity: The activity of PKC associated with freshly isolated membranes was measured directly in the membranes, as described previously (19). Neither chelators nor detergents were used to extract the PKC from these membranes and hence the acidic phospholipid requirement for PKC activation was met by the membranes themselves. Kinase activity was measured by determining the transfer of ³²P from [γ³²P]ATP to both non-selective (histone H1S) and PKC-selective substrates (MBP₃₋₁₄, peptide ε). MBP₃₋₁₄ peptide corresponds to residues 3-14 of myelin basic protein and contains a PKC phosphorylation site. The reaction mixture (50 μL) contained (final concentration): 1 mM NaHCO₃, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 100 μM Na₄P₂O₇, 1 μM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 50 mM

Tris-HCl pH 7.5 at 4°C, 100 µM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 75 µM MBP₃₋₁₄ or 100 µM peptide ε, 1 µM PKI, and 100 µM [γ -³²P]ATP (30-60 dpm/pmol). Where indicated, a highly selective inhibitor of PKC, bisindolylmaleimide I (Bis, 50 nM, IC₅₀ 10 nM), was included in the reaction medium. Chelerythrine-Cl (10 µM, IC₅₀ 660 nM) was also employed. Following a 1 min pre-incubation, the reaction was initiated by the addition of 10 µg of membrane suspension. After incubation for 10 min at 30°C, the reaction was stopped by adding 5 µl of 10% (v/v) acetic acid and the samples were subsequently clarified by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. A 40 µl aliquot of each supernatant, containing the acid-soluble substrate peptides, was applied to Whatman P81 phosphocellulose filter paper (2 cm²) and the filters were washed three times for 10 min each in 500 ml of 0.5% H₃PO₄. Bound ³²P was determined by Cerenkov counting. In experiments where the phosphorylation of endogenous membrane proteins was compared with that of histone type IIIS (1 mg/ml, 2 x 10⁻⁵ M), reactions were initiated by the addition of 10 µg of membrane suspension and terminated by the addition of 5 µl of 4X Laemmli sample buffer. Proteins were separated by electrophoresis on 10-20% (w/v) acrylamide-gradient SDS-polyacrylamide gels, stained using Coomassie Brilliant Blue R-250, dried between two sheets of cellophane, and exposed to Molecular Imaging screens for 48 hr. ³²P-incorporation was quantified by phosphor imaging (Bio-Rad GS 525 Molecular Imager System) as described previously (20).

Preparation of Cytosolic and Particulate Fractions: Myocytes were divided into 1 ml aliquots in 1.5 ml microcentrifuge tubes and used immediately after isolation. PMA and ET-1 were added directly to the cell suspensions from 1000-fold stock solutions prepared in either 100% DMSO (PMA) or distilled water (ET-1). Cells were incubated in the presence of agonists at room temperature and under gas (95% O₂; 5% CO₂) for 5 min and then chilled at 0°C for 1 min. All subsequent steps were

carried out on ice or at 5°C. Myocytes were pelleted by centrifugation at 3,000 rpm (600g) for 2 min and resuspended in 1 ml of ice-cold buffer A (20 mM Hepes pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 20 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerophosphate, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 25 μg/ml leupeptin, and 5 mM DTT). Note that this buffer does not contain detergents. Cells were disrupted by sonication as described above. Homogenates were centrifuged at 100,000g for 30 min in a Beckman Ti 90 rotor fitted with G-max adapters. These supernatants are referred to as the cytosolic fractions. The resulting pellets were resuspended in 1 ml of the buffer A containing 1% (v/v) Triton X-100 using a 2 ml Potter-Elvehjem tissue grinder (20 strokes), incubated for 30 min on ice, and separated by centrifugation at 100,000g for 30 min in a Beckman Ti 90 rotor. These second supernatants, containing detergent-soluble proteins, are referred to as the particulate fractions.

Immunoblotting: Proteins from isolated membranes, myocyte cytosols, or TX-100-solubilised particulate fractions were separated on 10-15% (w/v) acrylamide-gradient SDS-PAGE and transferred electrophoretically onto PVDF membranes at 100 V and 5°C for 90 min. Following transfer, PVDF membranes were blocked for 2 hours in TBST (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % v/v Tween-20) containing 5% (w/v) non-fat milk powder (Carnation) and incubated overnight at 5°C with PKC-specific antisera diluted in TBST containing 1% BSA. Following extensive washing with TBST, filters were reblocked for 10 min in TBST containing 5% (w/v) non-fat milk powder and incubated for 2 hr with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Laboratories) diluted 1:25,000 in reblocking buffer. Following extensive washing, immunoreactive bands were visualized by ECL (Renaissance, NEN) using BioMax MR film.

Data Analysis: Data were analyzed using a curve-fitting program (Prism 3.0c, GraphPad Software) and are presented as the mean ± the standard error of the mean

(SEM). The significance of differences between groups was estimated by one-way ANOVA and differences analyzed using Tukey's or Dunnet's multiple comparison post-hoc test, as indicated. Differences were considered significant when the probability value (p) was less than 0.05.

Miscellaneous Methods: Protein concentrations were measured according to the method of Bradford (21) using bovine γ -globulin as a standard.

RESULTS

To ensure that the conditions of the phosphorylation assay favored the phosphorylation of the exogenous substrates rather than endogenous membrane proteins, PKC activity was determined in the presence of membranes isolated from rat cardiac myocytes plus histone IIIS (1 mg/ml, 2×10^{-5} M), a commonly used PKC substrate. Under the conditions employed, 56.5 ± 1.6 % (n=6) of the total ^{32}P incorporation was into histone IIIS: hence, histone IIIS represented the major site of ^{32}P -incorporation. Furthermore, in the presence of PMA the phosphorylation of histone increased to 62.5 ± 2.1 % (n=6) of the total ^{32}P incorporation. Both basal and PMA-stimulated histone phosphorylation were inhibited by bisindolylmaleimide-1 (Bis, 50 nM). PKCs, in general, display a higher V_{max} towards peptide substrates, such as peptide ϵ and MBP₃₋₁₄, than histone IIIS (14). In the present study, the substrate peptides peptide ϵ and MBP₃₋₁₄ were employed at concentrations greater than employed for histone IIIS. Hence, the peptides can be considered to be preferred substrates, relative to endogenous membrane proteins, for PKC and thus their phosphorylation representative of PKC activation even in crude membrane fractions. The specificity of this phosphorylation was further emphasized by the observation that bisindolylmaleimide I (Bis), a highly selective inhibitor of PKC, inhibited the phosphorylation of both peptide ϵ and MBP₃₋₁₄ (Table 1).

To establish conditions suitable for measuring the activity of membrane-associated PKC activity, membranes were freshly isolated from unstimulated myocytes and two different substrate peptides, peptide ϵ and MBP₃₋₁₄, were employed (Fig. 1; A, B). The incorporation of ^{32}P was linear, with respect to time, for 10 minutes under all conditions employed and with both peptides. In the presence of peptide ϵ , addition of PMA to the assay medium did not induce a further increase in the rate of ^{32}P -incorporation (Fig. 1A, Table 1). Bisindolylmaleimide-1 (Bis, 50 nM) inhibited peptide ϵ phosphorylation to a similar extent in the presence (Fig. 1A, Table

1) and absence (not shown) of PMA. Chelerythrine-Cl (10 μ M) also inhibited peptide ϵ phosphorylation (not shown). On the other hand, when MBP₃₋₁₄ was employed as a substrate, the addition of PMA to the reaction medium increased the rate of peptide phosphorylation (Fig. 1B). PMA-stimulated phosphorylation of MBP₃₋₁₄ was inhibited by Bis. The rate of MBP₃₋₁₄ phosphorylation determined when PMA is present in the assay medium has been taken to represent the total amount of membrane-associated PKC activity. Hence, membranes freshly isolated from ventricular myocytes contain both active and inactive pools of PKC.

The studies described above demonstrated that peptide ϵ masked the presence of a membrane-associated pool of PKC that could be activated by the addition of PMA to the reaction medium. This phenomenon is consistent with previous studies using purified PKC isoforms in an *in vitro* mixed micellar assay system (14,15). Hence, MBP₃₋₁₄ was employed in subsequent studies of the regulation of the membrane-associated, activatable pool (e.g., total – active) of PKC. To determine if the inactive pool of membrane-associated PKC could be stimulated *in vivo*, intact myocytes were treated with PMA (100 nM) or ET-1 (100 nM), membranes isolated, and MBP₃₋₁₄ phosphorylation determined (Fig. 2). In unstimulated myocytes, 50% of the total membrane-associated PKC activity was inactive but activatable upon addition of PMA to the assay medium. As expected from previous studies (22,23), treatment of intact myocytes with PMA caused an increase in membrane-associated PKC activity (Fig. 2A). In myocytes, this activity was maximal following 15 seconds of stimulation then decreased to a plateau level. The peak value of total PKC activity in membranes from PMA-stimulated myocytes was 2 times the basal PKC activity (Fig. 2A) and 1.5 times the total activity in membranes from unstimulated cells (eg., Fig 2A, stimulation time zero). The plateau level of activity was equivalent to the total membrane-associated PKC activity in unstimulated cells. On the other hand, treatment of intact myocytes with ET-1 (Fig. 2B) resulted in a rapid (< 1 min)

reduction in membrane-associated PKC activity, both activatable and total, that was maximal following 5 min. of treatment. Thus, both PMA and ET-1 induced changes in the amount of membrane-associated PKC activity: however, their effects were distinct.

To compare the effect of PMA and ET-1 upon PKC activity in membranes with their effects upon PKC content, immunoblotting experiments were performed to follow changes in the amounts of selected PKC isoforms in membranes isolated from control and stimulated myocytes. PKCs ϵ and δ were recently shown to be responsible for the majority of the PKC activity in the heart (24) and hence were examined in the present study. The PMA-stimulated increase in membrane-associated PKC activity was accompanied by an increase in membrane-associated PKC ϵ immunoreactivity (Fig. 3; A,C) confirming that this treatment induced translocation. However, whereas PKC activity reached a plateau level after treating intact myocytes with PMA for 1 min (Fig. 2A), PKC ϵ immunoreactivity continued to increase in the membranes throughout the period of PMA stimulation. Following stimulation with ET-1, the membrane-associated PKC ϵ immunoreactivity decreased (Fig. 3 B,C) in parallel with the ET-1-mediated changes in PKC activity (Fig. 2B). In other words, ET-1 induced translocation of PKC ϵ away from the membrane. Furthermore, the ET-1 mediated loss of PKC ϵ immunoreactivity from the membrane fraction was greater in membranes isolated from myocytes stimulated with 100 nM ET-1 than with 10 pM ET-1 (Fig. 4). In contrast with the observations for PKC ϵ , membrane-associated PKC δ immunoreactivity remained unchanged following ET-1 treatment (not shown): no membrane-associated PKC α immunoreactivity was detected before or after ET-1 treatment (not shown).

Activation of PKC *in vivo* is often assessed by determining its translocation from the cytosol to the Triton X100-soluble extract of the particulate fraction. PKC ϵ translocation from the cytosol to the particulate fraction was determined by

immunoblotting following a 5 min stimulation of myocytes with either PMA or ET-1. As demonstrated previously, in unstimulated myocytes PKC ϵ immunoreactivity was detected in both the soluble and particulate fractions (22,25,26). Stimulation of intact myocytes with PMA (100 nM, 5 min) or ET-1 (100 nM, 5 min) induced a translocation of PKC ϵ from the cytosol to the particulate fraction (Fig. 5): PKC ϵ immunoreactivity was increased in the particulate fraction by 33% and 10%, respectively. This is in marked contrast to the results described above where ET-1 induced a decrease in PKC ϵ immunoreactivity in the membrane fraction (Fig. 3,4).

DISCUSSION

PKC is a ubiquitous family of serine/threonine kinases that has been implicated in a wide variety of cellular processes including hypertrophy of the ventricular myocyte. Most studies to date have suggested that PKC must translocate from the cytosol to the membrane in order to be fully activated. The data presented in this study demonstrates that ventricular myocyte membranes contain both active and inactive PKC. Treatment of intact myocytes with PMA resulted in both an increase in total membrane-associated kinase activity and translocation of PKC ϵ immunoreactivity to the membrane. Conversely, treatment of intact myocytes with ET-1 produced a diminution in membrane-bound PKC activity plus a translocation of PKC ϵ , but not PKC δ , away from the membrane. Hence, the membrane-associated PKC pool is accessible to effector molecules downstream of ET receptors and other factors are likely involved in regulating the subsequent localization of PKC.

Cellular membranes have been shown to contain an inactive pool of PKC that is activated by PMA or growth factors (17). As translocation is thought to reflect the activation of the PKC family, there is currently no explanation for the presence of an inactive pool of PKC located on the membrane. In this study, we examined the possibility that membrane-associated but inactive PKC could be activated under conditions of physiological stimulation whereas mitogenic stimuli (e.g. PMA) would cause PKC translocation from the cytosolic fraction to the membranes. PKC activity was detected in membranes isolated from adult ventricular myocytes using histone H1, peptide ϵ and MBP₃₋₁₄ as substrates. Since many PKC substrates can also be phosphorylated by the cAMP-dependant protein kinase (PKA), a peptide inhibitor of PKA (PKI) was included in the assay. The increase in kinase activity, in membranes isolated from unstimulated myocytes, when PMA was included in the kinase assay indicated either the presence of a second pool of membrane-associated PKC or a second stage of activation of a partially active PKC pool. Histone H1 is a good

substrate for the Ca^{2+} -sensitive PKC isoforms but a poor substrate for α PKCs and η PKCs (27,28); hence, peptide ϵ and MBP₃₋₁₄ were used to rule out the isoform selectivity of the observation. Peptide ϵ , a peptide derived from the pseudosubstrate motif of PKC ϵ demonstrated some unusual properties in that the PMA-activatable pool detected when using histone IIIS could not be detected with peptide ϵ . One possible explanation is that peptide ϵ was only phosphorylated by a membrane-associated, PMA-insensitive pool or subtype of PKC. This suggests that the activated and inactive enzyme represent two distinct pools of membrane-associated PKC. Another possibility is that, as shown previously (14,15), peptide ϵ diminishes the co-factor dependency of most PKC isoforms due to an arginine-rich region flanking the consensus phosphorylation site, thus activating the membrane-associated PKC. Contrary to histone IIIS, the MBP₃₋₁₄ peptide contains only the PKC consensus phosphorylation site r-x-s-x-r and is one of the most non isoform-selective PKC peptide substrates. Similar to histone IIIS, MBP₃₋₁₄ revealed a PMA-sensitive, membrane-associated PKC activity, suggesting that the membrane-associated activatable PKC pool may comprise both Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent PKC isoforms. The presence of Ca^{2+} -independent isoforms was confirmed by immunoblotting for PKC ϵ and PKC δ ; however, no PKC α immunoreactivity was detected in these membranes.

The $\text{G}\alpha_q$ protein-coupled receptor-mediated activation of PKC is well documented and is thought to involve the activation of PLC- β and subsequent production of 1,2-diacylglycerol (DG) and IP₃. PMA has been used as a long-lived, membrane-permeable DG analog to activate PKC. However, in the present study, marked differences were observed in the activation of membrane-associated PKC by PMA versus the ET-1 signaling pathway. PMA produced a rapid increase (within 15 seconds) followed by a decrease (within 1 minute) in membrane-associated PKC activity. This inactivation was not a result of the translocation of PKC away from the

membrane, as PKC ϵ immunoreactivity continued to increase. Thus, the translocation pattern of PKC ϵ , an abundant PKC isoform in the ventricular myocytes, did not correlate with the total amount of membrane-associated PKC activity. Instead, a pool of membrane-associated enzyme was created that could not be activated by the addition of PMA *in vitro*. In contrast, when myocytes were pretreated with ET-1, membrane-associated PKC activity did correlate with the pattern of PKC ϵ translocation. PKC ϵ translocated to the particulate fraction upon a 5 minute stimulation with either PMA or ET-1 (as previously showed by others (25,29)). However, stimulation with ET-1 resulted in both translocation of PKC ϵ from the membrane fraction and a diminution of membrane-associated PKC activity. As ET-1 produced an increase in PKC ϵ immunoreactivity in the particulate fraction, ET-1 must induce PKC ϵ to translocate, at least in part, from membranes to another component within the particulate fraction. The enzyme translocating away from the membrane could also have returned, in part, to the cytosol and represent a change in the total cytosolic PKC ϵ too small to be detected. PKC ϵ has been shown to translocate to the Z-line of the sarcomere (30-32). Binding to Golgi structures, points of cell-cell contact, perinuclear regions, and intercalated disks have also been demonstrated in cardiac tissue (33,34). The mechanism(s) regulating this redistribution and localization are currently unknown; however, they clearly differ between ET-1 and PMA. PKC β II has been shown to oscillate between the plasma membrane and the cytosol in response to stimulation of metabotropic glutamate receptors, G protein-coupled receptors that couple via G α_q to the hydrolysis of phosphoinositides, and this oscillatory behavior is arrested upon inhibition of PKC activity with the subsequent buildup of PKC β II on the plasma membrane (35). It is currently thought that the dissociation of activated PKC from the plasma membrane is dependent upon its ability to autophosphorylate (12,13,35). However, both DG and PMA lead to PKC activation and autophosphorylation. Hence, the differences

observed between PKC translocation and total activity in membranes when intact myocytes were stimulated with PMA may reflect a form of inactivation of the enzyme.

Our current findings suggest that a PMA-sensitive pool of PKC is present on the membranes of adult rat cardiac ventricular myocytes. Interestingly, the response of membrane-associated PKC in cardiac myocytes treated with ET-1 differed from that of 3T3-L1 cells treated with either epidermal growth factor or fibroblast growth factor stimuli or that of CTLL-2, WEHI-231 and S49 lymphoma cells treated with interleukin-2 (17). In these cell types, exposure to these agonists activated membrane-associated PKC whereas in myocyte membranes PKC activity was reduced by ET-1 and this appeared to be due to translocation away from the membranes. Furthermore, as 10^{-11} M and 10^{-7} M ET-1 ($K_d = 10^{-10}$ M) produced the same pattern of translocation, it is unlikely that there exists a differential regulation of membrane-associated PKC by high versus low concentrations of ET-1. Thus, the regulation of the membrane-associated PKC activation may be cell- and/or agonist-specific. As PMA, and peptides that have rich arginine-flanked PKC consensus sites, can activate membrane-associated PKC, the membrane-associated pool of PKC is activatable but possibly compartmentalized such that it is sequestered from endogenous DG. Compartmentalization may also underlie the mechanism whereby PMA pretreatment resulted in a pool of membrane-associated, but inactivatable, PKC. The endothelin receptor subtypes ET_A and ET_B have been shown to interact with G proteins other than Gq/11. Endothelin signaling through Go/Gi, Gs and Gq/12/13 have been observed in cultured VSMC, AT-1, cultured neonatal myocytes and adult rat ventricular myocytes (25,36,37). The relative expression levels of ET_A and ET_B also differs in a cell specific manner (38-42). These receptor subtypes may have distinct effects upon the activation and distribution of PKC in the myocyte. ET_B receptors

appear to be absent from cultured neonatal myocytes (43), the model most commonly used for the study of myocyte-specific signal transduction.

In conclusion, we demonstrate that ventricular myocytes contain both active and inactive pools of membrane-associated PKC. The pools of membrane-associated PKC are physically and/or functionally compartmentalized such that they respond differently when intact myocytes are treated with PMA versus ET-1. In addition, stimulation with an artificial PKC activator such as PMA resulted in the formation of an additional pool of PKC that was membrane-associated but could not be activated by subsequent stimulation with PMA *in vitro*. Finally, low (10^{-11} M) versus high (10^{-7} M) concentrations of ET-1 changed the magnitude, but not the pattern, of PKC activation and translocation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Dominique Chevalier for excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MT-14725) and the Fonds de la Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (FRICM). BGA is currently a Research Scholar of the Heart and Stroke Foundation of Canada. BB is the recipient of a research traineeship from the FRICM.

BIBLIOGRAPHY

1. Hunter, J. J., and Chien, K. R. (1999) *N. Engl. J. Med.* 341, 1276-1283.
2. Swynghedauw, B. (1999) *Physiol. Rev.* 79, 215-262.
3. Chien, K. R., Zhu, H., Knowlton, K. U., Miller-Hance, W., van-Bilsen, M., O'Brien, T. X., and Evans, S. M. (1993) *Ann. Rev. Physiol.* 55, 77-95.
4. Fuller, S. J., Gaitanaki, C. J., and Sugden, P. H. (1990) *Biochem. J.* 266, 727-736.
5. Shubeita, H. E., McDonough, P. M., Harris, A. N., Knowlton, K. U., Glembotski, C. C., Brown, J. H., and Chien, K. R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20555-20562.
6. Orr, J. W., and Newton, A. C. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 27715-27718.
7. Keranen, L. M., Dutil, E. M., and Newton, A. C. (1995) *Current Biol.* 5, 1394-1403.
8. Mochly-Rosen, D., Khaner, H., and Lopez, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3997-4000.
9. Mochly-Rosen, D., Henrich, C. J., Cheever, L., Khaner, H., and Simpson, P. C. (1990) *Cell Regul.* 1, 693-706.
10. Kraft, A. S., and Anderson, W. B. (1983) *Nature* 301, 621-623.
11. Feng, X., Zhang, J., Barak, L. S., Meyer, T., Caron, M. G., and Hannun, Y. A. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 10755-10762.
12. Feng, X., and Hannun, Y. A. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 26870-26874.

13. Feng, X., Becker, K. P., Stribling, S. D., Peters, K. G., and Hannun, Y. A. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 17024-17034.
14. Allen, B. G., Andrea, J. E., and Walsh, M. P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 29288-292948.
15. Andrea, J. E., Sutherland, C., Winter, C. K., and Walsh, M. P. (1998) *FEBS Lett.* 429, 73-77.
16. Bell, R. M. (1986) *Cell* 45, 631-632.
17. Chakravarthy, B. R., Whitfield, J. F., and Durkin, J. P. (1994) *Biochem. J.* 304, 809-816.
18. Rodrigues, B., and Severson, D. L. (1997) in *Biochemical Techniques in the Heart* (McNeill, J. H., ed), pp. 101-115, CRC Press, New York
19. Chakravarthy, B. R., Bussey, A., Whitfield, J. F., Sikorska, M., Williams, R. E., and Durkin, J. P. (1991) *Anal. Biochem.* 196, 144-150.
20. Chevalier, D., Thorin, E., and Allen, B. G. (2000) *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 44, 429-439.
21. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
22. Bogoyevitch, M. A., Parker, P. J., and Sugden, P. H. (1993) *Circ. Res.* 72, 757-767.
23. Kraft, A. S., Anderson, W. B., Cooper, H. L., and Sando, J. J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13193-13196.

24. Schreiber, K. L., Paquet, L., Allen, B. G., and Rindt, H. (2001) *Am. J. Physiol.* 281, H2062-H2071.
25. Jiang, T. R., Pak, E., Zhang, H. L., Kline, R. P., and Steinberg, S. F. (1996) *Circ. Res.* 78, 724-736.
26. Lemire, I., Allen, B. G., Rindt, H., and Hebert, T. E. (1998) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1827-1839.
27. Marais, R. M., and Parker, P. J. (1989) *Eur. J. Biochem.* 182, 129-137.
28. Huang, K. P., Huang, F. L., Nakabayashi, H., and Yoshida, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 14839-14845.
29. Clerk, A., Bogoyevitch, M. A., Andersson, M. B., and Sugden, P. H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 32848-32857.
30. Disatnik, M.-H., Buraggi, G., and Mochly-Rosen, D. (1994) *Exp. Cell Res.* 210, 287-297.
31. Huang, X. P., Pi, Y., Lokuta, A. J., Greaser, M. L., and Walker, J. W. (1997) *J. Cell Sci.* 110, 1625-1634.
32. Robia, S. L., Ghanta, J., Robu, V. G., and Walker, J. W. (2001) *Biophys. J.* 80, 2140-2151.
33. Csukai, M., Chen, C. H., De Matteis, M. A., and Mochly-Rosen, D. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 29200-29206.
34. Wang, Y., and Ashraf, M. (1998) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 2423-2435.

35. Dale, L. B., Babwah, A. V., Bhattacharya, M., Kelvin, D. J., and Ferguson, S. S. G. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 35900-35908.
36. Eguchi, S., Hirata, Y., Imai, T., and Marumo, F. (1993) *Endocrinology* 132, 524-529.
37. Hilal-Dandan, R., Merck, D. T., Lujan, J. P., and Brunton, L. L. (1994) *Mol. Pharmacol.* 45, 1183-1190.
38. Molenaar, P., O'Reilly, G., Sharkey, A., Kuc, R. E., Harding, D. P., Plumpton, C., Gresham, G. A., and Davenport, A. P. (1993) *Circ. Res.* 72, 526-538.
39. Fareh, J., Touyz, R. M., Schiffrin, E. L., and Thibault, G. (1996) *Circ. Res.* 78, 302-311.
40. Hilal-Dandan, R., Villegas, S., Gonzalez, A., and Brunton, L. L. (1997) *J. Pharm. Exp. Ther.* 281, 267-273.
41. Modesti, P. A., Vanni, S., Paniccchia, R., Bandinelli, B., Bertolozzi, I., Polidori, G., Sani, G., and Neri Serneri, G. G. (1999) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 333-339.
42. Modesti, P. A., Vanni, S., Paniccchia, R., Perrna, A., Maccherini, M., Lisi, G., Sani, G., and Serneri, G. G. N. (1999) *Biochem. Pharmacol.* 58, 369-374.
43. Hilal-Dandan, R., Ramirez, M. T., Villegas, S., Gonzalez, A., Endo-Mochizuki, Y., Brown, J. H., and Brunton, L. L. (1997) *Am. J. Physiol.* 272, H130-H137.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The cofactor-dependence of membrane-associated PKC activity is affected by the nature of the substrate. (A) Peptide ϵ (100 μM) phosphorylation by membrane-associated PKC was determined in the absence (control, \square) or presence of 1 μM PMA (\blacksquare), or 1 μM PMA plus 50 nM Bis (\bullet). (B) MBP₃₋₁₄ (75 μM) phosphorylation by membrane-associated PKC was determined in the absence (control, \square), or presence of 1 μM PMA (\blacksquare), or 1 μM PMA plus 50 nM Bis (\bullet). Membranes were isolated from unstimulated myocytes; “time” indicates the incubation time for the kinase assay. Values are means \pm SEM of three independent experiments performed using membranes isolated from separate myocyte preparations. Results for each preparation were normalized to the activity measured at 10 minutes in the presence of PMA. * $p < 0.05$ compared to control. † $p < 0.01$ compared to PMA. ‡ $p < 0.01$ compared to control.

Figure 2. ET-1 and PMA produce different patterns of PKC activation. Freshly isolated cardiac myocytes were stimulated with 100 nM PMA (A) or 100 nM ET-1 (B) for 0.25, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 or 10.0 minutes and then the cells were disrupted and membranes isolated. The ability of the membrane-associated PKC to phosphorylate MBP₃₋₁₄ (75 μM) was determined in the absence (\square), or presence of 1 μM PMA (\blacksquare), or 1 μM PMA plus 50 nM Bis (\bullet). Kinase assays were for 10 min under the conditions described in Methods. “Stimulation time” indicates the duration of myocyte treatment with PMA or ET-1. The results shown are means \pm SEM of three independent experiments performed using membranes isolated from separate myocyte preparations. Results for each preparation were normalized to the activity in unstimulated cells (time point zero) measured in the presence of PMA. * $p < 0.05$ compared to unstimulated cells (time point zero). † $p < 0.05$ compared with kinase activity determined when PMA was not added to the assay medium. Kinase activity

measured in the presence of Bis differed significantly from the activities determined both in the absence and presence of PMA at all time points.

Figure 3. ET-1 and PMA trigger different patterns of PKC ϵ translocation.

Cardiac myocytes were stimulated with 100 nM PMA (A) or 100 nM ET-1 (B) for various times as indicated, membranes isolated, and the amount of membrane-associated PKC ϵ determined by immunoblotting and probing with PKC ϵ -specific antisera. S1 and S2 fractions, containing Ca-independent and Ca-dependent isoforms of PKC, respectively, were derived from rat brain as described previously (14). (C) Quantification of A and B. PKC ϵ immunoreactivity was normalized to the PKC ϵ content in 10 μ g of membrane protein from unstimulated cells. The results shown in C are means \pm SEM of three independent experiments performed using membranes isolated from separate myocyte preparations. * $p < 0.05$ compared to unstimulated cells (time point zero).

Figure 4. Effect of ET-1 concentration upon the translocation of membrane-associated PKC ϵ .

Membranes were isolated from myocytes stimulated with PMA (100 nM, 5 min), ET-1 (10 pM, 5 min), or ET-1 (100 nM, 5 min). The resulting membranes (10 μ g) were separated by 10-20% (w/v) acrylamide-gradient SDS-PAGE, transferred to PVDF, and probed with PKC ϵ -specific antisera. The results shown are means \pm SEM of three independent experiments performed using membranes isolated from separate myocyte preparations. * $p < 0.05$ compared to PMA-treated cells.

Figure 5. PMA- and ET-1-stimulate the translocation of PKC ϵ from the cytosolic to the particulate fraction.

Cytosolic and particulate fractions were isolated from control (unstimulated), PMA stimulated (100 nM, 5 min), or ET-1 stimulated (100 nM, 5 min) myocytes, separated on SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes,

and immunoblotted for PKC ϵ (METHODS). Immunoreactive bands were quantified and the distribution of PKC ϵ immunoreactivity between the cytosol and particulate fraction for each treatment are indicated above in parentheses. The results shown are representative of three qualitatively similar, independent experiments performed using cytosolic and particulate fractions isolated from separate myocyte preparations.

TABLE 1

Effect of PMA and Bis upon the relative rates of phosphate incorporation into peptide ϵ and MBP₃₋₁₄ by membrane-associated PKC.

	Control	PMA	PMA + Bis
Peptide ϵ	0.492 \pm 0.037	0.487 \pm 0.039	0.236 \pm 0.045 ^{†‡}
MBP ₃₋₁₄	0.459 \pm 0.044	0.472 \pm 0.038	0.273 \pm 0.056 ^{†‡}

Peptide ϵ (100 μ M) and MBP₃₋₁₄ (75 μ M) phosphorylation by membrane-associated PKC was determined in the absence or presence of 1 μ M PMA, or 1 μ M PMA plus 50 nM Bis. Membranes were isolated from unstimulated myocytes. Kinase activity was determined immediately following membrane isolation. Incubation times were as shown in Figure 1. The results shown are means \pm SEM of three independent experiments performed using membranes isolated from separate myocyte preparations. Data are expressed as the rates of phosphate incorporation after normalization to the incorporation levels at 10 min in the presence of PMA. † significantly different from control, ‡ significantly different from PMA, $p < 0.01$, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons post hoc test.

Figure 1

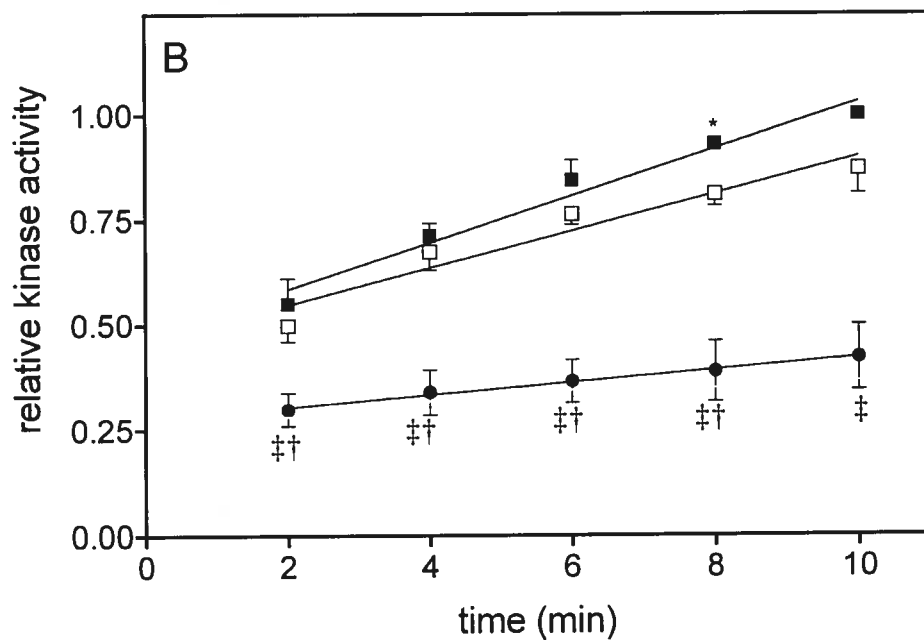
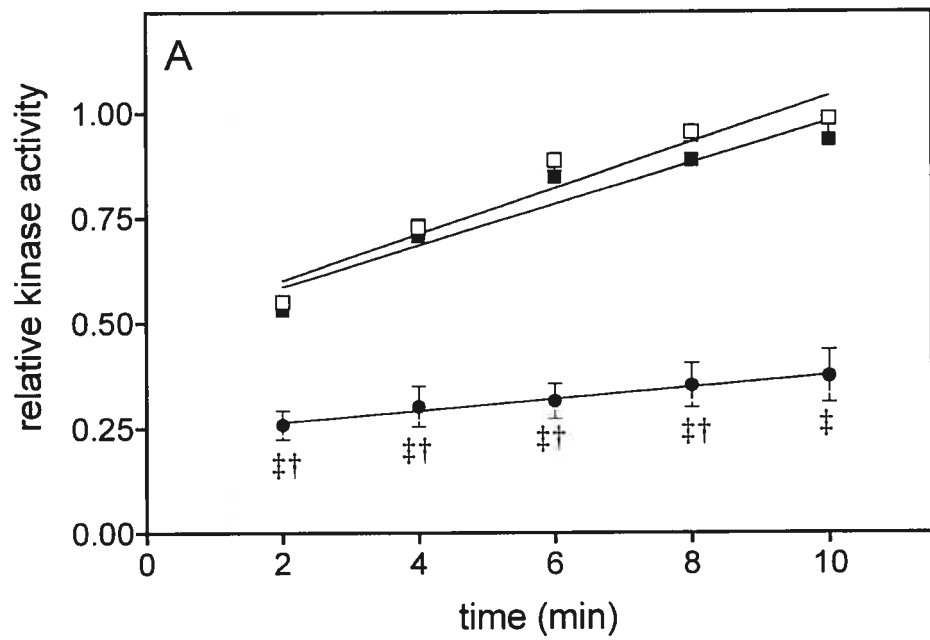


Figure 2

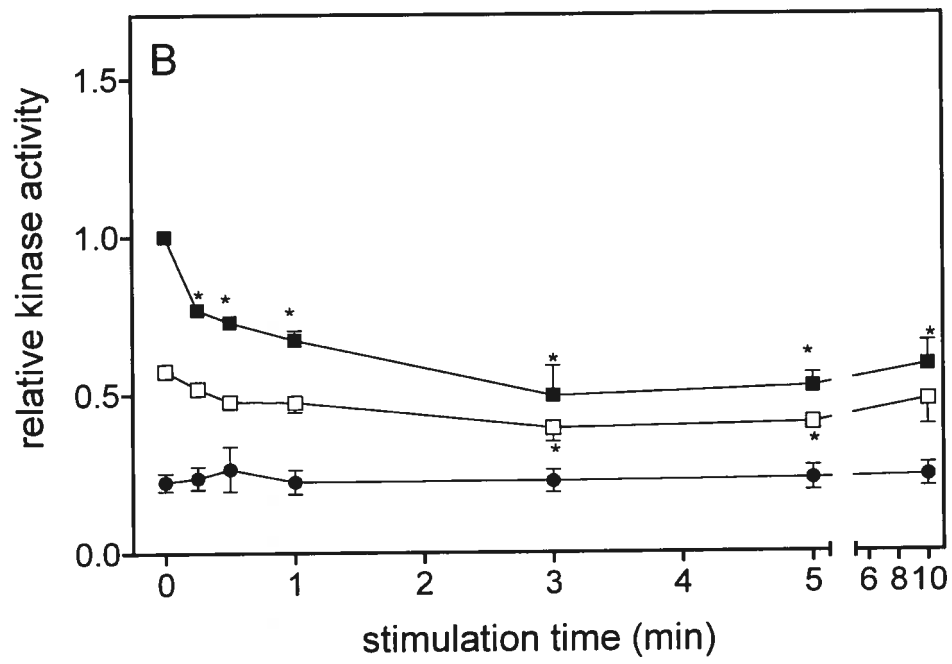
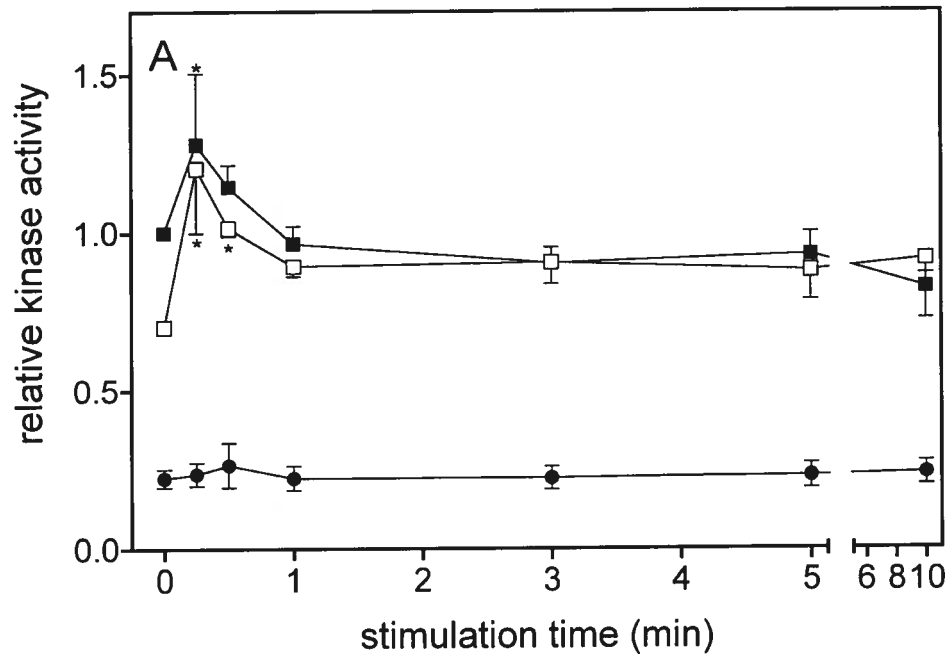


Figure 3

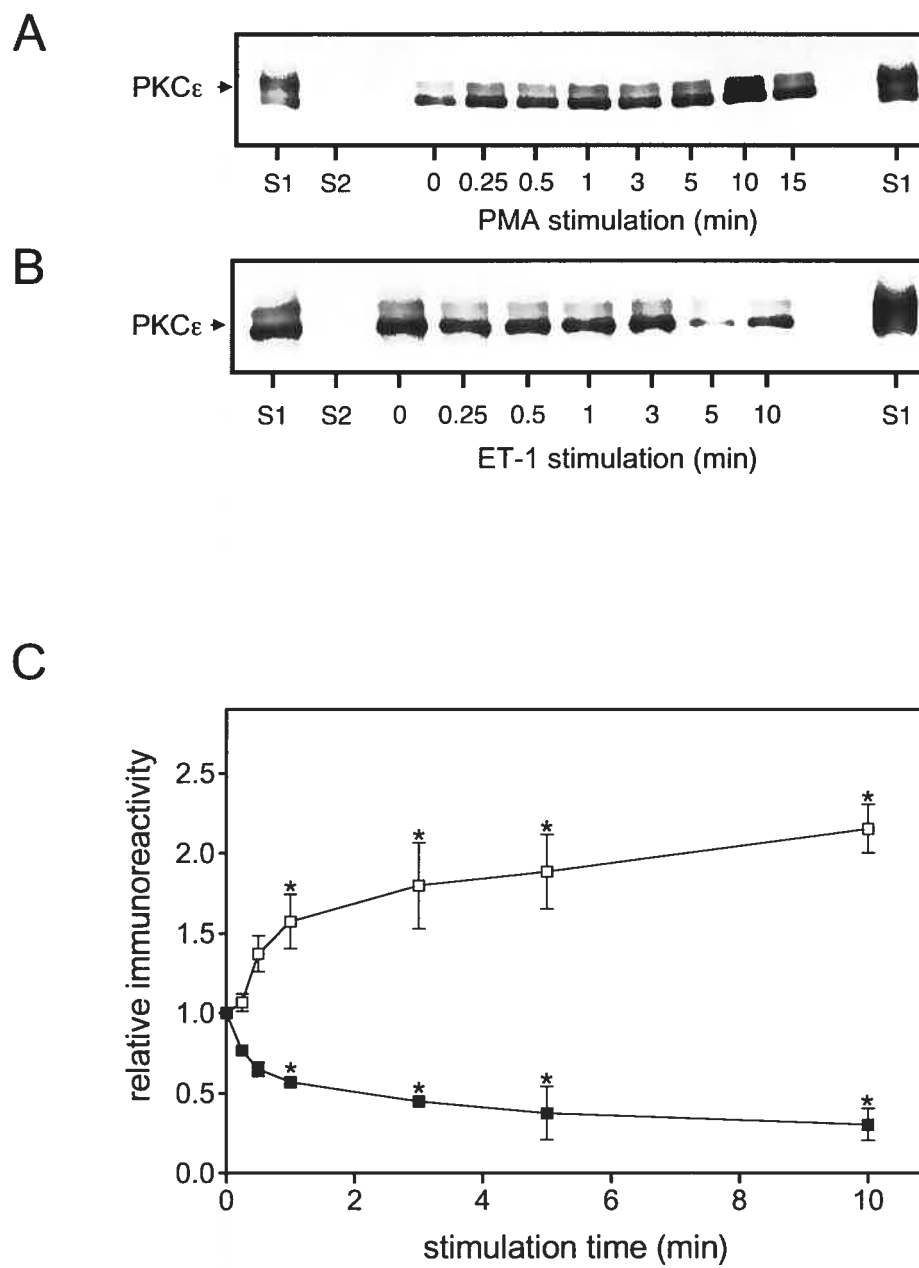


Figure 4

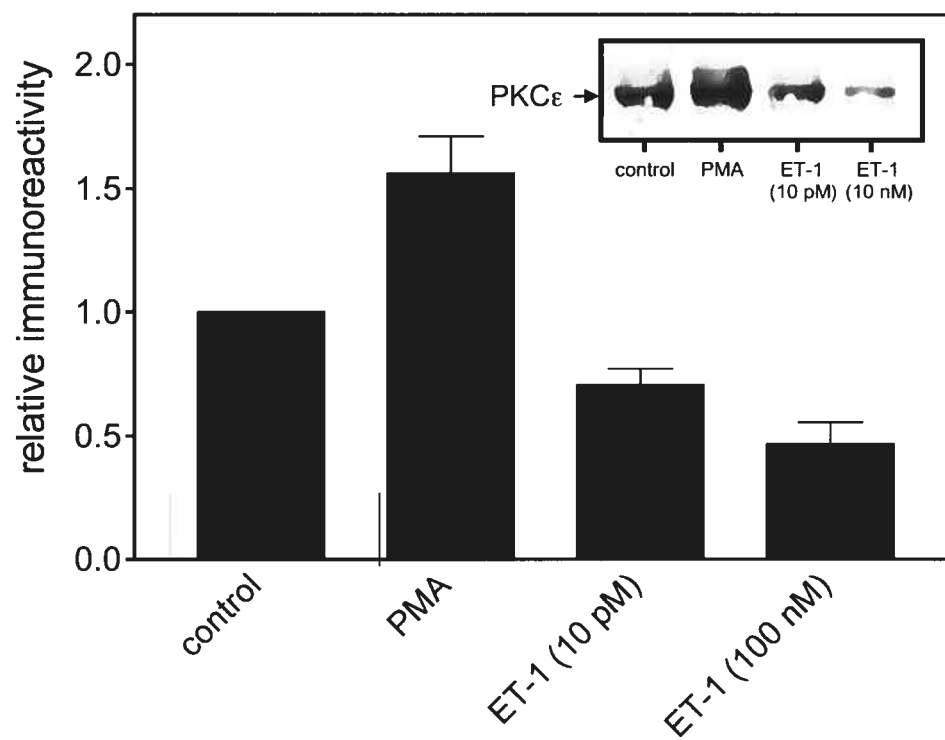
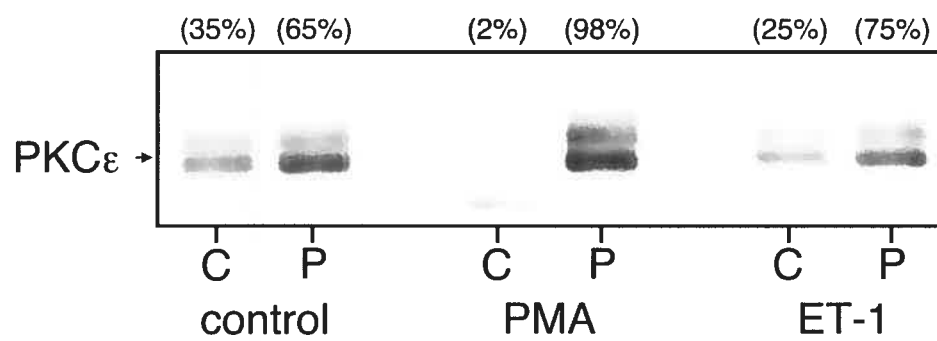


Figure 5



3. ARTICLE #2

Notre seconde étude était basée sur les études démontrant l'existence d'un système cardiaque à l'ET-1, sur un rôle potentiel de l'ET-1 internalisée (Sanchez et coll., 2002), sur la présence d'une cible intracellulaire à l'ET-1 (Bkaily et coll., 2000) et sur les récentes études révélant des RCPG intracellulaires fonctionnels [Revu dans (Gobeil et coll., 2003b)]. Comme l'ET-1 est relâchée à la suite d'un stretch des cardiomyocytes (Yamazaki et coll., 1996a), le but de l'étude était de vérifier et de caractériser les cibles intracellulaires d'un système intracrine à l'ET-1 potentiellement impliquées lors d'un stretch.

Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes

Benoit Boivin^{‡§}, Dominique Chevalier[‡], Louis Villeneuve[‡], Éric Rousseau[¶] and Bruce G. Allen^{‡§*}

J. Biol. Chem. 2003 Aug 1 ;278(31) ; 29153-29163

[‡] Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de Recherche, 5000 rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

[§] Département de Médecine et Biochimie and the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Université de Montréal, Montréal, PQ, Canada, H3C 3J7

[¶] Département de Physiologie et Biophysique, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, PQ, Canada, J1H 5N4

* Address for Correspondence: Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de Recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec H1T 1C8. Telephone: (514) 376-3330 (ext. 3591). FAX: (514) 376-1355. XXXXXXXXXX

Running Title: Nuclear endothelin receptors

SUMMARY

Endothelins are thought to act through two specific, plasmalemmal G protein-coupled receptor subtypes, ET_AR and ET_BR. However, in subfractionated cardiac membranes, ET_AR immunoreactivity was detected only in the plasma membrane whereas ET_BR immunoreactivity was detected predominantly in membranes of intracellular origin. Confocal microscopy demonstrated the presence of intracellular ET_AR and ET_BR in ventricular myocytes. ET_AR were primarily on plasma membrane (surface membranes and transverse-tubules) and to a lesser extent on the nucleus whereas ET_BR localized primarily to the nuclei. Western blot analysis of nuclei isolated from heart indicated the presence of endothelin receptors: both ET_AR and ET_BR copurified with nucleoporin 62, whereas markers of endoplasmic reticulum and Golgi membranes were depleted. Radioligand binding studies revealed isolated nuclei contain specific [¹²⁵I]ET-1 binding sites. Specific [¹²⁵I]ET-1 binding was reduced by 70-80% percent using the ET_AR-selective antagonist BQ610 and 20-30% using the ET_BR-specific antagonist BQ788. IRL-1620, an ET_BR-specific agonist, also reduced [¹²⁵I]ET-1 binding. Furthermore, ET-1 and IRL-1620 altered the incorporation of ³²P into nuclear proteins and caused a transient increase in nuclear Ca²⁺ concentration. Hence, cardiac nuclei possess both ET_AR and ET_BR subtypes, which are functional with respect to ligand binding and are coupled to signalling mechanisms within the nuclear membrane.

INTRODUCTION

Endothelins are a family of 21 amino acid isopeptides (ET-1, -2, -3)¹, derived from different genes, that mediate a wide spectrum of pharmacological activities in a variety of tissues (see (1)). In the heart, ET-1 produces positive inotropic (2-4) and chronotropic (5) effects, prolongs the action potential (6,7) and mediates cardiac remodeling in hypertrophy (4,8-14), myocardial infarction (15), and congestive heart failure (16,17). To date, two mammalian endothelin receptor subtypes (ET_AR and ET_BR) have been cloned (18-20). The ET_AR is selective for ET-1 = ET-2 >> ET-3, with sarafotoxin 6c being inactive whereas the ET_BR is non-selective. Subtype-specific pharmacological antagonists also help to distinguish the two receptor subtypes. An additional endothelin receptor (ETR) subtype, ET_CR, has been cloned from *Xenopus Laevis* (21); however, a mammalian homolog has yet to be identified. Both ET_AR and ET_BR are seven-transmembrane-spanning receptors known to couple to an overlapping array of heterotrimeric G-proteins (22) leading to activation of multiple signalling systems including phospholipase C (23-25), phospholipase D (26,27), phospholipase A₂ (28), cytosolic Ca²⁺ (29,30), Na/H exchange (31), cAMP production (23), cGMP production (32), tyrosine kinases (33,34), and MAP Kinases (14,35,36). Both ET_AR and ET_BR subtypes are present in heart (18,19,37-39); in human myocardium, ET_AR and ET_BR are expressed at similar levels (38).

It is now thought that ET-1 may act in an autocrine/paracrine manner in the cardiac ventricular myocyte. All three endothelins are synthesized as larger precursor proteins, preproETs, which are subsequently cleaved to 37-41 amino acid pro forms, referred to as big endothelins. Big endothelins are converted to mature endothelins by endothelin-converting enzymes (ECE). Splice variants of the ECE-1 isoform, ECE-1a and ECE-1c, have been detected in adult cardiac myocytes (40), and ECE-1c expression is upregulated 5-fold in myocytes during congestive heart failure (40). ET-1 is produced, stored and secreted by neonatal (41) and adult cardiac ventricular

myocytes (42) under basal conditions, and regulated in response to stretch (43) and electrical stimulation (42). These observations suggest cardiomyocytes may contain storage vesicles for ET-1 analogous to the Weibel-Palade bodies found in endothelial cells. Finally, both ET_AR and ET_BR subtypes are present in the rat heart (44) and on adult rat ventricular myocytes (ET_AR : ET_BR = 4:1, (45)). Hence, there is solid evidence in support of a local ET-1 system at the level of the ventricular myocyte.

All cellular activities of the endothelins are currently thought to be mediated through its interactions with specific receptors located on the cell surface. However, there is now evidence demonstrating insulin (46), epidermal growth factor (47), nerve growth factor (48), β -interferon (49), angiotensin II (50), and prostaglandin (51,52) receptors localize to the perinuclear region or nuclear membrane. In addition, endocytosed ET-1•ET_BR reduces preproET-1 mRNA levels (53) and cytosolic application of exogenous ET-1 increases nuclear Ca²⁺ levels (54), raising the possibility of intracellular endothelin receptors regulated by an “intracrine” process. Considering the major role the ET-1 system has in regulating heart function and dysfunction, the objectives of the present study were to determine the existence, localization, and subtype of intracellular endothelin receptors in ventricular myocytes. Our findings reveal 1) nuclear/perinuclear localization of ET_AR and ET_BR immunoreactivity, 2) nuclear endothelin receptors are capable of specific ligand binding, 3) stimulation of the nuclear endothelin receptors induce a transient increase in nuclear cisternal Ca²⁺ content, and 4) stimulation of nuclear endothelin receptors activate endogenous nuclear protein kinase activities. This study establishes the presence of functionally-coupled nuclear endothelin receptors in the ventricular myocardium.

¹The abbreviations used are: ANOVA, analysis of variance; BSA, bovine serum albumin; $[Ca^{2+}]_n$, nuclear cisternal Ca^{2+} concentration; DG, 1,2-diacylglycerol; DTT, dithiothreitol; ECE, endothelin converting enzyme; ERK, extracellular signal-regulated kinase; ET-1, endothelin-1; ET-2, endothelin-2; ET-3, endothelin-3; $ET_A R$, endothelin receptor subtype A; $ET_A R_{31-45}$, rat $ET_A R$ a.a. 31-45; $ET_A R_{413-426}$, rat ET_A a.a. 413-426; $ET_B R$, endothelin receptor subtype B; $ET_B R_{298-314}$, rat $ET_B R$ a.a. 298-314; $ET_B R_{405-417}$, rat $ET_B R$ a.a. 405-417; $ET_C R$, endothelin receptor subtype C; ETR, endothelin receptor; HRP, horseradish peroxidase; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; Nup62, nucleoporin 62; PBS, phosphate-buffered saline; PMA, phorbol 12-myristate, 13-acetate; SDS, sodium dodecylsulfate; TBS, tris-buffered saline.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials:

[¹²⁵I]Endothelin-1 (2000 Ci/mmol) and [³²P]ATP (6000 Ci/mol) were from Amersham Pharmacia Biotech (Oakville, Ontario). Non-labeled endothelin-1 (ET-1), BQ610 ((N,N-hexamethylene) carbamoyl-Leu-Dtrp (CHO)-Dtrp), BQ788 (N-*cis*-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl-L-γ-methylleucyl-D-l-methoxycarbonyltryptophanyl-D-norleucine), and IRL-1620 (succinyl-[Glu⁹,Ala^{11,15}]endothelin-1(8-21)) were from American Peptides Co. (Sunnyvale, CA). [¹²⁵I]IRL-1620 was from PerkinElmer Life Sciences Inc (Boston, MA). Fura-2/AM was from Molecular Probes (Eugene, OR). Antisera specific for the ET_AR were from Alomone labs (Jerusalem, Israel) (AER-001, rat ET_AR a.a. 413-426, NHNTERSSHKDSMN) and ABCAM (ab1919, rat ET_AR a.a. 31-45, SSHVEDFTPFGTEF). Antisera specific for the ET_BR were from Alomone labs (AER-002, rat ET_BR a.a. 299-314, CEMLRKKSGMQIALND) and Biogenesis Ltd (Poole, England) (#4113-3059, rat ET_BR a.a. 405-417, QTFEEKQSLEEKQ). Anti-nucleoporin p62 (#N43620), annexin II (#A14020), BiP/GRP78 (#G73320), and GM130 (#G65120) were from Transduction Laboratories (Lexington, Kentucky). Anti-caveolin-3 (N-18) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). TRITC-, CY5-, and HRP-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The chemiluminescence reagent Renaissance Plus was from NEN. Triton X-100, leupeptin and PMSF were from Roche Applied Science (Laval, Quebec). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis reagents, PVDF, nitrocellulose (0.22 μm), and Bradford protein assay reagents were from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Ontario). Essentially fatty acid-free BSA was from Sigma Chemical Co (Mississauga, Ontario). Unless otherwise stated, all reagents were of analytical grade and were purchased from VWR Canlab (Ville Mont-Royal, Quebec) or Fisher Scientific (Mississauga, Ontario).

Isolation of Ventricular Myocytes:

Calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated by Langendorff perfusion as described previously (55). This preparation provided 8 to 10 million cells/heart with 70 to 85% viability, as assessed by the presence of quiescent cells with rod-shaped morphology. No other cell types were detected.

Preparation of canine cardiac sarcoplasmic reticulum:

Cardiac microsomes were prepared from fresh ventricular myocardium and subfractionated as described previously (56). Fresh canine ventricles were homogenized in five volumes of 20 mM Imidazole/HCl buffer (pH 6.8 at 5°C) containing 0.3 M sucrose, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM sodium azide, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, 1.4 µg/ml pepstatin A, and 5 µg/ml aprotinin. Crude membrane vesicles (MV) were then prepared (57) and subfractionated into plasma membrane, longitudinal sarcoplasmic reticulum (SR) and junctional SR by loading with calcium phosphate followed by centrifugation into discontinuous sucrose density gradients (58). Plasma membrane, junctional SR, and longitudinal SR, also referred to as fractions 1, 3, and 5, respectively, were harvested from the 0/0.6 M sucrose interface, 0.8/1.1 M interface and the pellet at the bottom of the tube. Hence, fractions 2-5 comprise different membranes of intracellular origin. Each fraction was centrifuged for 30 min at 42,000 rpm in a Beckman 50.2 Ti rotor then resuspended in 1 ml of 20 mM histidine/HCl buffer (pH 6.8 at 5°C) containing 0.3 M KCl, 2 mM DTT, and 10 µM leupeptin, frozen using liquid nitrogen, and stored at -70°C.

Isolation of nuclei:

Rat cardiac nuclei were isolated according to a modified version of a previously described method (59). Briefly, rat hearts were pulverized under liquid nitrogen, resuspended in cold PBS and homogenized (Polytron, 8000 rpm; 2 x 10 s). The homogenate is referred to as the total extract (F.1). All subsequent steps were carried out on ice or at 5°C. Homogenates were centrifuged for 15 min at 500g and the supernatants, referred to as F.2, diluted 1:1 with buffer A (10 mM K-HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 25 µg/ml leupeptin, 0.2 mM Na₃VO₄), incubated 10 min on ice, and centrifuged for 15 min at 2000g. The resulting supernatant was discarded and the pellet, referred to as the crude nuclei (F.3), was resuspended in buffer B (0.3 M K-HEPES pH 7.9, 1.5 M KCl, 0.03 M MgCl₂, 25 µg/ml leupeptin, 0.2 mM Na₃VO₄), incubated on ice for 10 min, and centrifuged for 15 min at 2000g. The supernatant was removed and the pellet, referred to as the enriched nuclear fraction (F.4), was resuspended in buffer C (20 mM Na-HEPES (pH 7.9), 25% (v/v) glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 25 µg/ml leupeptin, 0.2 mM Na₃VO₄) and either used fresh or aliquoted, snap-frozen using liquid nitrogen, and stored at -80°C. Sheep nuclei were isolated as described previously (60).

Preparation of rat brain membranes:

Membranes were prepared from fresh rat brains by homogenizing in five volumes of 20 mM Imidazole/HCl buffer (pH 6.8 at 5°C) containing 0.3 M sucrose, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM NaN₃, 2 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 1.4 µg/ml pepstatin A, and 5 µg/ml aprotinin using a 25 ml Potter-Elvehjem tissue grinder (10 strokes). Homogenates were cleared of cellular debris by centrifugation for 10 min at 1000g and 5°C and then membranes were pelleted by centrifugation for 60 min at 100,000g

and 5°C. Membranes were resuspended in one volume of homogenization buffer, aliquoted, snap-frozen using liquid nitrogen, and stored frozen at -80°C.

Immunoblotting:

Proteins were separated on 10-20% (w/v) acrylamide-gradient SDS-PAGE. Following SDS-PAGE, samples were transferred at 100 V and 5°C for 90 min onto PVDF membranes in a buffer comprising 25 mM Tris base, 192 mM glycine, and 5% methanol. Membranes were blocked for 2 hr using a solution of 5 % (w/v) skimmed milk powder (Carnation) in 25 mM Tris-Hcl (pH 7.5 at 20°C), 150 mM NaCl (TBS), and 0.05% (v/v) Tween-20 (TBST). Membranes were incubated with primary antibodies, diluted 1:1000 with 1.0% bovine serum albumin in TBST, for 16 hr at 5°C, washed with TBST (3x, 10 min), reblocked with 5% non-fat milk in TBST (1x, 10 min), and incubated for 2 hr with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (Jackson Laboratories) diluted 1:25,000 in 5% (w/v) non-fat milk powder. Following extensive washing with TBST, immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Renaissance Plus, NEN Life Sciences) according to the manufacturer's instructions using BioMax MR film.

Confocal Microscopy:

The intracellular localization of the ET_AR and ET_BR subtypes was studied using a scanning confocal fluorescence microscope (LSM 510 Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Freshly isolated adult ventricular myocytes were plated on laminin-coated coverslips for 1 hr (37°C, 95% O₂-5% CO₂) and fixed for 20 min in 2% paraformaldehyde solution containing 0.1% (v/v) TX-100. Coverslips containing fixed myocytes were rinsed three times in PBS and incubated overnight at 4°C in PBS containing 10% donkey serum. Excess serum was removed and the cells were incubated for 1 hr at room temperature with primary antibody diluted 1:100 in PBS

containing 1.5% donkey serum. The coverslips were then rinsed gently three times with PBS, drained, and incubated for 1 hr at room temperature with a 1:500 (v/v) dilution of the appropriate secondary antibody (TRITC-conjugated anti-rabbit antibody, or ALEXA 488-conjugated anti-sheep antibody). The coverslips were gently washed three times with PBS, drained, and mounted onto glass slides using a drop of 0.1% DABCO/glycerol medium. Fluorescent myocytes were visualized as serial 0.5 μm thick optical sections in the z-axis plane of each cell. To obtain confocal images of dual-labeled cells, ALEXA 488 and TRITC emissions were collected simultaneously and composite images were created using the Zeiss software. For each secondary antibody, control experiments were performed in the absence of primary antibody. Where indicated, image stacks were digitally deconvolved (Huygens Professional, Scientific Volume Imaging).

Receptor Binding Assays:

Radioligand binding assays were performed essentially as described previously (45) in a binding buffer comprising 50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 24°C), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 1.0 mM PMSF, and 40 pM [¹²⁵I]ET-1. Binding was at room temperature for 2 hours in a reaction volume of 250 μl . Non-radioactive ET-1, BQ610, BQ788, and IRL-1620 were prepared as 10 mM stocks in 100% DMSO. Buffer, ligand and antagonists were combined in the tubes (12 x 75 mm polypropylene). Preliminary experiments were performed to ascertain that [¹²⁵I]ET-1 binding was linear with respect to protein concentration and that ligand binding was less than 10% of total added ligand. Binding was initiated by the addition of either 25 μg (sheep) or 100 μg (rat) of isolated nuclei. The reaction was stopped by rapid filtration under reduced pressure through Whatman glass microfiber filters (GF/C) with a cell harvester (Brandel). Tubes and filters were rinsed three times with cold 25 mM Tris-HCl, pH 7.5. Before filtration, filters were blocked by incubation for 60 min

in 50 mM Tris-Hcl pH 7.5 containing 5% (w/v) skim milk powder (Carnation). Radioactivity on the filters was quantified using a gamma counter (LKB Wallac). To determine the specific activity of the [¹²⁵I]ET-1 solution, 10 µl aliquots were quantified in quadruplicate by gamma counting during each binding assay. Data was analyzed using a non-linear curve-fitting program (Prism 3.0cx, GraphPad Software).

SDS-PAGE:

[¹²⁵I]ET-1 binding to ET_AR and ET_BR is essentially irreversible (45) and for ET_BR, but not ET_AR, binding is stable during SDS-PAGE at reduced temperature (61-64). To determine the apparent molecular mass of proteins binding [¹²⁵I]ET-1 and [¹²⁵I]IRL-1620, isolated nuclei were incubated with 2.0 nM [¹²⁵I]ET-1 or 2.2 nM [¹²⁵I]IRL-1620 plus 1 µM unlabeled ET-1, 1 µM BQ610 or 1 µM BQ788, where indicated, for 1 hr on ice in buffer comprising 50 mM Tris-Hcl (pH 7.4), 2 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, and 0.02% sodium azide. Samples were then solubilised with Laemmli sample buffer and resolved, along with Prestained Molecular Mass Markers (BioRad), on 10-20% (w/v) acrylamide-gradient SDS-PAGE. The electrophoresis cells were cooled to 15°C using an external, circulating refrigeration system. Gels were dried between two cellophane sheets, and exposed to BioMax BMR films for 48 hrs at -80°C in the presence of an intensifying screen (Kodak BioMax TranScreen-HE).

Fluorometric Measurement Calcium:

The effects of endothelin receptor agonists upon the permeability of the nuclear membrane to calcium ions were measured by fluorometry using the membrane-permeable, ratiometric calcium indicator, fura-2/AM. Fura-2/AM was prepared fresh daily as a 5 mM stock solution in anhydrous 100% DMSO. Rat heart nuclei were employed immediately after isolation. Aliquots of isolated ventricular nuclei were

resuspended in 0.5 ml of a loading buffer comprising 25 mM HEPES pH 7.0, 100 mM KCl, 2 mM K_2HPO_4 , and 4 mM $MgCl_2$. Fura-2/AM was added to the suspension of nuclei to a final concentration of 7.5 μ M and incubated for 45 min on ice. The fura-2-loaded nuclei were then diluted 1:2 and washed free of extranuclear fura-2/AM by centrifugation for 5 min at 2,700g and 4°C, resuspended once in 1 ml of loading buffer, and then centrifuged and resuspended in 50 μ l of loading buffer. Fura-2-loaded nuclei were incubated for 15 min on ice for final hydrolysis. Nuclei were then added to 50 μ l of loading buffer containing 800 nM $CaCl_2$ and seeded onto glass slides. Where indicated ET-1, IRL-1620, or vehicle (DMSO) were added directly to the nuclei. Fluorescence was measured using an Ion Optix microspectrofluorimeter using excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 509 nm. Calibration of the fluorescent signal was determined by sequential addition of 10 μ M ionomycin plus 1 mM $CaCl_2$ to obtain the maximal fluorescence ratio (R_{max}) and 4 mM EGTA to obtain the minimum fluorescence ratio (R_{min}). Autofluorescence was determined by measuring fluorescence from non-loaded nuclei and subtracting it from the fluorescence produced by fura-2-loaded nuclei.

Determination of protein kinase activity in isolated nuclei:

The effect of ETR agonists upon protein kinase activities in isolated cardiac nuclei was studied by incubating freshly isolated nuclei with [γ - ^{32}P]ATP in the presence or absence of ET-1 or IRL-1620 and then subjecting the phosphorylated nuclear proteins to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and autoradiography. The reaction medium (30 μ l) consisted of 20 mM Tris/HCl buffer (pH 7.5 at 30°C), 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 10 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 100 μ M GTP, 10 μ M [γ - ^{32}P]ATP (10 μ Ci/tube, 30-40 Ci/mmol), 100 μ g/ml leupeptin, 5 μ M microcystin LR, 1.4 μ g/ml pepstatin A plus nuclei (30 μ g). Agonists were present as indicated. Phosphorylation was initiated by the addition of 10 μ l of nuclei suspended

in reaction media minus ATP. Reactions were terminated after incubating 30 min at 30°C by the addition of 10 μ l of 4X Laemmli sample buffer, heated at 70°C for 90 s and resolved by electrophoresis on 10-20% acrylamide gradient SDS-PAGE. Following electrophoresis, gels were stained in 45% (v/v) denatured ethanol, 10% (v/v) acetic acid containing 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained in 20% (v/v) denatured ethanol containing 5% (v/v) acetic acid. Destained gels were dried between two sheets of cellophane (BioDesign, Inc) and exposed to Kodak BioMax MR film for 24 hr at -80°C in cassettes fitted with Kodak TranScreen-HE intensifying screens. Following autoradiography, gels were exposed to Molecular Imaging screens for 48 hr and 32 P incorporation was digitized and quantified by phosphor imaging (Bio-Rad GS 525 Molecular Analyzer).

Statistical Analysis:

Data are represented as the mean \pm the standard error of the mean (S.E.). The significance of differences between groups was estimated by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (Prism 3.0cx, GraphPad Software). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Miscellaneous Methods:

Protein concentrations were measured according to the method of Bradford (65) using bovine γ -globulin as a standard. Molecular masses of proteins on Western blots were determined by interpolation from a plot of $\log M_r$ vs. R_f for BioRad prestained molecular mass markers to which a second order polynomial curve was fitted by iterative curve-fitting using a non-linear curve-fitting program (Prism 3.0cx, GraphPad Software).

RESULTS

Subcellular localization of endothelin receptor subtypes.

Vascular endothelial cells internalize ET-1 in an ET_BR-dependent manner and, once taken up, ET-1 induces a decrease in the amount of prepro-ET-1 mRNA (53). Similarly, nuclear Ca²⁺ levels increase in response to a cytosolic application of exogenous ET-1 (54). We recently demonstrated the presence of ET_AR and ET_BR on adult rat ventricular myocytes (45) and the objective of the present study was to determine if functional ETRs exist intracellularly and, if so, determine the receptor subtype and subcellular localization of these receptors within the cardiac ventricular myocyte. Initially, canine cardiac membrane vesicles (MV) were isolated and subfractionated into membranes enriched in plasma membranes (Fig. 1A, fraction 1), and membranes of intracellular origin (Fig. 1A, fractions 2-5) (56,58). Immunoblotting using antisera specific for the ET_AR identified bands of 49 and 65 kDa present in the non-fractionated membrane vesicles (Fig. 1A, MV). The 65 kDa immunoreactive band was present in fractions 1 and 2, showing markedly enrichment in fraction 1. Similarly, bands of 60 and 65 kDa were detected in rat brain membranes (Fig 1A, RB). In contrast, antisera against the ET_BR subtype revealed a single band of 57 kDa in MV and fractions 1-5 (Fig 1B). Fractions 3-5, comprising membranes of intracellular origin, were visibly enriched in ET_BR immunoreactivity. In rat brain membranes, ET_BR-specific antisera revealed a 46-kDa band. Thus in canine heart, ET_AR immunoreactivity was detected primarily in plasma membranes whereas ET_BR immunoreactivity was observed in fractions corresponding to intracellular membranes.

Confocal imaging of endothelin receptor subtypes in ventricular myocytes.

The subcellular localization of ET_AR and ET_BR subtypes were studied further in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes using confocal immunofluorescence

microscopy along with ET_AR- and ET_BR-selective antibodies. As the selectivity of an antibody may differ in immunoblotting versus immunocytochemistry and endothelin receptors may exist in a folded state or complex that hinders access to a given epitope, two different antibodies, raised against peptides corresponding to distinct regions in the primary sequence of the receptor, were employed for each receptor subtype. Antisera for ET_AR were raised against synthetic peptides corresponding to amino acids 31-45 (ET_AR₃₁₋₄₅; ABCAM) and 413-426 (ET_AR₄₁₃₋₄₂₆; Alomone labs) in the primary sequence of the rat ET_AR. Antisera for ET_BR were raised against synthetic peptides corresponding to amino acids 299-314 (ET_BR₂₉₉₋₃₁₄; Alomone labs) and 405-417 (ET_BR₄₀₅₋₄₁₇; Biogenesis Ltd) in the primary sequence of the rat ET_BR.

The distribution of ET_AR was studied using antisera raised against peptides corresponding to amino acid residues 31-45 (Fig. 2A, B, F, H, J, K) or 413-426 (Fig. 2C) in the primary sequence for the rat ET_AR. Both antibodies decorated the cell surface and produced a striated pattern within the cell (Fig. 2A-C) indicating ET_AR exists in plasma membrane structures including both the surface membranes and the T-tubular network. In addition, nuclear or perinuclear staining was observed which appeared to extend outwards from the apex of the nuclei (e.g., Fig. 2C). Adult cardiac ventricular myocytes are generally binucleate. No staining was observed in the absence of the primary antibody (Fig. 2D, E). To further examine the possible nuclear localization of the ET_AR subtype, cells were decorated with antibodies to both ET_AR and to nucleoporin p62 (Nup62), a component of the central plug of the nuclear pore complex. Nup62 immunoreactivity was concentrated in a sharp ring surrounding the nucleus (Fig. 2G, H, J, K) and showed little non-nuclear staining. ET_AR appeared to localize to a structure surrounding, but lying outside of, that decorated by the Nup62 antibody.

The distribution of ET_BR was studied using antisera raised against peptides corresponding to amino acid residues 298-314 (Fig. 3A, B, F, L, H) or 405-417 (Fig.

3C, G, H) in the primary sequence for the rat ET_BR. Both antibodies produced a striated pattern within the cell along with strong staining of the nucleus (Fig. 3A-C, F, G, L). Three-dimensional digital deconvolution of the image stack revealed that the intense nuclear staining was due to staining of the nuclear membrane with some punctate staining within the nucleoplasm (Fig. 3U and inset). Staining of the surface membranes was much less obvious than observed for ET_AR, with ET_BR showing a more striated distribution suggestive of localization to the transverse tubules. When cells were simultaneously decorated with both ET_BR antibodies the pattern of distribution indicated that they co localized (Fig. 3F-H). To further examine the nuclear localization of the ET_BR subtype, cells were decorated with antibodies to both ET_BR and to Nup62 (Fig. 3L-Q). Nup62 immunoreactivity was concentrated in a sharp ring surrounding the nucleus (Fig. 3M, P) and showed little association with non-nuclear structures. The distribution of ET_BR immunoreactivity on the nucleus was strikingly similar to that observed with Nup62, suggesting ET_BR are also located on the nuclear envelope. Control experiments using only the secondary antibodies detected minimal non-specific fluorescence under the imaging conditions employed (Fig. 3R-T).

Biochemical characterization of nuclear endothelin receptors.

Imaging of cells using confocal microscopy indicated that ET_AR and ET_BR are located on or around the nuclei in ventricular myocytes. To further study and characterize the ETRs associated with the nucleus, nuclei were isolated from rat hearts. Four fractions were recovered from this purification: the total homogenate (F.1), 500g supernatant (F.2), crude nuclear fraction (F.3), and enriched nuclear fraction (F.4). This preparation was characterized by determining the distribution of marker proteins of known subcellular origins including caveolin-3 (rafts-plasma membrane), annexin II (plasma membrane, subcellular vesicles), BiP/GRP78

(endoplasmic reticulum), GM130 (Golgi apparatus), and Nup62 (nuclear envelope) (Fig. 4A). Both ET_AR and ET_BR immunoreactivity was detected in F.1 as were caveolin-3 (not shown), annexin II, BiP/GRP78, and GM130. ET_AR, annexin II, BiP, and GM130 were detected in the 500 g supernatant (F.2). This fraction was further purified. Nup62, annexin II, and GM130 immunoreactivity were detected in the crude nuclear fraction (F.3). Relative to F.3, the final nuclear fraction (F.4) was enriched in Nup62, ET_AR, and ET_BR. In contrast, the levels of GM130 and annexin II were reduced in F.4 relative to F.3. The immunoreactive bands detected in the rat heart nuclei using ET_AR- or ET_BR-specific antibodies were 48 kDa and 57 kDa (Fig. 4C), respectively. A faint 48 kDa ET_AR-immunoreactive band was also detected in canine cardiac vesicles (Fig. 1A, MV) and rat brain membranes (Fig. 1A, RB). Hence, both ET_AR and ET_BR-immunoreactive proteins copurified with a nuclear pore protein, Nup62. To further characterize the nuclear localization of ETRs, nuclei were isolated from sheep heart. An immunoreactive band of 48 kDa was detected in sheep nuclei using the ET_AR-specific antibody from Alomone (Fig. 4B) and ABCAM (not shown) whereas both ET_BR-specific antibodies revealed a 57 kDa immunoreactive band (Fig. 4B) similar to that in rat nuclei and canine heart. Thus, in nuclei isolated from both rat and sheep hearts, immunoreactive bands with molecular mass similar to that predicted for the ET_AR and ET_BR were detected using antibodies directed against two different epitopes in the sequence of the receptors.

Nuclear [¹²⁵I]ET-1 binding.

To determine if nuclear ETRs immunoreactivity was representative of the presence of functional, ligand-binding receptors, radioligand binding assays were performed using isolated nuclei. Nuclei isolated from both rat (Fig. 5A) and sheep heart (Fig. 5B) bound [¹²⁵I]ET-1 and this binding was displaced by unlabeled ET-1. The total specific ET-1 binding was 23.9 ± 5.7 fmol/mg and 5.1 ± 1.5 fmol/mg in

nuclei isolated from sheep and rat heart, respectively. This difference is consistent with fact that the nuclei isolated from sheep heart are of higher purity than those from rat heart. Nuclear ET-1-binding sites were pharmacologically classified using receptor subtype-specific antagonists. BQ610, an ET_AR-selective antagonist displaced 17.2 ± 1.3 fmol/mg and 4.3 ± 1.2 fmol/mg of the bound [¹²⁵I]ET-1 from sheep and rat heart, respectively. An ET_BR-selective antagonist, BQ788, displaced 5.04 ± 0.74 fmol/mg and 1.2 ± 0.35 fmol/mg of nuclear bound [¹²⁵I]ET-1 from sheep and rat heart, respectively. Based upon pharmacological characterization, there are currently thought to be two subtypes of the ET_BR, ET_{B1}R and ET_{B2}R. IRL-1620, an agonist selective for the ET_{B1}R subtype, also reduced [¹²⁵I]ET-1 binding. The displacement by IRL-1620 was slightly greater than observed using the non-selective ET_BR antagonist BQ788: this may result from differences in the rates of dissociation that exist for endothelin receptor agonists and antagonists. Whereas endothelin receptor antagonists bind the receptors reversibly, agonists such as ET-1 display negligible rates of dissociation and hence their binding has been described as irreversible (45,66,67). In an attempt to determine the sidedness of the endothelin binding sites, isolated nuclei were mechanically disrupted. However, sonication (on ice, 3 x 10 sec, 30 sec rest, 10% power setting, microprobe) destroyed greater than 80% of the specific [¹²⁵I]ET-1 binding without affecting the non-specific binding (not shown). These studies demonstrate that both ET_AR and ET_BR subtypes are present in isolated nuclei and bind their cognate ligands and antagonists.

Previous studies have demonstrated the [¹²⁵I]ET-1•ET_BR complex, but not [¹²⁵I]ET-1•ET_AR, remains intact during SDS-PAGE (63). Hence, to further characterize nuclear ETRs and compare the apparent molecular mass of the nuclear ETRs with those in other subcellular fractions, binding and SDS-PAGE was performed using [¹²⁵I]IRL-1620 (2.5 nM; Fig. 6). This compound is an ET_{B1}R-specific ligand characterized by a 100,000-fold selectivity for ET_BR over ET_AR (68). A band

of 60 kDa was observed in all samples and was most abundant in sheep heart nuclei (Fig. 6, lane 7). This molecular mass is similar to that for ET_BR detected by immunoblotting. Although ET_BR can undergo an N-terminal proteolytic cleavage during cellular lysis and membrane isolation (69), no bands of lower molecular mass were detected in the present study. To confirm the specificity of [¹²⁵I]IRL-1620 binding in the enriched nuclei fraction, [¹²⁵I]IRL-1620 binding was examined in the presence of excess (1 μM) unlabelled ET-1, BQ788 (ET_BR antagonist), or BQ610 (ET_AR antagonist). [¹²⁵I]IRL-1620 binding was reduced when the nuclei were preincubated either with unlabelled ET-1 or BQ788 (Fig. 6, lanes 2 and 4). BQ610 did not displace [¹²⁵I]IRL-1620. Thus, ET_{B1}R are present on cardiac nuclear membranes and display the same apparent molecular mass on SDS-PAGE as ET_{B1}R in other membranes.

Functional changes associated with nuclear actions of ET-1.

The studies described above demonstrate localization of endothelin receptors immunoreactivity and [¹²⁵I]ET-1 binding in ventricular membranes, isolated myocytes, and isolated cardiac nuclei. At the plasma membrane, ETRs are coupled to activation of PKC and numerous downstream signalling events including activation of the ERK MAP kinase pathway. Nuclei have been shown to contain phosphatidylinositols (Pis) (70,71), 1,2-diacylglycerol (72), plus PI-specific phospholipase Cβ₁ (73) required to produce 1,2-diacylglycerol. In addition, EGF regulates protein phosphorylation in isolated nuclei (74) suggesting the nuclear membrane contains sufficient elements to support receptor-activated protein kinase activities. Hence, the effect of ETR agonists upon nuclear phosphorylation was examined in isolated nuclei. Incubation of isolated nuclei in the presence of [^γ³²P]-ATP resulted in the incorporation of ³²P into several proteins (Fig. 7A) including two intense bands of 42 kDa (Fig. 7A, panel 3) and 46 kDa (Fig. 7A, panel 4). ET-1, IRL-

1620, and PMA induced different patterns of nuclear protein phosphorylation and both increases and decreases in phosphate incorporation were observed (Fig. 7B, panels 1-5). ET-1 decreased ^{32}P incorporation into the proteins shown in panels 1 and 4, whereas phosphorylation of a 65-kDa protein, shown in panel 2, was increased. IRL-1620 increased ^{32}P incorporation to a 30-kDa nuclear protein (panel 5). In contrast, the incorporation of ^{32}P into the phosphoprotein shown in panel 3 was unaffected by PMA or ETR agonists. It is also worthy of note that proteins where ^{32}P incorporation increased in response to ETR agonists also demonstrated an increased level of ^{32}P incorporation following treatment with PMA, suggesting the involvement of PKC downstream of nuclear endothelin receptors. As the ERK MAP kinase cascade is downstream of PKC, the effect of ET-1 and IRL-1620 upon the phosphorylation of ERK1/2, p90rsk, and Elk1 was examined. Phosphate incorporation was determined using antisera specific for the phosphorylated form of these proteins. ETR agonists produced no detectable change in phosphorylation of these proteins whereas antisera against total ERK1/2 clearly demonstrated the presence of both proteins in isolated nuclei (data not shown).

The nuclear envelope is a double membrane separating the nucleus from the cytoplasm. The luminal space between these membranes, referred to as the nuclear cisterna, can accumulate Ca^{2+} and it has been proposed that Ca^{2+} can be released directly from the nuclear cisterna into the nucleoplasm via Ca^{2+} channels associated with inositol trisphosphate and/or ryanodine receptors (75,76). In the present study, the effect of ETR agonists ET-1 and IRL-1620 upon nuclear cisternal Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_n$ was examined in freshly isolated nuclei using the ratiometric fluorescent Ca^{2+} indicator, fura-2/AM. Addition of ETR agonists to the fura-2-loaded nuclei, in the presence of 400 nM external Ca^{2+} , resulted in an increase in the A_{340}/A_{380} ratio. ET-1 caused a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_n$ from a basal value of ≈ 215 nM Ca^{2+} to ≈ 280 nM (Fig. 8). IRL-1620 also caused a similar increase in $[\text{Ca}^{2+}]_n$.

However, the increase in $[Ca^{2+}]_n$ induced by IRL-1620 was transitory and returned to basal level at 20 s. As there was no exogenous ATP present during these experiments, these results suggest that endothelin receptors are coupled to, and capable of opening, a calcium channel within the nuclear membrane.

DISCUSSION

To date, endothelin-related effects have been thought to be mediated via G protein-coupled receptors located on the plasma membrane. However, recent data imply that endothelins may also act intracellularly. ET-1 internalized via binding to the ET_BR has been shown to decrease the level of preproET-1 mRNA (53). Furthermore, cytosolic application of ET-1 is sufficient to evoke changes in nuclear calcium content (54). However, the existence and subcellular location of the ETRs has not been demonstrated. Thus, this study presents novel evidence for the presence of functional endothelin receptors on the nuclear envelope in cardiac myocytes.

Nuclear or perinuclear localization of ETRs can be attributed to translocation from the cell surface or *de novo* synthesis. Since the cells are exposed to circulating ET-1 *in vivo*, ligand-mediated receptor internalization and translocation to the perinuclear region is a possibility. ET_AR localize primarily to the plasma membrane (77) and internalize in a ligand-dependent manner (78). Once internalized, ET_AR follow a recycling pathway through the pericentriolar recycling compartment and then back to the plasma membrane (79). In contrast, in Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing a fusion protein comprising green fluorescent protein (GFP) and ET_BR (GFP-ET_BR), GFP-ET_BR was observed to internalize constitutively, without a requirement for ligand binding, and the internalized receptor was targeted to the lysosomes for degradation (64,79). The fate of each receptor subtype is under the control of specific elements regulating protein trafficking. Chimeric ET_AR and ET_BR constructs reveal the cytoplasmic C-terminal domain of ET_AR is sufficient to specify receptor recycling whereas the comparable domain in ET_BR specifies delivery to lysosomes (77,80). When stably expressed in HEK293 cells, ET_BR-GFP localizes primarily to the plasma membrane and ET-1 induces a metalloprotease-mediated cleavage between amino acid residues 64 and 65 in the extracellular N-terminal domain that precedes internalization of the receptor and its sorting into endosomes

(81). In addition, an N-terminal deletion mutant [Δ 2-64]ET_BR-GFP is functionally normal but showed a 15-fold decrease in expression at the cell surface when expressed in HEK293 cells (81). In ventricular myocytes, ET_BR was primarily intracellular (Figs. 1, 3) and no differences in the molecular mass were observed for ET_BR associated with plasma membrane versus nuclei (Fig. 6). Hence, both amino and carboxyl terminal domains contain elements that regulate the trafficking of endothelin receptors.

Endothelin-1 binding to either ET_AR or ET_BR results in receptor-ligand complexes that dissociate very slowly with reported half lives of up to 20 hours (82). Following internalization, both ET_AR and ET_BR remain bound to ligand for more than 2 hours (64,78). One could postulate that the ligand-bound and unoccupied forms of the ETRs follow different internalization pathways; however, GFP-ET_BR bound with cyanin3-conjugate ET-1 (cy3-ET-1) cotraffic from the cell surface to lysosomes, remaining as a complex within the cell for up to 4 hours (64). As ET_AR is internalized in a ligand-dependent manner and subsequently recycled to the cell surface, either there is a means within the cell to induce dissociation or the time required for recycling exceeds the half-life of the receptor-ligand complex. Interestingly, salicylic acid has been reported to induce the dissociation of ET-1 from ET_AR (83) whereas antagonists reduce the rate of dissociation (84) or increase ET-1 binding (45); hence, there may exist allosteric regulatory sites that regulate the dissociation of the receptor-ligand complex. Figures 6 and 7 demonstrate that nuclear ETRs were available for ligand binding. Taken together, these results suggest it is likely that nuclear ETRs result from *de novo* synthesis, rather than ligand-dependent internalization, and may represent a distinct and novel subcellular target for endothelins.

Evidence is emerging that demonstrates growth factor receptors and G protein coupled receptors (GPCRs) are present on nuclear or perinuclear membranes. Studies

have localized type 1 angiotensin II (AT₁) (50,85), epidermal growth factor (EGF-R) (47), c-erbB-4 (86), insulin (46,87), interferon β (49), muscarinic cholinergic (88), nerve growth factor (48), prostaglandin E₂ (PGE₂) (51,52), and opioid (89) receptors, in addition to many polypeptide ligands (e.g., epidermal growth factor, insulin, platelet-derived growth factor, nerve growth factor, parathyroid hormone-related protein, prolactin, interleukin 1, somatostatin, fibroblast growth factors 1 and 2, and transforming growth factor α) to the nucleus. Receptor ligands may be derived from the extracellular milieu or synthesized within the cell. Ligand-mediated receptor internalization and translocation to the nucleus has been demonstrated for AT₁ (90) and EGF-R (91). Conversely, the pro-form of transforming growth factor α (pro-TGF- α) may exert a mitogenic effect by interacting with nuclear EGF-R (92). The nuclear EGF-R may act as a 'stop' signal, following an initial mitogenic response, to prevent unregulated cell proliferation (see (93)). In contrast, PGE₂ is taken up via prostaglandin transporters after which it acts upon nuclear receptors (94). For intracellular ETRs to be of functional relevance, there must also be a source of intracellular ligand and both preproET-1 mRNA⁴ and ET-1 immunoreactivity (17,95) have been demonstrated in adult ventricular myocytes.

At present there is little known concerning the function of nuclear growth factor receptors or GPCRs. Potential roles for nuclear signalling pathways include regulation of nuclear transport, gene expression, and nuclear envelope formation. Key components of various signalling pathways are present at the nuclear envelope or within the nucleus itself, supporting the presence of nuclear signalling cascade(s). Evidence suggests the presence of nuclear heterotrimeric G-proteins (see (96)). Nuclear AT₁ receptors display guanine nucleotide-dependent ligand binding, indicating the presence of and coupling to heterotrimeric G-proteins (50). Biophysical

⁴ Farhat, N., Farhat, H., Thorin, E., and Allen, B.G. (Unpublished)

and microscopy studies support the presence of effectors including adenylyl cyclase (97), phosphodiesterase (98), diacylglycerol kinase- ζ (99), phospholipase A₂ (100), phospholipase C (73), phospholipase D (101), and phosphatidylinositol 3-kinase C2 α (102). The nuclear envelope comprises two membranes, the inner and outer nuclear membranes: the luminal space between these membranes is referred to as the nuclear cisterna or perinuclear space (103). Nuclear membranes contain sarco/endoplasmic Ca²⁺-ATPase (SERCA)-pumps (104,105) as well as ryanodine-sensitive Ca²⁺-channels (60,105) and IP₃-sensitive (60) Ca²⁺-channels. The signalling processes associated with the nuclear envelope include the products of nuclear lipid metabolism, such as 1,2-diacylglycerol (DG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) (see (106,107)). DG recruits and/or activates protein kinase C to phosphorylate intranuclear proteins: generation of IP₃ releases Ca²⁺ stored within the nuclear cisterna, increasing nucleoplasmic Ca²⁺. Nuclear FGF-2 activates casein kinase II and thereby induces transcription of ribosomal genes and phosphorylation of nucleolin (108). Similarly, EGF induces internalization and nuclear localization of the EGF-R and enhanced tyrosine phosphorylation of nuclear proteins (109). Stimulation of nuclear ETRs (Fig. 8) or PGE₂ receptors (51) causes an influx of Ca²⁺ into the nuclear cisterna or nucleoplasm. Nucleoplasmic Ca²⁺ regulates key nuclear functions including gene transcription, apoptosis, gene repair, topoisomerase activation, and polymerase unfolding. In addition to the regulatory effects mediated by the release of Ca²⁺ into nucleoplasm, the filling status of the nuclear cisterna alters the conformational state of the nuclear pore complex, inhibiting diffusion across the nuclear envelope and hence controlling the transport of molecules between the cytosol and the nucleoplasm (103,110).

To date, endothelin-related effects have been thought to be mediated via specific ETR subtypes located on the plasma membrane. The results of the present study provide novel evidence for the presence of functional ETRs on the nuclear

envelope in the ventricular myocardium. This is based upon the following: 1) nuclei isolated from both sheep and rat ventricular myocardium contained both ET_AR and ET_BR immunoreactive bands, 2) ET_AR and ET_BR immunoreactivity copurified with a marker of the nuclear pore complex (nucleoporin 62) and not with markers of the endoplasmic reticulum and Golgi membranes, 3) radioligand binding using receptor subtype-specific antagonists confirmed the presence of both ET_AR and ET_BR in nuclei isolated from both sheep and rat ventricular myocardium, 4) confocal fluorescence microscopy localized ETRs to the nuclear membrane in adult ventricular myocytes, 5) ETR agonists altered the pattern of protein phosphorylation and elicited an increase in nuclear cisternal Ca²⁺ concentration. Hence, cardiac nuclei possess ETRs and that are functional with respect to ligand binding and coupled to signalling mechanisms within the nuclear membrane. For intracellular ETRs to be of functional relevance, there must also be an intracellular source of ligand. One potential source is via uptake of endothelin from the extracellular milieu. Alternatively, ET-1 may be produced by the myocyte and act intracellularly as an “intracrine” mediator.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MT-14725) and the Fonds de la Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. BGA is currently a Research Scholar of the Heart and Stroke Foundation of Canada. ER is a National Scholar of the FRSQ. BB is the recipient of bursaries from the FRICM and FRSQ. The authors would like to thank Terry Hébert for both thoughtful discussions and careful reading of the manuscript.

BIBLIOGRAPHY

1. Rubanyi, G. M., and Polokoff, M. A. (1994) *Pharmacol. Rev.* **46**, 325-415
2. Baydoun, A. R., Peers, S. H., Cirino, G., and Woodward, B. (1989) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**, S193-S196
3. Firth, J. D., Roberts, A. F., and Raine, A. E. (1990) *Clin. Sci.* **79**, 221-226
4. Kelly, R. A., Eid, H., Krämer, B. K., O'Neill, M., Liang, B. T., Reers, M., and Smith, T. M. (1990) *J. Clin. Invest.* **86**, 1164-1171
5. Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. (1988) *Pflugers Arch.* **413**, 108-110
6. Watanabe, T. X., Kumagaye, S., Nishio, H., Nakajima, K., Kimura, T., and Sakakibara, S. (1989) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*
7. Watanabe, T., Kusumoto, K., Kitayoshi, T., and Shimamoto, N. (1989) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**, S108-S111
8. Simonson, M. S., and Dunn, M. J. (1991) *Hypertension* **17**, 856-863
9. Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. (1988) *Am. J. Physiol.* **255**, H970-H973
10. Concas, V., Laurent, S., Brisac, A. M., Perret, C., and Safar, M. (1989) *J. Hypertens.* **7**, S96-S97
11. Moravec, C. S., Reynolds, E. E., Stewart, R. W., and Bond, M. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 14-18
12. Firth, J. D., Roberts, A. F. C., and Raine, A. E. G. (1990) *Clin. Sci.* **13**, S193-S196
13. Lovenberg, W., and Miller, R. C. (1990) *Neurochem. Res.* **15**, 407-417
14. Shubeita, H. E., McDonough, P. M., Harris, A. N., Knowlton, K. U., Glembotski, C. C., Brown, J. H., and Chien, K. R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20555-20562

15. Nguyen, Q. T., Cheracek, P., Calderone, A., Stewart, D. J., Picard, P., Sirois, P., White, M., and Rouleau, J. L. (1998) *Circulation* **98**, 2323-2330
16. Cody, R. J., Haas, G. J., Binkley, P. F., Capers, Q., and Kelley, R. (1992) *Circulation* **85**, 504-509
17. Øie, E., Vinge, L. E., Tønnessen, T., Grøgaard, H. K., Kjekshus, H., Christensen, G., Smiseth, O. A., and Attramadal, H. (1997) *Am. J. Physiol.* **273**, H1727-H1736
18. Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. (1990) *Nature (London)* **348**, 730-732
19. Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1990) *Nature (London)* **348**, 732-735
20. Davenport, A. P. (2002) *Pharmacol. Rev.* **54**, 219-226
21. Karne, S., Jayawickreme, C. K., and Lerner, M. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19126-19133
22. Sokolovsky, M. (1993) *Receptors Channels* **1**, 295-304
23. Hilal-Dandan, R., Urasawa, K., and Brunton, L. L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10620-10624
24. Ambar, I., and Sokolovsky, M. (1993) *Eur. J. Pharmacol.* **245**, 31-41
25. Hilal-Dandan, R., Merck, D. T., Lujan, J. P., and Brunton, L. L. (1994) *Mol. Pharmacol.* **45**, 1183-1190
26. Liu, Y., Geisbuhler, B., and Jones, A. W. (1992) *Am. J. Physiol.* **262**, C941-C949
27. Friedlaender, M. M., Jain, D., Ahmed, Z., Hart, D., Barnett, R. L., and Nord, E. P. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, F845-F853
28. Husain, S., and Abdel-Latif, A. A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1392**, 127-144

29. Van Heugten, H. A., De Jonge, H. W., Bezstarosti, K., and Lamers, J. M. (1994) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**, 1081-1093
30. Pollock, D. M., Keith, T. L., and Highsmith, R. F. (1995) *FASEB J.* **9**, 1196-1204
31. Ballard, C., and Schaffer, S. (1996) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 11-17
32. Fujitani, Y., Ueda, H., Okada, T., Urade, Y., and Karaki, H. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **267**, 683-689
33. Simonson, M. S., and Herman, W. H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9347-9357
34. Sadoshima, J., Qiu, Z., Morgan, J. P., and Izumo, S. (1995) *Circ. Res.* **76**, 1-15
35. Bogoyevitch, M. A., Glennon, P. E., and Sugden, P. H. (1993) *FEBS Lett.* **317**, 271-275
36. Bogoyevitch, M. A., Glennon, P. E., Andersson, M. B., Clerk, A., Lazou, A., Marshall, C. J., Parker, P. J., and Sugden, P. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1110-1119
37. Hosoda, K., Nakao, K., Arai, H., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Shirakami, G., Saito, Y., Nakanishi, S., and Imura, H. (1991) *FEBS Lett.* **289**, 23-26
38. Molenaar, P., O'Reilly, G., Sharkey, A., Kuc, R. E., Harding, D. P., Plumpton, C., Gresham, G. A., and Davenport, A. P. (1993) *Circ. Res.* **72**, 526-538
39. Fareh, J., Touyz, R. M., Schiffrin, E. L., and Thibault, G. (1996) *Circ. Res.* **78**, 302-311
40. Ergul, A., Walker, C. A., Goldberg, A., Baicu, S. C., Hendrick, J. W., King, M. K., and Spinale, F. G. (2000) *Am. J. Physiol.* **278**, H2050-H2056
41. Suzuki, T., Kumazaki, T., and Mitsui, Y. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 823-830
42. Thomas, P. B., Liu, E. D. K., Webb, M. L., Mukherjee, R., Hebbar, L., and Spinale, F. G. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, H2629-H2637

43. Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y. Z., Shiojima, I., Hiroi, Y., Mizuno, T., Maemura, K., Kurihara, H., Aikawa, R., Takano, H., and Yazaki, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3221-3228
44. Ishikawa, T., Li, L. M., Shinmi, O., Kimura, S., Yanagisawa, M., Goto, K., and Masaki, T. (1991) *Circ. Res.* **69**, 918-926
45. Allen, B. G., Farah, H., Phuong, L. L., and Chevalier, D. (2003) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 95-104
46. Vigneri, R., Goldfine, I. D., Wong, K. Y., Smith, G. J., and Pezzino, V. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 2098-2103
47. Carpentier, I. L., Rees, A. R., Gregoriou, M., Kris, R., Schlessinger, J., and Orci, L. (1986) *Exp. Cell. Res.* **166**, 312-326
48. Yankner, B. A., and Shooter, E. M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1269-1273
49. Kushnaryov, V. M., MacDonald, H. S., Sedmak, J. J., and Grossberg, S. E. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3281-3285
50. Booz, G. W., Conrad, K. M., Hess, A. L., Singer, H. A., and Baker, K. M. (1992) *Endocrinology* **130**, 3641-3649
51. Bhattacharya, M., Peri, K. G., Almazan, G., Ribeiro-Da-Sylva, A., Shichi, H., Durocher, Y., Abramovitz, M., Hou, X., Varma, D. R., and Chemtob, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15792-15797
52. Bhattacharya, M., Peri, K. G., Ribeiro-Da-Sylva, A., Almazan, G., Shichi, H., Hou, X., Varma, D. R., and Chemtob, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 15719-15724
53. Sanchez, R., MacKenzie, A., Farhat, N., Nguyen, T.-D., Stewart, D. J., Mercier, I., Calderone, A., and Thrarin, E. (2002) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **39**, 652-659

54. Bkaily, G., Choufani, S., Hassan, G., El-Bizri, N., Jacques, D., and D'Orléans-Juste, P. (2000) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36 (Suppl. 1)**, S414-S417
55. Chevalier, D., and Allen, B. G. (2000) *Biochemistry* **39**, 6145-6156
56. Allen, B. G., and Katz, S. (2000) *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**, 2379-2384
57. Chamberlain, B. K., Levitsky, D. O., and Fleischer, S. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 6602-6609
58. Inui, M., Wang, S., Saito, A., and Fleischer, S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10843-10850
59. Dawn, B., Xuan, Y., Marian, M., Flaherty, M. P., Murphree, S. S., Smith, T. L., Bolli, R., and Jones, W. K. (2001) *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**, 161-173
60. Guihard, G., Proteau, S., and Rousseau, E. (1997) *FEBS Lett.* **414**, 89-94
61. Takasuka, T., Adachi, M., Miyamoto, C., Furuichi, Y., and Watanabe, T. (1992) *J. Biochem. (Tokyo)* **112**, 396-400
62. Takasuka, T., Akiyama, N., Horii, I., Furuichi, Y., and Watanabe, T. (1992) *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 748-753
63. Takasuka, T., Sakurai, T., Goto, K., Furuichi, Y., and Watanabe, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7509-7513
64. Oksche, A., Boese, G., Horstmeyer, A., Furkert, J., Beyermann, M., Bienert, M., and Rosenthal, W. (2000) *Mol. Pharmacol.* **57**, 1104-1113
65. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
66. Devadason, P. S., and Henry, P. J. (1997) *Br. J. Pharmacol.* **121**, 253-263
67. Hilal-Dandan, R., Villegas, S., Gonzalez, A., and Brunton, L. L. (1997) *J. Pharm. Exp. Ther.* **281**, 267-273
68. Takai, M., Umemura, I., Yamasaki, K., Watakabe, T., Fujitani, Y., Oda, K., Urade, Y., Inui, T., Yamamura, T., and Okada, T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 953-959

69. Hagiwara, H., Kozuka, M., Sakaguchi, H., Eguchi, S., Ito, T., and Hirose, S. (1991) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**, S117-S118
70. Vann, L. R., Wooding, F. B. P., Irvine, R. F., and Divecha, N. (1997) *Biochem. J.* **327**, 569-576
71. Clarke, J. H., Letcher, A. J., D'Santos, C. S., Salstead, J. R., Irvine, R. F., and Divecha, N. (2001) *Biochem. J.* **357**, 905-910
72. D'Santos, C. S., Clarke, J. H., Rivine, R. F., and Divecha, N. (1999) *Curr. Biol.* **22**, 437-440
73. Faenza, I., Matteucci, A., Manzoli, L., Billi, A. M., Aluigi, M., Peruzzi, D., Vitale, M., Castorina, S., Suh, P. G., and Cocco, L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 30520-30524
74. Bian, L., Lei, Z., and Rao, C. V. (1998) *Eur. J. Biochem.* **253**, 545-551
75. Gerasimenko, O. V., Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., and Petersen, O. H. (1995) *Cell* **80**, 439-444
76. Lui, P. P., Kong, S. K., Tsang, D., and Lee, C. Y. (1998) *Pflugers Arch.* **435**, 357-361
77. Abe, Y., Nakayama, K., Yamanaka, A., Sakurai, T., and Goto, K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8864-8671
78. Chun, M., Lin, H. Y., Henis, Y. I., and Lodish, H. F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10855-10860
79. Bremnes, T., Paasche, J. D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, B., and Attramadal, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17596-17604
80. Paasche, J. D., Attramadal, T., Sandberg, C., Johansen, H. K., and Attramadal, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34041-34050
81. Grantcharova, E., Furkert, J., Reusch, H. P., Krell, H.-W., Papsdorf, G., Beyermann, M., Schülein, H., Rosenthal, W., and Oksche, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43933-43941

82. Wu-Wong, J. R., Chiou, W. J., Magnuson, S. R., and Opgenorth, T. J. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1224**, 288-294
83. Talbodec, A., Berkane, N., Blandin, V., Breittmayer, J. P., Ferrari, E., Frelin, C., and Vigne, P. (2000) *Mol. Pharm.* **57**, 797-804
84. Sokolovsky, M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 32-38
85. Re, R. N., Vizard, D. L., Brown, J., LeGros, L., and Bryan, S. E. (1984) *J. Hypertension* **2**, S271-S273
86. Srinivasan, R., Gillett, C. E., Barnes, D. M., and Gullick, W. J. (2000) *Cancer Res.* **60**, 1483-1487
87. Horvat, A. (1978) *J. Cell Physiol.* **97**, 37-47
88. Lind, G. J., and Cavanagh, H. D. (1993) *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **34**, 2943-2952
89. Belcheva, M., Barg, J., Rowinski, J., Clark, W. G., Gloeckner, C. A., Ho, A., Gao, X. M., Chuang, D. M., and Coscia, C. (1993) *J. Neurosci.* **13**, 104-114
90. Lu, D., Yang, H., Shaw, G., and Raizada, M. K. (1998) *Endocrinology* **139**, 365-375
91. Marti, U., Ruchti, C., Kampf, J., Thomas, G. A., Williams, E. D., Peter, H. J., Gerber, H., and Burgi, U. (2001) *Thyroid* **11**, 137-145
92. Grasl-Kraupp, B., Schausberger, E., Hufnagl, K., Gerner, C., Löw-Baselli, A., Rossmanith, W., Parzefall, W., and Schulte-Hermann, R. (2002) *Hepatology* **35**, 1372-1380
93. Wells, A., and Marti, U. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 1-6
94. Gobeil, F., Jr., Dumont, I., Marrache, A. M., Vazquez-Tello, A., Bernier, S. G., Abran, D., Hou, X., Beauchamp, M. H., Quiniou, C., Bouayad, A., Choufani, S., Bhattacharya, M., Molotchnikoff, S., Ribeiro-Da-Silva, A., Varma, D. R., Bkaily, G., and Chemtob, S. (2002) *Circ. Res.* **90**, 682-689

96. Thomas, P. B., Liu, E. C. K., Webb, M. L., Mukherjee, R., Hebbar, L., and Spinale, F. G. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, H2629-H2637
97. Willard, F. S., and Crouch, M. F. (2000) *Immunol. Cell Biol.* **78**, 387-394
98. Yamamoto, S., Kawamura, K., and James, T. M. (1998) *Microsc. Res. Tech.* **40**, 479-498
99. Lugnier, C., Keravis, T., Le Bec, A., Pauvert, O., Proteau, S., and Rousseau, E. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1472**, 431-446
100. Topham, M. K., Bunting, M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Blackshear, P. J., and Prescott, S. M. (1998) *Nature (London)* **394**, 697-700
101. Fatima, S., Yaghini, F. A., Ahmed, A., Khandekar, Z., and Malik, K. U. (2003) *J. Cell. Sci.* **116**, 353-365
102. Baldassare, J. J., Jarpe, M., Alferes, L., and Raben, D. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4911-4914
103. Didichenko, S. A., and Thelen, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48135-48142
104. Stehno-Bittel, L., Perez-Terzic, C., and Clapham, D. E. (1995) *Science* **270**, 1835-1838
105. Lanini, L., Bachs, O., and Carafoli, E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11548-11552
106. Abrenica, B., and Gilchrist, J. S. C. (2000) *Cell Calcium* **28**, 127-136
107. Raben, D. M., Jarpe, M. B., and Leach, K. L. (1994) *Membrane Biol.* **142**, 1-7
108. Irvine, R. F. (2002) *Sci. STKE* **150**, RE13
109. Bonnet, H., Filhol, O., Truchet, I., Brethenou, P., Cochet, C., Amalric, F., and Bouche, G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24781-24787
110. Holt, S. J., Alexander, P., Inman, C. B., and Davies, D. E. (1994) *Biochem. Pharmacol.* **47**, 117-126
111. Perez-Terzic, C., Pyle, J., Jaconi, M., Stehno-Bittel, L., and Clapham, D. E. (1996) *Science* **273**, 1875-1877

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Localization of endothelin receptors in canine cardiac membranes.

Membranes were isolated from canine heart (MV, 1-5) or rat brain (RB) as described in METHODS. Each lane contains 25 μ g or 50 μ g (RB) of protein. MV, crude membrane vesicles; 1, fraction 1 (plasma membrane); 2-5, fractions 2-5. Fraction 3 is enriched in junctional sarcoplasmic reticulum (SR) whereas fraction 5 is enriched in longitudinal SR: hence, fractions 2-5 comprise different membranes of intracellular origin. Proteins were separated on 10-20% acrylamide-gradient SDS-PAGE gels and transferred onto PVDF membranes. Following blocking, membranes were incubated with antisera specific for ET_AR (A; rat ET_AR₄₁₃₋₄₂₆) or ET_BR (B; rat ET_BR₂₉₈₋₃₁₄). Immunoreactive bands were visualized by ECL. Molecular mass of prestained markers are indicated on the left (kDa). Arrows indicate the presence of immunoreactive bands.

Figure 2. Confocal immunofluorescent images of the distribution of the endothelin ET_A receptor subtype in adult rat ventricular myocytes.

Adult rat ventricular myocytes were fixed, labeled with antisera, and visualized with a Zeiss LSM 510 Confocal Fluorescent Microscope. (A) anti-ET_AR₃₁₋₄₅, (B) 5X enlargement of panel A, (C) anti-ET_AR₄₁₃₋₄₂₆. Panels (D) and (E) are control experiments for the images shown in A and C, respectively. (F) ET_AR staining pattern (anti-ET_AR₃₁₋₄₅, pseudocolour red), (G) nucleoporin p62 staining pattern (pseudocolour green), (H) colocalization staining pattern (colocalized pixels are pseudocolored yellow). (I,J,K) enlargements of nuclei from F-H, respectively. (L,M,N) are control experiments for F-H, respectively. For control experiments, myocytes from the same heart were prepared according to the labeling procedure except that primary antibodies were omitted. Confocal microscope settings for control images were identical to those employed in the presence of the respective primary antibody. The absence of signal in

these control images indicates that the blocking conditions were sufficient to prevent non-specific interactions between the myocytes and the secondary antibodies. The arrows in panels A and C indicate the position of the nuclei: adult ventricular myocytes are generally binucleate.

Figure 3. Confocal immunofluorescent images of the distribution of the endothelin ET_B receptor subtype in adult rat ventricular myocytes. Adult rat ventricular myocytes were fixed, labeled with antisera, and visualized with a Zeiss LSM 510 Confocal Fluorescent Microscope. (A) anti-ET_BR₂₉₈₋₃₁₄, (B) 5X enlargement of panel A, (C) anti-ET_BR₄₀₅₋₄₁₇. Panels (D) and (E) are control experiments for the images shown in A and C, respectively. (F) anti-ET_BR₂₉₈₋₃₁₄ (pseudocolour red), (G) anti-ET_BR₄₀₅₋₄₁₇ (pseudocolour green), (H) colocalization staining pattern (colocalized pixels are pseudocolored yellow). (I,J,K) are control experiments for F-H, respectively, where the primary antibody was omitted. (L) ET_BR staining pattern (anti-ET_BR₂₉₈₋₃₁₄, pseudocolour red), (M) nucleoporin p62 staining pattern (pseudocolour yellow), (N) colocalization staining pattern. (O,P,Q) enlargements of nuclei from L-N, respectively. (R,S,T) are control experiments for L-N, respectively. Panel (U, and inset) show an image following three-dimensional digital deconvolution of the image stack from a cell labeled with anti-ET_BR₂₉₈₋₃₁₄ (Huygens Professional software, Scientific Volume Imaging). For control experiments, myocytes from the same heart were prepared according to the labeling procedure except that primary antibodies were omitted. Confocal microscope settings for control images were identical to those employed in the presence of the respective primary antibody. The absence of signal in these control images indicates that the blocking conditions were sufficient to prevent non-specific interactions between the myocytes and the secondary antibodies. The arrows in panels A and C indicate the position of the nuclei.

Figure 4. Endothelin receptor immunoreactivity in isolated cardiac nuclei. (A) Nuclei were isolated from rat heart as described in Experimental Procedures. Lanes contain 25 μg each of homogenate (F.1), 500g supernatants (F.2), crude nuclei (F.3), or enriched nuclear fraction (F.4). Proteins were separated on 10-20% acrylamide-gradient SDS-PAGE gels and transferred onto filters. Following blocking, membranes were incubated with antisera specific for BiP/GRP78, Nucleoporin p62 (Nup62), Annexin II, GM130, ET_AR₄₁₃₋₄₂₆ or ET_BR₂₉₈₋₃₁₄. (B-C) Nuclei were isolated from sheep heart and 50 μg separated on 10-20% acrylamide-gradient SDS-PAGE gels and transferred onto filters. Following blocking, membranes were incubated with antisera specific for ET_AR (B) or ET_BR (C). Immunoreactive bands were visualized by ECL. In panels B and C, the molecular mass markers (in kDa) are indicated on the left.

Figure 5. [¹²⁵I]ET-1 binding to isolated cardiac nuclei and displacement by nonradioactive peptides. Nuclei isolated from rat (A) or sheep (B) heart were incubated with of 40 pM [¹²⁵I]ET-1 and in the absence or presence of either non-labeled ET-1 (1 μM), BQ610 (1 μM), BQ788 (1 μM), or IRL-1620 (1 μM). Results shown are the amount of bound [¹²⁵I]ET-1 displaced when incubated in the presence of the indicated non-labeled peptide. Data shown are means (\pm S.E.) of 2 (sheep) or 3 (rat) independent experiments using different preparations of nuclei; each determination was performed in triplicate.* $p < 0.05$ compared to ET-1. † $p < 0.05$ compared to BQ610.

Figure 6. [¹²⁵I]IRL-1620 binding to isolated cardiac nuclei. Rat heart nuclei (400 μg ; lanes 1-4 and lane 8), rat brain membranes (400 μg ; lane 5), canine cardiac membrane fraction 5 (100 μg ; lane 6) and sheep heart nuclei (100 μg ; lane 7) were

incubated with of 2.5 nM [¹²⁵I]IRL1620 and in the absence or presence of either non-labeled ET-1 (1 μM; lane 2), BQ610 (1 μM; lane 3), or BQ788 (1 μM; lane 4). Following binding, samples were solubilized using SDS-PAGE sample buffer and resolved by acrylamide-gradient SDS-PAGE. Gels were dried and ¹²⁵I incorporation determined by autoradiography as described in METHODS. The molecular mass markers (in kDa) are indicated in the center.

Figure 7. The effect of endothelin receptor agonists on protein phosphorylation in isolated nuclei. Rat heart nuclei (30 μg) were incubated for 30 min at 30 °C in the absence (a) or presence of ET-1 (b, 0.1 μM), IRL-1620 (c, 0.1 μM), or PMA (d, 0.1 μM). Nuclei were then solubilized using Laemmli sample buffer and proteins separated using 10-20% (w/v) acrylamide-gradient SDS-PAGE. Gels were dried and ³²P incorporation determined by autoradiography and phosphor imaging. Due to the large differences in ³²P incorporation in the bands indicated as 1-5 in panel A, the contrast was adjusted using the transform function in Molecular Analyst (version 2.1.2, BioRad Laboratories) and the bands were independently reproduced in panel B. The maximum pixel depth for the imaging screens is 64,000: the values obtained did not exceed this value.

Figure 8. Effects of endothelin receptor agonists on Ca²⁺ transients in isolated cardiac nuclei. Freshly isolated nuclei were resuspended in a buffer comprising 25 mM HEPES pH 7.0, 100 mM KCl, 2 mM K₂HPO₄, and 4 mM MgCl₂ (loading buffer) plus 7.5 μM fura-2/AM and incubated for 45 min on ice. Dye-loaded nuclei were washed free of extra nuclear fura-2/AM, incubated for 15 min on ice for final hydrolysis, added to an equal volume of loading buffer containing 800 nM CaCl₂, and seeded onto glass slides. Where indicated (arrow), ET-1, IRL-1620, or vehicle (DMSO) was added. The nuclear cisternal Ca²⁺ concentration [Ca²⁺]_n was measured

as described in METHODS using an Ion Optix microspectrofluorimeter ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ and 380 nm; $\lambda_{\text{em}} = 509$ nm). Typical tracings of intracellular Ca^{2+} are shown. Results are representative of 6 determinations performed using 3 independent nuclei preparations.

Figure 1

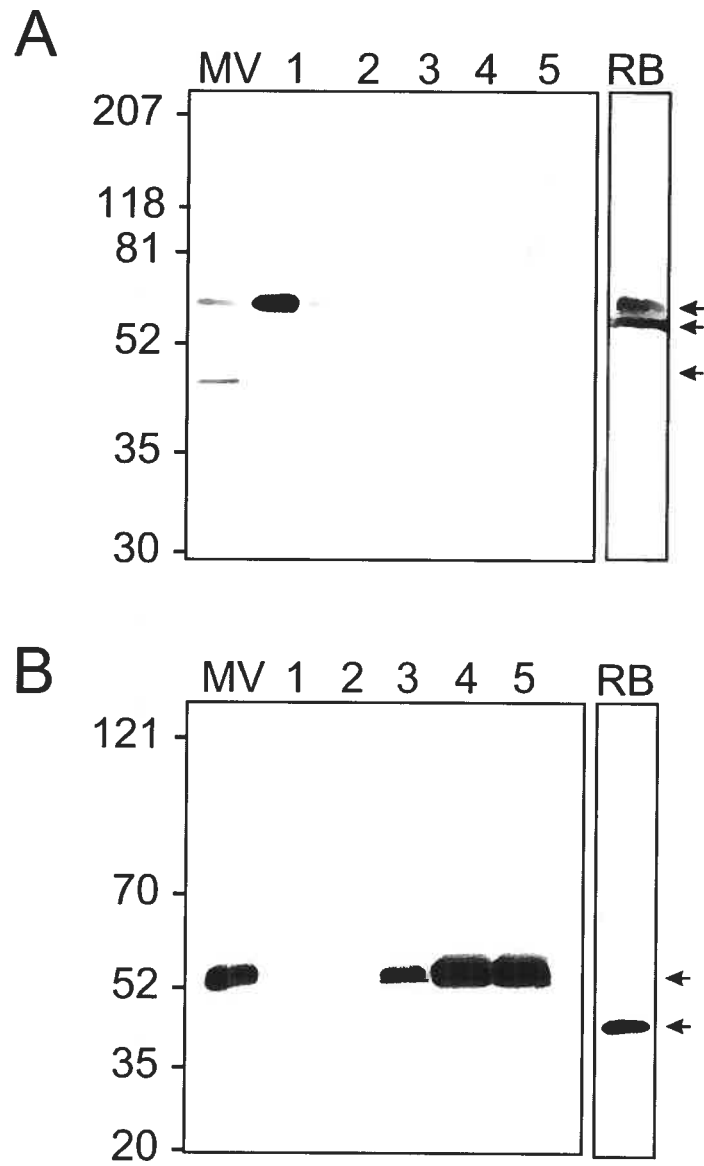


Figure 2

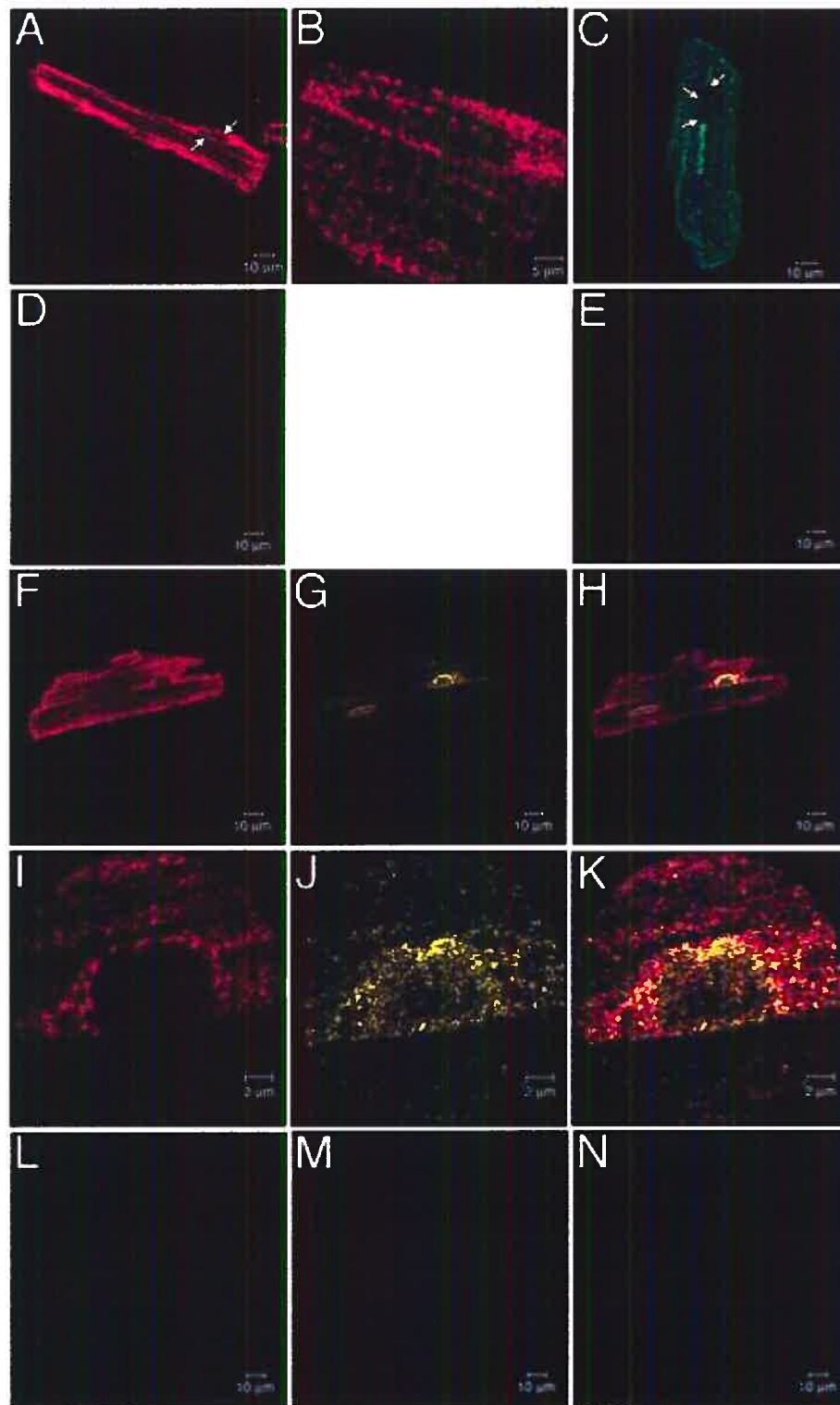


Figure 3

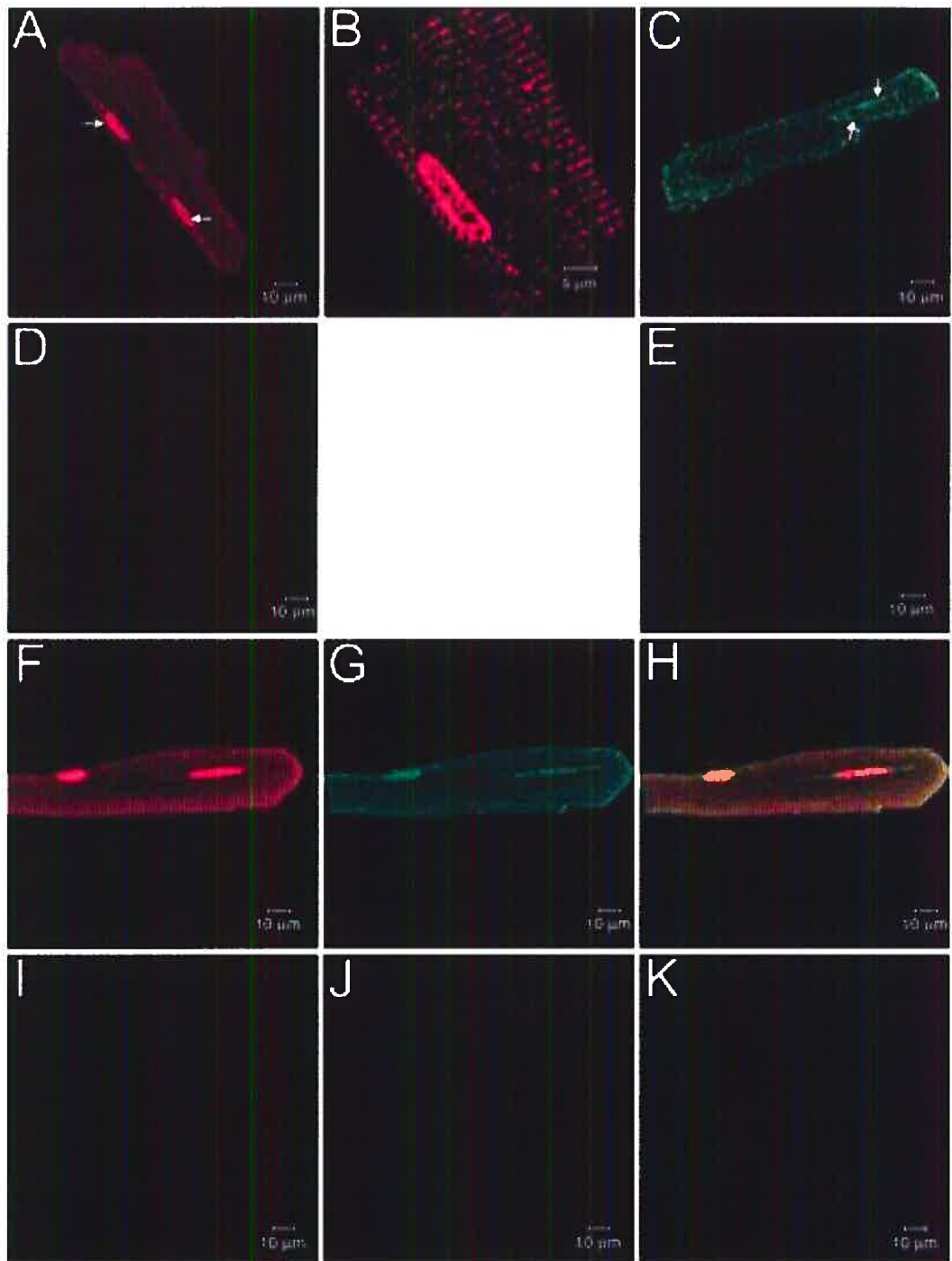


Figure 3 (suite)

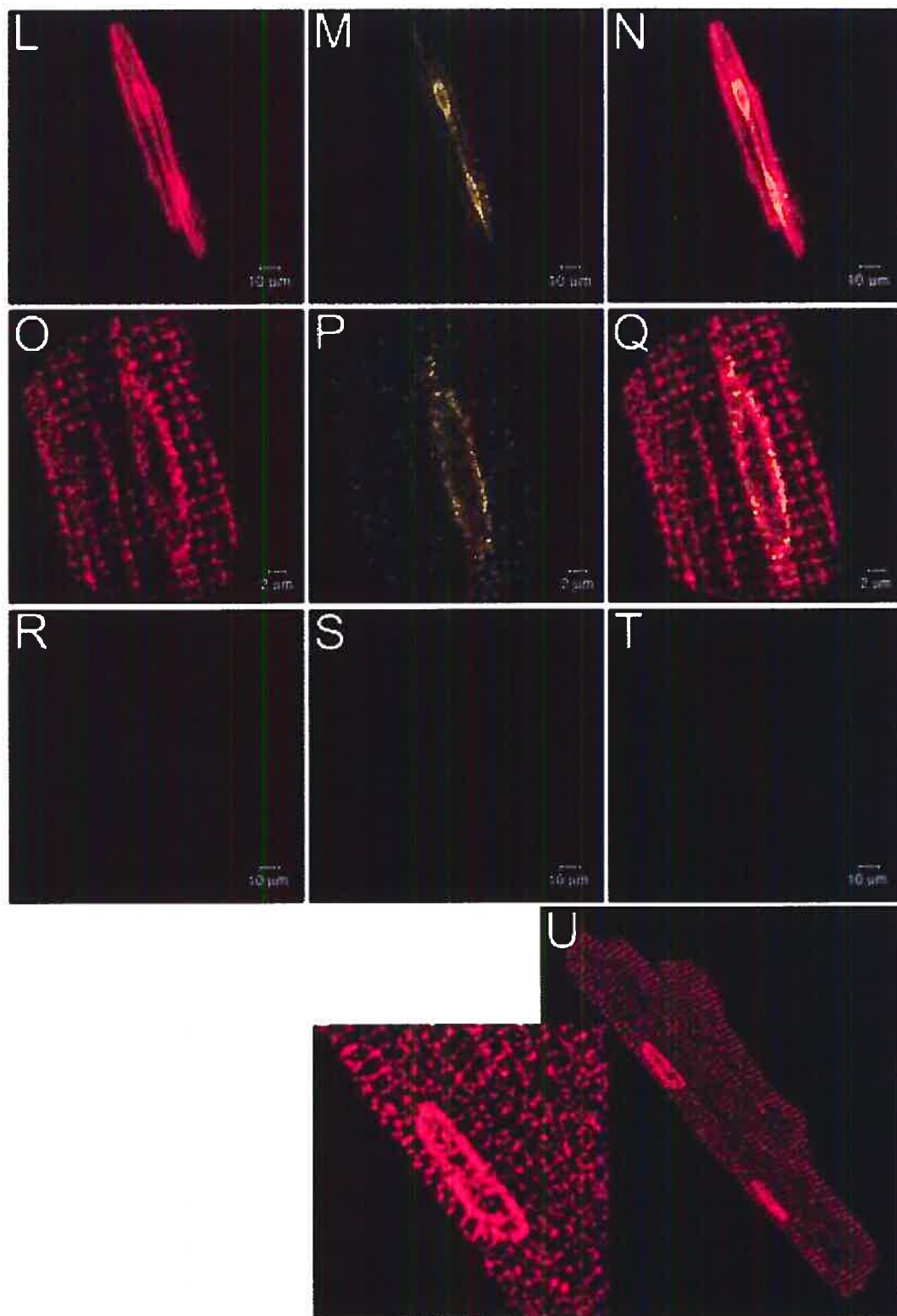


Figure 4

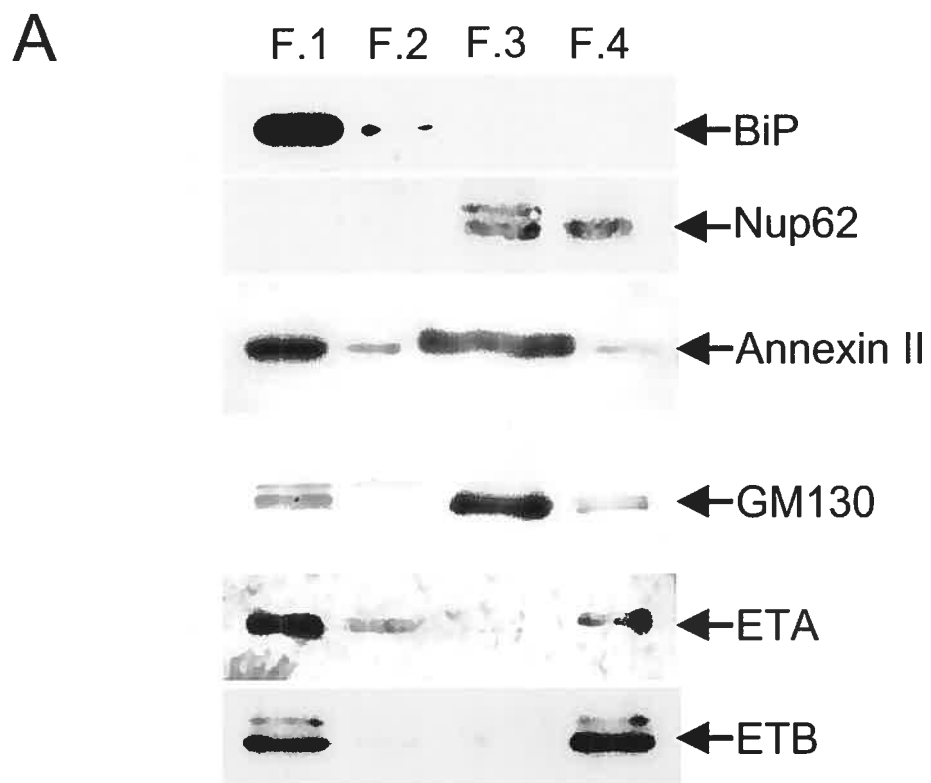
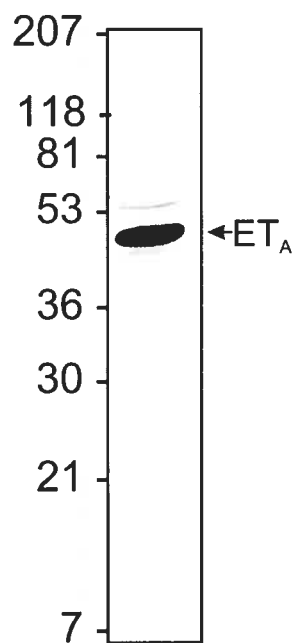
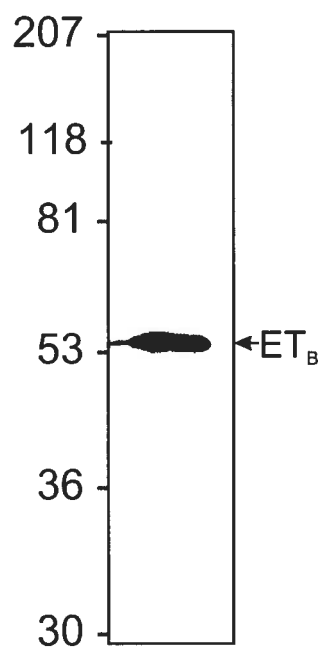
**B****C**

Figure 5

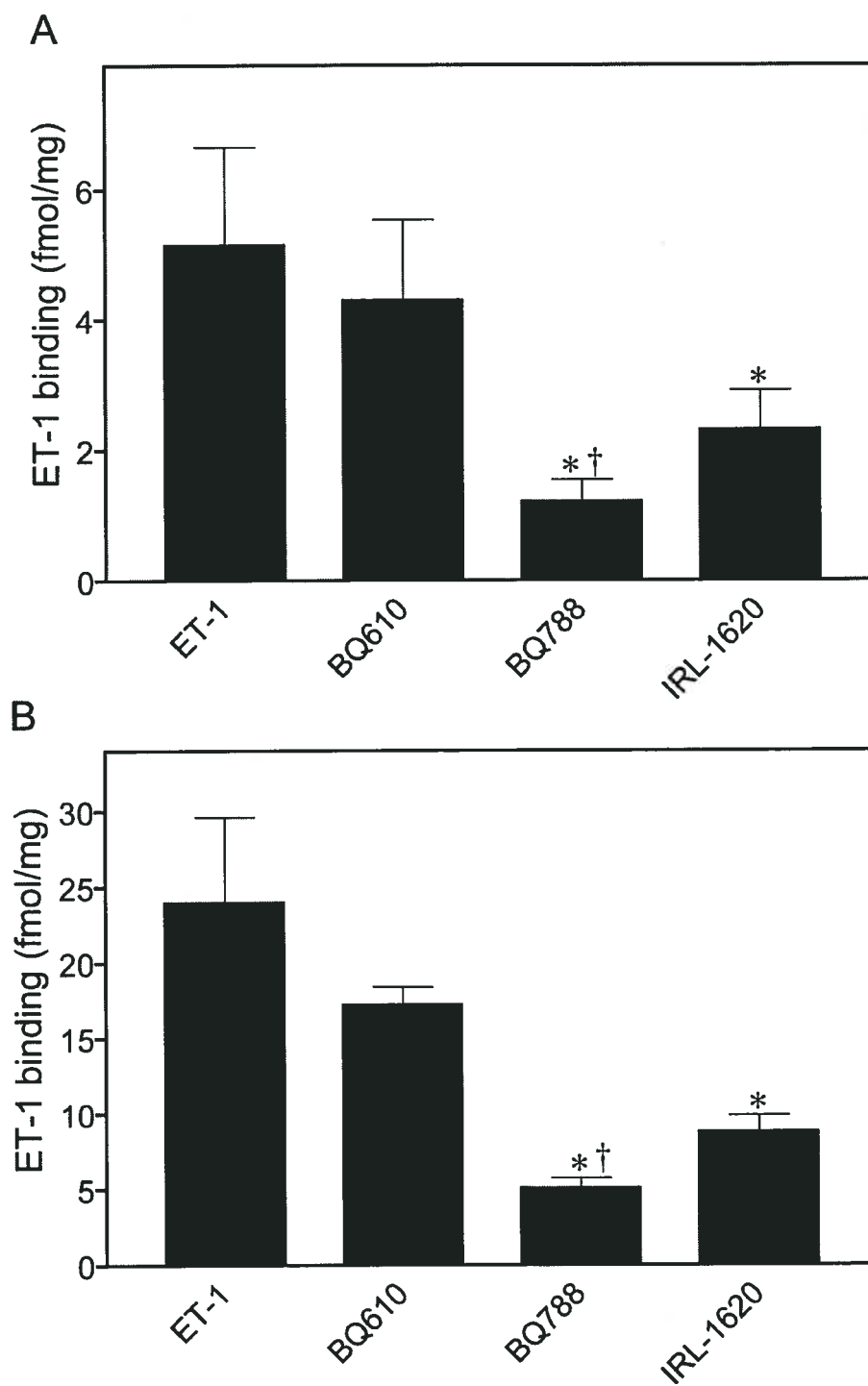


Figure 6

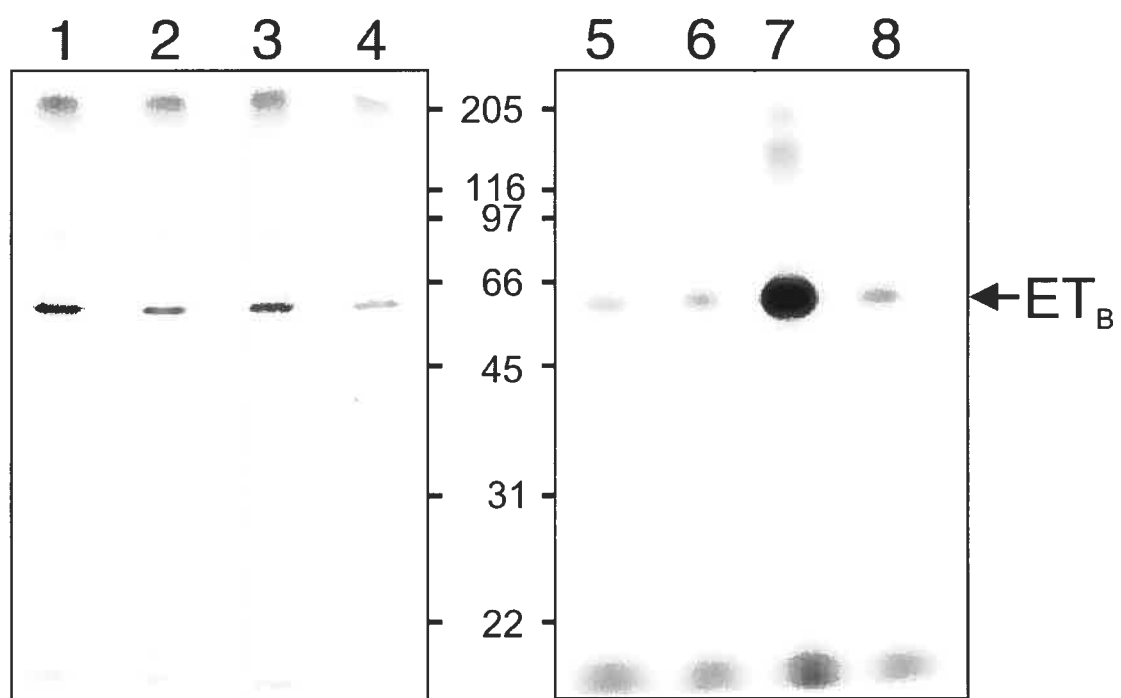


Figure 7

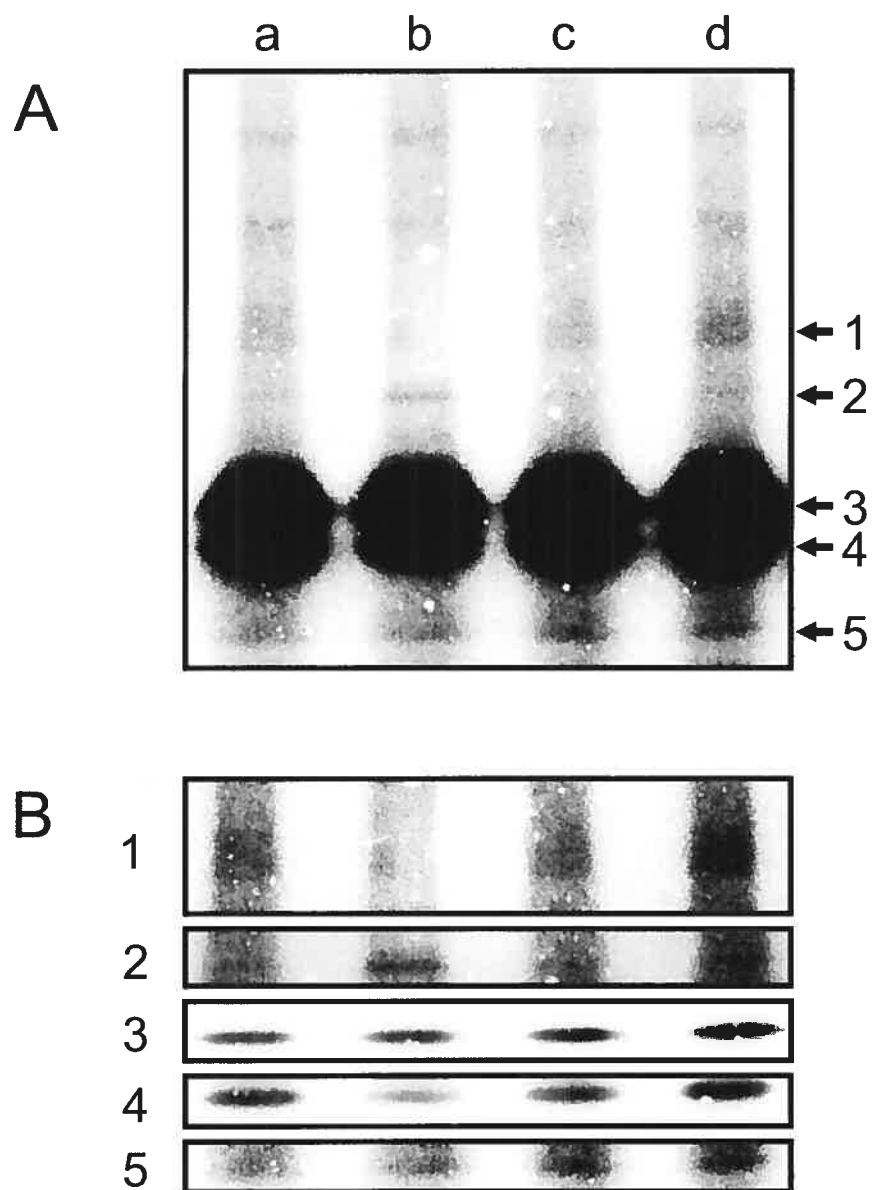
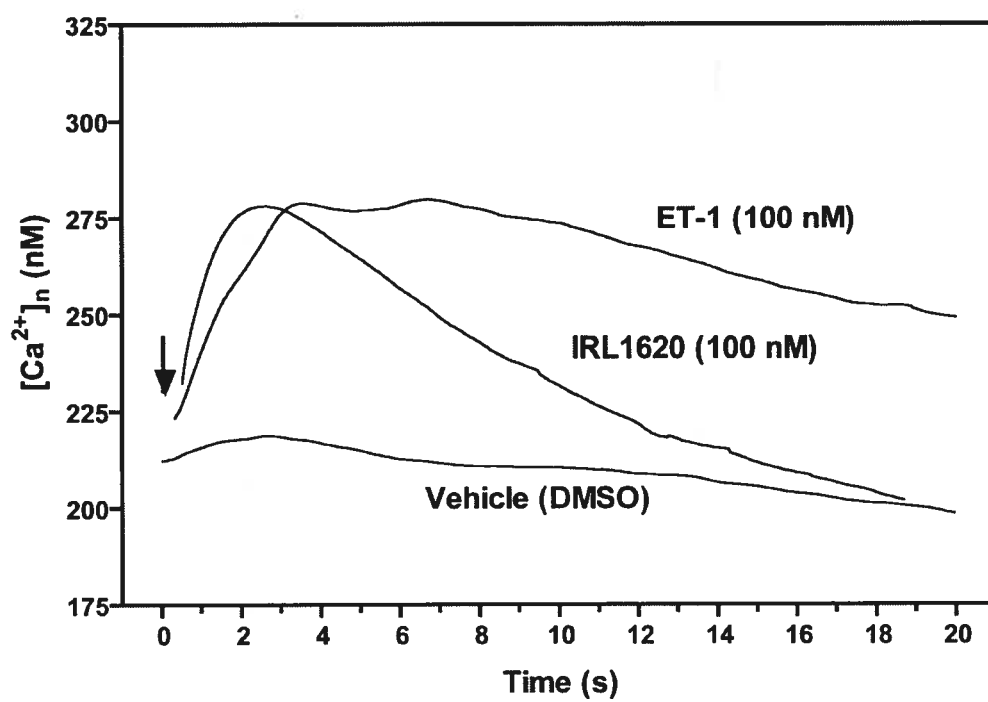


Figure 8



4. ARTICLE #3

Enfin, à la suite de notre étude identifiant des ETR intracellulaires, nous avons revisité l'hypothèse controversée selon laquelle les ETR peuvent interagir et internaliser via les cavéoles (Chun et coll., 1995; Chun et coll., 1994; Yamaguchi et coll., 2003). Par ailleurs, comme les cavéoles servent aussi à l'organisation de complexes protéiques, l'étude visait également à vérifier si les cavéoles servaient à organiser un signalosome formé des composantes de la cascade de signalisation de l'endothéline menant à l'activation de Erk1/2 dans les cardiomyocytes adultes.

**Sub-cellular distribution of endothelin signaling pathway
components in ventricular myocytes and heart:
Lack of preformed caveolar signalosomes**

**Benoit Boivin^{‡§}, Louis R. Villeneuve[‡], Nada Farhat[‡], Dominique
Chevalier[‡], and Bruce G. Allen^{†‡§*}**

J. Mol. Cell. Cardiol. 2005 Apr;38(4):665-676.

[‡] Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de Recherche, 5000 rue Bélanger,
Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

[§] Département de Biochimie and the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux
Autonome, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

[†] Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada,
H3C 3J7

* Address for Correspondence: Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de
Recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec H1T 1C8. Telephone: (514)
376-3330 (3591). FAX: (514) 376-1355. Email: [REDACTED]

Running Title: Endothelin pathway subcellular localization

Key words: Lipid rafts, caveolae, endothelin, ERK, signalosome

SUMMARY

Stimulation of endothelin receptors (ETRs) leads to activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. It is unclear whether compartmentalization to lipid rafts is necessary for proper endothelin signalling, as methodologies employed to isolate and study caveolae involve detergent extraction, which may induce aggregation of membrane-associated proteins. The present study was to determine if components of the endothelin-1 (ET-1) pathway leading to ERK activation localize to caveolae and constitute preformed signalosomes. Microsomes were prepared from intact ventricular myocardium, in the absence of detergents, and fractionated by differential and sucrose-density gradient centrifugation to determine if caveolins and components of the ETRs post-receptor signalling cascade were in vesicles having similar physical properties. Confocal fluorescence microscopy, followed by digital deconvolution, was employed to determine if the signalling proteins colocalized with caveolin within intact, freshly isolated adult myocytes. With the exception of ET_ARs, proteins from the ET-1 pathway copurified in part or entirely (G α_{11}), with caveolin-1 and caveolin-3. In contrast, with the exception of G $\alpha_{q/11}$, G α_{i3} and G β G-protein subunits, most of the proteins studied showed little colocalization with caveolin-3. Thus, although components of the ET-1 signalling pathway may exist in vesicles having similar characteristics to vesicles containing caveolin, these proteins did not associate with caveolae in intact myocytes. The lack of detectable colocalization of caveolin-3 with proteins within the endothelin post-receptor signalling system in intact myocytes argues against the presence of a preformed, caveolae-associated signalosome.

INTRODUCTION

Lipid rafts are plasma membrane microdomains that are enriched in glycosphingolipids and cholesterol, insoluble in nonionic detergents at 4°C [1], and of low density on sucrose gradients [2]. Caveolae, a subset of lipid rafts, are flask-like invaginations of the plasma membrane [3] whose structural integrity is achieved by specialized integral membrane proteins, including the caveolins [4, 5]. Caveolae can be either stationary, held in place within the plasma membrane by the cortical actin cytoskeleton [6] or form vesicles as part of a unique endocytic-exocytic system [7, 8]. Caveolae have been implicated in regulating cellular cholesterol balance [9] and signal transduction [7, 10, 11].

To date, six caveolin gene products have been detected in mammals (i.e. caveolin-1 α , -1 β , -2 α , -2 β , -2 γ and -3). Caveolins -1 and -2 are expressed in various cell types whereas caveolin-3 expression is muscle-specific. Several different methods have been developed to purify caveolae using caveolins as marker proteins. Subcellular fractionation has shown that caveolin-1-enriched fractions are also enriched in lipid-modified proteins, signalling molecules, and receptors (reviewed in [7, 11]). Hence, caveolae may function as a signalosome: such higher levels of organization would offer advantages including an increased efficiency of signal transduction and a possible reduction in molecular crosstalk.

The lower fluidity of glycosphingolipid-, cholesterol-, and sphingomyelin-rich rafts favors the accumulation of acylated, prenylated, or glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked proteins [7, 12]. However, although acyl and prenyl groups are equally hydrophobic, the irregular structure of prenyl tails may exclude them from lipid rafts [13]. Caveolar localization of certain proteins is also mediated by interaction with a caveolin scaffolding domain [11]. Thus, kinetics of protein-protein and/or lipid-protein

interactions, plus the kinetics of lipid-modified proteins diffusing through specific lipid environments, determine protein partitioning into lipid rafts and caveolae.

Methods for isolating caveolae generally involve conditions that alter the composition of membrane microdomains (e.g. detergent, sonication, alkaline pH, high ionic strength), and thus create extraction artifacts (Reviewed in [7]). A commonly used method involves flotation of a detergent-insoluble, glycosphingolipid-enriched (DIGs) fraction on sucrose gradients [1]: low buoyant density on sucrose gradients is a characteristic of all forms of lipid rafts. Therefore, proteins partitioning into the low-density fraction may not actually interact in native membranes or even coexist within the same membrane subdomains. In the present study, 5-step discontinuous sucrose-density gradients were employed to fractionate cardiac ventricular microsomes. Using microsomes prepared and fractionated in the absence of detergents, we examined the association of ET_AR and ET_BR, heterotrimeric guanine nucleotide-dependent regulatory proteins (G-proteins: G α_{13} -, G $\alpha_{q/11}$ -, G α_s -, G β -), small G-proteins of the Ras subfamily (H-, K-, N-, R-Ras), protein kinase C- ϵ (PKC- ϵ), and protein kinases from the ERK Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) cascade (Raf-1, Mek-1 and ERK1/2) with microsomal fractions containing caveolin-enriched vesicles. The cellular localization of these proteins was determined in freshly isolated adult myocytes using deconvolved confocal microscopy. Taken together, data from microsomal fractionation and deconvolved confocal images of endothelin signalling pathway components suggested that even those components of the endothelin signalling pathway that copurified with caveolin did not significantly colocalize with caveolin in intact myocytes. Hence, although these proteins were associated with a population of membrane vesicles displaying similar physical properties as caveolin-containing

vesicles, they were not contained within the same vesicles as caveolin and hence were not associated with caveolae in vivo.

MATERIALS AND METHODS

Materials:

Antisera specific for the ET_AR (AER-001) and ET_BR (AER-002) were from Alomone Laboratories Inc (Jerusalem, Israel). Anti-caveolin-1 (C37120) was from Transduction Laboratories (Lexington, KY) and anti-pan-Ras (Ab-3) was from Calbiochem (San Diego, CA). Anti-caveolin-3 (sc-7665), G α_{i3} (sc-262), G $\alpha_{q/11}$ (sc-392), G α_s (sc-823), G β (sc-378), H-Ras (sc-29), K-Ras (sc-30), N-Ras (sc-31), R-Ras (sc-523), nPKC- ϵ (sc-214), and Mek-1 (sc-219) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-calsequestrin was a gift from Dr. Larry R. Jones (Kannert Institute of Cardiology, Indianapolis, IN, USA). Anti-Raf-1 was a gift from Dr. Steven Pelech (UBC, BC, Canada). Anti-ERK1-CT antiserum was raised against a synthetic peptide, corresponding to residues 333-367 of rat ERK1 MAP kinase (Global Peptide Services, Fort Collins, CO, USA) and recognized both ERK1 and ERK2. Normal donkey serum, Cy5-, and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Alexa-conjugated secondary antibodies and 170 nm FluoSpheres (PS-Speck Microscope Point Source Kit) were from Molecular Probes (Eugene, OR). The chemiluminescence reagent Renaissance Plus was from PerkinElmer Life Sciences (Woodbridge, Ontario). Triton X-100 (TX-100), leupeptin and PMSF were from Roche Applied Science (Laval, Québec). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis reagents, PVDF (0.22 μ m), and Bradford protein assay reagents were from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Ontario). Fatty acid-free BSA and Tris base were from Sigma Chemical Co (Mississauga, Ontario). Unless otherwise stated, all other reagents were of analytical grade from VWR Canlab (Ville Mont-Royal, Québec). NanoPure-grade water was employed throughout these studies.

Preparation and subfractionation of canine cardiac microsomes:

Canine cardiac microsomes were prepared and subfractionated as described previously [14]. Briefly, fresh canine ventricles were homogenized, using a Waring blender, in five volumes of 20 mM Imidazole/HCl buffer (pH 6.8 at 5°C) containing 0.3 M sucrose, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM NaN₃, 2 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 1.4 µg/ml pepstatin A, and 5 µg/ml aprotinin. Crude microsomes were then prepared [15] and further separated by ATP-dependent loading with calcium phosphate followed by centrifugation into discontinuous sucrose-density gradients (0.0, 0.6, 0.8, 1.1, 1.6 M) [16]. Fractionated cardiac membrane vesicles (FCMV) harvested from the 0/0.6 M sucrose interface (fraction 1), the 0.8/1.1 M interface (fraction 3), and the pellet at the bottom of the tube (fraction 5) were enriched in plasma membrane, junctional sarcoplasmic reticulum (JSR), and longitudinal sarcoplasmic reticulum (LSR) [14, 16, 17], respectively. Hence, fractions 1-5 comprise membranes of diverse origins. Each fraction was resuspended in histidine/HCl buffer (pH 6.8 at 5°C) containing 0.3 M KCl, 2 mM DTT, and 10 µg/ml leupeptin, aliquoted, frozen using liquid nitrogen, and stored at -80°C.

Immunoblotting:

Protein samples were separated by electrophoresis on 10-20% (w/v) acrylamide-gradient SDS-PAGE and transferred (100 V, 5°C, 90 min) onto PVDF membranes in a buffer comprising 25 mM Tris base, 192 mM glycine, and 5% (v/v) methanol. Membranes were blocked for 2 hr with 5 % (w/v) skimmed milk powder (Carnation) in 25 mM Tris (pH 7.5 at 20°C), 150 mM NaCl (TBS), and 0.05% (v/v) Tween-20 (TBST). Membranes were then incubated with primary antibody diluted in 1% BSA in TBST for 16 hr at 5°C, washed with TBST (3 x 10 min), reblocked with TBST containing 5% (w/v) non-fat milk powder for 10 min, and incubated in the presence of

the appropriate HRP-conjugated secondary antibody in blocking solution for 2 hr. Immunoreactive bands were visualized by ECL using Kodak BioMax ML or MR film.

Isolation of rat cardiac ventricular myocytes:

Adult rat cardiac ventricular myocytes (ACVM) were isolated as previously described [18]. This preparation provided 6 to 8 million cells/heart with 70 to 85% viability. Myocyte viability and purity were assessed by microscopy. No other cell types were detected. Where indicated, myocytes were maintained overnight in primary culture as described previously [19].

Confocal microscopy:

Confocal fluorescence microscopy was performed as described previously [20]. Myocytes were plated on laminin-coated coverslips for 1 hr (37°C, 95% O₂-5% CO₂), fixed for 20 min in PBS (pH 7.4) containing 2% (w/v) paraformaldehyde, then washed three times in PBS and incubated 1 hr at room temperature in PBS containing 5% normal donkey serum plus 0.2% (v/v) TX-100. Excess serum was removed and the cells were incubated for 16 hr at 4°C with primary antibody diluted in PBS containing 1% normal donkey serum and 0.04% (v/v) TX-100. Coverslips were then washed with PBS, drained, and incubated for 1 hr at room temperature with the appropriate secondary antibody (Alexa546-conjugated anti-goat antibody, Cy5-conjugated anti-rabbit antibody, or Alexa647-conjugated anti-mouse antibody). The coverslips were washed with PBS, drained, and mounted onto glass slides using a drop of 0.1% DABCO/glycerol medium. Coverslips were fixed to the slides with nail polish. Fluorescence was visualized as serial 180 nm-thick optical sections in the z-axis plane of each cell. In the case of dual-labeled cells, fluorescence from donkey anti-goat Alexa546-conjugated antibodies and donkey anti-rabbit Cy5- or donkey anti-mouse Alexa647-conjugated antibodies were collected alternatively and

composite images were created using the Zeiss LSM510 software. For each secondary antibody, control experiments were performed in the absence of primary antibody.

Immunocytofluorescence was acquired using a scanning confocal fluorescence microscope (LSM 510 Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 63/1.4 oil Plan-Apochromat objective. The images were acquired with voxel dimensions of 60 nm (x - y plane) and 180 nm (z -axis), respecting Nyquist parameters for sampling at all wavelengths employed. A typical image stack consisted of 80-100 serial 2-D images acquired at 180 nm intervals. Image stacks were digitally deconvolved to reduce out-of-focus light. The point spread function (PSF) of the Zeiss 510 confocal microscope was measured at wavelengths corresponding to the λ_{em} for each fluorophore using images of 170 nm FluoSpheres, labeled with the appropriate dye, acquired using the same parameters as employed for myocytes. FluoSpheres were prepared as described previously [21] and PSFs determined using images acquired from 10 separate beads. Deconvolution reduced the image dimensions (full-width at half-maximum intensity, FWHM) of orange FluoSpheres ($\lambda_{ex} = 540$ nm, $\lambda_{em} = 560$ nm) from (x,y,z) 620 x 620 x 1760 nm to 370 x 370 x 960 nm and of far-red FluoSpheres ($\lambda_{ex} = 633$ nm, $\lambda_{em} = 660$ nm) from 750 x 750 x 1980 nm to 450 x 450 x 1080 nm. Image stacks from labeled myocytes were deconvolved for 20 iterations using the Maximum Likelihood Estimation algorithm, and the appropriate calculated PSF, with Huygens Professional (Version 2.4.1, Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands) software. Files were stored in TIFF format and 3-D projections were reconstructed from deconvolved stacks using Volocity 2.0.1 (Improvision Ltd.)

Miscellaneous methods:

Protein concentration was measured by the Bradford [22] method using bovine γ -globulin as a standard.

RESULTS

Subfractionation and confocal imaging of caveolins

Differential centrifugation followed by calcium-loading and centrifugation into five-step discontinuous sucrose density gradients has previously been successfully applied to fractionate canine cardiac microsomes [15, 16]. This approach uses neither detergents nor alkaline pH and hence should not aggregate hydrophobic proteins and detergent insoluble lipid domains. In the present study, this method was employed to determine if proteins involved in ET-1 signal transduction (Fig. 1) copurify with vesicles containing caveolin. Fractions 1, 2, 3, 4 and 5 were harvested from the 0.0/0.6, 0.6/0.8, 0.8/1.1 and 1.1/1.6 M sucrose interfaces, and from the pellet at the bottom of the tube, respectively. These fractions are enriched in sarcolemma (fraction 1), JSR (fraction 3) and LSR (fraction 5) [16]. Antisera specific for calsequestrin, a calcium binding protein localized to the JSR, revealed a band of 56-60-kDa in the non-fractionated membrane vesicles (MV) (Fig. 2A, *MV*) and fractions 3 and 4, as previously reported [14, 16].

Although caveolin-3 expression is muscle-specific, the ventricular myocardium also contains cells other than myocytes. Hence, to identify caveolae-containing fractions, FCMV were examined for caveolin-1 and caveolin-3. Both caveolin-1 and -3 immunoreactivity was detected. Caveolin-1 antisera revealed a 21-kDa immunoreactive band in unfractionated microsomes (Fig. 2B, *MV*) and in fractions 2, 3, and 4 (Fig. 2B). This protein was most abundant in fractions 2 and 3. A 21-kDa caveolin-3-immunoreactive band presented a similar fractionation profile (Fig. 2C), with caveolin-3 immunoreactivity being most abundant in fraction 3. The caveolin-3 antisera employed in these studies revealed no other bands in FCVMs (Fig. 2C) or rat

heart (Not Shown). Thus, caveolae distributed to the 0.6/0.8, 0.8/1.1 and 1.1/1.6 M sucrose interfaces when isolated as described herein.

The subcellular localization of caveolins in ACVM was studied using confocal immunofluorescence microscopy. As previously reported [23], caveolin-1 was not detected in myocytes (Data not shown) and hence the caveolin-1 immunoreactivity observed in FCVMs originated from other cell types present within the ventricular myocardium. A *z*-axis maximum intensity projection of untreated images of a myocyte (1024 x 741 x 31 voxels) decorated with antibodies directed against caveolin-3 was performed to obtain a 3-D image of the cell (Fig. 2D). To reduce out-of-focus light, cell images were deconvolved to reduce the FWHM (Fig. 2E). Following deconvolution, caveolin-3 immunofluorescence displayed a punctate signal at the cell surface and a striated pattern within the cell. Although the T-tubular network is also plasma membrane, caveolin-3 immunofluorescence was more intense on surface membranes than T-tubules. Thus, caveolin-3 exists in plasma membrane structures including both the surface membranes and T-tubules. No immunofluorescence corresponding to an intracellular caveosome compartment was observed.

Endothelin receptors

ET_AR and ET_BR colocalize with caveolin-1 in mammalian (e.g. COS-1, HEK293) and insect (Sf9) cell lines [24, 25]. It is not presently known if ETRs also colocalize with caveolin-3. Hence, fractions 1-5 were examined using antisera specific to ET_AR or ET_BR (Fig. 3A,G). ET_AR-specific antisera revealed a 65-kDa band in non-fractionated membrane vesicles (Fig. 3A, MV) and this protein showed marked enrichment in fraction 1. ET_BR-specific antibodies revealed a 57-kDa doublet present in MV and enriched in fractions 3-5 (Fig. 3G). Thus, in canine heart, ET_AR

immunoreactivity was restricted to plasma membrane-enriched fractions devoid of caveolin immunoreactivity, whereas ET_BR immunoreactivity localized primarily to fractions enriched in membranes of intracellular origin [20].

The subcellular localization of ETRs and caveolin-3 was examined in intact myocytes using confocal immunofluorescence microscopy. Stacks of cell images from caveolin-3-decorated ACVM co-labeled with either ET_AR (Fig. 3B-F) or ET_BR (Fig. 3H-L) specific antibodies were deconvolved. As in other studies [20, 26], ET_AR antibodies decorated the cell surface, the nuclear membrane, plus intracellular structures resulting in a striated pattern (Fig. 3B, D-F). Although some ET_AR was detected on T-tubules, most of the intracellular ET_AR immunofluorescence localized to longitudinal and axial structures visible in the *x-y* plane (Fig. 3B) and *x-z* cross-section (Fig. 3D). Caveolin-3 was detected on cell surface and both transverse and axial components of the T-tubule network, visible as vertical labeling in the *x-y* plane and *x-z* cross-section, as previously observed [27]. ACVM are binucleate, and it is worthy of note that ET_AR immunofluorescence was also detected in an undefined compartment lying between the two nuclei. Thus ET_AR localized to plasmalemma, longitudinal and axial T-tubules, as well as on an undefined “internuclear” compartment and nuclear membranes in ACVM. ET_AR showed no colocalization (e.g. less than 1% colocalized voxels per cell (c.v.c.)) with caveolin-3 on plasma membranes and T-tubules (Fig. 3D-F). ET_BR-labeling revealed an intracellular striated pattern in addition to strong nuclear localization (Fig. 3H,J-L; [20]). ET_BR immunofluorescence on T-tubules was punctate, localized primarily to T-tubules visible on the *x-y* plane (Fig. 3H), and *x-z* cross-sections (Fig. 3J). Punctate cytosolic ET_BR immunofluorescence was also visible in the *x-y* plane. Partial (<1% c.v.c.) colocalization of ET_BR and caveolin-3 was observed on transverse and axial T-tubules (Fig. 3J-L).

Heterotrimeric GTP-binding proteins

ET_AR couple to G_q and G_s whereas ET_BR couple to G_q and G_i [28, 29]. As G α may be *N*-myristoylated and/or palmitoylated, whereas G γ can be prenylated [30], specific G-protein heterotrimeric complexes may localize to one or more subtype of lipid raft. In addition, the inactive, GDP-bound form of G α_s may interact with caveolins [31], impeding the reassociation of the heterotrimeric G-protein complex and leading to heterologous desensitization [32]. Antisera against G $\alpha_{q/11}$, G α_s , G α_{i3} , or G β were used to determine if these G-protein subunits localize to caveolin-containing membrane fractions. G $\alpha_{q/11}$ antisera revealed bands of 41- and 43-kDa (Fig. 4A; [33]). The 41-kDa band, corresponding to G α_q , was enriched in fraction 1, whereas the 43-kDa band, corresponding to G α_{11} , was in fractions 2-4, as were caveolins -1 and -3. Both 45- and 52-kDa forms of G α_s (G α_s -S and G α_s -L, respectively) were detected (Fig. 4G): G α_s -S was in fractions 1-2, whereas G α_s -L was weakly detected in fractions 4-5. Anti-G α_{i3} antisera revealed a single 41-kDa band in fractions 1-3, but most abundant in fraction 1 (Fig. 4M). The distribution of G $\beta\gamma$ complexes was studied using pan-G β antisera, which revealed 38-40 kDa bands of different intensities (Fig. 4S). As expected from the large number of possible G $\beta\gamma$ complexes (i.e. combinations of 5 G β and 12 G γ isoforms), the 38-kDa band showed a broad spectrum of membrane localization and was detected in all fractions, whereas the 40-kDa band was enriched in fractions 1-2. Thus, in FCMV, G $\beta\gamma$ complexes were in all fractions including, but not restricted to, those containing caveolin. Whereas G α_{11} tended to copurify with caveolins, only a fraction of the total immunoreactivity for other G α -protein subunits was detected in caveolin-containing fractions (i.e. fraction 2).

In FCMVs, G α_q and G α_s -L were absent from caveolin-enriched fractions, whereas G α_{11} , G α_s -S, G α_{i3} and G β partially or completely copurified with caveolin. In intact ACVMs, G $\alpha_{q/11}$ -labeling produced a strong punctate signal at the surface plasma

membrane, T-tubules, and intercalated disc region (Fig. 4B). $G\alpha_{q/11}$ was also detected on the nuclear membrane. $G\alpha_{q/11}$ colocalized with caveolin-3 (pseudocolour yellow) at the plasma membrane, T-tubules and intercalated disc (Fig. 4C-F). However, intense colocalization was restricted to the surface plasmalemma. As this antisera recognized both $G\alpha_{11}$ and $G\alpha_q$, and in light of results shown in Fig. 4A, it is possible that $G\alpha_{11}$ localized to caveolae in intact myocytes. $G\alpha_s$ -labeled ACVM revealed punctate immunofluorescence on plasma membranes and the T-tubules (Fig. 4H,J-L); however, the signal was strongest at the nuclear membrane and intercalated disc region. Colocalization of $G\alpha_s$ and caveolin-3 was observed solely at the plasma membrane (Fig. 4I-L). It is thus possible that $G\alpha_s$ -S is partly localized to caveolae in plasmalemma. $G\alpha_{\theta 3}$ immunofluorescence was apparent on T-tubules, plasma membrane, intercalated discs and nuclear membranes (Fig. 4N). Interestingly, $G\alpha_{13}$ immunofluorescence was more intense on T-tubules than on surface membranes. $G\alpha_{13}$ colocalization with caveolin-3 was observed at the intercalated disc and, to a much lesser extent, at the surface plasma membrane (Fig. 4O-R). As $G\beta\gamma$ complexes remain intact, the subcellular localization of $G\beta\gamma$ complexes was assessed using pan- $G\beta$ antisera. $G\beta$ immunofluorescence was observed at all locations previously observed for $G\alpha$ subunits (e.g., plasma membrane, T-tubules, intercalated disc, and nuclear membrane; Fig. 4T). Colocalization of $G\beta\gamma$ complexes with caveolin-3 was detected at the plasma membrane, intercalated disc, and T-tubules (Fig. 4U-X). Interestingly, all G-protein subunits revealed a punctate immunofluorescence pattern between T-tubules suggesting they may be present on intracellular vesicles. Thus, while microsomes containing $G\alpha_s$ and $G\alpha_{13}$ immunoreactivity copurified with those containing caveolin-3 during subcellular fractionation, confocal imaging indicated only partial colocalization with caveolin-3 in myocytes.

Phospholipase C-β1

Upon stimulation, ETRs activate the ERK MAP kinase pathway via activation of $G_{q/11}$ and PLC-β. When activated, PLC-β hydrolyses phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5) P_2) to diacylglycerol (DAG) plus Ins P_3 [34]. It is currently unclear how the subcellular localization of PLC-β is regulated. Although both PLC-β1 and PLC-β2 contain N-terminal pleckstrin-homology domains (which can bind PtdIns(4,5) P_2), the membrane-binding affinities of PLC-β show little dependence upon lipid composition [35]. However, once bound to membranes, PLC-β localization may be influenced by the distribution of PtdIns(4,5) P_2 . Interestingly, PtdIns(4,5) P_2 may be enriched in lipid rafts [36, 37]. The subcellular localization of PLC-β1 in heart was examined in FCMV by immunoblot. As previously observed in ACVM [26], the major band detected was a doublet of 100-kDa. PLC-β1 immunoreactivity was enriched in fractions 2, 4, and 5 suggesting this enzyme localizes to the plasmalemma-JSR (fraction 2), and LSR (fraction 4-5) (Fig. 5A). Thus, although PLC-β1 is a cytosolic protein, a fraction of the enzyme is membrane-bound.

In ACVM, PLC-β1 antisera decorated nuclear and plasma membranes and produced an intricate pattern suggesting interconnected subcellular membranous structures (Fig. 5B-F). In FCMV (Fig. 5A), PLC-β1 was enriched in fraction 5, previously characterized by others as LSR [16], suggesting PLC-β1 associates with the SR. Interestingly, PLC-β1 was also detected on the interconnected subcellular membranous structures forming what was tentatively described as the “internuclear” compartment. Although PLC-β1 was detected in FCMV fractions 2-4, no colocalization with caveolin-3 was observed in intact myocytes (Fig. 5C-F).

PKC-ε and monomeric G-proteins of the Ras subfamily

Signalling between PLC-β and the ERK MAP kinase pathway involves DAG and InsP_3 production, InsP_3 -mediated Ca^{2+} release, plus activation of PKCs and Ras G-proteins. In neonatal cardiac myocytes, ET-1-mediated PKC-ε activation induces maximal GTP loading of “primed” Ras-GDP within 1 minute [38], whereas translocation of PKC-ε to the caveolae occurred over a much slower time course [39]. Interestingly, a membrane-bound pool of PKC-ε has also been observed in unstimulated ACVM [40]. Thus, pools of PKC-ε localize to different subcellular compartments. In FCMV, PKC-ε antisera revealed a doublet of 97-kDa (Fig. 5G), as previously observed [41], which was most abundant in fractions 1-2 but a faint signal was also be detected in fractions 3-5. Thus, under basal conditions the membrane-bound PKC-ε was primarily associated with the plasma membrane.

PKC-ε is generally thought to be a cytosolic protein that translocates to membranes upon activation. However, as previously observed [40], PKC-ε was detected in the plasmalemmal fraction under basal conditions. In intact myocytes, PKC-ε immunofluorescence was punctate and decorated the cell surface, intracellular structure(s) resulting in a striated pattern, and cytosol (Fig. 5H). PKC-ε localization to T-tubules was proximal to the cell surface, and punctate cytosolic immunofluorescence was observed primarily near the center of the cell. When PKC-ε and caveolin-3 immunofluorescence were overlaid, colocalization (pseudocolored yellow) was detected at the external plasma membrane and T-tubules (Fig. 5I-L). However, colocalization was minimal and thus it is unlikely the PKC-ε detected in fractions 2-4 was associated with caveolae. Although it is possible that the stress of isolation may have induced PKC-ε translocation from the cytosol, allowing cells to recover overnight in primary culture did not alter the distribution of PKC-ε immunoreactivity (Fig. 5 M-Q).

GDP-loaded Ras proteins are thought to interact with caveolin and distribute to caveolae (Reviewed in [31]). Furthermore, members of the Ras family may be both farnesylated and palmitoylated [42, 43] suggesting these proteins may associate with lipid rafts. However, bulky isoprenoid groups linked to Ras proteins may actually hinder distribution into the ordered lipid environment of lipid rafts [13]. H-Ras, K-Ras, N-Ras, and R-Ras were detected in FCMV (Fig. 6A-C,I,O). Pan-Ras antisera detected a 21-kDa band in non-fractionated membrane vesicles (Fig. 6O, *MV*) that was enriched in fractions 1-2. Isoform-specific Ras antibodies also supported enrichment of these proteins in fractions 1-2. Thus Ras isoforms were present at the plasma membrane and copurification with caveolins in fraction 2 suggests a possible association with caveolae.

N-Ras-antisera decorated ACVM in a striated pattern reminiscent of ET_A R fluorescence (Figs. 6D, 2B). N-Ras immunofluorescence was also observed at the plasma membrane and T-tubules. Most of the intracellular immunofluorescence localized to longitudinal and axial structures visible in the x - y plane (Fig. 6D), and x - z plus y - z cross-sections (Fig. 6F,H). When overlaid with caveolin-3 immunofluorescence (Fig. 6E), minimal colocalization (<1% c.v.c.) was observed at the plasma membrane and axial T-tubules (Fig. 6G,H). R-Ras immunofluorescence was observed at the cell surface, T-tubules, and on nuclear membranes, as well as in a longitudinal striated pattern (Fig. 6J). Colocalization of R-Ras with caveolin-3 (Fig. 6K) at the plasma membrane and T-tubules was visible in the x - y plane (Fig. 6M) and colocalization on axial T-tubules was visible in both x - z and y - z cross-sections (Fig. 6L,N). Staining with antisera for H-Ras and K-Ras was similar to immunofluorescence without primary antibody (Data not shown). A pan-Ras antibody, used to confirm Ras distribution, decorated the surface membranes and T-tubules (Fig. 6P). Similar to N- and R-Ras immunofluorescence, pan-Ras antisera

produced a punctate pattern between the T-tubules. Thus, Ras isoforms may be present either in endo/exocytic vesicles or the cytosol. Pan-Ras immunofluorescence colocalized with caveolin-3 at the surface membranes and on T-tubules near surface membranes (Fig. 6Q), but not in the cytosol (Fig. 6R-T). Although pan-Ras immunofluorescence was observed in proximity to that of caveolin-3 deeper within the cell, only minimal colocalization was detected. Thus, although microsomes containing pan-Ras were detected in fractions 1 and 2 (e.g. copurifying with caveolin-3-containing microsomes), only a fraction of Ras immunofluorescence colocalized with caveolin-3 in intact myocytes.

ERK1/2 cascade

The ERK MAP kinase cascade is a three-kinase module consisting of MAPK kinase kinases (e.g. A-Raf and B-Raf or Raf-1), MAPK kinases (e.g. MEK1/2) and MAP kinases (e.g. ERK1/2). Activation of Raf is thought to be mediated by GTP-loaded Ras [44]. Upon binding to GTP-Ras, Raf translocates from the cytosol to plasma membranes for further activation (Reviewed in [45]). Interestingly, EGF stimulation results in translocation of Raf-1 to caveolin-rich membranes [46]. Consequently, the targeting of Raf to a specific location represents one means of regulating a pool of localized ERK activity. The distribution of components of the ERK MAP kinase pathway was determined in FCMVs. Raf-1, was detected as a 74 kDa immunoreactive band (Fig. 7A), as previously observed [47], in fractions 1-2. MEK1 was in fractions 1-3 (Fig. 7G). MEK antisera did not reveal any bands other than MEK itself in FCMVs or in cytosol or particulate fractions from rat heart (Fig. 7G,M). ERK1/2 was also most abundant in fractions 1 and 2 (Fig. 7N). Thus, subcellular fractionation suggested components of the ERK MAP kinase cascade may associate with the plasma membrane under basal conditions.

In intact myocytes, Raf-1 distribution was similar to that observed for PKC- ϵ . Labeling was mostly at T-tubules near the cell periphery and showed a distinct punctate signal, characteristic of cytosolic proteins, in the cell interior (Fig. 7B). No colocalization was observed between Raf-1 and caveolin-3 (Fig. 7C-F). The distribution of MEK-1 immunofluorescence was similar to that of PKC- ϵ and Raf-1 (Fig. 7H). In addition, MEK-1 was detected within the nucleus. MEK-1 and caveolin-3 did not colocalize (Fig. 7I-L). ERK1/2 immunofluorescence localized to the T-tubules near the cell periphery and as a punctate pattern in cell interior (Fig. 7O). In addition, ERK1/2 immunofluorescence was observed in the intercalated disc region and within the nucleus. Interestingly, colocalization of ERK1/2 and caveolin-3 was observed within the intercalated disc region (Fig. 7Q-S).

DISCUSSION

One effector pathway for ET-1 is the ERK MAP kinase cascade. Activation of the cascade involves ligand-mediated activation of the ETRs, G-proteins, a phospholipase, Ras isoforms, and PKC family members. The present study was to examine if these signalling proteins localize to caveolae and constitute preformed signalosomes (Reviewed in [48]). These studies employed subcellular fractionation of canine ventricular microsomes, prepared in the absence of detergents, to determine if microsomes containing caveolin copurified with those containing components of the ET-1 effector pathway. Confocal fluorescence microscopy was employed to determine if these proteins colocalized with caveolin-3 in adult ventricular myocytes. Confocal data stacks were digitally deconvolved reduce out-of-focus light and thus reduce the incidence of false positives when determining colocalization. Components of the ET-1 signalling pathway were not generally present as preformed complexes in caveolae and even proteins present in membrane vesicles that copurified with caveolins on sucrose density gradients showed differences in localization when visualized by confocal imaging.

The nature and relevance of lipid rafts remains controversial (Reviewed in [49]). Although all membranes contain glycerophospholipids, sphingolipids and sterols are found primarily in plasma membrane and endosomes [50, 51]. Plasma membranes contain distinct flask-like structures (caveolae) that are enriched in sphingolipids and cholesterol and coated with an integral membrane protein, caveolin [4, 5]. Caveolar lipid rafts are classically purified by flotation of DIGs on sucrose gradients. Based on observations that DIGs can be isolated from cells devoid of caveolin [52, 53], that DIGs enriched in GPI-linked proteins can be separated from caveolar DIGs [54], and that prenyl(geranylgeranyl)-linked proteins can be separated from caveolae [55], it is thought that different populations of lipid rafts co-exist within the cellular

membranes. In the present study, in absence of detergents and alkaline pH, caveolae distributed in fractions of sucrose densities ranging from 0.6 M to 1.6 M (e.g. 20%-55%), and were most abundant at the 0.8M/1.1M (e.g. 27%/37%) interface. In non cardiac tissues, using flotation of DIGs fraction on sucrose-density gradients [1], caveolae are typically found at the 5%/30% sucrose interface. Furthermore, although TX-100 has been a useful tool in the isolation of certain types of lipid rafts, a number of questions have been raised with regards to the integrity of DIGs as *de facto* lipid rafts [49]. Firstly, nonphysiological rearrangements of the lipid bilayer may occur during detergent solubilization [56-58]. Secondly, formation of DIGs may arise not only from differences in the solubility of microsomes by TX-100, but also from a difference in detergent solubility of the membrane bilayer itself due to the asymmetry in the lipid composition of the bilayer [59]. Finally, TX-100 may also induce the formation of DIGs by concentrating cholesterol and sphingolipids away from the liquid disordered state membranes [60]. Hence, detergent solubilization may result in interaction between proteins that were not in contact *in vivo*. Thus, expanding the resolving capacity of discontinuous sucrose density gradients by adding additional 'steps', in conjunction with the use of detergent-free buffers, may facilitate the separation of caveolae from other membrane-associated signalling molecules during subcellular fractionation and, hence, reveal differences in subcellular distribution.

The distribution, nature and role(s) of lipid rafts in cardiac myocytes remain to be established; however, caveolae have been implicated in formation of the T-tubule system [23, 61-64]. In the present study, caveolin-3 immunoreactivity was detected at the surface plasmalemma, T-tubular network and intercalated discs in adult ventricular myocytes. Caveolin-1 was not detected in these cells. Other studies have also demonstrated the presence of caveolin-3 in the T-tubular network [65, 66]. Interestingly, Parton et al. Reported caveolin-3 in caveolae associated with the cell

surface, but not T-tubules, in differentiated cells and mature muscle [23]. As caveolin-3 expression is induced during the differentiation of C2C12 myoblasts in culture [67] and in vivo [68], the inability to detect this protein in T-tubules following differentiation may reflect lower levels, rather than the absence, of expression.

To date, most studies of ETR localization, internalization, recycling and post-receptor signalling have employed cultured cell systems. ETRs colocalize with caveolin-1 in mammalian COS-1 or HEK293, and insect Sf9 cell lines [24, 25]. In addition, in C2C12 cells, caveolin-1 and caveolin-3 show differentiation-state-specific differences in expression and subcellular localization [23, 69]. Hence, caveolin isoforms may serve distinct functional roles. In adult ventricular myocytes, ET_A R were present at the cell surface, nuclear membranes and on longitudinal and axial structures, whereas ET_B R were observed on the nuclear membranes and on T-tubules, as previously reported [20, 26]. Interestingly, both ETRs have been shown to be palmitoylated [70, 71] and palmitoylation has been implicated in several aspects of GPCR signalling (Reviewed in [72]) including protein inclusion or exclusion from cellular compartments [73]. ET_B R, but not ET_A R, showed a small, but detectable, colocalization with caveolin-3 on transverse and axial T-tubules. However, one must exercise caution in interpreting such observations, as colocalization refers to the presence of two proteins within the same voxel but does not indicate that actual physical interaction or association occurred. Interestingly, the presence of internalized ET_B R with no detectable caveolin-3 colocalization suggests that ET_B R do not internalize via caveolae in adult ventricular myocytes. This observation is consistent with studies in CHO or COS cells showing ET_B R internalize via clathrin-coated pits and are subsequently processed through late endosomes and lysosomes [74, 75]. Alternatively, this observation conflicts with reports that ET_B R interacts with caveolin-1 via its scaffolding and C-terminal domains [25]. On the other hand,

the pathways mediating ET_AR internalization have not yet been established. ET_AR localize primarily to the plasma membrane [76], and internalize in a ligand-dependent manner [77] in a process thought to be clathrin-mediated, passing through early endosomes for subsequent sorting [74]. ET_AR have also been shown to localize to caveolae and internalize with caveolin [78, 79]. However, as treatment of cells with cholesterol oxidase shifts the pathway of ET_AR internalization from the caveolae to clathrin-coated pits [79], the reported differences in ET_AR internalization may depend upon cell type as well as other factors underlying pathway selection. In addition, studies of ET_AR trafficking employ cells engineered to over-express the receptor and this has been associated with an increase in the cellular content of caveolin [78], suggesting that overexpressing ET_AR may modify the cellular trafficking pathways. Thus, although it has been shown in other cell types, the lack of ETRs colocalizing with caveolin-3 in adult ventricular myocytes suggests an internalization process via other mechanisms.

With the exception of ET_ARs, all the proteins implicated in the ET-1 signalling examined in the present study were found to copurify in part or entirely (e.g. G α_{11}) with caveolin-1 and caveolin-3 on sucrose-density gradients. Hence, although all proteins from this branch of the post-receptor endothelin-signalling pathway are not transmembrane or lipid-modified proteins, they all associated with microsomes to some extent. However, with the exception of G $\alpha_{q/11}$, G α_{i3} and G β , colocalization of the signalling proteins studied herein with caveolin-3 was negligible in adult ventricular myocytes. Consequently, although it is plausible that ETRs interact with preformed signalosomes at the plasmalemmal level, and a specialized membrane microdomain may be involved, this organization is not dependent upon the association with caveolae.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-64183) and the Fonds de la Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (FRICM). BGA was a New Investigator of the Heart and Stroke Foundation of Canada and is currently a Senior Scholar of the Fondation de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). BB is the recipient of a bursary from the Fondation de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

ABBREVIATIONS

Adult rat cardiac ventricular myocyte (ACVM), colocalized voxels per cell (c.v.c), detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched (DIG), diacylglycerol (DAG), endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor (ETR), extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), fractionated cardiac membrane vesicles (FCMVs), full-width at half-maximum intensity (FWHM), G-protein coupled receptor (GPCR), glycosylphosphatidylinositol (GPI), Guanine nucleotide-dependent regulatory protein (G-protein), junctional sarcoplasmic reticulum (JSR), longitudinal sarcoplasmic reticulum (LSR), membrane vesicles (MV), mitogen-activated protein kinase (MAPK), phospholipase C- β 1 (PLC- β 1), phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns(4,5) P_2), point spread function (PSF), protein kinase C (PKC), transverse-tubule (T-tubule), Triton X-100 (TX-100).

BIBLIOGRAPHY

1. Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 1993; 122: 789-807.
2. Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10104-10108.
3. Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; 1: 445-458.
4. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992; 68: 673-682.
5. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8655-8659.
6. Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, Van Deurs B. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 238-250.
7. Anderson RG. The caveolae membrane system. *Ann Rev Biochem* 1998; 67: 199-225.
8. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 2002; 3: 311-320.
9. Ikonen E, Parton RG. Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic* 2000; 1: 212-217.
10. Lisanti MP, Scherer PE, Tang TL, Sargiacomo M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signaling hypothesis. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 231-235.

11. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 431-467.
12. Schroeder R, London E, Brown D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12130-12134.
13. Melkonian KA, Ostermeyer AG, Chen JZ, Roth MG, Brown DA. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts – Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* 1999; 274: 3910-3917.
14. Allen BG, Katz S. Calreticulin and calsequestrin are differentially distributed in canine heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2379-2384.
15. Chamberlain BK, Levitsky DO, Fleischer S. Isolation and characterization of canine cardiac sarcoplasmic reticulum with improved Ca^{2+} transport properties. *J Biol Chem* 1983; 258: 6602-6609.
16. Inui M, Wang S, Saito A, Fleischer S. Characterization of junctional and longitudinal sarcoplasmic reticulum from heart muscle. *J Biol Chem* 1988; 263: 10843-10850.
17. Allen BG, Katz S. Phosphorylation of cardiac junctional and free sarcoplasmic reticulum by PKC- α , PKC- β , PKA and the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* 1996; 155: 91-103.
18. Chevalier D, Allen BG. Two distinct forms of MAPKAP kinase-2 in adult cardiac ventricular myocytes. *Biochemistry* 2000; 39: 6145-6156.
19. Zhou Y-Y, Wang S-Q, Zhu W-Z, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H, Xiao R-P. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am J Physiol* 2000; 279: H429-H436.

20. Boivin B, Chevalier D, Villeneuve LR, Rousseau É, Allen BG. Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 29153-29163.
21. Sedarat F, Lin E, Moore EDW, Tibbits GF. Deconvolution of confocal images of dihydropyridine and ryanodine receptors in developing cardiomyocytes. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1098-1103.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
23. Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 1997; 136: 137-154.
24. Miyoung C, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: Colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11728-11732.
25. Yamaguchi T, Murata Y, Fujiyoshi Y, Doi T. Regulated interaction of endothelin B receptor with caveolin-1. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1816-1827.
26. Robu VG, Pfeiffer ES, Robia SL, Balijepalli RC, Pi Y, Kamp TJ, Walker JW. Localization of functional endothelin receptor signaling complexes in cardiac transverse tubules. *J Biol Chem* 2003; 278: 48154-48161.
27. Scriven DRL, Klimek A, Lee KL, Moore EDW. The molecular architecture of calcium microdomains in rat cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci* 2002; 976: 488-499.
28. Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 12468-12474.

29. Takagi Y, Ninomiya H, Sakamoto A, Miwa S, Masaki T. Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelin_{A/B} chimeras. *J Biol Chem* 1995; 270: 10072-10078.
30. Chen CA, Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* 2001; 20: 1643-1652.
31. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1998; 273: 5419-5422.
32. Murthy KS, Makhlof GM. Heterologous desensitization mediated by G protein-specific binding to caveolin. *J Biol Chem* 2000; 275: 30211-30219.
33. Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE. The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J Biol Chem* 1994; 269: 13733-13735.
34. Exton JH. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu Rev Physiol* 1994; 56: 346-369.
35. Runnels LW, Jenco J, Morris A, Scarlata S. Membrane binding of phospholipase C- β 1 and C- β 2 is @ of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the - α and - $\beta\gamma$ subunits of G-proteins. *Biochemistry* 1996; 35: 16824-16832.
36. Pike LJ, Casey L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem* 1996; 271: 26453-26456.
37. Liu Y, Casey L, Pike LJ. Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in low-density membrane domains in the absence of caveolin. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 245: 684-690.
38. Chiloeches A, Paterson FH, Marais R, Clerk A, Marshall CJ, Sugden PH. Regulation of Ras-GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat

- ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. *J Biol Chem* 1999; 274: 19762-19770.
39. Rybin VO, Xu X, Steinberg SF. Activated protein kinase C isoforms target to cardiomyocyte caveolae: stimulation of local protein phosphorylation. *Circ Res* 1999; 84: 980-988.
 40. Boivin B, Allen BG. Regulation of membrane-bound PKC in adult cardiac ventricular myocytes. *Cell Signal* 2003; 15: 217-224.
 41. Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH. Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-epsilon is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. *Circ Res* 1993; 72: 757-767.
 42. Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 1989; 57: 1167-1177.
 43. Newman CM, Magee AI. Posttranslational processing of the ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155: 79-96.
 44. Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 1994; 264: 1463-1467.
 45. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003; 15: 463-469.
 46. Mineo C, James GL, Smart EJ, Anderson RG. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J Biol Chem* 1996; 271: 11930-11935.
 47. Bogoyevitch MA, Marshall CJ, Sugden PH. Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c-Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 26303-26310.

48. Rebois RV, Hébert TE. Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. *Receptors Channels* 2003; 9: 169-194.
49. Munro S. Lipid rafts: Elusive or illusive? *Cell* 2003; 115: 377-388.
50. Van Meer G. Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 29-33.
51. Hao M, Lin SX, Karylowski OJ, Wustner D, McGraw TE, Maxfield FR. Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J Biol Chem* 2002; 277: 609-617.
52. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* 1994; 269: 30745-30748.
53. Gorodinsky A, Harris DA. Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J Cell Biol* 1995; 129: 619-627.
54. Schnitzer JE, McIntosh DP, Dvorak AM, Liu J, Oh P. Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* 1995; 269: 1435-1439.
55. Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 2002; 293: 913-916.
56. Le Maire M, Champeil P, Moller JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1508: 86-111.
57. Mayor S, Maxfield FR. Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 929-944.
58. Hao M, Mukherjee S, Maxfield FR. Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001; 98: 13072-13077.

59. Wang TY, Silvius JR. Cholesterol does not induce segregation of liquid-ordered domains in bilayers modeling the inner leaflet of the plasma membrane. *Biophys J* 2001; 81: 2762-2773.
60. Heerklotz H. Triton promotes domain formation in lipid rafts mixture. *Biophys J* 2002; 83: 2693-2701.
61. Ezerman EB, Ishikawa H. Differentiation of the sarcoplasmic reticulum and T-system in developing chick skeletal muscle in vitro. *J Cell Biol* 1967; 35: 405-420.
62. Ishikawa H. Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J Cell Biol* 1968; 38: 51-66.
63. Franzini-Armstrong C. Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse. *Dev Biol* 1991; 146: 353-362.
64. Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Scherer PE, Lisanti MP. Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J Biol Chem* 1999; 274: 30315-30321.
65. Ralston E, Ploug T. Caveolin-3 is associated with the T-tubules of mature skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 1999; 246: 510-515.
66. Scriven DRL, Dan P, Moore EDW. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 2000; 79: 2682-2691.
67. Tang ZL, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of

- the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 1996; 271: 2255-2261.
68. Biederer CH, Ries S, Moser M, Florio M, Israel MA, McCormick F, Buettner R. The basic helix-loop-helix transcription factors myogenin and Id2 mediate specific induction of caveolin-3 gene expression during embryonic development. *J Biol Chem* 2000; 275: 26245-26251.
 69. Lee H, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa G-C, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P. Amphiphysin 2 (Bin1) and t-tubule biogenesis in muscle. *Science* 2002; 297: 1193-1196.
 70. Horstmeyer A, Cramer H, Sauer T, Müller-Ester W, Schroeder C. Palmitoylation of endothelin receptor A. Differential modulation of signal transduction activity by post-translational modification. *J Biol Chem* 1996; 271: 20811-20819.
 71. Okamoto Y, Ninomiya H, Tanioka M, Sakamoto A, Miwa S, Masaki T. Palmitoylation of human endothelin_B: its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J Biol Chem* 1997; 272: 21589-21596.
 72. Qanbar R, Bouvier M. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Therapeut* 2003; 97: 1-33.
 73. McCabe JB, Berthiaume LG. Functional roles for fatty acylated amino-terminal domains in subcellular localization. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 3771-3786.
 74. Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 17596-17604.
 75. Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Furkert J, Beyermann M, Bienert M, Rosenthal W. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 1104-1113.

76. Abe Y, Nakayama K, Yamanaka A, Sakurai T, Goto K. Subtype-specific trafficking of endothelin receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 8864-8671.
77. Chun M, Lin HY, Henis YI, Lodish HF. Endothelin-induced endocytosis of cell surface ET_A receptors. Endothelin remains intact and bound to the ET_A receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 10855-10860.
78. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11728-11732.
79. Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T. Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 6439-6446.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Endothelin signalling pathway.

Figure 2. Localization of caveolins in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes. Canine ventricular microsomes (MV) and fractions 1 to 5 (25 μ g) were resolved on gradient SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Following blocking, membranes were incubated with (A) anti-calsequestrin (1:1000), (B) anti-caveolin-1 (1:1000) and (C) anti-caveolin-3 (1:1000). Molecular mass of standard proteins are indicated on the left (kDa). (D) Representative image obtained by confocal microscopy showing the distribution of caveolin-3 in an ACVM. The image is a z-axis maximum intensity projection with dimensions of 1024 x 741 x 31 voxels. Scale bar is 10 μ m. (E) Image D following 3-D digital deconvolution (See METHODS).

Figure 3. Localization of endothelin receptors in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes. Canine ventricular microsomes (MV) and fractions 1 to 5 (25 μ g) were resolved on gradient SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Following blocking, membranes were incubated with (A) anti-ET_AR (1:1000) or (G) anti-ET_BR (1:1000). Deconvolved *x-y* images of an ET_AR (pseudocolour red) (B) and caveolin-3 (pseudocolour green) (C) colabeled ACVM shown separately or superimposed (E). Representative *x-z* (D) or *y-z* (F) cross-sections of the myocyte shown in E. Deconvolved *x-y* image of an ET_BR (pseudocolour red) (H) and caveolin-3 (pseudocolour green) (I) colabeled ACVM shown separately or superimposed (K). Representative *x-z* (J) or *y-z* (L) cross-sections of the myocyte shown in K. Voxels where colocalization was detected are pseudocolored yellow. Scale bar is 6.0 μ m for all *x-y* plane images and *x-z* cross-section images and 1.8 μ m for all *y-z* cross-section images.

Figure 4. Localization of heterotrimeric GTP-binding proteins in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes. Canine ventricular microsomes (MV) and fractions 1 to 5 (25 μ g) were resolved on gradient SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Following blocking, membranes were incubated with (A) $G\alpha_{q/11}$ antisera (1:1000), (G) $G\alpha_s$ antisera (1:1000), (M) $G\alpha_{i3}$ (1:1000), or (S) $G\beta$ antisera (1:1000). Deconvolved x - y images of a $G\alpha_{q/11}$ (pseudocolour red) (B) and caveolin-3 (pseudocolour green) (C) colabeled ACVM shown separately or superimposed (E). Representative x - z (D) or y - z (F) cross-sections of the $G\alpha_{q/11}$ and caveolin-3 colabeled myocyte shown in E. Deconvolved x - y image of a $G\alpha_s$ (pseudocolour red) (H) and caveolin-3 (pseudocolour green) (I) colabeled ACVM shown separately or superimposed (K). Representative x - z (J) or y - z (L) cross-sections of the $G\alpha_s$ and caveolin-3 colabeled myocyte shown in K. Deconvolved x - y image of a $G\alpha_{i3}$ (pseudocolour red) (N) and caveolin-3 (pseudocolour green) (O) colabeled ACVM shown separately or superimposed (Q). Representative x - z (P) or y - z cross-sections of the $G\alpha_{i3}$ and caveolin-3 colabeled myocyte shown in Q. Deconvolved x - y image of a $G\beta$ (pseudocolour red) (T) and caveolin-3 (pseudocolour green) (U) colabeled ACVM shown separately or superimposed (W). Representative x - z (V) or y - z (X) cross-sections of the $G\beta$ and caveolin-3 colabeled myocyte shown in W. Voxels where colocalization was detected are pseudocolored yellow. Scale bar is 6.0 μ m for all x - y plane images and x - z cross-section images and 1.8 μ m for all y - z cross-section images.

Figure 5. Localization of phospholipase C- β 1 and protein kinase C- ϵ in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes. Canine ventricular microsomes (MV) and fractions 1 to 5 (25 μ g) were resolved on gradient SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Following blocking, membranes were incubated with (A) PLC- β 1 antisera (1:1000) or (G) nPKC- ϵ antisera (1:200).

Deconvolved *x-y* image of a PLC- β 1 (pseudocolour red) (**B**) and caveolin-3 (pseudocolour green) (**C**) colabeled ACVM shown separately or superimposed (**E**). Representative *x-z* (**D**) or *y-z* (**F**) cross-sections of the PLC- β 1 and caveolin-3 colabeled myocyte shown in **E**. Panels **H-L** are representative images from myocytes fixed immediately after isolation. Deconvolved *x-y* image of a nPKC- ϵ (pseudocolour red) (**H**) and caveolin-3 (pseudocolour green) (**I**) colabeled ACVM shown separately or superimposed (**K**). Representative *x-z* (**J**) or *y-z* (**L**) cross-sections of the nPKC- ϵ and caveolin-3 colabeled myocyte shown in **K**. Panels **M-Q** are representative images from myocytes maintained overnight in culture prior to fixation. Deconvolved *x-y* image of a nPKC- ϵ (pseudocolour red) (**M**) and caveolin-3 (pseudocolour green) (**N**) colabeled ACVM shown separately or superimposed (**P**). Representative *x-z* (**O**) or *y-z* (**Q**) cross-sections of the nPKC- ϵ and caveolin-3 colabeled myocyte shown in **P**. Voxels where colocalization was detected are pseudocolored yellow. Scale bar is 6.0 μm for all *x-y* plane images and *x-z* cross-section images and 1.8 μm for all *y-z* cross-section images.

Figure 6. Localization of GTP-binding proteins of the Ras subfamily in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes. Canine ventricular microsomes (MV) and fractions 1 to 5 (25 μg) were resolved on gradient SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Following blocking, membranes were incubated with (**A**) H-Ras antisera (1:1000), (**B**) K-Ras antisera (1:1000), (**C**) N-Ras (1:1000), (**I**) R-Ras antisera (1:1000), or (**O**) Pan-Ras antisera (1:200). Deconvolved *x-y* image of an N-Ras (pseudocolour red) (**D**) and caveolin-3 (pseudocolour green) (**E**) colabeled ACVM shown separately or superimposed (**G**). Representative *x-z* (**F**) or *y-z* (**H**) cross-sections of the N-Ras and caveolin-3 colabeled myocyte shown in **G**. Deconvolved *x-y* image of an R-Ras (pseudocolour red) (**J**) and caveolin-3 (pseudocolour green) (**K**) colabeled ACVM shown separately or superimposed (**M**).

Representative x - z (L) or y - z (N) cross-sections of the R-Ras and caveolin-3 colabeled myocyte shown in M. Deconvolved x - y image of a Pan-Ras (pseudocolour red) (P) and caveolin-3 (pseudocolour green) (Q) colabeled ACVM shown separately or superimposed (S). Representative x - z or y - z (T) cross-sections of the Pan-Ras and caveolin-3 colabeled myocyte shown in S. Voxels where colocalization was detected are pseudocolored yellow. Scale bar is 6.0 μm for all x - y plane images and x - z cross-section images and 1.8 μm for all y - z cross-section images.

Figure 7. Localization of protein kinases from the ERK cascade in canine cardiac microsomal fractions and intact ventricular myocytes. Canine ventricular microsomes (MV) and fractions 1 to 5 (25 μg) were resolved on gradient SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Following blocking, membranes were incubated with (A) Raf-1 antisera (1:1000), (G) MEK-1 antisera (1:1000), or (N) ERK1/2 antisera (1:1000). In addition, fraction 2 (a, 200 μg) and both particulate (b, 25 μg) and cytosolic fractions (c, 25 μg) from rat heart were resolved on gradient SDS-PAGE, transferred to PVDF, and probed for MEK-1 immunoreactivity (M). Deconvolved x - y image of an Raf-1 (pseudocolour red) (B) and caveolin-3 (pseudocolour green) (C) colabeled ACVM shown separately or superimposed (E). Representative x - z (D) or y - z (F) cross-sections of the deconvolved stack of the Raf-1 and caveolin-3 colabeled myocyte shown in E. Deconvolved x - y image of a MEK-1 (pseudocolour red) (H) and caveolin-3 (pseudocolour green) (I) colabeled ACVM shown separately or superimposed (K). Representative x - z (J) or y - z (L) cross-sections of the MEK-1 and caveolin-3 colabeled myocyte shown in K. Deconvolved x - y image of an ERK1/2 (pseudocolour red) (O) and caveolin-3 (pseudocolour green) (P) colabeled ACVM shown separately or superimposed. Representative x - z (Q) or y - z (S) cross-sections of the deconvolved stack of the ERK1/2 and caveolin-3 colabeled myocyte shown in R. Voxels where colocalization was detected are pseudocolored

yellow. Scale bar is 6.0 μm for all x - y plane images and x - z cross-section images and 1.8 μm for all y - z cross-section images. Molecular mass of prestained standards are indicated on the left of panels G and M (kDa).

Figure 1

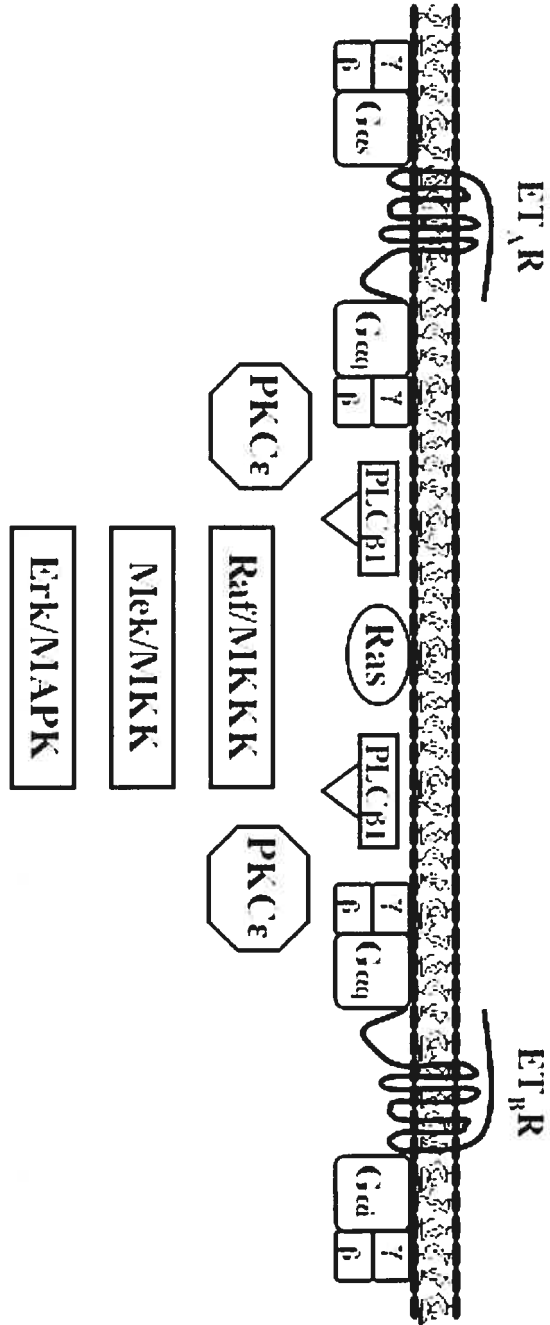


Figure 2

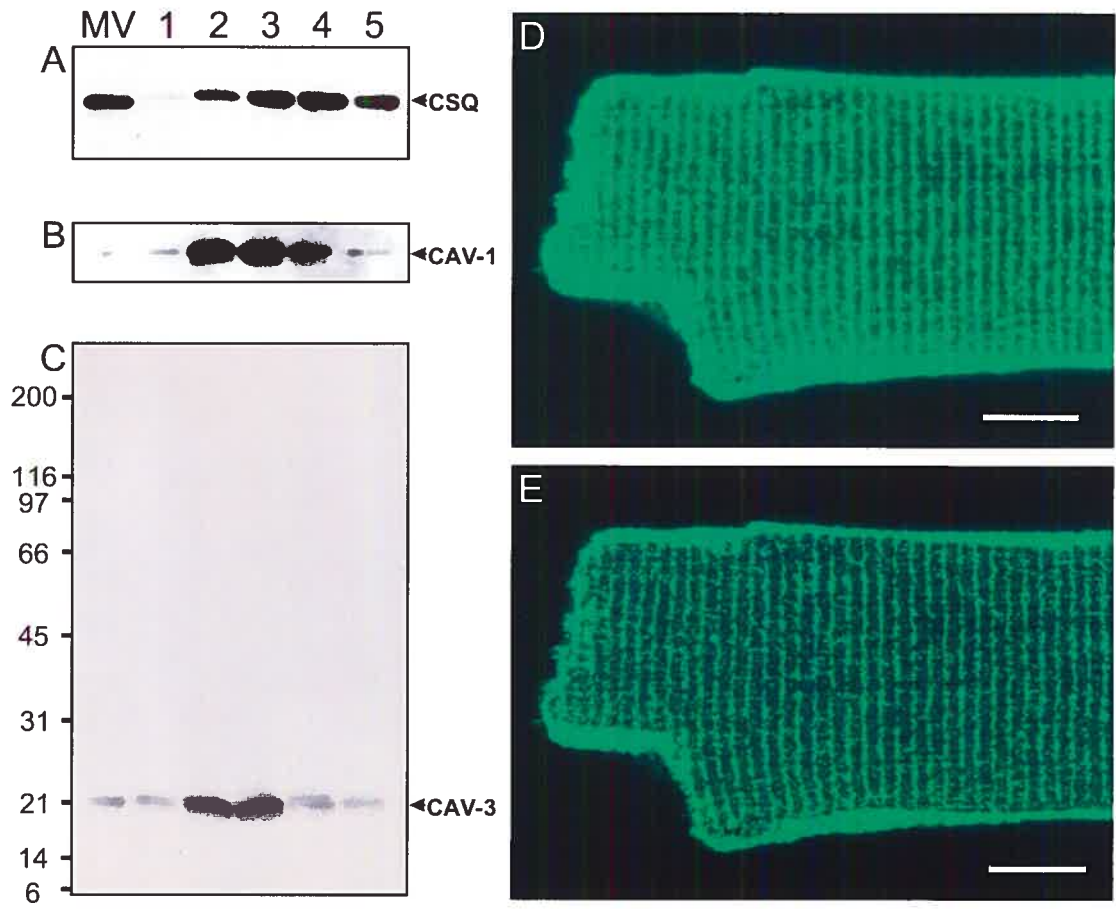


Figure 3

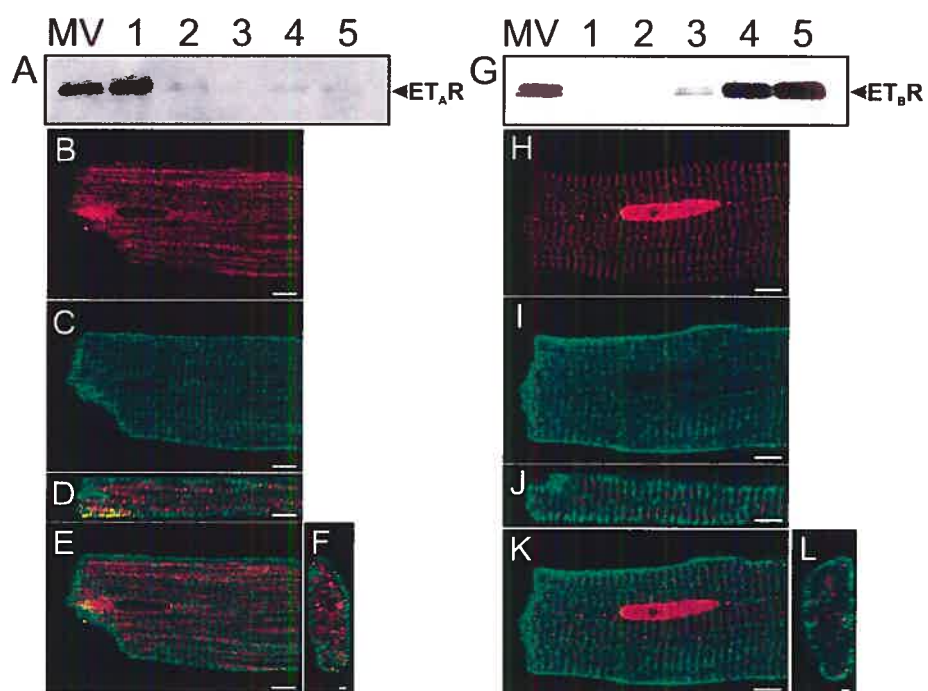


Figure 4

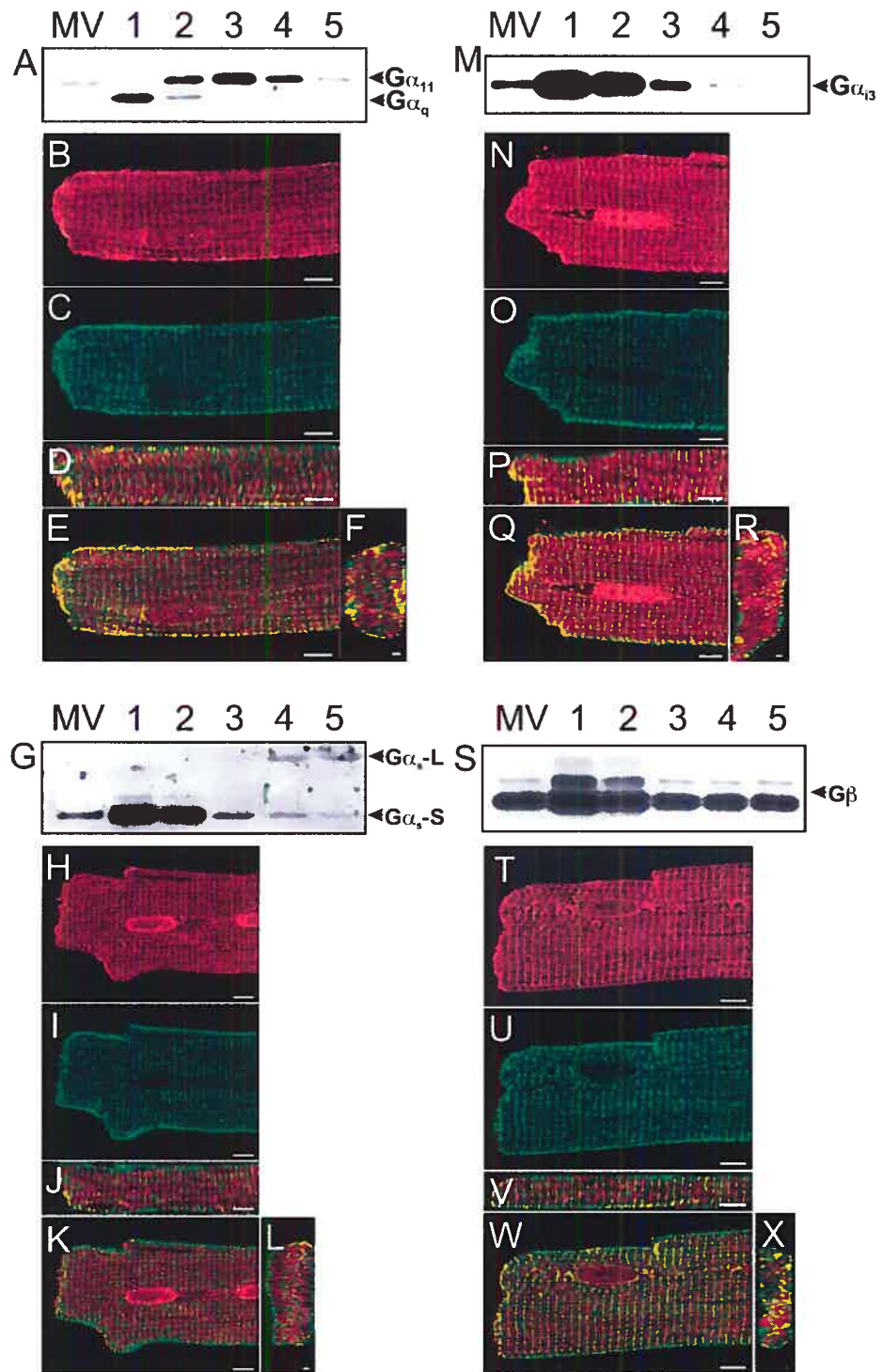


Figure 5

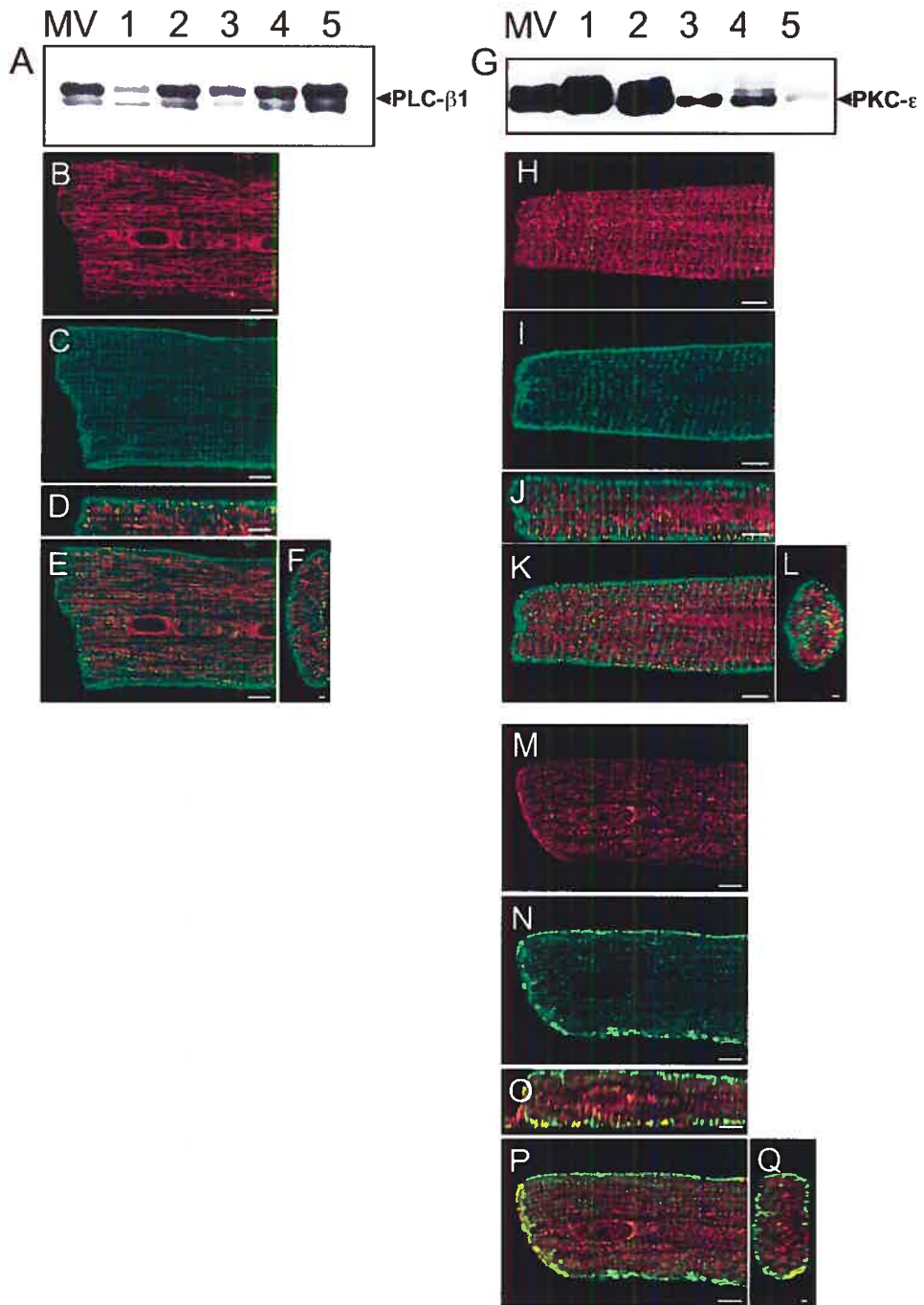


Figure 6

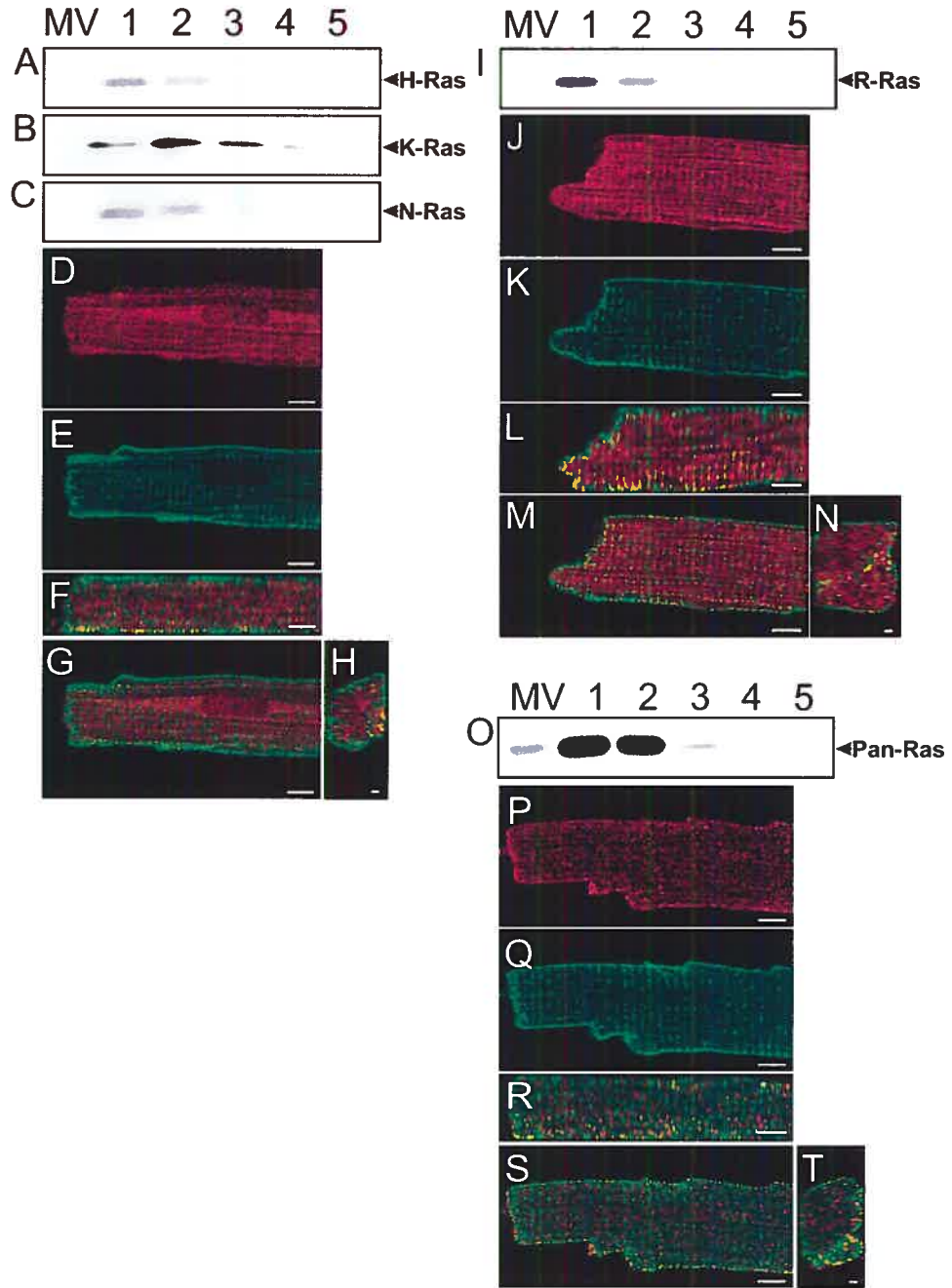
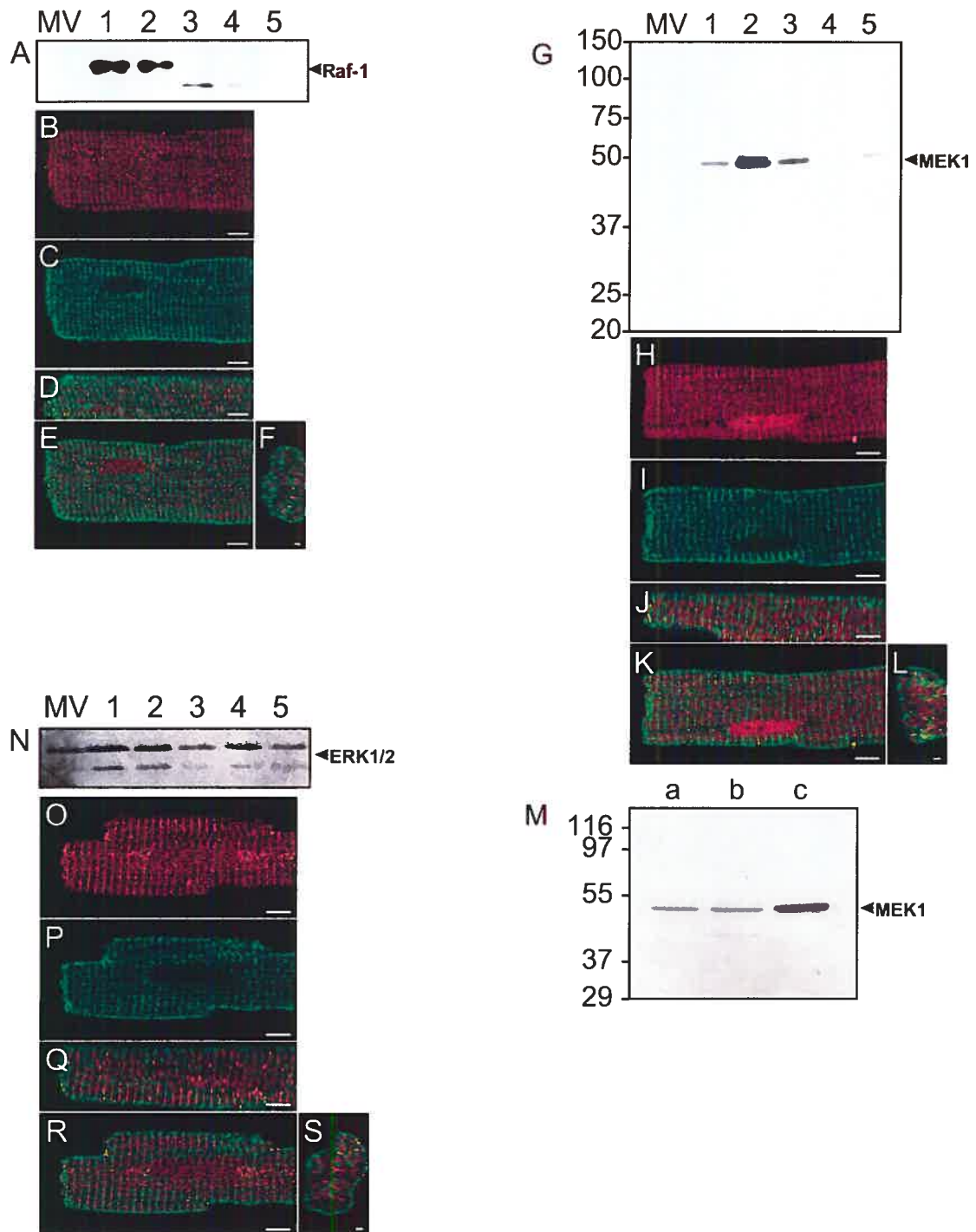


Figure 7



5. DISCUSSION

L'hypertrophie du myocarde est un processus adaptatif. La croissance du cœur survient normalement au moment du développement, de la grossesse et d'exercices athlétiques. Cependant, l'hypertrophie est également un processus compensatoire qui se manifeste lorsque le cœur est soumis à une surcharge de travail causée par une surcharge hémodynamique, accompagnée ou non d'une augmentation de facteurs neurohormonaux (Cooper, 1997; Swynghedauw, 1999). Initialement, ce remodelage cardiaque est bénéfique et réduit le stress imposé aux parois, en accord avec la loi de Laplace. Cette adaptation des parois qui survient pendant le remodelage se produit par le biais d'une nouvelle phase de croissance au niveau du cardiomyocyte. Toutefois, les cardiomyocytes sont des cellules terminales qui ont renoncé à leur potentiel de croissance prolifératif afin de pouvoir fonctionner continuellement et qui répondent à ces stimuli en augmentant leur contenu protéique (Goss, 1966). En outre, le changement du contenu protéique des cardiomyocytes a pour but d'améliorer leur fonction contractile par l'expression de protéines sarcomériques embryonnaires (Schwartz et coll., 1986). Bien que les mécanismes de la mécanotransduction soient mal définis, il semble évident que cette voie soit intimement sollicitée dans le processus hypertrophique des cardiomyocytes adultes (Katz, 2001; Lammerding et coll., 2004; Swynghedauw, 1999).

Les isoformes ET-1 et ET-3 sont toutes deux présentes dans le myocarde (Matsumoto et coll., 1989; Suzuki et coll., 1993). L'ET-1 et l'ET-3 sont relâchées et l'ARNm des pro-peptides est régulé à la hausse pendant la mécanotransduction induite par le stretch des cardiomyocytes, le stretch de bandes de muscle cardiaque ou les surcharges hémodynamiques (Arai et coll., 1995; Ennis et coll., 2005; Yamazaki et coll., 1996a). Dans les cardiomyocytes en culture primaire, l'ET-1 est un facteur autocrine et paracrine qui provoque la myofibrillogenèse, les changements

transcriptionnels ainsi que le grossissement caractéristique de l'hypertrophie (Ito et coll., 1991; Shubeita et coll., 1990; Suzuki et coll., 1990). De plus, les antagonistes du sous-type ET_AR réduisent les effets hypertrophiques lors de bandages aortiques (Ito et coll., 1994). Les deux sous-types de récepteurs à l'endothéline, ET_AR et ET_BR, stimulent l'activité GTPasique d'une protéine Gq-hétérotrimérique et provoquent l'hypertrophie des cardiomyocytes adultes au moyen des MAP kinases (Bogoyevitch et coll., 1996; Clerk et coll., 1999; Dorn et coll., 1999a; Sugden, 2001).

Dans le cadre de la première étude intitulée *Regulation of membrane-bound PKC in adult cardiac myocytes*⁵, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'activation d'un pool membranaire de PKC pouvait provoquer une signalisation différente de celle observée lorsque les cardiomyocytes adultes sont soumis à des doses hypertrophiques d'ET-1 (e.g. 10⁻⁷ M). Un pool de PKC associées à la membrane a déjà été observé dans les cellules de fibroblastes 3T3-L1 (Halsey et coll., 1987), dans les plaquettes (Pelech et coll., 1990a), dans les cellules de lymphomes (S40, S49, WEHI 231, CTLL-2), dans les cellules de thymus, dans les cellules de la rate et dans les cellules extraites de cerveaux entiers de rats (Chakravarthy et coll., 1994). Dans l'étude de Halsey (Halsey et coll., 1987) et dans l'étude de Pelech (Pelech et coll., 1990a), l'observation du pool membranaire était indirectement mesurée: une augmentation de l'activité membranaire de PKC était observée sans translocation de l'enzyme vers la fraction non-soluble. Cependant, l'étude effectuée par Durkin et collaborateurs (1994), en utilisant la technique préalablement développée par leur laboratoire (Chakravarthy et coll., 1991), a permis de mesurer l'activité de PKC de façon directe dans les membranes isolées (Chakravarthy et coll., 1994). Les méthodes conventionnelles pour mesurer l'activité des PKC associées-aux-membranes *in vitro* requièrent que l'enzyme soit solubilisée avec des détergents et

⁵ Régulation des PKC associées à la membrane dans les myocytes cardiaques ventriculaire adultes

que l'activité soit mesurée en présence d'excès de Ca^{2+} , de phosphatidylsérine et de PMA ou de DAG (Hannun et coll., 1985; Kikkawa et coll., 1982). Cependant, cette méthode ne permet pas de faire la distinction entre les formes actives et inactives de PKC dans les membranes natives car les deux formes sont activées lorsque l'enzyme est mise en présence de phospholipides, de PMA et d'un excès de Ca^{2+} .

Contrairement à la théorie selon laquelle les PKC activées sont transloquées à la membrane, en utilisant la méthode de mesure de l'activité des PKC membranaires développée par Chakravarthy, nous avons observé la présence d'un pool de PKC associées-à-la-membrane qui était inactivé dans les cardiomyocytes adultes au repos. Trois facteurs pouvaient moduler ce pool d'enzymes membranaire: 1) le PMA; 2) le substrat peptidique pep- ϵ ; et 3) l'ET-1. Le PMA ainsi que le pseudosubstrat modifié de nPKC ϵ pouvaient activer directement le pool de PKC associées-à-la-membrane. Selon la formulation du D' Bell, il a été convenu que ce pool d'enzymes associé à la membrane était constitué de PKC amorcées mais inactives (Bell, 1986). Le mécanisme par lequel le PMA active les PKC est bien compris et implique la liaison du PMA au domaine C1, ce qui cause un changement conformationnel de l'enzyme, et dégage le pseudosubstrat du domaine catalytique (Orr et coll., 1994a). Cependant, le mécanisme par lequel le pep- ϵ active l'enzyme est moins bien connu. L'effet semble être différent selon les isoformes (Andrea et coll., 1998), mais il a été avancé que les substrats dont la composition est riche en résidus arginines (p. ex., pep- ϵ : ERM \underline{R} PRKRQGSVRRRV) pouvaient lier (Bruins et coll., 1998) et activer allostériquement les PKC (Leventhal et coll., 1993). Pourtant, ce mécanisme d'activation n'est pas général puisqu'il n'influence pas la phosphorylation des histones (Ferrari et coll., 1987). Il est donc plus probable que l'effet observé avec les substrats riches en arginines soit expliqué par une compétition directe du substrat exogène avec le pseudosubstrat envers les résidus acides présents dans le site actif (Orr et coll., 1994a). Puisque pep- ϵ et les peptides riches en arginines permettent une activité de

PKC dépendante de la phosphatidylsérine en absence de DAG/PMA ou de Ca^{2+} (Andrea et coll., 1998; Ferrari et coll., 1987; Leventhal et coll., 1993), il semble logique de proposer que la translocation de l'enzyme elle-même permette de contrôler la phosphorylation de certains substrats par PKC. Finalement, l'ET-1 pouvait moduler l'interaction des PKC associées-à-la-membrane mais pas leur activité. Étant donné que le PMA pouvait activer ces PKC membranaires, il semble que le DAG produit par l'hydrolyse du $PI(4,5)P_2$ lors de l'activation des ETRs était inaccessible au pool de PKC amorcées-inactives. Ceci suggère une compartimentalisation de la production de DAG ou du pool membranaire de PKC. Il est aussi intéressant de noter qu'en plus du pool de PKC amorcées et inactives associées-à-la-membrane, un second pool de PKC activées était aussi présent aux membranes des cardiomyocytes adultes.

Le patron de translocation de nPKC ϵ [c.-à-d. l'isoforme majeure du cœur adulte (Bogoyevitch et coll., 1993b)] était différent lors d'une exposition des cardiomyocytes au PMA ou à l'ET-1. L'ET-1 causait une translocation inverse du pool de nPKC ϵ associées-à-la-membrane vers d'autres microdomaines ou vers des structures de la fraction non-soluble. Cette observation confirme d'autres études ayant préalablement démontré la translocation de nPKC ϵ au sarcomère (Disatnik et coll., 1994; Huang et coll., 1997; Robia et coll., 2001), au disque intercalaire (Wang et coll., 1998), au Golgi (Csukai et coll., 1997; Lehel et coll., 1995; Lehel et coll., 1996), aux mitochondries (Baines et coll., 2002) et aux cavéoles (Rybin et coll., 1999). Quant à la stimulation des cardiomyocytes au PMA, celle-ci causait une translocation «classique» de nPKC ϵ vers la membrane et vers la fraction non-soluble. Il est intéressant de noter que le PMA provoquait la translocation de nPKC ϵ qui n'était pas accompagnée d'une augmentation d'activité enzymatique aux membranes. L'activité basale et totale de PKC (c.-à-d. comprenant le pool membranaire activé et le pool membranaire pouvant être activé) était maximale à quinze secondes et la diminution en activité n'était pas accompagnée d'une translocation inverse des isoformes nPKC δ

ou nPKC ϵ . Puisque l'ajout de PMA aux membranes isolées après différents temps de stimulation des cellules (au PMA) ne pouvait activer le pool de PKC transloqué, il est probable que l'enzyme soit inactivée à la membrane ou que l'enzyme ayant transloqué soit déjà inactive. Aussi, il a été rapporté que les PKC membranaires étaient beaucoup plus sensibles à la déphosphorylation que les PKC cytosoliques (Dutil et coll., 1994), ce qui explique en partie l'inactivation et la régulation à la baisse des PKC lors de pré-traitements au PMA (Hansra et coll., 1999). Après une stimulation prolongée au PMA, les PKC localisées aux membranes sont dégradées par protéolyse (Junco et coll., 1994; Kishimoto et coll., 1989). Cependant, aucun produit de dégradation n'a été observé lors de notre étude. Finalement, le patron de translocation de la nPKC ϵ était le même avec différentes concentrations d'ET-1, ce qui suggère que la signalisation de PKC à des concentrations physiologiques (10^{-9} M) est la même qu'à des concentrations hypertrophiques (10^{-7} M).

Ces résultats accroissent notre compréhension du processus d'activation des PKC: ils signalent la présence d'un pool de PKC amorcées mais inactives à la membrane de cardiomyocytes au repos et séparent le processus de translocation de l'activité enzymatique elle-même. Cette dernière observation éclaire d'une façon toute particulière les résultats d'études utilisant des peptides capables d'inhiber (ϵ PKC₁₄₋₂₁) (Gray et coll., 1997; Johnson et coll., 1996) ou d'entraîner la translocation de nPKC ϵ ($\psi\epsilon$ RACK $\rightarrow\epsilon$ PKC₈₅₋₉₂) (Dorn et coll., 1999b). En effet, dans un premier cas le peptide ϵ PKC₁₄₋₂₁, directement dérivé de la partie VI de nPKC ϵ , lie une protéine RACK, ce qui inhibe la translocation de l'enzyme et prévient la contraction des myocytes en culture (Johnson et coll., 1996) ainsi que la protection induite par le préconditionnement contre l'ischémie des cardiomyocytes (Gray et coll., 1997). Dans une seconde étude effectuée par cette même équipe, le peptide ϵ PKC₈₅₋₉₂, ayant une homologie avec la séquence de ϵ RACK₂₈₅₋₂₉₂, cause la translocation de l'enzyme et protège les cardiomyocytes et les coeurs de souris contre l'ischémie (Dorn et coll.,

1999b). En se basant sur le dogme de l'activation de PKC par sa translocation, les auteurs établissent un lien direct entre la translocation de la nPKC ϵ et l'inhibition ou l'activation de l'activité enzymatique de la nPKC ϵ dans la protection contre l'ischémie des myocytes et du cœur. Or, compte tenu de nos résultats, il est possible d'analyser différemment les résultats de l'équipe du D^r Mochly-Rosen et de proposer que la présence membranaire de la nPKC ϵ est suffisante à son rôle cardioprotecteur. Il serait intéressant de déterminer si ces peptides causent ou non l'activation de la nPKC ϵ et d'identifier quelles sont les protéines qui interagissent avec cette enzyme une fois sa translocation accomplie.

Les résultats présentés dans la seconde étude intitulée *Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes*⁶ introduisent le concept de cibles intracellulaires de l'ET-1 dans les cœurs et dans les cardiomyocytes adultes. Dans ces travaux, il a été observé que les deux sous-types d'ETR étaient présents au niveau des noyaux des cardiomyocytes adultes. Par essais de liaisons à l' [¹²⁵I]ET-1, le ratio ET_AR:ET_BR a été évalué à 3:1 au niveau des noyaux isolés. De façon proportionnelle, une plus grande fraction des ET_BR étaient cependant détectés aux noyaux. Bien que d'autres RCPG aient aussi été détectés aux noyaux et aux membranes associées, la provenance de ces récepteurs demeure ambiguë. Certains récepteurs semblent être présents dans l'environnement périnucléaire à la suite de l'internalisation des récepteurs. C'est le cas notamment des AT₁R (Chen et coll., 2000; Lu et coll., 1998), des récepteurs à substance P (Grady et coll., 1995), des récepteurs à neurotensine (Beudet et coll., 1998; Faure et coll., 1995) et des ET_BRs (Bremnes et coll., 2000; Oksche et coll., 2000). Cependant, une telle localisation périnucléaire des récepteurs est généralement attribuée à une localisation aux Golgi ou aux lysosomes. Ce corrélat appuie difficilement le processus d'internalisation des

⁶ Des récepteurs à l'endothéline fonctionnels sont présents sur les noyaux des myocytes cardiaques ventriculaires

récepteurs comme étant l'étape logique d'une présence éventuelle des récepteurs aux membranes nucléaires. Toutefois, la compréhension du processus d'internalisation des récepteurs étant sommaire, cette étape ne peut être complètement discréditée.

Afin d'être activement transportées au noyau, les protéines doivent contenir un signal de localisation nucléaire (SLN) qui est reconnu par des protéines de la famille des importines qui agissent ensuite comme transporteurs de ces protéines à travers le pore nucléaire. Le complexe protéine (SLN)-importine est ensuite dissocié au noyau par un processus dépendant des Ran-GTP (Gorlich, 1997). Or, des SLN ont été identifiés dans la huitième hélice- α de quelques RCPG de la classe A, dont les récepteurs AT_1R , les récepteurs à l'adénosine (A3R), ainsi que les $ET_A R$ et $ET_B R$ (Lee et coll., 2004). Puisque la huitième hélice- α des RCPG fait partie de la boucle cytosolique des RCPG, leur SLN est accessible aux importines cytosoliques lorsque les récepteurs sont dans les vésicules internalisées. Ces SLN présents dans les ETR pourraient expliquer la présence de structures vésiculaires nucléoplasmiques observées par microscopie confocale lorsque les myocytes étaient incubés en présence d'anticorps contre les ETR. Cependant, le SLN des ETR pourrait difficilement expliquer leur présence à la membrane nucléaire.

Une explication de la réponse pharmacologique atypique des ETR (p. ex. vasoconstriction soutenue) réside dans la liaison quasi-irréversible du complexe ET-ETR (Allen et coll., 2003; Waggoner et coll., 1992) avec une demie-vie de dissociation d'environ vingt heures (Wu-Wong et coll., 1994). Or, il s'avère que les récepteurs nucléaires présents dans les cardiomyocytes adultes étaient libres de ligand. Ceci suggère fortement que ces récepteurs intracellulaires proviennent d'une synthèse *de novo*. Bien qu'environ 15 % de la synthèse protéique soit effectuée au noyau (Iborra et coll., 2001), l'observation selon laquelle les ETR de surface et intracellulaires possédaient une même masse apparente porte à croire que ces deux populations de récepteurs ont subi un même processus de maturation par la voie

habituelle du réseau formé par le réticulum endoplasmique et le Golgi. Cependant, le mécanisme du rétro-transport entre le Golgi-*trans* et le noyau est inconnu (Tekirian, 2002). Finalement, la fonctionnalité des récepteurs nucléaires a été établie en démontrant qu'ils pouvaient altérer l'incorporation de ^{32}P de protéines nucléaires et qu'ils pouvaient provoquer une augmentation transitoire de Ca^{2+} nucléaire.

Différentes hypothèses ont été élaborées sur l'origine des récepteurs intracellulaires. Tout d'abord, le modèle basé sur le chimiotactisme suppose que les ligands et les récepteurs font partie d'un mécanisme primordial de la chimiotactie ayant pour objectif de fournir les substrats nécessaires à la survie de la cellule (Csaba, 1981; Csaba, 1984). Selon cette hypothèse, les récepteurs de la membrane de surface seraient les premiers à être apparus et les membranes internes seraient dérivées de la membrane de surface lors d'endocytoses. Ce dogme propose donc une apparition des récepteurs intracellulaires en conséquence au processus endocytique. Cependant, dans les années 1950, D^r Koshtoiants proposait une origine intracellulaire des récepteurs. Cette hypothèse se base sur la sensibilité des protéines à certains agents chimiques endogènes. Selon cet auteur, certaines protéines (c.-à-d. des récepteurs) ont développé une forte sensibilité à des acides aminés transformés cytoplasmiques [(Koshtoiants, 1951; Koshtoiants, 1963), revu dans (Shmukler et coll., 1998)]. Selon le D^r Shmukler, ces récepteurs intracellulaires servent de senseurs pour détecter et contrôler les niveaux intracellulaires de précurseurs de protéines (Shmukler et coll., 1998). En extrapolant à partir de ces théories, il est possible d'émettre l'hypothèse de récepteurs à l'endothéline intracellulaires ayant comme fonction de doser les endothélines intracellulaires.

Or, à notre connaissance il y a deux sources potentielles d'endothéline intracellulaire pour les cardiomyocytes. La première source provient du milieu extracellulaire. L'ET-1 est présente dans la circulation et son niveau peut augmenter jusqu'à un facteur de cinq dans diverses conditions pathologiques (Cody et coll.,

1992; Stewart et coll., 1991). À ce propos, il est intéressant de noter que le récepteur ET_B R, qui possède une même affinité pour toutes les endothélines, est un récepteur de clairance dans les poumons, les reins et le foie (Dupuis et coll., 1996; Fukuroda et coll., 1994). ET_B R internalise, avec ou sans ligand, puis est ciblé vers les lysosomes (Bremnes et coll., 2000; Oksche et coll., 2000). Ce mécanisme est une des voies d'entrée possible du ligand dans la cellule puisque la particularité de l'endothéline de posséder une constante de dissociation quasi-irréversible avec l' ET_B R (Allen et coll., 2003; Oksche et coll., 2000; Wu-Wong et coll., 1994) est abolie lorsque le complexe récepteur-ligand est dans un environnement acide (Sanchez et coll., 2002). Évidemment, la seconde source d'endothélines intracellulaires provient de la synthèse protéique au niveau des cardiomyocytes. Tout comme dans le cas des cellules endothéliales, les cardiomyocytes semblent posséder deux voies de relâche de l'endothéline. L'une est constitutive (Suzuki et coll., 1993; Thomas et coll., 1996) et l'autre est régulée par divers stress tels qu'un stretch cyclique (Yamazaki et coll., 1996b) ou une stimulation électrique (Thomas et coll., 1996). De plus, non seulement l'ET-1 est présente dans les cardiomyocytes, mais l'ET-3 a également été détectée. En effet, bien que l'ARNm de la prépro-ET-3 soit peu présent dans le ventricule au repos, une augmentation d'environ 60 % a été observée dans des bandes de muscle provenant de ventricules ayant subi un stretch pendant quinze minutes (Ennis et coll., 2005). Cependant, contrairement aux cellules endothéliales dont l'ET-1 est entreposée dans des vésicules de Weibel-Palade, aucune vésicule de la sorte n'a encore été observée dans les cardiomyocytes. Si l'on considère que 1) l'internalisation du complexe ET_B R*ET-1 régule à la baisse l'ARNm de la preproET-1 dans les cellules endothéliales vasculaires en culture primaire (Sanchez et coll., 2002) et que 2) le niveau d'ET-3 est de retour au niveau basal dans des bandes de muscle provenant de ventricules ayant subi un stretch pendant trente minutes (Ennis et coll., 2005), il est possible que les récepteurs intracellulaires aient un rôle de senseur de

l'environnement externe et interne et régulent la présence de son ARNm tel que proposé par Koshtoiants. Un tel système intracrine a déjà été bien caractérisé pour l'angiotensine [Revu dans (Re, 2003)]. L'existence d'un système intracrine aux endothélines pourrait se révéler cliniquement important. En effet, puisque les deux populations de récepteurs sont différemment couplées aux voies de signalisations, il est donc à prévoir que l'administration d'antagonistes liposolubles ou non auront des effets distincts.

Enfin, la troisième étude intitulée *Sub-cellular distribution of endothelin signaling pathway components in ventricular myocytes and heart: lack of preformed caveolar signalosomes*⁷ avait comme objectif de vérifier l'organisation spatiale du système de transduction de l'endothéline dans les cardiomyocytes adultes. L'endothéline peut activer de multiples voies de signalisation et évoquer différentes réponses pharmacologiques mais l'expression des deux sous-types d'ETR ne peut à elle seule expliquer la diversité de signalisation. Comme une sous-population d'ETR nucléaires a été observée et caractérisée dans les cardiomyocytes adultes et que la sous-population d'ETR localisée aux tubules-t est responsable de l'effet inotrope de l'ET-1 (Robu et coll., 2003), nous avons voulu vérifier si l'interaction des ETR avec la cavéoline (Chun et coll., 1994; Yamaguchi et coll., 2003) pouvait aussi contribuer à l'organisation de la voie de signalisation de l'endothéline.

Plusieurs pistes tiennent compte des cavéolines au moment du développement de l'hypertrophie cardiaque. Les mutations de la cavéoline-3 causent des cavéolinopathies qui ont été associées à des malfonctionnements musculaires [Revu dans (Sugie et coll., 2004; Williams et coll., 2004)]. De plus, une mutation de la cavéoline-3 (T63S) a récemment été identifiée chez un patient atteint de

⁷ Distribution sous-cellulaire des composantes de la voie de signalisation de l'endothéline dans les myocytes ventriculaires et le cœur: absence de signalosomes cavéolaires

cardiomyopathie hypertrophique familiale (Hayashi et coll., 2004). Cependant, cette mutation est la seule qui soit directement reliée à un mal fonctionnement cardiaque. D'autres mutations observées dans cette même région, soit les mutations T63P et $\Delta 63-65$ ont plutôt été considérées dans les dystrophies musculaires (Matsuda et coll., 2001; Minetti et coll., 1998). Cette mutation T63S est localisée dans le domaine d'échafaudage de la cavéoline (p. ex., cav-1: 82-101, cav2: 67-86, cav-3: 55-74) qui a déjà été impliqué dans la liaison aux PKC (Oka et coll., 1997), aux sous-unités α des protéines-G hétérotrimériques, de H-Ras (Li et coll., 1996) et de Erk1/2 [(Engelman et coll., 1998a), revu dans (Engelman et coll., 1998b; Okamoto et coll., 1998; Razani et coll., 2002; Williams et coll., 2004)]. Or, toutes ces protéines jouent vraisemblablement un rôle dans l'hypertrophie cardiaque. Non seulement le domaine d'échafaudage des cavéolines interagit-il avec ces protéines de transduction du signal hypertrophique, mais une telle interaction a aussi été constatée dans le cas des récepteurs AT₁R (Fujita et coll., 2001; Ishizaka et coll., 1998; Wyse et coll., 2003). De plus, l'effet hypertrophique de l'ET-1 et de la phényléphrine, qui agissent *via* des RCPGq comme l'AT₁R, est inhibé par la surexpression de la cavéoline-3 (Koga et coll., 2003). Il semble donc que le niveau d'expression des cavéolines, par le biais de la stoechiométrie d'interaction avec diverses protéines conférée par le domaine d'échafaudage, organisent et inactivent les interacteurs du signal hypertrophique. L'expression de la cavéoline-3 est directement régulée à la hausse par la phényléphrine et le PMA dans les cardiomyocytes (Kikuchi et coll., 2005). De plus, les souris Cav-1^{-/-} et Cav-3^{-/-} ainsi que les souris doublement invalidées Cav-1^{-/-}/Cav-3^{-/-} sont toutes atteintes de cardiomyopathies (Cohen et coll., 2003; Park et coll., 2002; Woodman et coll., 2002; Zhao et coll., 2002). L'effet hypertrophique observé chez les souris invalidées en cavéoline-3 a été associé à la suractivation de la voie Erk1/2 (Woodman et coll., 2002). L'absence ou la surabondance des cavéolines semble donc désorganiser la transduction du signal.

Le modèle des radeaux lipidiques actuel suppose que les molécules qui le constituent soient regroupées, et peut-être préassemblées, en un domaine précis. L'hypothèse de la présence d'un signalosome de la voie de signalisation de l'endothéline échafaudé par la cavéoline dans les radeaux lipidiques des cardiomyocytes adultes a été étudiée par une technique d'extraction des microsomes en absence de détergents ainsi que par la déconvolution d'images obtenues par microscopie confocale. Tel que mentionné ailleurs, la façon par laquelle les détergents interagissent avec les radeaux lipidiques peut causer la réorganisation des lipides et former de nouvelles phases insolubles aux détergents (Edidin, 2003; Heerklotz, 2002; Munro, 2003). Une séparation des microsomes en absence de détergents permet donc d'éviter de mesurer l'interaction entre deux protéines initialement localisées dans des radeaux lipidiques distincts *in vivo*. Quant au modèle utilisé, il a été rapporté que la cavéoline-3 possède une localisation distincte dans les cardiomyocytes adultes puisqu'elle est présente sur le système des tubules-T (Scriven et coll., 2002) et qu'elle est pareillement localisée dans les cardiomyocytes adultes et dans le myocarde adulte (Head et coll., 2005). Le modèle du cardiomyocyte adulte possède tous les interacteurs: il est donc plus représentatif de l'organisation réelle du système de transduction du signal de l'endothéline *in vivo* que les systèmes de surexpression utilisés jusqu'à maintenant. De plus, la colocalisation d'émissions dans un même voxel (c.-à-d. dans la même unité tridimensionnelle) suite à la déconvolution d'images obtenues avec ce modèle permet de distinguer les protéines localisées dans des microsomes possédant des propriétés biophysiques similaires dans un gradient de sucrose (c.-à-d. une même densité; faux positifs) des protéines localisées dans un même microsome.

Dans cette étude, les cavéoles étaient localisées aux interfaces entre 0,6 et 1,6 M de sucrose (c.-à-d. 20-55 %) plutôt qu'à l'interface 5-30 % tel qu'observé lorsque les radeaux lipidiques sont rassemblés dans la fraction non-soluble (Sargiacomo et

coll., 1993). Cependant, exception faite de $G\alpha_{11}$ et de $G\beta$, les récepteurs et la plupart des protéines impliquées dans la voie de transduction du signal présentaient un coefficient de sédimentation ne chevauchant que partiellement celui des cavéolines. De plus, la localisation hors des cavéoles a été corroborée par microscopie confocale. L'observation selon laquelle les ETR étaient localisés hors des cavéoles n'est pas conséquente avec les études précédentes qui ont révélé l'interaction des ETR avec la cavéoline-1 (Chun et coll., 1995; Chun et coll., 1994; Yamaguchi et coll., 2003). Cependant, la cavéoline-3 pourrait posséder des interactions distinctes des deux autres isoformes.

Quelques patrons d'interaction ont été observés entre les cavéoles et les RCPG. Dans un premier temps, il a été observé que certains RCPG cardiaques, dont les β_2AR et les récepteurs A(1) à l'adénosine, sortent des cavéoles après leur exposition à un agoniste (Cao et coll., 1998; Lasley et coll., 2000; Ostrom et coll., 2001; Rybin et coll., 2000). D'autres récepteurs transloquent vers les cavéoles après la liaison au ligand. C'est le cas entre autres des récepteurs de la bradykinine. En effet, les récepteurs B_1R transloquent vers les cavéoles après leur liaison au ligand mais sans être internalisés par ces vésicules (Lamb et coll., 2001; Sabourin et coll., 2002), contrairement au B_2R qui transloquent vers les cavéoles et internalisent par celles-ci (de Weerd et coll., 1997; Lamb et coll., 2001). Finalement, un dernier type d'interaction aux cavéoles a aussi été proposé pour les AT_1R . Bien que les AT_1R aient préalablement été associés aux cavéoles après leur stimulation (Ishizaka et coll., 1998), une récente étude a plutôt attribué l'interaction entre la cavéoline et les AT_1R à un rôle de chaperone moléculaire lors de la maturation des récepteurs (Wyse et coll., 2003). Cette étude, grâce à l'utilisation de cavéolines mutées dans le domaine d'échafaudage (c.-à-d. le domaine d'interaction à l' AT_1R) et de souris $cav-1^{-/-}$, démontre que les AT_1R ont besoin de la cavéoline-1 afin d'être acheminés à la surface. Ce phénomène de rétention au Golgi dans les cellules déficientes en

cavéolines a aussi été observé dans le cas de protéines avec une modification lipidique covalente (p. ex., glycosylphosphatidyl inositol) (Sotgia et coll., 2002). L'absence de colocalisation des ETR avec la cavéoline en absence de ligand n'exclut pas la possibilité que les ETR puissent transloquer aux cavéoles après une stimulation à l'endothéline. Cependant, puisque les récepteurs internalisent constitutivement, il est probable que l'absence de colocalisation indique que l'internalisation des deux sous-types soit effectuée par la voie des cages de clathrines comme il a déjà été proposé dans d'autres types cellulaires (Bremnes et coll., 2000; Oksche et coll., 2000). Finalement, l'observation selon laquelle les ETR sont présents dans la fraction non-soluble en présence de Triton X-100 (Chun et coll., 1994; Yamaguchi et coll., 2003), mais hors des cavéoles en absence de détergents, suggère fortement que les ETR sont localisés dans des radeaux lipidiques non-cavéolaires. Il est aussi possible que les ETR soient acheminés en surface *via* un mécanisme dépendant des cavéolines, comme dans le cas des AT₁R (Wyse et coll., 2003).

Quand aux protéines impliquées dans la voie de signalisation menant à l'activation de Erk1/2, toutes co-purifiaient en partie ou entièrement (p. ex. G α_{11} et G β) avec les cavéolines sur les gradients de sucrose. Cependant, l'absence de colocalisation d'émissions dans un même voxel suite aux déconvolutions, à l'exception de nPKC ϵ , G $\alpha_{q/11}$, G α_{13} et G β , supporte une association de ces protéines à des microsomes différents des cavéoles mais possédant une densité similaire. Compte tenu du rôle régulateur que possède les cavéolines dans l'inactivation de PKC (Oka et coll., 1997) et G α (Li et coll., 1996), il est possible que l'interaction entre les cavéolines et ces protéines (c.-à-d. G $\alpha_{q/11}$, G β et nPKC ϵ) qui agissent en amont de Erk1/2 soit suffisante à la régulation de la cascade (Engelman et coll., 1998a; Woodman et coll., 2002) du signal hypertrophique (Koga et coll., 2003; Park et coll., 2002; Woodman et coll., 2002).

6. CONCLUSION

Cette étude portant sur l'organisation de la transduction du signal de l'endothéline dans les cardiomyocytes ventriculaires clarifie certains aspects pouvant contribuer au processus hypertrophique. L'endothéline est un peptide circulant pouvant lier deux sous-types de récepteurs couplés aux protéines-G de surface, soit les sous-types ET_AR et ET_BR. L'activation de ces deux récepteurs présents sur les membranes externes de surface et du système de tubules-T active la voie des MAP kinases Erk1/2 via la protéine G_{q/11} hétérotrimérique. Les récepteurs étant localisés hors des cavéoles, il est possible que l'activation du complexe récepteur-protéine-G cause l'association de G $\alpha_{q/11}$ à la cavéoline-3 et aux cavéoles, ce mécanisme faisant partie de l'inactivation de la GTPase. Cependant, le récepteur n'y est pas associé et internalise par une voie distincte des cavéoles. Nous croyons que ceci représente une première voie d'entrée de l'ET-1 pouvant potentiellement activer les sous-types ET_AR et ET_BR localisés à la membrane nucléaire.

L'activation d'un nouveau pool d'enzymes nécessaires à l'activation de Erk1/2 ayant préalablement été impliqué dans l'hypertrophie des cardiomyocytes a été observé et partiellement caractérisé. Ce pool associé à la membrane était constitué de PKC amorcées mais inactives ainsi que d'enzymes actives. L'ET-1 causait la translocation de ces enzymes, actives et amorcées, vers une membrane autre que la membrane plasmique causant subséquemment l'activation des MAP kinases Erk1/2.

Enfin, nous avons proposé l'hypothèse selon laquelle les sous-types ET_AR et ET_BR, présents et fonctionnels aux noyaux des cardiomyocytes, font partie d'un système intracrine et représentent des cibles privilégiées de l'endothéline exprimée et relâchée au moment du stretch des cardiomyocytes. Ces récepteurs pouvant activer

des protéines kinases nucléaires et causer une entrée transitoire de Ca^{2+} au noyau participant potentiellement à la transcription de gènes impliqués dans l'hypertrophie causée par l'endothéline.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Ahn, N. G., Seger, R., Bratlien, R. L., Diltz, C. D., Tonks, N. K., et Krebs, E. G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4220-4227
2. Allen, B. G., et Katz, S. (1991) *Biochemistry* **30**, 4334-4343
3. Allen, B. G., Phuong, L. L., Farhat, H., et Chevalier, D. (2003) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 95-104
4. Ambar, I., et Sokolovsky, M. (1993) *Eur. J. Pharmacol.* **245**, 31-41
5. Anderson, R. G. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199-225
6. Andrea, J. E., Sutherland, C., Winter, C. K., et Walsh, M. P. (1998) *FEBS Lett.* **429**, 73-77
7. Angelova, K., Puett, D., et Narayan, P. (1997) *Endocrine* **7**, 287-293
8. Angers, S., Salahpour, A., et Bouvier, M. (2002) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 409-435
9. Anversa, P., et Kajstura, J. (1998a) *Circ. Res.* **83**, 1-14
10. Anversa, P., Leri, A., Beltrami, C. A., Guerra, S., et Kajstura, J. (1998b) *Lab. Invest.* **78**, 767-786
11. Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., et Nakanishi, S. (1990) *Nature* **348**, 730-732
12. Arai, M., Yoguchi, A., Iso, T., Takahashi, T., Imai, S., Murata, K., et Suzuki, T. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, H2084-H2091
13. Aramori, I., et Nakanishi, S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 12468-12474
14. Arinami, T., Ishikawa, M., Inoue, A., Yanagisawa, M., Masaki, T., Yoshida, M. C., et Hamaguchi, H. (1991) *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 990-996
15. Arya, R., Kedar, V., Hwang, J. R., McDonough, H., Li, H. H., Taylor, J., et Patterson, C. (2004) *J. Cell Biol.* **167**, 1147-1159

16. Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G., et Lefkowitz, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17882-17890
17. Baines, C. P., Zhang, J., Wang, G. W., Zheng, Y. T., Xiu, J. X., Cardwell, E. M., Bolli, R., et Ping, P. (2002) *Circ. Res.* **90**, 390-397
18. Ballard, C., et Schaffer, S. (1996) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 11-17
19. Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G., Shi, L., Gether, U., et Javitch, J. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29171-29177
20. Barnes, K., Walkden, B. J., Wilkinson, T. C., et Turner, A. J. (1997) *J. Neurochem.* **68**, 560-577
21. Bauman, A. L., et Scott, J. D. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, E203-E206
22. Baumgarten, C. R., Linz, W., Kunkel, G., Scholkens, B. A., et Wiener, G. (1993) *Brit. J. Pharmacol.* **108**, 293-295
23. Baydoun, A. R., Peers, S. H., Cirino, G., et Woodward, B. (1989) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**, S193-S196
24. Beudet, A., Nouel, D., Stroh, T., Vandembulcke, F., Dal-Farra, C., et Vincent, J. P. (1998) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 1479-1489
25. Behn-Krappa, A., et Newton, A. C. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 728-737
26. Bell, R. M. (1986) *Cell* **45**, 631-632
27. Benkirane, M., Jin, D. Y., Chun, R. F., Koup, R. A., et Jeang, K. T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30603-30606
28. Berridge, M. J. (1993) *Nature* **361**, 315-325
29. Bers, D. M. (1991) *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*, 1 Ed. Developments in Cardiovascular Medicine, 122, Kluwer Academic Publishers, Boston

30. Bhattacharya, M., Peri, K. G., Almazan, G., Ribeiro-Da-Sylva, A., Shichi, H., Durocher, Y., Abramovitz, M., Hou, X., Varma, D. R., et Chemtob, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15792-15797
31. Bhattacharya, M., Peri, K. G., Ribeiro-Da-Sylva, A., Almazan, G., Shichi, H., Hou, X., Varma, D. R., et Chemtob, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 15719-15724
32. Bkaily, G., Choufani, S., Hassan, G., El-Bizri, N., Jacques, D., et D'Orléans-Juste, P. (2000) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**, S414-S417
33. Blais, V., Fugere, M., Denault, J. B., Klarskov, K., Day, R., et Leduc, R. (2002) *FEBS Lett.* **524**, 43-48
34. Blanco-Aparicio, C., Torres, J., et Pulido, R. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 1129-1136
35. Bogoyevitch, M. A., Glennon, P. E., Andersson, M. B., Clerk, A., Lazou, A., Marshall, C. J., Parker, P. J., et Sugden, P. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1110-1119
36. Bogoyevitch, M. A., Glennon, P. E., et Sugden, P. H. (1993a) *FEBS Lett.* **317**, 271-275
37. Bogoyevitch, M. A., Parker, P. J., et Sugden, P. H. (1993b) *Circ. Res.* **72**, 757-767
38. Bogoyevitch, M. A., et Sugden, P. H. (1996) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 1-12
39. Booz, G. W., Conrad, K. M., Hess, A. L., Singer, H. A., et Baker, K. M. (1992) *Endocrinology* **130**, 3641-3649
40. Borner, C., Eppenberger, U., Wyss, R., et Fabbro, D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2110-2114
41. Borner, C., Filipuzzi, I., Wartmann, M., Eppenberger, U., et Fabbro, D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13902-13909

42. Bosanaca, I., Michikawab, T., Mikoshibab, K., et Ikuraa, M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1742**, 89-102
43. Bouusso, D., Bdolah, A., et Sokolovsky, M. (1992) *Neurosci. Lett.* **140**, 247-250
44. Bremnes, T., Paasche, J. D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, B., et Attramadal, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17596-17604
45. Bristow, M. R., Minobe, W., Rasmussen, R., Larrabee, P., Skerl, L., Klein, J. W., Anderson, F. L., Murray, J., Mestroni, L., Karwande, S. V., Fowler, M., et Ginsburg, R. (1992) *J. Clin. Invest.* **89**, 803-815
46. Bruins, R. H., Annable, C., Ward, N. E., Gravitt, K. R., O'Brian, C. A., et Epand, R. M. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 258-264
47. Buu, N. T., Hui, R., et Falardeau, P. (1993) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**, 1037-1046
48. Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., et Arkininstall, S. (1998) *Science* **280**, 1262-1265
49. Cao, T. T., Mays, R. W., et von Zastrow, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24592-24602
50. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., et Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7847-7851
51. Cenni, V., Doppler, H., Sonnenberg, E. D., Malardi, N., Newton, A. C., et Toker, A. (2002) *Biochem. J.* **363**, 537-545
52. Chakravarthy, B. R., Bussey, A., Whitfield, J. F., Sikorska, M., Williams, R. E., et Durkin, J. P. (1991) *Anal. Biochem.* **196**, 144-150
53. Chakravarthy, B. R., Whitfield, J. F., et Durkin, J. P. (1994) *Biochem. J.* **304**, 809-816

54. Chaudhary, A., King, W. G., Mattaliano, M. D., Frost, J. A., Diaz, B., Morrison, D. K., Cobb, M. H., Marshall, M. S., et Brugge, J. S. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 551-554
55. Chen, C. A., et Manning, D. R. (2001) *Oncogene* **20**, 1643-1652
56. Chen, R., Mukhin, Y. V., Garnovskaya, M. N., Thielen, T. E., Iijima, Y., Huang, C., Raymond, J. R., Ullian, M. E., et Paul, R. V. (2000) *Am. J. Physiol.* **279**, F440-F448
57. Chidiac, P., Green, M. A., Pawagi, A. B., et Wells, J. W. (1997) *Biochemistry* **36**, 7361-7379
58. Chidsey, C. A., Sonnenblick, E. H., Morrow, A. G., et Braunwald, E. (1966) *Circulation* **33**, 43-51
59. Chien, K. R., Zhu, H., Knowlton, K. U., Miller-Hance, W., van-Bilsen, M., O'Brien, T. X., et Evans, S. M. (1993) *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 77-95
60. Chiloeches, A., Paterson, F. H., Marais, R., Clerk, A., Marshall, C. J., et Sugden, P. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19762-19770
61. Chong, H., Vikis, H. G., et Guan, K. L. (2003) *Cell. Signal.* **15**, 463-469
62. Chun, M., Lin, H. Y., Henis, Y. I., et Lodish, H. F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10855-10860
63. Chun, M., Liyanage, U. K., Lisanti, M. P., et Lodish, H. F. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11728-11732
64. Clark, G. J., Drugan, J. K., Rossman, K. L., Carpenter, J. W., Rogers-Graham, K., Fu, H., Der, C. J., et Campbell, S. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20990-21003
65. Clerk, A., Bogoyevitch, M. A., Andersson, M. B., et Sugden, P. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 32848-32857
66. Clerk, A., Bogoyevitch, M. A., Fuller, S. J., Lazou, A., Parker, P. J., et Sugden, P. H. (1995) *Am. J. Physiol.* **269**, H1087-H1097

67. Clerk, A., et Sugden, P. H. (1997) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1593-1604
68. Clerk, A., et Sugden, P. H. (1999) *Am. J. Cardiol.* **83**, 64H-69H
69. Clerk, A., et Sugden, P. H. (2004) *Biochem. Cell Biol.* **82**, 603-609
70. Cody, R. J., Haas, G. J., Binkley, P. F., Capers, Q., et Kelley, R. (1992) *Circulation* **85**, 504-509
71. Cohen, A. W., Park, D. S., Woodman, S. E., Williams, T. M., Chandra, M., Shirani, J., Pereira de Souza, A., Kitsis, R. N., Russell, R. G., Weiss, L. M., Tang, B., Jelicks, L. A., Factor, S. M., Shtutin, V., Tanowitz, H. B., et Lisanti, M. P. (2003) *Am. J. Physiol.* **284**, C457-C474
72. Concas, V., Laurent, S., Brisac, A. M., Perret, C., et Safar, M. (1989) *J. Hypertens.* **7**, S96-S97
73. Conklin, D. S., Galaktionov, K., et Beach, D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7892-7896
74. Cooper, G., IV. (1997) *Ann. Rev. Med.* **48**, 13-23
75. Cooper, I. V. G., Kent, R. L., Uboh, C. E., Thompson, E. W., et Marino, T. A. (1985) *J. Clin. Invest.* **75**, 1403-1414
76. Cramer, H., Muller-Esterl, W., et Schroeder, C. (1997) *Biochemistry* **36**, 13325-13332
77. Cramer, H., Muller-Esterl, W., et Schroeder, C. (1998) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31**, S203-S206
78. Cramer, H., Schmenger, K., Heinrich, K., Horstmeyer, A., Boning, H., Breit, A., Piiper, A., Lundstrom, K., Muller-Esterl, W., et Schroeder, C. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 5449-5459
79. Csaba, G. (1981) *Ontogeny and phylogeny of hormone receptors*. Monogr. Dev. Biol., 15, Karger, Basel
80. Csaba, G. (1984) *Horm. Metab. Res.* **16**, 329-335

81. Csukai, M., Chen, C. H., De Matteis, M. A., et Mochly-Rosen, D. (1997) *J. Biol Chem.* **272**, 29200-29206
82. Curtis, T. M., et Scholfield, C. N. (2001) *Br. J. Pharmacol.* **134**, 1787-1795
83. D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B., et Dorn, G. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8121-8126
84. D'Orléans-Juste, P., Plante, M., Honoré, J. C., Carrier, E., et Labonté, J. (2003) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 503-510
85. Davenport, A. P. (2002) *Pharmacol. Rev.* **54**, 219-226
86. Davenport, A. P., et Kuc, R. E. (2000) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**, S12-S14
87. De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., et Kim, S. H. (1993) *Nature* **363**, 595-602
88. de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T. D., et Vane, J. R. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 9797-9800
89. de Weerd, W. F., et Leeb-Lundberg, L. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17858-17866
90. Disatnik, M.-H., Buraggi, G., et Mochly-Rosen, D. (1994) *Exp. Cell Res.* **210**, 287-297
91. Dorn, G. W., et Heller Brown, J. (1999a) *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 26-34
92. Dorn, G. W., Souroujon, M. C., Liron, T., Che-Hong, C., Gray, M. O., Zhou, H. Z., Csukai, M., Wu, G., Lorenz, J. N., et Mochly-Rosen, D. (1999b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 12798-12803
93. Dougherty, M. K., Muller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., et Morrison, D. K. (2005) *Mol. Cell* **17**, 215-224

94. Dumaz, N., et Marais, R. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 29819-29823
95. Dupuis, J., Goresky, C. A., et Fournier, A. (1996) *J. Appl. Physiol.* **81**, 1510-1515
96. Dutil, E. M., Keranen, L. M., DePaoli-Roach, A. A., et Newton, A. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29359-29362
97. Dutil, E. M., et Newton, A. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 10697-10701
98. Dutil, E. M., Toker, A., et Newton, A. C. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 1366-1375
99. Edidin, M. (2003) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257-283
100. Elshourbagy, N. A., Adamou, J. E., Gagnon, A. W., Wu, H. L., Pullen, M., et Nambi, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 25300-25307
101. Emoto, N., et Yanagisawa, M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15262-15268
102. Engelman, J. A., Chu, C., Lin, A., Jo, H., Ikezu, T., Okamoto, T., Kohtz, D. S., et Lisanti, M. P. (1998a) *FEBS Letters* **428**, 205-211
103. Engelman, J. A., Zhang, X. L., Galbiati, F., Volonte, D., Sotgia, F., Pestell, R. G., Minetti, C., Scherer, P. E., Okamoto, T., et Lisanti, M. P. (1998b) *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1578-1587
104. Ennis, I. L., Garcarena, C. D., Perez, N. G., Dulce, R. A., Camilion de Hurtado, M. C., et Cingolani, H. E. (2005) *Am. J. Physiol.* **288**, H2925-H2930
105. Ergul, A., Walker, C. A., Goldberg, A., Baicu, S. C., Hendrick, J. W., King, M. K., et Spinale, F. G. (2000) *Am. J. Physiol.* **278**, H2050-H2056
106. Fabian, J. R., Daar, I. O., et Morrison, D. K. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7170-7179
107. Fanger, G. R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M. B., et Johnson, G. L. (1997) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 67-74
108. Fantl, W. J., Muslin, A. J., Kikuchi, A., Martin, J. A., MacNicol, A. M., Gross, R. W., et Williams, L. T. (1994) *Nature* **371**, 612-614

109. Fareh, J., Touyz, R. M., Schiffrin, E. L., et Thibault, G. (1996) *Circ. Res.* **78**, 302-311
110. Farrar, W. L., Thomas, T. P., et Anderson, W. B. (1985) *Nature* **315**, 235-237
111. Faure, M. P., Alonso, A., Nouel, D., Gaudriault, G., Dennis, M., Vincent, J. P., et A., B. (1995) *J. Neurosci.* **15**, 4140-4147
112. Feng, X., et Hannun, Y. A. (1998a) *J. Biol. Chem.* **273**, 26870-26874
113. Feng, X., Zhang, J., Barak, L. S., Meyer, T., Caron, M. G., et Hannun, Y. A. (1998b) *J. Biol. Chem.* **273**, 10755-10762
114. Ferrari, S., Marchiori, F., Marin, O., et Pinna, L. A. (1987) *Eur. J. Biochem.* **163**, 481-487
115. Firth, J. D., Roberts, A. F., et Raine, A. E. (1990) *Clin. Sci.* **79**, 221-226
116. Flint, A. J., Paladini, R. D., et Koshland, D. E., Jr. (1990) *Science* **249**, 408-411
117. Force, T., Bonventre, J. V., Heidecker, G., Rapp, U., Avruch, J., et J.M., K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1270-1274
118. Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K., et Parton, R. G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 8655-8659
119. Freed, E., Symons, M., MacDonald, G., McCormick, F., et Ruggieri, R. (1994) *Science* **265**, 1713-1716
120. Freedman, N. J., Ament, A. S., Oppermann, M., Stoffel, R. H., Exum, S. T., et Lefkowitz, R. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17734-17743
121. Fu, H., Xia, K., Pallas, D. C., Cui, C., Conroy, K., Narsimhan, R. P., Mamon, H., Collier, R. J., et Roberts, T. M. (1994) *Science* **266**, 126-129
122. Fujita, T., Toya, Y., Iwatsubo, K., Onda, T., Kimura, K., Umemura, S., et Ishikawa, Y. (2001) *Cardiovasc. Res.* **51**, 709-716
123. Fujitani, Y., Ueda, H., Okada, T., Urade, Y., et Karaki, H. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **267**, 683-689

124. Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., et Nishida, E. (1997a) *J. Biol. Chem.* **272**, 32642-32648
125. Fukuda, M., Gotoh, Y., et Nishida, E. (1997b) *EMBO J.* **16**, 1901-1908
126. Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M., et Nishikibe, M. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **199**, 1461-1465
127. Fuller, S. J., Gaitanaki, C. J., et Sugden, P. H. (1990) *Biochem. J.* **266**, 727-736
128. Gao, T., et Newton, A. C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 31585-31592
129. Gobeil, F. J., Bernier, S. G., Vazquez-Tello, A., Brault, S., Beauchamp, M. H., Quiniou, C., Marrache, A. M., Checchin, D., Sennlaub, F., Hou, X., Nader, M., Bkaily, G., Ribeiro-da-Silva, A., Goetzl, E. J., et Chemtob, S. (2003a) *J. Biol. Chem.* **278**, 38875-38883
130. Gobeil, F. J., Dumont, I., Marrache, A. M., Vazquez-Tello, A., Bernier, S. G., Abran, D., Hou, X., Beauchamp, M. H., Quiniou, C., Bouayad, A., Choufani, S., Bhattacharya, M., Molotchnikoff, S., Ribeiro-Da-Silva, A., Varma, D. R., Bkaily, G., et Chemtob, S. (2002) *Circ. Res.* **90**, 682-689
131. Gobeil, F. J., Vazquez-Tello, A., Marrache, A. M., Bhattacharya, M., Checchin, D., Bkaily, G., Lachapelle, P., Ribeiro-Da-Silva, A., et Chemtob, S. (2003b) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 196-204
132. Goldberg, M., et Steinberg, S. F. (1996) *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1089-1093
133. Gorlich, D. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 412-419
134. Goss, R. J. (1966) *Science* **153**, 1615-1620
135. Grady, E. F., Garland, A. M., Gamp, P. D., Lovett, M., Payan, D. G., et Bunnett, N. W. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 509-524
136. Grant, R. P. (1965) *Circulation* **32**, 301-308

137. Grantcharova, E., Furkert, J., Reusch, H. P., Krell, H. W., Papsdorf, G., Beyermann, M., Schulein, R., Rosenthal, W., et Oksche, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43933-43941
138. Gray, M. O., Karliner, J. S., et Mochly-Rosen, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30945-30951
139. Green, M. A., Chidiac, P., et Wells, J. W. (1997) *Biochemistry* **36**, 7380-7394
140. Gregan, B., Jurgensen, J., Papsdorf, G., Furkert, J., Schaefer, M., Beyermann, M., Rosenthal, W., et Oksche, A. (2004a) *J. Biol. Chem.* **279**, 27679-27687
141. Gregan, B., Schaefer, M., Rosenthal, W., et Oksche, A. (2004b) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **44**, S30-S33
142. Guyton, A. C., et Hall, J. E. (1996) *Textbook of Medical Physiology*, 9th Ed., W.B. Saunders company
143. Halsey, D. L., Girard, P. R., Kuo, J. F., et Blackshear, P. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2234-2243
144. Hamilton, M., Liao, J., Cathcart, M. K., et Wolfman, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29079-29090
145. Han, D. C., Rodriguez, L. G., et Guan, J. L. (2001) *Oncogene* **20**, 346-357
146. Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., et Marshall, C. J. (1989) *Cell* **57**, 1167-1177
147. Hanks, S. K., et Hunter, T. (1995) *FASEB J.* **9**, 576-596
148. Hannun, Y. A., Loomis, C. R., et Bell, R. M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10039-10043
149. Hansra, G., Garcia-Paramio, P., Prevostel, C., Whelan, R. D., Bornancin, F., et Parker, P. J. (1999) *Biochem. J.* **342**, 337-344
150. Harvey, R. P. (2002) *Nat. Rev. Genet.* **3**, 544-556
151. Hasegawa, H., Hiki, K., Sawamura, T., Aoyama, T., Okamoto, Y., Miwa, S., Shimohama, S., Kimura, J., et Masaki, T. (1998a) *FEBS Lett.* **428**, 304-308

152. Hasegawa, H., Hiki, K., Sawamura, T., Aoyama, T., Okamoto, Y., Miwa, S., Shimohama, S., Kimura, J., et Masaki, T. (1998b) *FEBS Lett.* **428**, 304-308
153. Hayashi, T., Arimura, T., Ueda, K., Shibata, H., Hohda, S., Takahashi, M., Hori, H., Koga, Y., Oka, N., Imaizumi, T., Yasunami, M., et Kimura, A. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 178-184
154. Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Lai, N. C., Niesman, I. R., Farquhar, M. G., et Insel, P. A. (2005) *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print]
155. Heerklotz, H. (2002) *Biophys. J.* **83**, 2693-2701
156. Henrich, C. J., et Simpson, P. C. (1988) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **20**, 1081-1085
157. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., et Vogelstein, B. (1997) *Mol. Biol. Cell* **1**, 3-11
158. Hickey, K. A., Rubanyi, G. M., Paul, R. J., et Highsmith, R. F. (1985) *Am. J. Physiol.* **248**, C550-C556
159. Hilal-Dandan, R., Merck, D. T., Lujan, J. P., et Brunton, L. L. (1994) *Mol. Pharmacol.* **45**, 1183-1190
160. Hilal-Dandan, R., Ramirez, M. T., Villegas, S., Gonzalez, A., Endo-Mochizuki, Y., Brown, J. H., et Brunton, L. L. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, H130-H137
161. Hilal-Dandan, R., Urasawa, K., et Brunton, L. L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10620-10624
162. Hioki, Y., Okada, K., Ito, H., Matsuyama, K., et Yano, M. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **174**, 446-451
163. Hocher, B., George, I., Rebstock, J., Bauch, A., Schwartz, A., Neumayer, H., et Bauer, C. (1999) *Hypertension* **33**, 816-822
164. Hofmann, J. (1997) *FASEB J.* **11**, 649-669
165. Hooper, N. M. (1994) *FEBS Lett.* **354**, 1-6

166. Hosoda, K., Nakao, K., Arai, H., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Shirakami, G., Saito, Y., Nakanishi, S., et Imura, H. (1991) *FEBS Lett.* **289**, 23-26
167. House, C., et Kemp, B. E. (1987) *Science* **238**, 1726-1728
168. Huang, J. W., Chen, C. L., et Chuang, N. N. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 1087-1094
169. Huang, X. P., Pi, Y., Lokuta, A. J., Greaser, M. L., et Walker, J. W. (1997) *J. Cell Sci.* **110**, 1625-1634
170. Hunter, J. J., et Chien, K. R. (1999a) *NEJM* **341**, 1276-1283
171. Hunter, J. J., et Chien, K. R. (1999b) *N. Engl. J. Med.* **341**, 1276-1283
172. Husain, S., et Abdel-Latif, A. A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta.* **1392**, 127-144
173. Hyatt, S. L., Liao, L., Chapline, C., et Jaken, S. (1994) *Biochemistry* **33**, 1223-1228
174. Iborra, F. J., Jackson, D. A., et Cook, P. R. (2001) *Science* **293**, 1139-1142
175. Ikeda, K., Emoto, N., Raharjo, S. B., Nurhantari, Y., Saiki, K., Yokoyama, M., et Matsuo, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32469-32477
176. Ikeda, S., Emoto, N., Alimsardjono, H., Yokoyama, M., et Matsuo, M. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 421-426
177. Ikonen, E., et Parton, R. G. (2000) *Traffic* **1**, 212-217
178. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, T., et Masaki, T. (1989a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2863-2867
179. Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M., et Masaki, T. (1989b) *J. Biol. Chem.* **264**, 14954-14959
180. Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., et Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7610-7616
181. Insel, P. A. (2003) *Trends Endocrinol. Metab.* **14**, 100-102

182. Irie, K., Gotoh, Y., Yashar, B. M., Errede, B., Nishida, E., et Matsumoto, K. (1993) *Science* **265**, 1716-1719
183. Ishikawa, M., Saito, Y., Miyamoto, Y., Kuwahara, K., Ogawa, E., Nakagawa, O., Harada, M., Masuda, I., et Nakao, K. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 377-381
184. Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., et Masaki, T. (1988) *Am. J. Physiol.* **255**, H970-H973
185. Ishizaka, N., Griendling, K. K., Lassegue, B., et Alexander, R. W. (1998) *Hypertension* **32**, 459-466
186. Ito, H., Hirata, Y., Hiroe, M., Tsujino, M., Adachi, S., Takamoto, T., Nitta, M., Taniguchi, K., et Marumo, F. (1991) *Circ. Res.* **69**, 209-215
187. Ito, H., Hiroe, M., Hirata, Y., Fujisaki, H., Adachi, S., Akimoto, H., Ohta, Y., et Marumo, F. (1994) *Circulation* **89**, 2198-2203
188. Johnson, J. A., Gray, M. O., Chen, C., et Mochly-Rosen, D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24962-24966
189. Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W. J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L. Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Brancheck, T. A., et Gerald, C. (1998) *Nature* **396**, 674-679
190. Jordan, B. A., et Devi, L. A. (1999) *Nature* **399**, 697-700
191. Jouneaux, C., Mallat, A., Serradeil-Le Gal, C., Goldsmith, P., Hanoune, J., et Lotersztajn, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1845-1851
192. Junco, M., Webster, C., Crawford, C., Bosca, L., et Parker, P. J. (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 259-263
193. Kaibuchi, K., Takai, Y., et Nishizuka, Y. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7146-7149

194. Kaku, T., Lakatta, E. G., et Filburn, C. (1991) *Am. J. Physiol.* **260**, C635-C642
195. Karne, S., Jayawickreme, C. K., et Lerner, M. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19126-19133
196. Katz, A. M. (1998) *J. Card. Fail.* **4**, 67-81
197. Katz, A. M. (2001) *Physiology of the Heart*, 3rd Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
198. Kawanabe, Y., Okamoto, Y., Nozaki, K., Hashimoto, N., Miwa, S., et Masaki, T. (2002) *Mol. Pharmacol.* **61**, 277-284
199. Kelly, R. A., Eid, H., Krämer, B. K., O'Neill, M., Liang, B. T., Reers, M., et Smith, T. M. (1990) *J. Clin. Invest.* **86**, 1164-1171
200. Kennelly, P. J., et Krebs, E. G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15555-15558
201. Keranen, L. M., Dutil, E. M., et Newton, A. C. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 1394-1403
202. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S., et Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13341-13348
203. Kikuchi, T., Oka, N., Koga, A., Miyazaki, H., Ohmura, H., et Imaizumi, T. (2005) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **45**, 204-210
204. Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S. I., Tominaga, M., Kuroda, T., et Nishizuka, N. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 4088-4092
205. Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., et Nishizuka, Y. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2273-2276
206. Kitamura, K., Shiraishi, N., Singer, W. D., Handlogten, M. E., Tomita, K., et Miller, R. T. (1999) *Am. J. Physiol.* **276**, C930-C937
207. Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S., et Sowadski, J. M. (1991) *Science* **253**, 407-414

208. Koga, A., Oka, N., Kikuchi, T., Miyazaki, H., Kato, S., et Imaizumi, T. (2003) *Hypertension* **42**, 213-219
209. Kohout, T. A., et Rogers, T. B. (1993) *Am. J. Physiol.* **264**, C1350-C1359
210. Kolch, W., Heldecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahldl, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marmé, D., et Rapp, U. R. (1993) *Nature* **364**, 249-252
211. Koshtoiants, K. S. (1951) *Proteins, metabolism and neural regulation*, House U.S.S.R. Acad. Sci., Moscow
212. Koshtoiants, K. S. (1963) *The Problems Related to Enzymochemistry of Excitation and Inhibition Events, and to Evolution of Nervous System Function*, House U.S.S.R. Acad. Sci., Moscow
213. Kraft, A. S., et Anderson, W. B. (1983) *Nature* **301**, 621-623
214. Kuo, J. F., Andersson, R. G. G., Wise, B. C., Mackerlova, L., Salomonsson, I., Brackett, N. L., Katoh, N., Shoji, M., et Wrenn, R. W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7039-7043
215. Lamb, M. E., De Weerd, W. F., et Leeb-Lundberg, L. M. (2001) *Biochem. J.* **355**, 741-750
216. Lammerding, J., Kamm, R. D., et Lee, R. T. (2004) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1015**, 53-70
217. Lasley, R. D., Narayan, P., Uittenbogaard, A., et Smart, E. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4417-4421
218. Lavoie, C., et Hebert, T. E. (2003) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**, 186-195
219. Lavoie, C., Mercier, J. F., Salahpour, A., Umapathy, D., Breit, A., Villeneuve, L. R., Zhu, W. Z., Xiao, R. P., Lakatta, E. G., Bouvier, M., et Hebert, T. E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 35402-35410
220. Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., et Parker, P. J. (1998) *Science* **281**, 2042-2045

221. Lee, D. K., Lanca, A. J., Cheng, R., Nguyen, T., Ji, X. D., Gobeil, F. J., Chemtob, S., George, S. R., et B.F., O. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 7901-7908
222. Lee, S., Lin, M., Mele, A., Cao, Y., Farmar, J., Russo, D., et Redman, C. (1999) *Blood* **94**, 1440-1450
223. Lehel, C., Olah, Z., Jakab, G., et Anderson, W. B. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1406-1410
224. Lehel, C., Oláh, Z., Petrovics, G., Jakab, G., et Anderson, W. B. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 98-103
225. Leventhal, P. S., et Bertics, P. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13906-13913
226. Li, S., Couet, J., et Lisanti, M. P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 29182-29190
227. Lindpaintner, K., Jin, M. W., Niedermaier, N., Wilhelm, M. J., et Ganten, D. (1990) *Circ. Res.* **67**, 564-573
228. Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Tang, T. L., et Sargiacomo, M. (1994) *Trends Cell Biol.* **4**, 231-235
229. Liu, Y., Casey, L., et Pike, L. J. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **245**, 684-690
230. Liu, Y., Geisbuhler, B., et Jones, A. W. (1992) *Am. J. Physiol.* **262**, C941-C949
231. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., et Lefkowitz, R. J. (1990) *Science* **248**, 1547-1550
232. Lovenberg, W., et Miller, R. C. (1990) *Neurochem. Res.* **15**, 407-417
233. Lu, D., Yang, H., Shaw, G., et Raizada, M. K. (1998) *Endocrinology* **139**, 365-375
234. Luttrell, L. M., et Lefkowitz, R. J. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 455-465

235. Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., et Lefkowitz, R. J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 2449-2454
236. MacLellan, W. R., et Schneider, M. D. (2000) *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 289-319
237. Maguire, J. J., et Davenport, A. P. (1995) *Br. J. Pharmacol.* **115**, 191-197
238. Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M. F., et Marshall, C. J. (1998) *Science* **280**, 109-112
239. Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., et Marshall, C. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4378-4383
240. Marais, R., et Marshall, C. J. (1996) *Cancer Surv.* **27**, 101-125
241. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., et Jan, L. Y. (2000) *Neuron* **27**, 97-106
242. Marie, J. P., Guillemot, H., et Hatt, P. Y. (1976) *Pathol. Biol.* **24**, 549-554
243. Marrache, A. M., Gobeil, F. J., Bernier, S. G., Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., Choufani, S., Bkaily, G., Bourdeau, A., Sirois, M. G., Vazquez-Tello, A., Fan, L., Joyal, J. S., Filep, J. G., Varma, D. R., Ribeiro-Da-Silva, A., et S., C. (2002) *J. Immunol.* **169**, 6474-6481
244. Marshall, F. H., Jones, K. A., Kaupmann, K., et Bettler, B. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 396-399
245. Matsuda, C., Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Aoki, M., Murayama, K., Nishino, I., Nonaka, I., Arahata, K., et Brown, R. H. J. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1761-1766
246. Matsumoto, H., Suzuki, N., Kitada, C., et Fujino, M. (1994) *Peptides* **15**, 505-510
247. Matsumoto, H., Suzuki, N., Onda, H., et Fujino, M. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 74-80

248. McNutt, N. S., et Fawcett, D. W. (1974) in *The Mammalian Myocardium* (Brady, L., ed), pp. 1-49, Wiley, New York
249. Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G., et Brown, D. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 3910-3917
250. Mellor, H., et Parker, P. J. (1998) *Biochem. J.* **332**, 281-292
251. Michaud, N. R., Fabian, J. R., Mathes, K. D., et Morrison, D. K. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3390-3397
252. Milano, C. A., Dolber, P. C., Rockman, H. A., Bond, R. A., Venable, M. E., Allen, L. F., et Lefkowitz, R. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10109-10113
253. Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F. D., Lisanti, M. P., et Zara, F. (1998) *Nat. Genet.* **18**, 365-368
254. Mochly-Rosen, D., et Gordon, A. S. (1998) *FASEB J.* **12**, 35-42
255. Mochly-Rosen, D., Henrich, C. J., Cheever, L., Khaner, H., et Simpson, P. C. (1990) *Mol. Biol. Cell* **1**, 693-706
256. Mochly-Rosen, D., Khaner, H., et Lopez, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 3997-4000
257. Mochly-Rosen, D., Wu, G., Hahn, H., Osinska, H., Liron, T., Lorenz, J. N., Yatani, A., Robbins, J., et Dorn, G. W. n. (2000) *Circ. Res.* **86**, 1173-1179
258. Molenaar, P., O'Reilly, G., Sharkey, A., Kuc, R. E., Harding, D. P., Plumpton, C., Gresham, G. A., et Davenport, A. P. (1993) *Circ. Res.* **72**, 526-538
259. Moravec, C. S., Reynolds, E. E., Stewart, R. W., et Bond, M. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 14-18

260. Morello, J. P., Salahpour, A., Petaja-Repo, U. E., Laperriere, A., Lonergan, M., Arthus, M. F., Nabi, I. R., Bichet, D. G., et Bouvier, M. (2001) *Biochemistry* **40**, 6766-6775
261. Morrison, D. K. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 1609-1612
262. Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. R., et Copeland, T. D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17309-17316
263. Muda, M., Theodosiou, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., Boschert, U., Rodrigues, N., Ashworth, A., et Arkinstall, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9323-9329
264. Muller, J., Ory, S., Copeland, T., Piwnica-Worms, H., et Morrison, D. K. (2001) *Mol. Cell* **8**, 983-993
265. Muller, L., Barret, A., Etienne, E., Meidan, R., Valdenaire, O., Corvol, P., et Tougard, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 545-555
266. Munro, S. (2003) *Cell* **115**, 377-388
267. Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., et Shaw, A. S. (1996) *Cell* **84**, 889-897
268. Nambi, P., Pullen, M., Kincaid, J., Nuthulaganti, P., Aiyar, N., Brooks, D. P., Gellai, M., et Kumar, C. (1997) *Mol. Pharmacol.* **52**, 582-589
269. Nery, F. C., Passos, D. O., Garcia, V. S., et Kobarg, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 11444-11455
270. Newman, C. M., et Magee, A. I. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1155**, 79-96
271. Newton, A. C. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 973-976
272. Newton, A. C. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 161-167
273. Newton, A. C. (2002) *Biochem. J.* **370**, 361-371
274. Newton, A. C., et Johnson, J. E. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 155-172

275. Nguyen, A., Burack, W. R., Stock, J. L., Kortum, R., Chaika, O. V., Afkarian, M., Muller, W. J., Murphy, K. M., Morrison, D. K., Lewis, R. E., McNeish, J., et Shaw, A. S. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3035-3045
276. Nguyen, Q. T., Cheracek, P., Calderone, A., Stewart, D. J., Picard, P., Sirois, P., White, M., et Rouleau, J. L. (1998) *Circulation* **98**, 2323-2330
277. Nishizuka, Y. (1995) *FASEB J.* **9**, 484-496
278. O'Malley, K. L., Jong, Y. J., Gonchar, Y., Burkhalter, A., et Romano, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 28210-28219
279. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., et Barak, L. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17201-17210
280. Oka, N., Yamamoto, M., Schwencke, C., Kawabe, J., Ebina, T., Ohno, S., Couet, J., Lisanti, M. P., et Ishikawa, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 33416-33421
281. Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E., et Lisanti, M. P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 5419-5422
282. Okamoto, Y., Ninomiya, H., Tanioka, M., Sakamoto, A., Miwa, S., et Masaki, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21589-21596
283. Oksche, A., Boese, G., Horstmeyer, A., Furkert, J., Beyermann, M., Bienert, M., et Rosenthal, W. (2000) *Mol. Pharmacol.* **57**, 1104-1113
284. Olson, E. N. (2001) *Science* **291**, 2327-2328
285. Olson, E. N., et Schneider, M. D. (2003) *Genes Dev.* **17**, 1937-1956
286. Orr, J. W., et Newton, A. C. (1994a) *J. Biol. Chem.* **269**, 8383-8387
287. Orr, J. W., et Newton, A. C. (1994b) *J. Biol. Chem.* **269**, 27715-27718
288. Ory, S., Zhou, M., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., et Morrison, D. K. (2003) *Curr. Biol.* **13**, 1356-1364
289. Osmanagic-Myers, S., et Wiche, G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 18701-18710

290. Ostrom, R. S., Gregorian, C., Drenan, R. M., Xiang, Y., Regan, J. W., et Insel, P. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 42063-42069
291. Paasche, J. D., Attramadal, T., Sandberg, C., Johansen, H. K., et Attramadal, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34041-34050
292. Parekh, D. B., Ziegler, W., et Parker, P. J. (2000) *EMBO J.* **19**, 496-503
293. Park, D. S., Woodman, S. E., Schubert, W., Cohen, A. W., Frank, P. G., Chandra, M., Shirani, J., Razani, B., Tang, B., Jelicks, L. A., Factor, S. M., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., et Lisanti, M. P. (2002) *Am. J. Pathol.* **160**, 2207-2217
294. Park, S. H., Zarrinpar, A., et Lim, W. A. (2003) *Science* **299**, 1061-1064
295. Pawson, T., et Scott, J. D. (1997) *Science* **278**, 2075-2080
296. Pears, C., Stabel, S., Cazaubon, S., et Parker, P. J. (1992) *Biochem. J.* **283**, 515-518
297. Pelech, S. L., Charest, D. L., Howard, S. L., Paddon, H. B., et Salari, H. (1990a) *Biochim. Biophys. Acta* **1051**, 100-107
298. Pelech, S. L., Paddon, H. B., Charest, D. L., et Federspiel, B. S. (1990b) *J. Immunol.* **144**, 1759-1766
299. Pelkmans, L., et Helenius, A. (2002) *Traffic* **3**, 311-320
300. Pike, L. J., et Casey, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 26453-26456
301. Pinet, F. (2004) *Médecine/Sciences* **20**, 339-345
302. Ping, P., Takano, H., Zhang, J., Tang, X. L., Qiu, Y., Li, R. C., Banerjee, S., Dawn, B., Balafonova, Z., et Bolli, R. (1999) *Circ. Res.* **84**, 587-604
303. Ping, P., Zhang, J., Qiu, Y., Tang, X. L., Manchikalapudi, S., Cao, X., et Bolli, R. (1997) *Circ. Res.* **81**, 404-414
304. Pollock, D. M., Keith, T. L., et Highsmith, R. F. (1995) *FASEB J.* **9**, 1196-1204
305. Prowse, C. N., et Lew, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 99-103

306. Puceat, M., Hilal-Dandan, R., Strulovici, B., Brunton, L. L., et Brown, J. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16938-16944
307. Razani, B., Woodman, S. E., et Lisanti, M. P. (2002) *Pharmacol. Rev.* **54**, 431-467
308. Re, R. N. (2003) *Am. J. Physiol.* **284**, H751-H757
309. Reddy, P. S., et Corley, R. B. (1998) *BioEssays* **20**, 546-554
310. Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., et Prossnitz, E. R. (2005) *Science* **307**, 1625-1630
311. Rhee, S. G. (2001) *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281-312
312. Rigas, A. C., Ozanne, D. M., Neal, D. E., et Robson, C. N. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46087-46093
313. Robia, S. L., Ghanta, J., Robu, V. G., et Walker, J. W. (2001) *Biophys. J.* **80**, 2140-2151
314. Robu, V. G., Pfeiffer, E. S., Robia, S. L., Balijepalli, R. C., Pi, Y., Kamp, T. J., et Walker, J. W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48154-48161
315. Ron, D., Chen, C., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., et D., M.-R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 839-843
316. Ron, D., Jiang, Z., Yao, L., Vagts, A., Diamond, I., et Gordon, A. S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 27039-27046
317. Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., et Anderson, R. G. (1992) *Cell* **68**, 673-682
318. Roy, F., Laberge, G., Douziech, M., Ferland-McCollough, D., et Therrien, M. (2002) *Genes Dev.* **16**, 427-438
319. Rubanyi, G. M., et Polokoff, M. A. (1994) *Pharmacol. Rev.* **46**, 325-415
320. Runnels, L. W., Jenco, J., Morris, A., et Scarlata, S. (1996) *Biochemistry* **35**, 16824-16832
321. Russell, F. D., et Molenaar, P. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 353-359

322. Russell, F. D., Skepper, J. N., et Davenport, A. P. (1998) *Circ. Res.* **83**, 314-321
323. Ruwhof, C., et van der Laarse, A. (2000) *Cardiovasc. Res.* **47**, 23-37
324. Rybin, V. O., et Steinberg, S. F. (1994) *Circ. Res.* **74**, 299-309
325. Rybin, V. O., Xu, X., Lisanti, M. P., et Steinberg, S. F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 41447-41457
326. Rybin, V. O., Xu, X., et Steinberg, S. F. (1999) *Circ. Res.* **84**, 980-988
327. Sabourin, T., Bastien, L., Bachvarov, D. R., et Marceau, F. (2002) *Mol. Pharmacol.* **61**, 546-553
328. Sadoshima, J., et Izumo, S. (1997) *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 551-571
329. Sadoshima, J., Qiu, Z., Morgan, J. P., et Izumo, S. (1995) *Circ. Res.* **76**, 1-15
330. Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Goto, K., et Masaki, T. (1990) *Nature* **348**, 732-735
331. Salahpour, A., Angers, S., et Bouvier, M. (2000) *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 163-168
332. Sanchez, R., MacKenzie, A., Farhat, N., Nguyen, T.-D., Stewart, D. J., Mercier, I., Calderone, A., et Thorin, É. (2002) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **39**, 652-659
333. Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z., et Lisanti, M. P. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 789-807
334. Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., et Weber, M. J. (1998) *Science* **281**, 1668-1671
335. Schiaffino, S., Samuel, J. L., Sassoon, D., Lompre, A. M., Garner, I., Marotte, F., Buckingham, M., Rappaport, L., et Schwartz, K. (1989) *Circ. Res.* **64**, 937-948
336. Schonwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J., et Parker, P. J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 790-798

337. Schreiber, S. S., Oratz, M., Evans, S. M., Gueyikian, I., et Rothschild, M. A. (1970) *Am. J. Physiol.* **219**, 481-486
338. Schroeder, R., London, E., et Brown, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12130-12134
339. Schwartz, K., de la Bastie, D., Bouveret, P., Oliviero, P., Alonso, S., et Buckingham, M. (1986) *Circ. Res.* **59**, 551-555
340. Schweizer, A., Valdenaire, O., Koster, A., Lang, Y., Schmitt, G., Lenz, B., Bluethmann, H., et Rohrer, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20450-20456
341. Schweizer, A., Valdenaire, O., Nelbock, P., Deuschle, U., Dumas Milne Edwards, J. B., Stumpf, J. G., et Loffler, B. M. (1997) *Biochem. J.* **328**, 871-877
342. Scriven, D. R. L., Klimek, A., Lee, K. L., et Moore, E. D. W. (2002) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **976**, 488-499
343. Seo, B., Oemar, B. S., Siebenmann, R., von Segesser, L., et Luscher, T. F. (1994) *Circulation* **89**, 1203-1208
344. Severs, N. J. (2000) *Bioessays* **22**, 188-199
345. Shao, X., Davletov, B. A., Sutton, R. B., Südhof, T. C., et Rizo, J. (1996) *Science* **273**, 248-251
346. Shapiro, D. A., Kristiansen, K., Weiner, D. M., Kroeze, W. K., et Roth, B. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 11441-11449
347. Sharkey, N. A., et Blumberg, P. M. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 1051-1056
348. Shimada, K., Takahashi, M., Ikeda, M., et Tanzawa, K. (1995) *FEBS Lett.* **371**, 140-144
349. Shimada, K., Takahashi, M., et Tanzawa, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18275-18278

350. Shin, H.-G., Barnett, J. V., Chang, P., Reddy, S., Drinkwater, D. C., Pierson, R. N., Wiley, R. G., et Murray, K. T. (2000) *Cardiovasc. Res.* **48**, 285-299
351. Shmukler, Y. B., et Buznikov, G. A. (1998) *Persp. Dev. Neurobiol.* **5**, 469-480
352. Shraga-Levine, Z., et Sokolovsky, M. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **246**, 495-500
353. Shraga-Levine, Z., et Sokolovsky, M. (2000) *Cell. Mol. Neurobiol.* **20**, 305-317
354. Shubeita, H. E., McDonough, P. M., Harris, A. N., Knowlton, K. U., Glembotski, C. C., Brown, J. H., et Chien, K. R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20555-20562
355. Silvestre, J. S., Robert, V., Heymes, C., Aupetit-Faisant, B., Mouas, C., Moalic, J. M., Swynghedauw, B., et Delcayre, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 4883-4891
356. Simonson, M. S., et Dunn, M. J. (1991) *Hypertension* **17**, 856-863
357. Simonson, M. S., et Herman, W. H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9347-9357
358. Smart, E. J., Ying, Y. S., Mineo, C., et Anderson, R. G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10104-10108
359. Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Lannigan, D. A., Freed, T. A., Zoltoski, A. J., et Sturgill, T. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 31588-31593
360. Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Malarkey, K., et Sturgill, T. W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 2893-2898
361. Sokolovsky, M. (1991) *Trends Biochem. Sci.* **16**, 261-264
362. Sokolovsky, M. (1993) *Receptors Channels* **1**, 295-304
363. Sokolovsky, M., Ambar, I., et Galron, R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20551-20554

364. Sonnenberg, E. D., Gao, T., et Newton, A. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45289-45297
365. Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M., et Field, L. J. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, H2183-H2189
366. Sossin, W. S., et Schwartz, J. H. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 207-208
367. Sotgia, F., Razani, B., Bonuccelli, G., Schubert, W., Battista, M., Lee, H., Capozza, F., Schubert, A. L., Minetti, C., Buckley, J. T., et Lisanti, M. P. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3905-3926
368. Sournia, J. C. (1992) *Histoire de la Médecine. Histoire des sciences* (Fisher, J.-L., Ed.), Composition Facompo, Paris
369. Spann, J. F. J., Buccino, R. A., Sonnenblick, E. H., et Brauwald, E. (1967) *Circ. Res.* **21**, 341-354
370. Stannard, C., Lehenkari, P., et Godovac-Zimmermann, J. (2003) *Biochemistry* **42**, 13909-13918
371. Starksen, N. F., Simpson, P. C., Bishopric, N., Coughlin, S. R., Lee, W. M., Escobedo, J. A., et Williams, L. T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 8348-8350
372. Steinberg, S. F., Goldberg, M., et Rybin, V. O. (1995) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 141-153
373. Stewart, D. J., Kubac, G., Costello, K. B., et Cernacek, P. (1991) *J. Am. Coll. Cardiol.* **18**, 38-43
374. Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M., et Hancock, J. F. (1994) *Science* **264**, 1463-1467
375. Strasser, R. H., Briem, S. K., Vahl, C. F., Lang, R., Hagl, S., et Kübler, W. (1996) *Circulation* **94**, I554 (abstr.)
376. Sugden, P. H. (2001) *Ann. Med.* **33**, 611-622
377. Sugden, P. H., et Clerk, A. (1997) *Cell. Signal.* **9**, 337-351

378. Sugie, K., Murayama, K., Noguchi, S., Murakami, N., Mochizuki, M., Hayashi, Y. K., Nonaka, I., et Nishino, I. (2004) *Neuromuscul. Disord.* **14**, 810-814
379. Suzuki, T., Hoshi, H., et Mitsui, Y. (1990) *Febs Lett* **268**, 149-151
380. Suzuki, T., Kumazaki, T., et Mitsui, Y. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 823-830
381. Swynghedauw, B. (1999) *Physiol. Rev.* **79**, 215-262
382. Takagi, Y., Ninomiya, H., Sakamoto, A., Miwa, S., et Masaki, T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10072-10078
383. Takahashi, M., Fukuda, K., Shimada, K., Barnes, K., Turner, A. J., Ikeda, M., Koike, H., Yamamoto, Y., et Tanzawa, K. (1995) *Biochem. J.* **311**, 657-665
384. Takahashi, N., Calderone, A., Izzo, N. J. J., Maki, T. M., Marsh, J. D., et Colucci, W. S. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 1470-1476
385. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., et Nishizuka, Y. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3692-3695
386. Takihara, Y., Matsuda, Y., et Hara, J. (2000) *Carcinogenesis* **21**, 2073-2077
387. Tang, Z. L., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F., et Lisanti, M. P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2255-2261
388. Tanoue, T., Moriguchi, T., et Nishida, E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19949-19956
389. Tanoue, T., et Nishida, E. (2002a) *Pharmacol. Ther.* **93**, 193-202
390. Tanoue, T., et Nishida, E. (2003) *Cell. Signal.* **15**, 455-462
391. Tanoue, T., Yamamoto, T., Maeda, R., et Nishida, E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26629-26639
392. Tanoue, T., Yamamoto, T., et Nishida, E. (2002b) *J. Biol. Chem.* **277**, 22942-22949

393. Tardif, M., Savard, M., Flamand, L., et Gosselin, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24148-24154
394. Taylor, S. S., et Radzio-Andzelm, E. (1994) *Structure* **2**, 345-355
395. Teis, D., Wunderlich, W., et Huber, L. A. (2002) *Dev. Cell* **3**, 803-814
396. Tekirian, T. L. (2002) *Exp. Cell Res.* **281**, 9-18
397. Therrien, M., Chang, H. C., Solomon, N. M., Karim, F. D., Wassarman, D. A., et Rubin, G. M. (1995) *Cell* **83**, 879-888
398. Thibault, G., Arguin, C., et Garcia, R. (1995) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**, 2327-2336
399. Thomas, P. B., Liu, E. D. K., Webb, M. L., Mukherjee, R., Hebbar, L., et Spinale, F. G. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, H2629-H2637
400. Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., et Van Deurs, B. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 238-250
401. Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M., et Zuker, C. S. (1997) *Nature* **388**, 243-249
402. Tsutakawa, S. E., Medzihradzsky, K. F., Flint, A. J., Burlingame, A. L., et Koshland, D. E., Jr. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26807-26812
403. Valdenaire, O., Lepailleur-Enouf, D., Egidy, G., Thouard, A., Barret, A., Vranckx, R., Tougard, C., et Michel, J. B. (1999) *Eur. J. Biochem.* **264**, 341-349
404. Vanheugten, H. A. A., Eskildsenhelmond, Y. E. G., Dejonge, H. W., Bezstarosti, K., et Lamers, J. M. J. (1996) *Mol. Cell. Biochem.* **157**, 5-14
405. Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., et Cooper, J. A. (1993) *Cell* **74**, 205-214
406. Waggoner, W. G., Genova, S. L., et Rash, V. A. (1992) *Life Sci.* **51**, 1869-1876

407. Wakasaki, H., Koya, D., Schoen, F. J., Jirousek, M. R., Ways, D. K., Hoit, B. D., Walsh, R. A., et King, G. L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9320-9325
408. Wang, Y. G., et Ashraf, M. (1998) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 2423-2435
409. Wartmann, M., et Davis, R. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6695-6701
410. Wartmann, M., Hofer, P., Turowski, P., Saltiel, A. R., et Hynes, N. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3915-3923
411. Watanabe, T., Kusumoto, K., Kitayoshi, T., et Shimamoto, N. (1989a) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**, S108-S111
412. Watanabe, T. X., Kumagaye, S., Nishio, H., Nakajima, K., Kimura, T., et Sakakibara, S. (1989b) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**, S207-S208
413. White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M., et Marshall, F. H. (1998) *Nature* **396**, 679-682
414. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., et Jonhson, G. L. (1999) *Physiol. Rev.* **79**, 143-180
415. Wientzek, M., Allen, B. G., McDonald-Jones, G., et Katz, S. (1997) *Mol. Cell. Biochem.* **166**, 11-23
416. Wiggers, C. J. (1928) *The Pressure Pulses in the Cardiovascular System* (Longmans, G., Ed.), London
417. Wilker, E., et Yaffe, M. B. (2004) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**, 633-642
418. Williams, T. M., et Lisanti, M. P. (2004) *Ann. Med.* **36**, 584-595
419. Winston, L. A., et Hunter, T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30837-30840
420. Woodgett, J. R., Gould, K. L., et Hunter, T. (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**, 177-184

421. Woodman, S. E., Park, D. S., Cohen, A. W., Cheung, M. W., Chandra, M., Shirani, J., Tang, B., Jelicks, L. A., Kitsis, R. N., Christ, G. J., Factor, S. M., Tanowitz, H. B., et Lisanti, M. P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38988-38997
422. Wreggett, K. A., et Wells, J. W. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22488-22499
423. Wu-Wong, J. R., Chiou, W. J., Magnuson, S. R., et Opgenorth, T. J. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1224**, 288-294
424. Wunderlich, W., Fialka, I., Teis, D., Alpi, A., Pfeifer, A., Parton, R. G., Lottspeich, F., et Huber, L. A. (2001) *J. Cell Biol.* **152**, 765-776
425. Wyse, B. D., Prior, I. A., Qian, H., Morrow, I. C., Nixon, S., Muncke, C., Kurzchalia, T. V., Thomas, W. G., Parton, R. G., et Hancock, J. F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 23738-23746
426. Xia, K., Mukhopadhyay, N. K., Inhorn, R. C., Barber, D. L., Rose, P. E., Lee, R. S., Narsimhan, R. P., D'Andrea, A. D., Griffin, J. D., et Roberts, T. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 11681-11686
427. Xing, H., Zhang, S., Weinheimer, C., Kovacs, A., et Muslin, A. J. (2000) *EMBO J.* **19**, 349-358
428. Xing, H. R., Campodonico, L., et Kolesnick, R. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 26210-26214
429. Xu, B., Stippec, S., Robinson, F. L., et Cobb, M. H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26508-26515
430. Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D., et Yanagisawa, M. (1994) *Cell* **78**, 473-485
431. Yamada, E. (1955) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 445-458
432. Yamaguchi, T., Murata, Y., Fujiyoshi, Y., et Doi, T. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 1816-1827

433. Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Hiroi, Y., Mizuno, T., Maemura, K., Kurihara, H., Aikawa, R., Takano, H., et Yazaki, Y. (1996a) *J. Biol. Chem.* **271**, 3221-3228
434. Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y. Z., Shiojima, I., Hiroi, Y., Mizuno, T., Maemura, K., Kurihara, H., Aikawa, R., Takano, H., et Yazaki, Y. (1996b) *J. Biol. Chem.* **271**, 3221-3228
435. Yanagisawa, H., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Emoto, N., Williams, S. C., Takeda, S., Clouthier, D. E., et Yanagisawa, M. (2000) *J. Clin. Invest.* **105**, 1373-1382
436. Yanagisawa, M., Inoue, A., Ishikawa, T., Kasuya, Y., Kimura, S., et Kumagaye, S. (1988a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 6964-6967
437. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tombe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., et Masaki, T. (1988b) *Nature* **332**, 411-415
438. Yang, C., et Kazanietz, M. G. (2003) *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 602-608
439. Yorikane, R., Sakai, S., Miyauchi, T., Sakurai, T., Sugishita, Y., et Goto, K. (1993) *FEBS Lett.* **332**, 31-34
440. Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H., et Goldsmith, E. J. (1994) *Nature* **367**, 704-711
441. Zhao, Y. Y., Liu, Y., Stan, R. V., Fan, L., Gu, Y., Dalton, N., Chu, P. H., Peterson, K., Ross, J. J., et Chien, K. R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11375-11380
442. Zhuo, J. L., Imig, J. D., Hammond, T. G., Orengo, S., Benes, E., et Navar, L. G. (2002) *Hypertension* **39**, 116-121
443. Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Le Good, J. A., Whelan, R. D. H., Kelly, J. J., Frech, M. M., Hemmings, B. A., et Parker, P. J. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 522-529

