



HAL
open science

Implication de la sous-unité α_4 des canaux calciques voltage dépendants dans la régulation de l'expression génique

Katell Fablet

► **To cite this version:**

Katell Fablet. Implication de la sous-unité α_4 des canaux calciques voltage dépendants dans la régulation de l'expression génique. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV052 . tel-00716335

HAL Id: tel-00716335

<https://theses.hal.science/tel-00716335>

Submitted on 10 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Neurosciences - Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Katell FABLET

Thèse dirigée par **Dr Michel De Waard**

préparée au sein du **Laboratoire Canaux calciques, Fonctions et Pathologies** de l'**Institut des Neurosciences de Grenoble** dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Implication de la sous-unité β_4 des canaux calciques voltage dépendants dans la régulation de l'expression génique

Thèse soutenue publiquement le **11 octobre 2011**,
devant le jury composé de :

Pr Gilles FAURY

Professeur, Université Joseph Fourier, HP2, Président

Dr Pierre CHARNET,

DR2, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire de Montpellier, Rapporteur

Dr Laurent SACHS,

DR2, Muséum National d'Histoire Naturelle, Rapporteur

Dr Florian LESAGE,

DR1, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université Nice Sophia Antipolis,
Examineur

Dr Michel DE WAARD

DR1, Institut des Neurosciences de Grenoble, Directeur de thèse



Résumé

Les canaux calciques dépendants du voltage (CCVD) sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la libération de neurotransmetteurs, la contraction musculaire ou encore la régulation de l'expression génique. Les CCVD sont constitués d'une sous-unité canalaire (α_1 ou Ca_v) par laquelle les ions Ca^{2+} entrent dans le milieu intracellulaire, associée à différentes sous-unités auxiliaires, $\alpha_2\delta$, β et γ qui régulent leur fonction. Ma thèse a contribué à la mise en évidence d'une nouvelle voie de régulation du couplage excitation-transcription impliquant la sous-unité β_4 des CCVD. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à la compréhension des déterminants de l'entrée de β_4 dans le noyau et aux mécanismes de régulation de l'expression génique par cette sous-unité des CCVD. Un modèle animal nous a été particulièrement utile, la souris léthargique (*lh*), déficiente pour la sous-unité β_4 et considérée comme un modèle d'étude de l'épilepsie-absences.

Une translocation de β_4 du cytoplasme vers le noyau est observée au cours de la différenciation neuronale. Cette translocation est dépendante de l'intégrité structurale de β_4 et plus précisément de l'interaction de ses domaines SH3 (Src Homology 3) et GK (Guanylate Kinase). La translocation de β_4 au noyau nécessite son association avec un partenaire : la sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 2A (PP2A), B56 δ . La dépolarisation membranaire permet un décrochage de β_4 du canal et son association à B56 δ . β_4 migre donc vers le noyau sous forme de complexe avec B56 δ /PP2A.

Une étude transcriptomique réalisée pour comparer le profil d'expression dans le cervelet de souris *lh* par rapport aux souris wild-type a montré l'implication de β_4 dans la répression et l'activation d'un certain nombre de gènes. Particulièrement β_4 réprime fortement l'expression du gène qui code pour la tyrosine hydroxylase (TH). Dans le noyau, β_4 interagit avec un facteur de transcription, le récepteur aux hormones thyroïdiennes α (TR α). Cette association permet au complexe β_4 /B56 δ /PP2A de cibler la région promotrice du gène TH comme cela a été montré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Le complexe β_4 /B56 δ /PP2A est capable de s'associer aux histones et de déphosphoryler spécifiquement les histones H3 en Ser¹⁰ au niveau de la région promotrice du gène TH. Cette modification de la chromatine est corrélée avec le recrutement de Heterochromatin Protein 1 γ (HP1 γ) au niveau du promoteur du gène TH. HP1 γ est impliquée dans la formation d'hétérochromatine et pourrait expliquer la répression de l'expression du gène TH. Ainsi dans le cervelet de souris *lh*, l'absence de β_4 déclenche un dérèglement de cette voie de signalisation qui entraîne la sur-expression du gène TH.

La mutation humaine R482X à l'origine de la délétion d'une partie du domaine C-terminal de β_4 et responsable d'une forme d'épilepsie juvénile myoclonique, perturbe la localisation nucléaire de β_4 . En effet, le mutant β_{1-481} incapable de s'associer à B56 δ /PP2A et de migrer au noyau n'interagit pas avec les histones. La voie de signalisation permettant la régulation de l'expression génique par β_4 n'est donc plus assurée par le mutant.

Ainsi, la fonction de β_4 ne se limite pas à son action cytoplasmique en tant que sous-unité auxiliaire des CCVD. En effet, ce travail montre combien dans le noyau, β_4 , joue un rôle important dans la régulation de l'expression génique.

Abstract

Voltage dependent calcium channels (VDCC) participate to various cellular processes such as neurotransmitters release, muscular contraction or gene expression regulation. VDCC are composed of a pore-forming subunit (α_1 or Ca_v), that allows Ca^{2+} to enter the cells associated with auxiliary subunits, $\alpha_2\delta$, β and γ . My thesis studies on a new signaling pathway in which the β_4 subunit of VDCC couples neuronal excitability to transcription. In particular it focuses on the understanding of the β_4 nuclear translocation determinants and the mechanisms of gene expression regulation by this VDCC subunit.

β_4 translocation from the cytoplasm to the nucleus is observed during neuronal differentiation. This translocation depends on β_4 structural integrity and more precisely on interaction between the β_4 SH3 (Src Homology 3) and GK (Guanylate Kinase) domains. β_4 nuclear translocation is conditioned by its association with a partner: the regulatory subunit of phosphatase protein 2A (PP2A), B56 δ . Membrane depolarization induces β_4 channel uncoupling and association with B56 δ . Thus, β_4 migrates to the nucleus in complex with B56 δ /PP2A.

A study on gene expression generated by microarray was carried on to compare profiles of gene expression in lethargic (*lh*) mice, considered as spontaneous β_4 KO with wild-type (WT) mice cerebellum. This study proved the influence of β_4 on the repression and the activation of certain genes. Particularly, β_4 strongly represses tyrosine hydroxylase (TH) gene expression. In the nucleus, β_4 interacts with a transcription factor: the thyroid hormone receptor α (TR α). This association allows β_4 /B56 δ /PP2A complex to target the TH gene promoter as shown by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. This complex is also able to associate itself with histones and dephosphorylate Ser¹⁰ histone H3 in the TH gene promoter. This chromatin modification is correlated with HP1 γ (Heterochromatin Protein 1 γ) recruitment in the TH gene promoter. HP1 γ is known to promote heterochromatin formation that could explain the TH gene repression by β_4 . Thus, in *lh* mice cerebellum, the absence of β_4 triggers a complete disorganization of this signaling pathway that results in the up-regulation of the TH gene.

R482X, the human mutation inducing the C-terminus domain deletion of β_4 and responsible for a form of juvenile myoclonic epilepsy prevents β_4 nuclear localization. In fact, the mutant β_{1-481} unable to associate with B56 δ /PP2A and to migrate to the nucleus does not interact with HP1 γ and histones. The signaling pathway allowing gene regulation by β_4 is prevented by the mutant.

Thus, β_4 does not play a confined role in the cytoplasm as CCVD auxiliary subunit but also functions in the nucleus as a gene expression regulator.

Table des matières

Liste des Abréviations.....	1
Rappels bibliographiques	3
Introduction.....	4
Chapitre 1. Canaux calciques dépendants du voltage et transcription	5
1. Différentes voies d'entrée du calcium	5
1.1. Les canaux calciques dépendants du voltage.....	5
1.2. Les récepteurs-canaux.....	6
1.3. Les canaux activés par des seconds messagers.....	7
1.4. Les stocks intracellulaires	7
2. Différentes voies de régulation de la transcription dépendantes du calcium	7
2.1. Voie CREB	7
2.2. Voie MEF-2	9
2.3. Voie NFAT	10
2.4. Voie DREAM.....	11
2.5. Voie NFκB	11
3. CCVD et régulation de la transcription.....	12
3.1. Implication des CCVD dans la régulation de l'expression génique	12
3.2. Régulation indirecte de facteurs de transcription par l'entrée d'ions Ca^{2+} à travers les CCVD.....	13
3.3. Régulation des facteurs de transcription par des protéines activées par les ions Ca^{2+} associées aux CCVD	17
3.4. Facteurs de transcription directement régulés par les ions Ca^{2+}	19
3.5. Régulation directe de la transcription par certains composants des CCVD	20
Chapitre 2. La sous-unité β_4 des CCVD.....	23
1. β_4 , une sous-unité régulatrice des CCVD.....	23
1.1. Différentes sous-unité β	23

1.2.	β_4 , un membre des protéines MAGUK	25
1.3.	Implication de β_4 dans l'assemblage, l'ancrage à la membrane et la régulation des CCVD.....	27
1.4.	Mutations de la sous-unité β_4 et leur implication sur la modulation des propriétés biophysiques des CCVD	29
2.	Interaction de la sous-unité β avec d'autres protéines.....	33
2.1.	Interaction avec les protéines RGK	33
2.2.	Interaction avec HP1 γ	34
2.3.	Interaction avec les protéines synaptiques.....	34
2.4.	Interaction avec la dynamine	35
2.5.	Interaction avec la bestrophine.....	35
2.6.	Interaction avec les canaux potassiques à large conductance activés par le voltage et les ions Ca ²⁺	36
2.7.	Interaction avec le transporteur du Zinc 1	36
2.8.	Interaction avec Ahnak.....	37
3.	La souris léthargique, un modèle approprié d'étude du rôle de β_4	37
3.1.	La souris <i>lh</i> : un phénotype complexe	38
3.2.	Une mutation du gène codant pour la sous-unité β_4 des CCVD à l'origine du phénotype <i>lh</i>	39
3.3.	Souris <i>lh</i> : un modèle d'épilepsie d'absence	40
3.4.	Le remaniement des sous-unités β compense l'absence de β_4 dans la souris <i>lh</i>	42
Chapitre 3. Récepteur aux hormones thyroïdiennes alpha		44
1.	Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes	44
2.	Mécanismes d'actions de TR	46
2.1.	Répression de la transcription par TR en absence de T3	47
2.2.	Activation de la transcription par TR lié à T3	49
2.3.	Cas des gènes négativement régulés	50
3.	Rôle physiologique de TR α dans le cerveau.....	51

Résultats	54
Revue 1 :	55
Introduction.....	56
Conclusion	57
Revue 2 :	58
Introduction.....	59
Conclusion	60
Article 1 :	61
Introduction.....	62
Matériel et méthodes.....	64
Cultures de lignées cellulaires	64
Transfections cellulaires	64
Immunocytochimie.....	66
Imagerie confocale et calcul des ratios noyau/cytoplasme de la sous-unité β_4	67
Préparation d'homogénat protéique	67
Immunoprécipitation	69
Test d'activité phosphatase.....	69
Test d'activité luciférase.....	69
Protocole d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	71
Conclusion	80
Conclusion et perspectives.....	81
Annexes	87
Annexe 1.....	88
Annexe 2.....	89
Références bibliographiques.....	90

Liste des Abréviations

4-AP	4-aminopyridine
AID	α Interacting Domain
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
Best1	Bestrophine 1
BID	β Interacting Domain
BKCa	canaux potassiques à large conductance activés par le voltage et les ions Ca^{2+}
bZIP	basic leucine Zipper
CA1	Corne d'Amon 1
CaMK	Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein Kinase
CaMKK	CaMK kinase
CBP	CREB Binding Protein
CCAT	Calcium Channel Associated Transcriptional regulator
CCVD	Canaux Calciques Voltage Dépendants
ChIP	Chromatine Immunoprecipitation
CoIP	Co-immunoprécipitation
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CSD	Chromo Shadow Domain
DNA-PK	protéine kinase dépendante de l'ADN
DRE	Downstream Response Element
DREAM	Downstream Response Element Antagonist Modulator
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
GK	Guanylate Kinase
GTP	Guanosine Triphosphate)
HDAC	Histone Deacetylase
HP1 γ	Heterochromatin Protein 1 γ
IP ₃	Inositol 1,4,5 triphosphate
KO	Knock-out
<i>Lh</i>	Léthargique
MAGUK	Membrane-Associated Guanylate Kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF-2	Myocyte Enhancer Factor 2

N-CoR	Nuclear receptor Co-Repressor
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NGF	Nerve Growth Factor
NLS	Nuclear Localisation Signal
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PP1	Protéine Phosphatase 1
PP2A/B	Protéine Phosphatase 2A ou 2B
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SERCA	Sarco/endo-plasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPases
SH3	Src Homology 3
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid-hormones receptor
SOC	Store-operated channel
SRC	Steroid Hormone Receptor
T3	Tri-iodothyronine
T4	Tétra-iodothyronine ou thyroxine
TH	Tyrosine Hydroxylase
TORC	Transducers of Regulated CREB activity
TR	Récepteur aux hormones thyroïdiennes
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TTX	Tétradotoxine
WT	Wild-Type
ZnT-1	Zinc transporter 1

Rappels bibliographiques

Introduction

Ma thèse a porté sur l'étude d'une sous-unité auxiliaire des canaux calciques dépendants du voltage (CCVD), la sous-unité β_4 et son rôle nucléaire sur la régulation de l'expression génique. Ce travail s'inscrit naturellement dans le cadre d'études sur les CCVD et leur implication dans la régulation de la transcription. Dans la première partie des rappels bibliographiques de cette thèse, je ferai donc une synthèse des travaux portant sur la régulation directe ou indirecte par les CCVD de l'expression génique. Dans une deuxième partie, je m'intéresserai plus particulièrement à la sous-unité β_4 , sa fonction de sous-unité auxiliaire des CCVD, ses interactions avec de nombreuses protéines et je présenterai un modèle animal d'étude de β_4 , la souris léthargique (*lh*) considérée comme un KO naturel de β_4 . Enfin je profiterai d'une troisième partie, pour aborder le rôle d'un facteur de transcription, le récepteur aux hormones thyroïdiennes α ($TR\alpha$) dont j'ai découvert l'interaction avec β_4 au cours de ma thèse et qui constitue un élément très important de la voie de régulation par β_4 de l'expression génique.

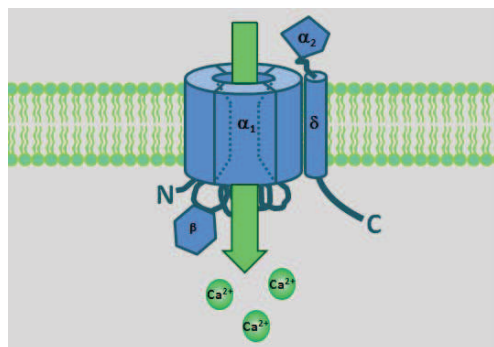
Chapitre 1. Canaux calciques dépendants du voltage et transcription

Le calcium et plus précisément l'ion Ca^{2+} constitue un signal intracellulaire ubiquitaire important contrôlant un grand nombre de processus cellulaires tels que la libération de neurotransmetteurs, le couplage excitation-contraction ou encore la régulation de l'expression génique. Avec une concentration calcique extracellulaire de l'ordre de 2 mM, la concentration cytosolique de 10 à 100 nM est maintenue grâce à un équilibre entre les influx et les efflux de calcium finement régulé. Même un faible flux de calcium augmente de façon significative la concentration de calcium intracellulaire. Le flux d'ions Ca^{2+} qui s'établit dans le sens de son fort gradient de concentration en réponse aux signaux extracellulaires constitue un moyen de transmettre rapidement ces signaux à travers la membrane plasmique.

1. Différentes voies d'entrée du calcium

1.1. Les canaux calciques dépendants du voltage

Plusieurs entrées dans la cellule sont possibles pour les ions Ca^{2+} . Les canaux calciques dépendants du voltage (CCVD) qui tirent leur nom de leur régulation par les changements de voltage de la membrane plasmique, forment la principale voie d'entrée du calcium dans les cellules excitables (Davila 1999). Ces canaux sont fermés lors de l'hyperpolarisation de la membrane plasmique et s'ouvrent en cas de dépolarisation de la membrane plasmique. Les CCVD se divisent en plusieurs classes : les canaux activés à haut voltage qui comprennent les canaux de type-L, -P/Q, -N et -R et les canaux activés à bas voltage avec les canaux de type-T. Ces CCVD sont constitués par une sous-unité



canalaire α_1 ou Ca_v -qui forme le pore par lequel circulent les ions Ca^{2+} - différente suivant le type de CCVD (voir Tableau 1). A cette sous-unité α_1 , s'associent les sous-unités auxiliaires β , $\alpha_2\delta$ et γ (voir Figure 1). Elles sont impliquées dans l'assemblage, le ciblage et l'ancrage des canaux à la membrane et sont responsables de la modulation des paramètres biophysiques des CCVD.

Figure 1. Les CCVD sont composés de plusieurs sous-unités

Dans les neurones, les CCVD accomplissent plusieurs fonctions comme l'intégration au niveau des dendrites des signaux électriques entrants ou encore la libération de neurotransmetteurs. On mesure leur importance physiologique, en cas de mutations génétiques qui peuvent occasionner de nombreuses pathologies comme l'épilepsie, les migraines, l'ataxie, les myopathies...

Dépendance au voltage	Classification biophysique	Classification moléculaire	Nomenclature structurale
Canaux activés à haut voltage	Type L	α_{1S}	Ca _v 1.1
		α_{1C}	Ca _v 1.2
		α_{1D}	Ca _v 1.3
		α_{1F}	Ca _v 1.4
	Type P/Q	α_{1A}	Ca _v 2.1
	Type N	α_{1B}	Ca _v 2.2
	Type R	α_{1E}	Ca _v 2.3
Canaux activés à bas voltage	Type T	α_{1G}	Ca _v 3.1
		α_{1H}	Ca _v 3.2
		α_{1I}	Ca _v 3.3

Tableau 1. Canaux calciques dépendants du voltage

1.2. Les récepteurs-canaux

Les récepteurs-canaux forment une autre voie d'entrée du calcium extracellulaire. Ce sont des canaux ioniques multimériques perméables aux ions Ca²⁺ et/ou aux ions Na⁺, K⁺ et Cl⁻, modulés par des agonistes extérieurs comme les hormones ou les neurotransmetteurs. Les récepteurs acétylcholinergiques nicotiniques font partie de cette catégorie de canaux. La fixation de l'acétylcholine ou de la nicotine entraîne l'ouverture du canal favorisant l'entrée de calcium extérieur. Les récepteurs glutamatergiques : récepteurs α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) et récepteurs N-Methyl-D-aspartate (NMDA) sont également considérés comme des récepteurs-canaux. En effet, ils sont spécifiquement activés en réponse à la fixation de glutamate. Ces deux types de récepteurs-canaux ont des propriétés biophysiques différentes. Les récepteurs NMDA s'activent lentement à la suite de la dépolarisation de la membrane et la fixation du glutamate sur le récepteur et s'inactivent lentement et de façon incomplète tandis que les récepteur AMPA s'activent rapidement et se désensibilisent en quelques millisecondes.

1.3. Les canaux activés par des seconds messagers

Les canaux activés par des seconds messagers constituent également une voie d'entrée du calcium dans la cellule, ils sont contrôlés par des messagers intracellulaires. Il s'agit des canaux cationiques nucléotides cycliques dépendants, des canaux calciques régulés par l'acide arachidonique et des canaux TRPC (Transient Receptor Potential Canonical). Dans ce dernier groupe de canaux, TRPC6 laissant passer préférentiellement les ions Ca^{2+} et Na^+ , est activé par les récepteurs couplés aux protéines G.

1.4. Les stocks intracellulaires

Une grande part du calcium utilisé pour la signalisation provient des stocks intracellulaires. Ces stocks intracellulaires sont constitués par le réticulum endoplasmique et le réticulum sarcoplasmique. La libération d'ions Ca^{2+} dans le cytoplasme peut se faire à la suite de la fixation de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) sur un canal calcique dépendant de l' IP_3 situé sur la membrane du réticulum endoplasmique. Dans le muscle, l'augmentation intracellulaire d'ions Ca^{2+} initialement présents dans le réticulum sarcoplasmique est à l'origine de la contraction musculaire. La sortie des ions Ca^{2+} est médiée par un canal spécifique du calcium; ce canal ayant une forte affinité pour la ryanodine est appelé récepteur à la ryanodine. Ces stocks intracellulaires ont une capacité limitée, ainsi leur régulation est finement assurée au niveau du réticulum. Les pompes SERCA (Sarco/endo-plasmic Reticulum Ca^{2+} ATPases) recyclent le calcium libéré. Les SOCs (Store-operated channels) quant à eux s'ouvrent lorsque le réticulum se vide de ses ions Ca^{2+} assurant ainsi le maintien des stocks calciques internes.

Si chacune de ces voies d'entrée du calcium conduit à une augmentation significative du calcium intracellulaire, nous verrons par la suite que les réponses en termes de régulation des gènes diffèrent.

2. Différentes voies de régulation de la transcription dépendantes du calcium

2.1. Voie CREB

L'expression des gènes-dépendants de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) est contrôlée par différents facteurs de transcription incluant CREB (cAMP Response Element Binding Protein). CREB régule différentes fonctions biologiques telles le métabolisme du glucose, la plasticité

neuronale, la mémoire, etc... Ce facteur de transcription se lie au niveau du site CRE (cAMP response element) du promoteur de ces gènes sous forme de dimère. Cette association au site CRE nécessite le recrutement du coactivateur CBP (CREB binding protein)/p300 favorisé par la phosphorylation de CREB au niveau de Ser¹³³ (Vo et Goodman 2001). Autrement dit, l'état de phosphorylation de CREB notamment au niveau de Ser¹³³ est important pour son activité transcriptionnelle. C'est sous sa forme phosphorylée (pCREB) que CREB est capable d'activer la transcription de gènes tels que c-fos ou BDNF. Il est important de noter que la phosphorylation de Ser¹⁴² and Ser¹⁴³ s'ajoutant à la phosphorylation de Ser¹³³ de CREB perturbe l'interaction de CREB avec son cofacteur CBP (Kornhauser, Cowan et al. 2002).

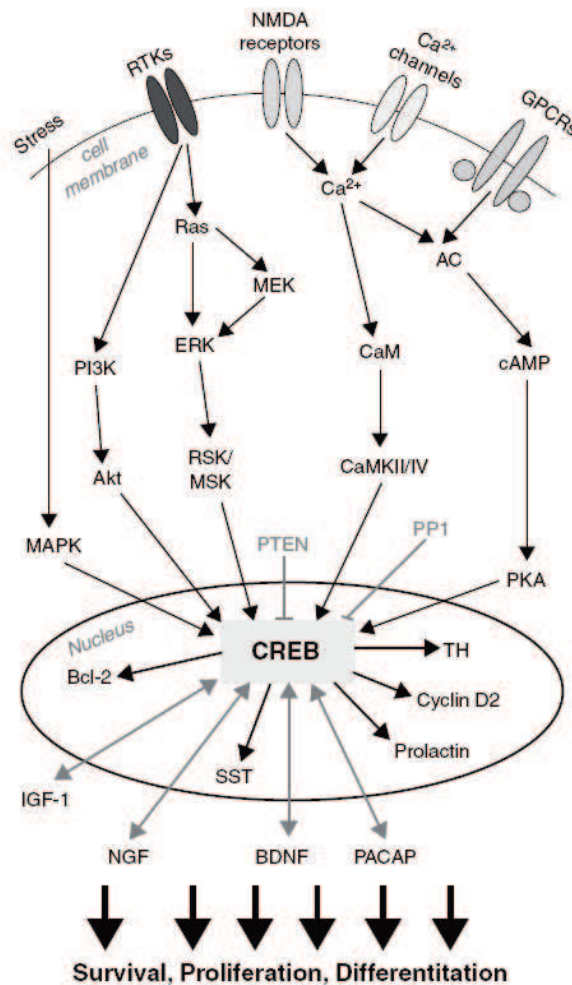


Figure 2. Voie de signalisation CREB

La phosphorylation de CREB au niveau de Ser¹³³ peut se faire par plusieurs kinases, PKA (protein kinase A), PKC (Protein Kinase C), MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), p38 ou encore CaMK (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase) et CaMKK (CaMK kinase) (voir Figure 2). Le recrutement de CBP au niveau de Ser¹³³ phosphorylée nécessite préalablement

la phosphorylation Ca^{2+} et CaMKIV dépendante de CBP au niveau Ser³⁰¹. Cette phosphorylation modifierait les capacités de transactivation de CBP et notamment son activité histones acétyltransférase. En effet CBP/p300 modifie l'organisation des histones et de la chromatine favorisant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle au niveau des promoteurs contenant CRE. Par ailleurs un autre élément est déterminant pour l'activation de CREB. Il s'agit du coactivateur TORC (transducers of Regulated CREB activity). TORC sous des conditions non stimulées est sous forme phosphorylé et séquestré dans le cytoplasme. Une fois déphosphorylé en réponse aux signaux Ca^{2+} et AMPc, il est transloqué au noyau (Sasaki, Takemori et al. 2011). TORC active la transcription en ciblant sous forme de tétramère, le domaine bZIP (basic leucine zipper) de CREB de manière indépendante à la phosphorylation de CREB (Phu, Wallbach et al. 2011).

2.2. Voie MEF-2

La famille des facteurs de transcription MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor 2) est impliquée dans la régulation de nombreux gènes spécifiques des muscles. Chez les vertébrés, quatre gènes MEF-2 (MEF-2 A-D) identifiés codent pour différents transcrits ; chaque transcrit possédant différents variants d'épissage. Les protéines MEF-2 lient leur séquence d'ADN cible sous forme d'homodimère ou d'hétérodimères avec les autres protéines MEF-2. A l'état de repos dans la cellule, les protéines MEF-2 agissent au sein d'un complexe répresseur qui comprend des histones déacétylases et des protéines liées à la calmoduline. Par exemple, l'interaction des protéines MEF-2 avec HDAC 4 et 5 (histone deacetylase 4 et 5) est à l'origine de la répression du promoteur c-jun (Wang, Bertos et al. 1999). MEF-2 B et D séquestré par Cabin 1 en complexe avec HDAC 1 est responsable de la répression de Nurr 77 (Youn, Chatila et al. 2000). Lors de l'activation des voies de signalisation intracellulaire entraînant l'augmentation des complexes Ca^{2+} /calmoduline, MEF-2 se dissocie du complexe répresseur. Ces mécanismes dépendants du calcium favoriseraient la phosphorylation des HDACs conduisant à leur sortie du noyau et en conséquence l'activation des gènes ciblés par MEF-2.

2.3. Voie NFAT

La famille des facteurs de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) est impliquée dans les processus développementaux des vertébrés et la morphogénèse mais aussi dans la réponse immunitaire (Medyouf et Ghysdael 2008). NFAT est activé en réponse à l'augmentation du calcium intracellulaire qui active une phosphatase sérine/thréonine, la calcineurine autrement appelée protéine phosphate 2B (PP2B) (Clipstone et Crabtree 1992). Cette phosphatase enlève directement plusieurs résidus phosphate au niveau de la partie N-terminale de la protéine NFATc qui correspond à la sous-unité Ca^{2+} -calcineurine-sensible du complexe de transcription NFAT. Ces modifications permettent une translocation nucléaire rapide de NFATc (Crabtree et Schreiber 2009) (voir Figure 3).

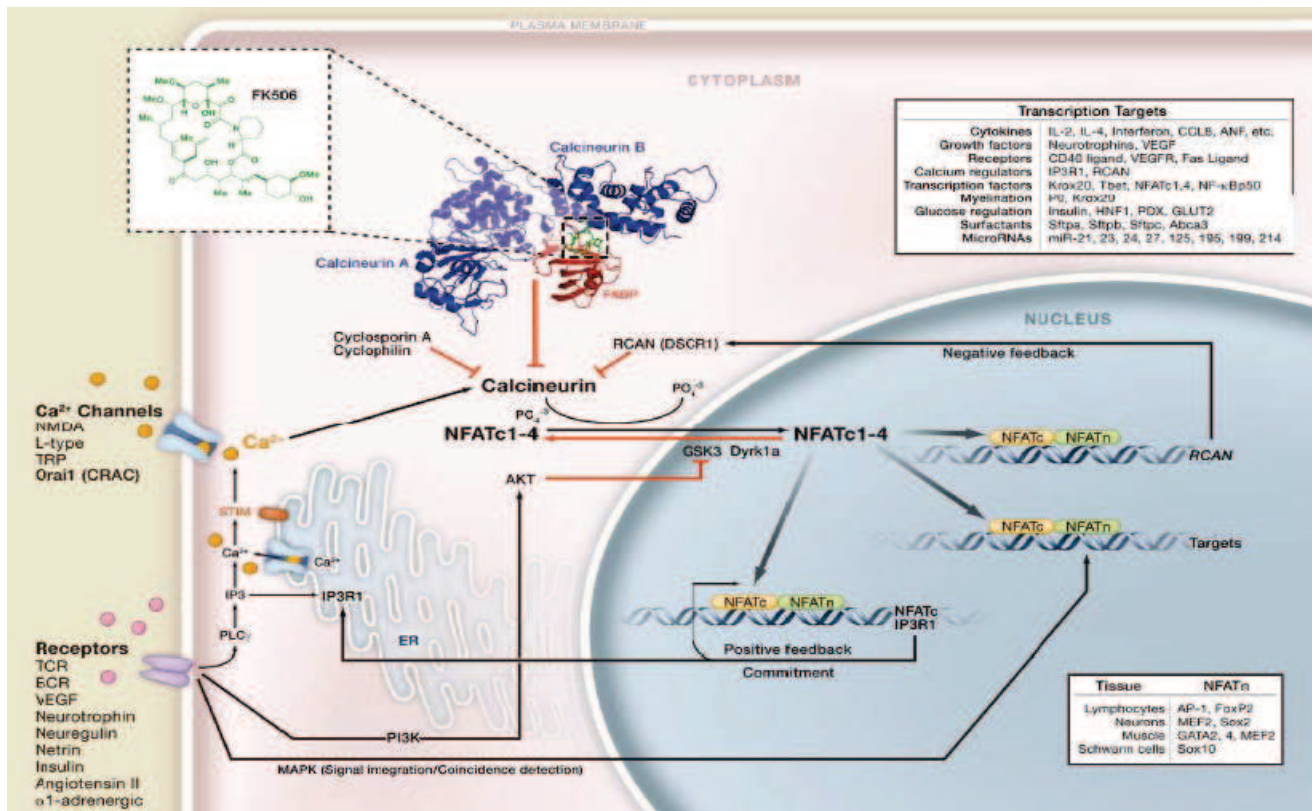


Figure 3. Signalisation Ca^{2+} -calcineurine-NFAT
Crabtree, G. R. and S. L. Schreiber (2009). "SnapShot: Ca^{2+} -Calcineurin-NFAT Signaling." *Cell* **138**(1): 210-210.

A l'inverse la rephosphorylation du domaine N-terminal de NFATc par différentes kinases permet son export du noyau (Sheridan, Heist et al. 2002). D'autres modifications post-traductionnelles comme la sumoylation de certains résidus lysine de NFAT participent également à la régulation de NFAT (Terui, Saad et al. 2004). Dans le noyau, les protéines NFATc s'associent à l'ADN sous forme de complexe avec NFATn et régulent l'expression de nombreux gènes incluant les gènes codant pour des cytokines, des

facteurs de croissance et leurs récepteurs, des protéines impliquées dans les interactions cellule-cellule, etc...

2.4. Voie DREAM

DREAM (Downstream Responsive Element Antagonist Modulator) aussi connu sous le nom de calsenilin ou KChIP3 (potassium channel interacting protein) est un membre de la famille KChIP. C'est en cherchant les protéines d'interaction avec l'élément de réponse en aval de la « TATA box » dans la région non transcrite en 5' (ou DRE pour Downstream Responsive Element) du gène codant pour la prodynorphine, que ce facteur de transcription a été identifié (Carrion, Mellström et al. 1998; Carrion, Link et al. 1999). Il est retrouvé dans différents compartiments cellulaires. Dans le noyau, DREAM se lie à DRE sous forme de tétramère et agit comme répresseur transcriptionnel régulé par le calcium (Mellström, Savignac et al. 2008). DREAM possède en effet la caractéristique d'avoir quatre « EF hands », c'est-à-dire des domaines hélice-boucle-hélice de liaison aux ions Ca^{2+} . La liaison des ions Ca^{2+} à DREAM permet la dissociation de ce facteur de transcription au DRE favorisant sa transition conformationnelle d'un état tétramérique à un état dimérique (Lusin, Vanarotti et al. 2008). Ainsi les ions Ca^{2+} sont à l'origine de la levée de répression transcriptionnelle des promoteurs contenant un DRE. Les gènes régulés par cette voie de signalisation seront ultérieurement détaillés (voir paragraphe 3.4).

2.5. Voie NFκB

Les facteurs de transcription NF-κB (Nuclear Factor κB) sont impliqués dans la régulation de la transcription dans le cadre de processus tels que la mémoire ou l'apprentissage. La famille des facteurs de transcription NF-κB exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules de mammifère comporte cinq membres, p50, p52, p65, c-Rel et RelB. Ces différents facteurs de transcription lient l'ADN sous forme d'homo ou d'hétéro-dimères (Thanos et Maniatis 1995). Dans les cellules au repos, le dimère de NF-κB est retenu dans le cytoplasme par son association avec des molécules inhibitrices de la famille IκB. La formation NF-κB/IκB masque le NLS présent sur NF-κB empêchant sa translocation nucléaire (Whiteside et Israël 1997). En réponse à de nombreux stimuli, le dimère de NF-κB est dégagé des protéines IκB par un processus impliquant la phosphorylation d'IκB, son ubiquitination et sa dégradation protéolytique postérieure via la voie du protéasome 26S (Choi, Kim et al. 2006). Dans les cellules nerveuses, l'augmentation des niveaux intracellulaires d'ions Ca^{2+} régule l'induction de NF-κB, c'est-à-dire sa translocation nucléaire et son activité sur la transcription. En effet, Lilienbaum et al. ont

découvert en 2003 que trois senseurs cellulaires aux niveaux intracellulaires d'ions Ca^{2+} à savoir la calmoduline, les protéines kinases C et la voie p21^{ras} /phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt sont impliqués dans l'activation de NF- κ B dépendante du calcium (Lilienbaum et Israel 2003). D'autre part, les auteurs ont mis en évidence que l'entrée d'ions Ca^{2+} par les CCVD de type-L et à travers l'ouverture indirecte des récepteurs à l'IP3, associés aux stocks intracellulaires d'ions Ca^{2+} est responsable de l'activité basale et induite de NF- κ B via l'intervention des cytokines et du glutamate.

3. CCVD et régulation de la transcription

L'entrée de calcium dans les neurones d'hippocampes ou la libération des stocks intracellulaires de calcium peuvent produire un transitoire calcique dans le noyau. En effet, Hardingham et al. ont montré en 1997 que l'entrée de calcium à travers les récepteurs NMDA, les CCVD de type-L ou la libération d'ions Ca^{2+} des stocks intracellulaires entraîne une augmentation de la concentration nucléaire de calcium à l'origine d'une activité transcriptionnelle dépendante de CREB (Hardingham, Chawla et al. 1997). Cela dit suivant la voie d'entrée du calcium, la réponse en termes d'expression génique est différente. Il a été par exemple prouvé que le gène BDNF (brain-derived neurotrophic factor) est fortement induit par une entrée calcique via les CCVD de type-L mais beaucoup moins par une entrée calcique via les récepteurs NMDA ou les CCVD de type-N (Westenbroek, Hell et al. 1992; Ghosh A, Carnahan J et al. 1994). Plus récemment l'équipe dirigée par Torre a examiné les sources d'entrée calcique à l'origine du contrôle des changements de l'expression génique induit par l'application de gabazine, un antagoniste des récepteurs GABA_A . Cette étude réalisée dans des cultures de neurones d'hippocampe et faisant appel à des bloqueurs pharmacologiques spécifiques, a permis de distinguer un set de gènes spécifiquement induits par l'activation des récepteurs NMDA, un set de gènes spécifiquement activés par la stimulation des CCVD de type-L et un set de gènes dépendants à la fois de l'activation des récepteurs NMDA et des CCVD de type-L (Pinato, Pegoraro et al. 2009). Je m'intéresserai par la suite plus spécifiquement à l'influence de l'entrée calcique à travers les CCVD sur la régulation génique.

3.1. Implication des CCVD dans la régulation de l'expression génique

En 1986, deux études mettent en évidence pour la première fois, l'implication des canaux calciques dans l'expression génique. La première, réalisée par Morgan J.I. et Curran T. démontre l'augmentation des niveaux d'expression du pro-oncogène c-fos dans les cellules pheochromocytoma (PC12) à la suite de dépolarisation chronique (Morgan et Curran 1986). Cette induction de c-fos est

bloquée par la nisoldipine, un bloqueur des CCVD de type-L et par deux inhibiteurs de la calmoduline, le trifluoperazine et la chlorpromazine. Cette étude prouve donc que l'élévation de Ca^{2+} cytoplasmique par les CCVD de type-L est à l'origine de l'expression de c-fos dépendante de la calmoduline. La seconde étude dirigée par Greene L.A. atteste d'une régulation de l'expression de c-fos dans les cellules PC12 en réponse à l'activation des récepteurs nicotiques ou en réponse au NGF (Nerve Growth Factor), l'induction de c-fos faisant intervenir deux voies de signalisation différentes (Greenberg, Ziff et al. 1986). L'induction par NGF est indépendante des ions Ca^{2+} extracellulaires alors que l'induction par la nicotine fait intervenir une entrée d'ions Ca^{2+} par les CCVD de type-L comme le montre le blocage de l'induction de c-fos par le vérapamil, un inhibiteur des CCVD.

3.2. Régulation indirecte de facteurs de transcription par l'entrée d'ions Ca^{2+} à travers les CCVD

L'entrée d'ions Ca^{2+} par les CCVD de type-L, entraîne l'activation de nombreuses CaMK dans les neurones d'hippocampe (Bading, Ginty et al. 1993). Ce processus est à l'origine de l'activation du promoteur c-fos. Il est démontré que CaMKI, CaMKII et CaMKIV ont la capacité de phosphoryler CREB au niveau de Ser^{133} , entraînant généralement l'activation de ce facteur de transcription (Yokokura, Terada et al. 1997; Chawla, Hardingham et al. 1998). CaMKII peut aussi phosphoryler CREB au niveau de Ser^{142} , qui correspond dans ce cas à une inhibition de CREB (Sun, Enslin et al. 1994). Comme nous l'avons précédemment signalé, CaMKIV joue un rôle particulièrement important dans la signalisation CREB, en recrutant CBP au niveau de CREB. On sait que ce phénomène se fait en présence de calcium. On peut donc se demander comment les CaMK nucléaires sont activées par une entrée de Ca^{2+} à travers les CCVD de type-L. La calmoduline présente un rôle clé dans l'activation des CaMK. Ce senseur au calcium exprimé de manière ubiquitaire contient quatre motifs de liaison au calcium dits « EF-hands » (Weiss, Hui et al. 2010). L'entrée des ions Ca^{2+} à travers les CCVD de type-L, active la calmoduline qui se trouve alors sous forme liée aux Ca^{2+} : Ca^{2+} -calmoduline. C'est sous cette forme, qu'elle est transloquée dans le noyau où elle s'accumule. Cette élévation de Ca^{2+} -calmoduline dans le noyau s'effectue dans les 15 s. après stimulation dans les neurones pyramidaux d'hippocampe, les cellules granulaires du cervelet, les neurones néocorticaux ou encore les cellules granulaires du gyrus denté (Mermelstein, Deisseroth et al. 2001). Cela-dit la translocation nucléaire de Ca^{2+} -calmoduline ne peut s'expliquer par une simple diffusion. En effet si on empêche la Ca^{2+} -calmoduline de former des interactions dépendantes de Ca^{2+} par un peptide, elle perd alors sa capacité à se transloquer dans le noyau (Mermelstein, Deisseroth et al. 2001). Ainsi l'association de Ca^{2+} -calmoduline avec des protéines de liaison à la calmoduline au sein d'un complexe serait essentielle pour permettre la translocation de Ca^{2+} -calmoduline. D'autres mécanismes

d'activation des CaMK existent. En effet en 2001, l'équipe de Bading a montré dans les neurones d'hippocampe, que la voie de signalisation CREB pouvait être activée par le calcium nucléaire seul et ne nécessitait pas l'import de protéines cytoplasmiques dans le noyau (Hardingham, Arnold et al. 2001). Effectivement l'activation de CREB induite par stimulation des CCVD de type-L est toujours observée dans les neurones d'hippocampe en présence d'une lectine de plante, l'agglutinine de germe de blé qui se lie aux complexes des pores nucléaires, bloquant ainsi l'import nucléaire. Ainsi un pool de Ca^{2+} nucléaires à l'origine de l'activation des CaMK intranucléaires, semble contrôler la fonction CREB. L'importance de la signalisation calcique nucléaire est à nouveau mise en évidence par cette même équipe dans le cadre de travaux sur le programme génétique à l'origine des mécanismes de neuroprotection. Ces travaux indiquent que 185 gènes régulés par l'activité neuronale sont induits ou réprimés de façon dépendante de la signalisation calcique nucléaire (Zhang, Zou et al. 2009). L'implication de la libération des ions Ca^{2+} des stocks intracellulaires dans cette signalisation calcique nucléaire a été examinée. La déplétion des stocks intracellulaires avec l'acide cyclopiazonique ou la thapsigargine bloque l'expression génique médiée par CREB (Hardingham, Arnold et al. 2001). Récemment, dans des cardiomyocytes adultes, le suivi des flux calciques par des indicateurs calciques fluorescents, le Fluo-4 et l'Asante Calcium Red a permis de mettre en évidence la perte totale du gradient $[Ca^{2+}]_{\text{cytoplasme-noyau}}$ en présence d'acide cyclopiazonique (Ljubojevic, Walther et al. 2011). Ceci confirme l'importance de la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires qui suit une stimulation électrique pour la propagation calcique de la périphérie de la cellule jusqu'au noyau, phénomène à l'origine de l'activation de la voie de signalisation CREB (Hardingham, Arnold et al. 2001). Ces résultats supportent des travaux antérieurs montrant que l'injection nucléaire de BAPTA-D70, un chélateur de calcium spécifiquement dirigé au niveau du noyau inhibe l'activation de CREB qui suit l'ouverture de CCVD de type-L (Hardingham, Chawla et al. 1997; Chawla, Hardingham et al. 1998).

L'implication des kinases activées par Ca^{2+} dans la voie de signalisation CREB n'est plus à démontrer, cependant elle ne doit pas occulter l'importance de phosphatases dépendantes de Ca^{2+} telle que la calcineurine, dans cette voie de régulation. Par exemple, dans les cellules granulaires de cervelet, l'entrée calcique à travers les CCVD de type-L contrôle l'expression du récepteur à l'IP3 type 1 via l'activation de la calcineurine (Genazzani, Carafoli et al. 1999).

La calcineurine pourrait servir de modulateur et influencer la déphosphorylation de pCREB par l'intermédiaire de la protéine phosphatase de type 1 (PP1). Dans

les neurones d'hippocampe de rat, la calcineurine active PP1 limitant la durée de phosphorylation et restreignant ainsi l'activation de la réponse transcriptionnelle de CREB (Bito, Deisseroth et al. 1996). En 1996, Liu et Graybiel ont montré dans des coupes striatales de nouveau-nés de rats que l'inhibition de la calcineurine par FK506 peut prolonger la phosphorylation de CREB suivant le traitement BAY K8644, activateur des CCVD de type-L (Liu et Graybiel 1996). Des travaux plus récents ont mis en évidence ce même effet sur la durée de phosphorylation de CREB par la calcineurine. Effectivement l'inhibition de la calcineurine corrélée à la prolongation de la période de phosphorylation de CREB réduit la mortalité de neurones corticaux de rat soumis à un traitement à des niveaux excitotoxiques de NMDA (Lee, Butcher et al. 2005). De manière contradictoire, l'inhibition de la calcineurine par l'ascomycine dans les cellules non-neuronales comme les cellules chromaffines bloque l'expression du gène codant pour la proenképhaline dépendante de CREB (Hahm, Chen et al. 2003). De plus, Kingsbury et al. ont démontré dans les neurones corticaux de souris, que l'inhibition de la calcineurine par FK506 ou la cyclosporine A, bloque l'expression génique dépendant de CREB induite par la dépolarisation et ceci sans inhiber l'influx calcique induit par la dépolarisation ni la phosphorylation de CREB au niveau de ¹³³Ser (Kingsbury, Bambrick et al. 2007).

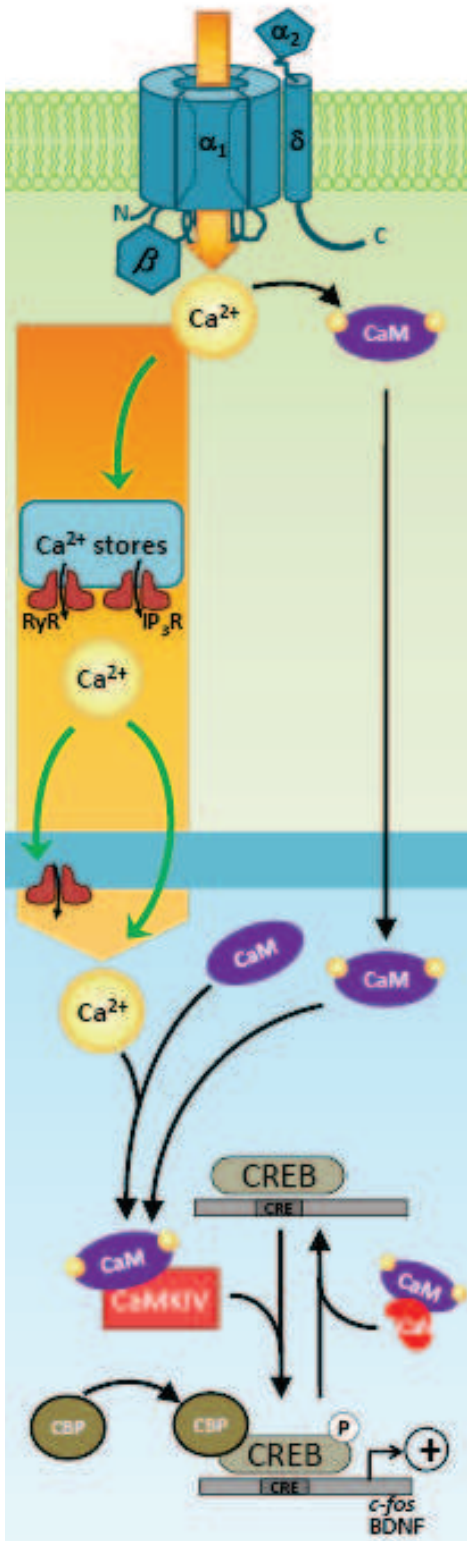


Figure 4. Activation de facteurs de transcription par des protéines activées par les ions Ca^{2+} entrés par les CCVD

Abréviations : RyR : Récepteur à la Ryanodine, IP_3R : Récepteur à l' IP_3 , CaN : Calcineurine, CaM : Calmoduline.

La calcineurine semble donc jouer des rôles différents sur la régulation de la transcription dépendante de CREB. Ceux-ci pourraient refléter des différences de types cellulaires ou développementales concernant les neurones. La voie de signalisation CREB ainsi que ses différents effecteurs est visible Figure 4, page 15.

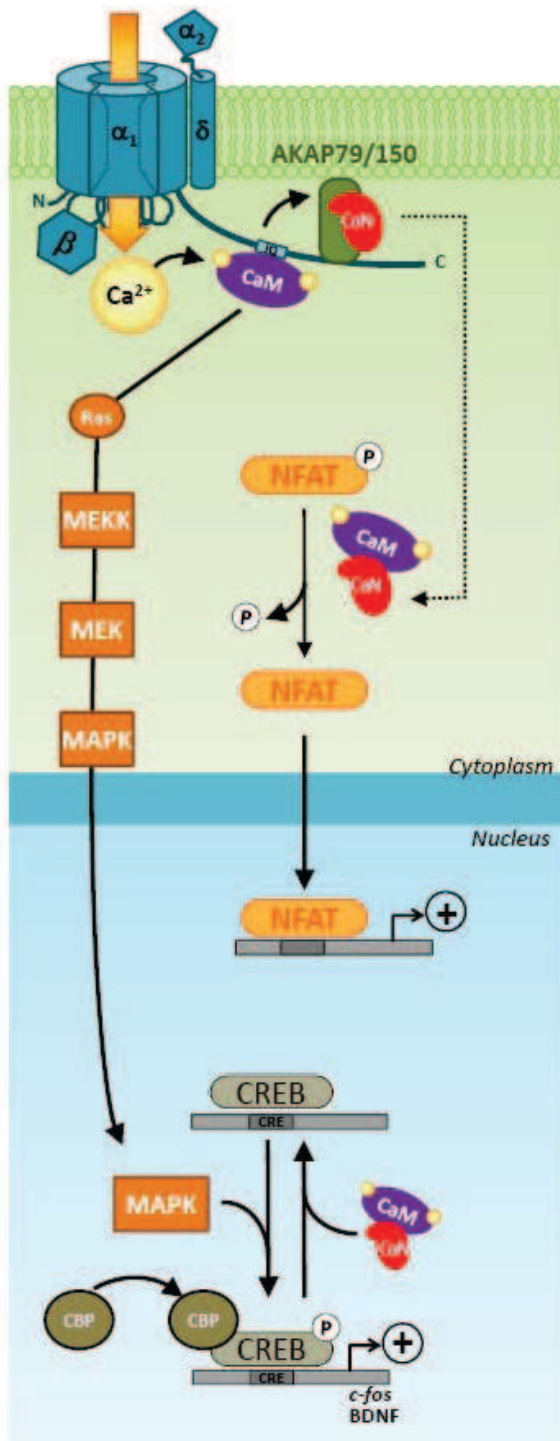
Bien que l'influence des CCVD de type-L sur la régulation génique ait été majoritairement étudiée, d'autres CCVD incluant notamment les CCVD de type-N et -P/Q participant aussi à une élévation marquée des niveaux de Ca^{2+} cytoplasmiques et nucléaires, pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression génique. Effectivement dans le couplage excitation-transcription, les CCVD de type-L prédominent généralement. Les CCVD de type-N et -P/Q participent à la signalisation calcique nucléaire avec une force du signal 70 fois plus faible que les CCVD de type-L pour un potentiel de membrane donné (Poburko, Wheeler et al. 2011). Ceci peut s'expliquer par le fait que les CCVD de type-L ont une signalisation très locale et ciblent notamment des CaMK qui leur sont associées, ce qui n'est pas le cas des CCVD de type-N ou -P/Q, dont les ions Ca^{2+} qui passent à travers leur sous-unité canalaire doivent parcourir une distance plus grande avant d'atteindre leur cible. Plusieurs travaux mettent en évidence l'implication de l'influx calcique à travers les CCVD de type-N dans la régulation de la transcription. Une étude a permis de distinguer dans les neurones des ganglions sympathiques, l'effet de différents patrons d'activité électrique sur la translocation dépendante des ions Ca^{2+} (voir Chapitre 1, paragraphe 2.3) du facteur de transcription NFATc1. En effet les trains de stimulation à 10 Hz activent la translocation nucléaire de NFATc1 alors que les trains de stimulation à 1 Hz sont inefficaces (Hernández-Ochoa, Contreras et al. 2007). L' ω -conotoxin GVIA, un inhibiteur spécifique des CCVD de type-N bloque la translocation nucléaire de NFATc1 induite par la stimulation à 10 Hz montrant la dépendance de ce processus de translocation vis-à-vis de ce type de CCVD. Par ailleurs, la stimulation par les phéromones de l'organe voméronasal (organe situé sous la surface intérieure du nez spécialisé dans la détection des phéromones) entraîne une élévation de l'expression de c-fos dépendante des CCVD de type-N (Murakami, Matsui et al. 2006). D'autre part en 2007, Zhao et al. ont observé à la fois la phosphorylation de CREB et l'augmentation en ARNm et en protéines de c-fos à la suite de dépolarisation des neurones des ganglions cervicaux supérieurs (Zhao, Liu et al. 2007). Cette phosphorylation de CREB dépendante des CCVD de type-N a lieu à de faibles fréquences de stimulation ; à haute fréquence de stimulation la régulation de CREB implique exclusivement les CCVD de type-L. Enfin une étude menée par Katz a mis en évidence récemment que l'activation spécifique des CCVD de type-N par stimulation électrique à 5 Hz de neurones sensoriels primaires dissociés produit une augmentation de l'expression en ARNm et en protéines de tyrosine hydroxylase (Brosenitsch et Katz 2001).

Les CCVD de type-P/Q sont également impliqués dans une voie de régulation génique. L'équipe de Snutch a montré en 1999 que l'influx d'ions Ca^{2+} à travers les CCVD de type-P/Q dans les cellules granulaires du cervelet est responsable de l'activation de l'expression de la syntaxine-1A (Sutton,

McRory et al. 1999). Cet effet fait intervenir les stocks calciques intracellulaires mais également des voies de signalisation impliquant CaMKII et IV, PKA et MAPK kinase. La syntaxine 1A est un composant du complexe SNARE impliqué dans la fusion des vésicules et la libération des neurotransmetteurs, qui est physiquement associé aux CCVD de type-P/Q. Cet exemple représente un mécanisme de boucles rétroactives liant la signalisation synaptique à l'expression génique.

3.3. Régulation des facteurs de transcription par des protéines activées par les ions Ca^{2+} associées aux CCVD

Ces voies de régulation impliquent des modifications au niveau des facteurs de transcription par des kinases ou phosphatases mais diffèrent des exemples précédemment évoqués par l'implication de protéines de régulation interagissant directement avec les CCVD (voir Figure 5). Encore une fois la voie de régulation CREB fournit un exemple intéressant. Dolmetsch et al. ont prouvé en 2001 que la sous-unité canalaire du CCVD de type-L et plus exactement un motif isoleucine-glutamine (IQ) de la partie C-terminale de $Ca_v1.2$ lie la Ca^{2+} -calmoduline (Dolmetsch, Pajvani et al. 2001). Cette liaison est à l'origine de l'activation de la voie de signalisation MAPK qui permet le transfert du signal calcique du CCVD au noyau où l'on observe la phosphorylation de CREB au niveau de Ser¹³³. L'activation de CREB est spécifique de l'activation des CCVD de type-L comme le montre l'absence d'effet sur l'activation de CREB de bloqueurs spécifiques des CCVD de type-N et -P/Q. Ceci met en avant l'importance des microdomaines calciques. En effet, l'EGTA qui tamponne le calcium cytoplasmique sans affecter l'élévation calcique à proximité du canal n'a pas d'effet sur la phosphorylation de CREB dépendante de CCVD de type-L (Deisseroth, Heist et al. 1998). Cette voie de phosphorylation de CREB implique ainsi le CCVD de type-L à travers son interaction avec la calmoduline et le calcium entré dans la cellule à travers les CCVD de type-L. Une mutation au niveau de la partie C-terminale de $Ca_v1.2$ en aval du domaine IQ empêchant la liaison de Ca^{2+} -calmoduline sans affecter les courants calciques, entraîne une diminution de l'activation d'un gène rapporteur sous contrôle de CREB. Ceci met en évidence que la Ca^{2+} -calmoduline libre non liée au canal est incapable dans ce cas d'induire la phosphorylation de CREB.



L'interaction directe de CaMKII avec le domaine C-terminal de la sous-unité canalaire, Ca_v1.2 des CCVD de type-L a par ailleurs été examinée. Hudmon et al. ont montré en 2005 que la liaison de CaMKII au canal nécessite l'entrée d'ions Ca²⁺ à travers le pore ionique ainsi que l'activation de la calmoduline. CaMKII ainsi activée, phosphoryle les CCVD de type-L, ce qui induit la facilitation de ces CCVD (Hudmon, Schulman et al. 2005). Une autre étude révèle la capacité de la CaMKII phosphorylée à activer la voie de signalisation CREB en réponse à la stimulation des CCVD de type-L (Wheeler, Barrett et al. 2008). A l'heure actuelle aucune étude, cependant n'a montré de régulation de la transcription dépendante de CREB par CaMKII liée au canal

Figure 5. Activation de facteurs de transcription par des protéines activées par Ca²⁺ liées aux CCVD

Deux exemples sont illustrés : la voie de régulation MAPK à l'origine de l'activation de CREB par la calmoduline (CaM) lié au domaine IQ des CCVD de type-L et la voie de régulation de NFAT par la calcineurine (CaN) associée au canal et activée par la calmoduline (CaM).

Très récemment de nouvelles données indiquent l'existence dans des cardiomyocytes de nouveau-nés de rats d'une voie de régulation de la

transcription CREB-dépendante initiée par l'activation des CCVD de type-L mais indépendante de la CaMKII (Kobrinisky, Duong et al. 2011).

La voie de signalisation NFAT fournit également un exemple intéressant de transcription initiée par la dépolarisation neuronale. L'équipe de Crabtree s'est intéressée à cette voie de signalisation et a découvert dans des neurones d'hippocampe une régulation des gènes précoces suite à l'activation de NFATc4/NFAT3 (Graef, Mermelstein et al. 1999). Cette activation NFATc4/NFAT3 nécessite l'action de la calcineurine elle-même activée par la liaison de Ca²⁺ au niveau de sa sous-unité régulatrice et par la

calmoduline. Ce processus est inhibé par des bloqueurs des CCVD de type-L. Cependant les inhibiteurs des CCVD de type-N et -P /Q restent sans effet. La calcineurine lie la sous-unité canalaire $Ca_v1.2$ des CCVD de type-L juste en aval des résidus 1965-1971 (Xu, Ginsburg et al. 2010). Cette liaison se fait via l'ancrage de la calcineurine à la protéine kinase-A AKAP79/150 (Oliveria, Dell'Acqua et al. 2007). Il a été montré que des ARNi spécifiques de AKAP150 inhibent la translocation nucléaire de NFATc4 induite par la dépolarisation, laissant penser que cette protéine d'ancrage est nécessaire à la déphosphorylation de NFAT4c dépendante de la calcineurine (voir Figure 5).

Ces différents exemples mettent en évidence l'existence de voies de régulation des gènes par les CCVD via des molécules sensibles au calcium interagissant avec les CCVD. Ces molécules peuvent interagir directement aux CCVD ou indirectement via une protéine d'ancrage.

3.4. Facteurs de transcription directement régulés par les ions Ca^{2+}

Dans les études précédemment décrites, les facteurs de transcription étaient régulés par des protéines liées à Ca^{2+} telles que la calmoduline. Dans cette partie j'évoquerai une voie de régulation faisant intervenir un facteur de transcription directement lié aux ions Ca^{2+} . Dans ce cas, le lien entre l'élévation de calcium intracellulaire et la régulation de la transcription est donc très direct. Le répresseur transcriptionnel DREAM régulé par le calcium illustre parfaitement ce fait (voir Figure 6, p20). Pour plus de détails sur la régulation de DREAM par les ions Ca^{2+} , voir Chapitre 1, paragraphe 2.4. DREAM a tout d'abord été caractérisé pour son rôle dans la régulation du gène de la prodynorphine via l'élément de réponse DRE (Carrion, Mellström et al. 1998; Carrion, Link et al. 1999).

D'autres gènes régulés par DRE ont par la suite été identifiés, parmi lesquels les gènes codant pour *c-fos* et GnRH (gonadotropin-releasing hormone)(Carrion, Link et al. 1999; Leclerc et Boockfor 2007). Les neurones immortalisés GT1-7 présentent une libération pulsatile de GnRH. En présence de nimodipine, un inhibiteur des CCVD de type-L ou d'anticorps neutralisant DREAM, l'expression et la libération de GnRH est abolie dans ces cellules (Leclerc et Boockfor 2007), mettant en évidence le lien entre l'entrée de calcium à travers les CCVD de type-L et l'activation de DREAM à l'origine de l'expression du gène qui code pour GnRH.

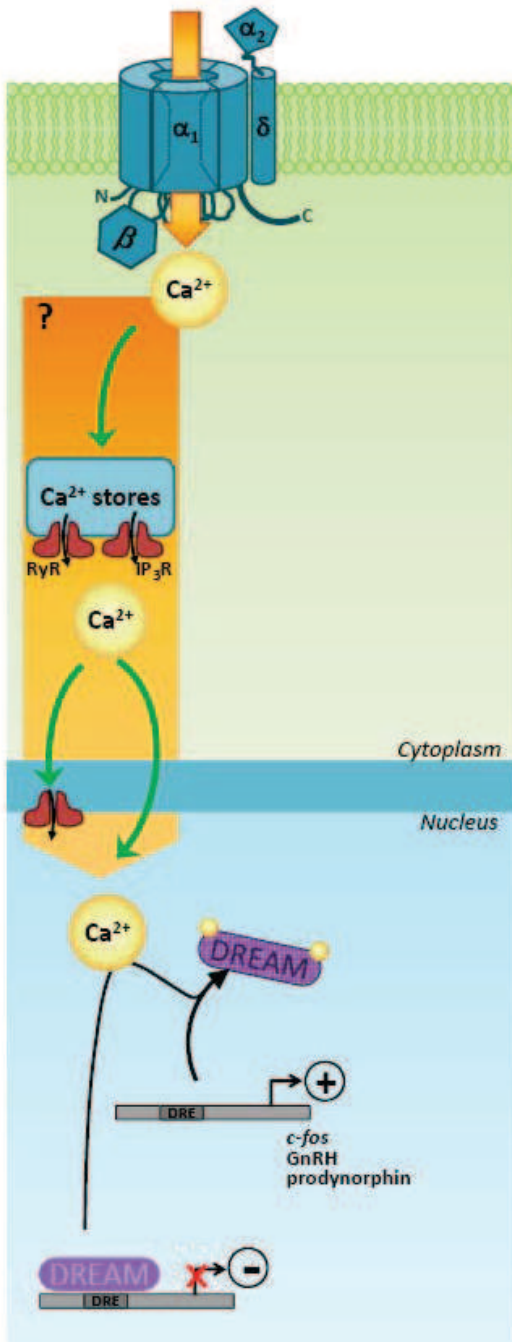


Figure 6. Activation de facteurs de transcription par des protéines activées par Ca^{2+} liées aux CCVD

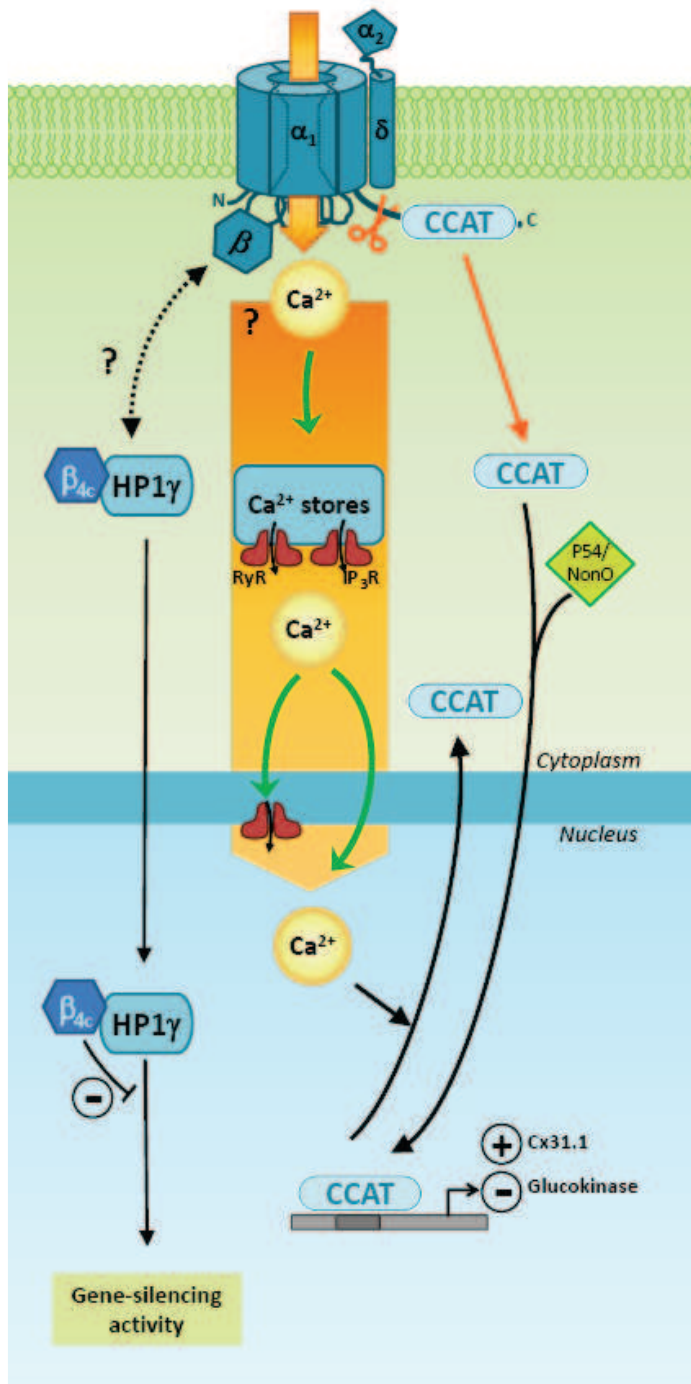
Exemple de l'activation du facteur de transcription DREAM par l'entrée d'ions Ca^{2+} à travers les CCVD de type-L.

Abréviations : RyR : Récepteur à la Ryanodine, IP_3R : Récepteur à l' IP_3

3.5. Régulation directe de la transcription par certains composants des CCVD

La première preuve de l'implication d'un élément de CCVD en tant que facteur de transcription provient d'une étude menée en 2003 sous la direction de Lesage. Cette étude s'est intéressée à un court variant d'épissage de la sous-unité β_4 du poulet, nommé β_{4c} et a montré son interaction directe avec CHCB2/HP1 γ (chromobox protein 2/heterochromatin protein 1 γ), une protéine nucléaire impliquée

dans la mise sous silence de gènes et la régulation de la transcription (Hibino, Pironkova et al. 2003), voir Figure 7. Cette interaction est nécessaire à la translocation nucléaire de β_{4c} . Les sous-unités β sont normalement des sous-unités auxiliaires des CCVD. Ce court variant d'épissage auquel il manque le domaine guanylate kinase (GK) des sous-unités β ne devrait pas pouvoir s'associer à la sous-unité canalaire des CCVD (pour plus d'explication, voir1, paragraphe 0, page 27). Pourtant ces travaux montrent paradoxalement que β_{4c} affecte tout de même très légèrement les propriétés biophysiques des CCVD. CHCB2/HP1 γ reconnaît et se lie à un résidu lysine situé dans la partie C-terminale de l'histone H3 qui est spécifiquement méthylé par SUV39H1 (Rea, Eisenhaber et al. 2000). La liaison de SUV39H1 et CHCB2/HP1 γ à l'histone H3 favorise la formation d'hétérochromatine (état de la chromatine très condensé) et donc la répression de l'activité transcriptionnelle. Grâce à un système reporteur GAL4-CAT, les auteurs ont montré l'influence de CHCB2/HP1 γ et β_{4c} sur l'expression CAT. CHCB2/HP1 γ réprime l'expression CAT tandis que β_{4c} atténue l'activité de mise sous silence du complexe CHCB2/HP1 γ . En ce début d'année, un variant d'épissage β_{4c} a été identifié dans le cerveau humain par l'équipe de Horne (Xu, Lee et al. 2011). L'alignement des séquences de β_{4c} du poulet et de l'humain montre que ces deux protéines sont presque identiques. β_{4c} humain interagit avec le CSD (Chromo Shadow Domain) de HP1 γ via un motif consensus PXVXL dans la partie C-terminale de β_{4c} .



H3 qui est spécifiquement méthylé par SUV39H1 (Rea, Eisenhaber et al. 2000). La liaison de SUV39H1 et CHCB2/HP1 γ à l'histone H3 favorise la formation d'hétérochromatine (état de la chromatine très condensé) et donc la répression de l'activité transcriptionnelle. Grâce à un système reporteur GAL4-CAT, les auteurs ont montré l'influence de CHCB2/HP1 γ et β_{4c} sur l'expression CAT. CHCB2/HP1 γ réprime l'expression CAT tandis que β_{4c} atténue l'activité de mise sous silence du complexe CHCB2/HP1 γ . En ce début d'année, un variant d'épissage β_{4c} a été identifié dans le cerveau humain par l'équipe de Horne (Xu, Lee et al. 2011). L'alignement des séquences de β_{4c} du poulet et de l'humain montre que ces deux protéines sont presque identiques. β_{4c} humain interagit avec le CSD (Chromo Shadow Domain) de HP1 γ via un motif consensus PXVXL dans la partie C-terminale de β_{4c} .

Figure 7. Régulation de l'expression génique par la sous-unité β_{4c} et le fragment CCAT

En 2006, deux études ont parallèlement mis en évidence l'implication directe d'un fragment protéolytique de la partie C-terminale de sous-unités canalaire dans la régulation de l'expression génique (voir Figure 7). La première étude menée dans le laboratoire de Dolmetsch indique la présence d'un fragment protéolytique de 75 kDa de la partie C-terminale de $Ca_v1.2$ dans le cortex de rat (Gomez-Ospina, Tsuruta et al. 2006). Ce fragment nommé CCAT (Calcium Channel Associated Transcriptional regulator) produit comme protéine soluble dans la cellule, est capable d'être transloqué dans le noyau de neurones corticaux. A ce niveau il s'associe à une protéine nucléaire p54(nrb)/Nono qui intervient dans la régulation de la transcription en aval de la protéine N-WASP (Neuronal Wiscott Aldrich Syndrome Protein)(Wu, Yoo et al. 2006). Le système de gène rapporteur UAS-luciférase a permis d'étudier l'influence de CCAT sur la transcription UAS dans des cellules Neuro2A transfectées avec $Ca_v1.2$ -Gal4. Les résultats indiquent la capacité de ce fragment C-terminal à activer la transcription UAS et ainsi l'expression de luciférase. CCAT est responsable de la sur- ou sous-régulation de plusieurs gènes. En effet, CCAT régule l'expression de protéines de jonctions gap comme la connexine Cx31.1, d'un récepteur NMDA, de plusieurs canaux potassiques et de protéines de signalisation comme RGS5 (regulator of G-protein signaling 5), Formin ou NOS (nitric oxide synthase). La même année Kordasiewicz et al. ont détecté dans le noyau de cellules de Purkinje de cervelet de souris et d'humain la présence d'un fragment de 60-75 kDa de la partie C-terminale de la sous-unité canalaire $Ca_v2.1$ (Kordasiewicz, Thompson et al. 2006). Ce fragment C-terminal possédant des extensions polyglutamine est toxique pour les cellules en culture ou les cellules granulaires du cervelet lorsqu'il est localisé dans le noyau. Les mécanismes à l'origine de cette toxicité ne sont pas encore connus mais pourraient impliquer des processus de régulation génique.

Enfin, en 2010, l'équipe de Yang a mis en évidence, l'interaction de la sous-unité β_3 des CCVD mais également β_{1b} , β_{2a} et β_4 avec Pax6, un facteur de transcription appartenant à la famille « paired box » (Pax) et essentiel au développement des yeux, du cerveau, du nez et du pancréas (Zhang, Yamada et al. 2010). Plus exactement, c'est avec Pax6(S), une nouvelle isoforme isolée différant de Pax6 par son domaine C-terminal tronqué et la présence en C-terminale d'un domaine riche en sérine nommé « S tail » que les sous-unités β interagissent. Cette équipe a également démontré dans des cellules HEK 293T que β_3 située dans le cytoplasme en absence de Pax6(S) est transloquée dans le noyau en présence de ce facteur de transcription. Le rôle de β_3 sur l'activité transcriptionnelle de Pax6(S) a été examiné par le biais d'un test luciférase. β_3 est capable de réduire l'activité transcriptionnelle de Pax6(S), cela dit le mécanisme de régulation est encore inconnu.

Ainsi ces études récentes ouvrent des perspectives intéressantes quant aux rôles directs des CCVD dans le couplage excitation-transcription.

Chapitre 2. La sous-unité β_4 des CCVD

1. β_4 , une sous-unité régulatrice des CCVD

1.1. Différentes sous-unité β

Les sous-unités β avec une masse moléculaire de l'ordre de 52 à 78 kDa sont codées par quatre gènes distincts CACNB1-4. Ainsi quatre isoformes, incluant β_4 , ont été identifiées, chacune ayant différents variants d'épissage. Les sous-unités β ont une distribution tissulaire différente suivant l'isoforme et le variant d'épissage ((Buraei et Yang 2010), voir Tableau 2).

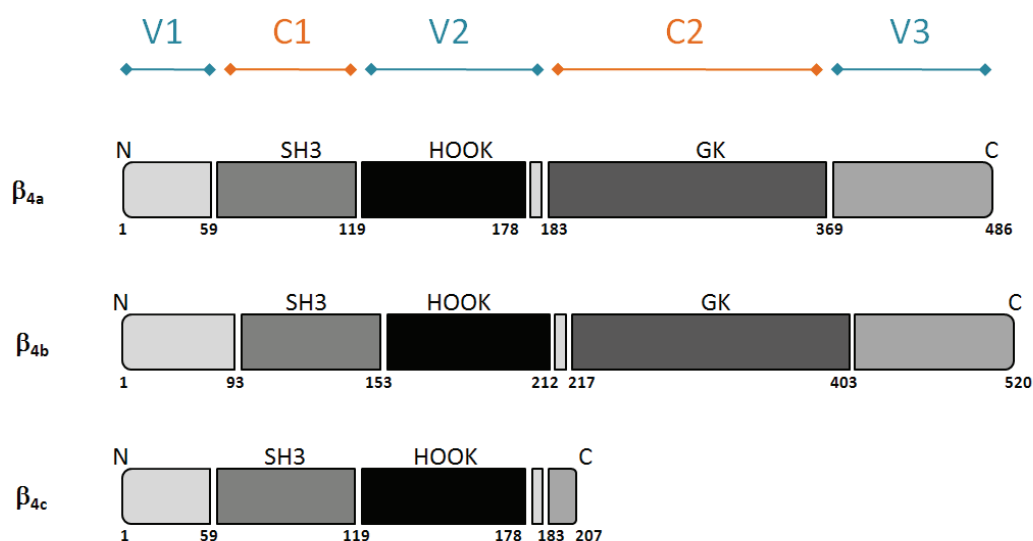
Sous-unités β	Distribution tissulaire
β_1	Exprimée dans le cerveau (cortex cérébral, habenula, hippocampe et bulbe olfactif), le cœur, les muscles squelettiques, la rate et les cellules T mais pas dans les reins, le foie et l'estomac.
β_{1a}	Exprimée exclusivement dans les muscles squelettiques.
β_{1b}	Exprimée dans le cerveau (cervelet, cortex cérébral et hippocampe), dans les terminaisons nerveuses des jonctions neuromusculaires et le pancréas.
β_{1c}	Exprimée dans le cerveau et la rate. N'est pas détectée dans les reins, le foie, les muscles ou l'estomac.
β_{1d}	Exprimée dans le cœur.
β_2	Exprimée dans le cerveau (hippocampe -l'isoforme la plus abondante dans cette région-, cervelet, noyaux pontiques, substance noire, habenula, glande pinéale, noyaux thalamiques et télencéphale), le cœur, les poumons, les terminaisons nerveuses des jonctions neuromusculaires et le pancréas, les cellules T, les ostéoblastes mais pas dans le foie, la rate, les reins et le pancréas.
β_{2a}	Exprimée dans le cerveau, le cœur et l'aorte.
β_{2b}	Exprimée dans le cerveau, le cœur et l'aorte. Isoforme la plus abondante dans le cœur humain.
β_{2c}	Exprimée dans le cerveau, le cœur.
$\beta_{2d,e}$	Exprimée dans le cœur.
β_3	Exprimée surtout dans le cerveau (cervelet, cortex cérébral, habenula, hippocampe, bulbe olfactif et striatum) mais également dans le cœur, l'aorte, les poumons, la rate, les reins, les muscles lisses et squelettiques, les cellules T et la trachée et pas dans le foie, les testicules et le pancréas.
β_3 tronquée	Exprimée dans le cerveau, le cœur.

β_4	Exprimée dans le cerveau (cervelet –c'est la sous-unité β la plus abondante dans cette région-, tronc cérébral, cortex cérébral, gyrus denté, habenula, hippocampe, bulbe olfactif, thalamus, hypothalamus et striatum) mais également dans les reins, les terminaisons nerveuses des jonctions neuromusculaires, les muscles squelettiques, la moelle épinière, les cellules T et les testicules. N'est pas détectée dans le cœur (sauf chez les jeunes animaux), le foie, les poumons, la rate, ou le thymus.
β_{4a}	Exprimée dans la moelle épinière et le cervelet.
β_{4b}	Exprimée dans la moelle épinière, l'hippocampe et le prosencéphale.
β_{4c}	Exprimée dans le tronc cérébral et le cervelet.

Tableau 2. Distribution tissulaire des sous-unités β

Buraei, Z.etJ. Yang (2010). "The beta Subunit of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels." *Physiological Reviews* **90**(4): 1461-1506.

β_4 est clonée pour la première fois par Castellano et al. en 1993 (Castellano, Wei et al. 1993). CACNB4 code pour trois variants d'épissage, β_{4a-c} . L'isoforme, β_{4b} est la première isoforme détectée et comprend 519 acides aminés. En 2002, Helton et Horne ont identifié β_{4a} . Ce variant d'épissage est plus court que β_{4b} et diffère uniquement de celui-ci par sa partie N-terminale qui comporte 58 acides aminés au lieu de 92 acides aminés pour β_{4b} ((Helton et Horne 2002), voir Figure 8).

Figure 8. Différents variants d'épissage de β_4

La distribution dans le cortex cérébelleux de ces deux variants d'épissage a été examinée par Vendel et al. en 2002. Les expériences d'immunohistochimie révèlent une distribution différente de β_{4a} et β_{4b} . β_{4a} est exprimée à travers la couche moléculaire, au niveau des synapses, du cervelet alors que β_{4b} est exprimée dans les corps cellulaires des cellules de Purkinje et la glie de Bergmann (Vendel, Terry

et al. 2006). D'autres études se sont intéressées à la localisation de β_4 dans le cervelet. β_4 a été détectée dans les noyaux de cellules granulaires et de cellules de Purkinje de cervelet de souris adultes (Subramanyam, Obermair et al. 2009). D'autre part, β_{4b} et non β_{4a} , lorsqu'elle est exprimée de manière hétérologue dans des myotubes squelettiques ou des neurones, présente une localisation nucléaire (Subramanyam, Obermair et al. 2009). Préalablement Colecraft et al. avaient noté la localisation nucléaire de β_4 -GFP exprimée de manière hétérologue dans des myocytes cardiaques (Colecraft, Alseikhan et al. 2002).

Un nouveau variant d'épissage, β_{4c} a été découvert chez le poulet par Hibino et al. en 2003. β_{4c} correspond à une forme tronquée de β_{4a} (voir Figure 8). Sa distribution tissulaire examinée par RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) a montré sa présence dans le cerveau, la moelle épinière, les yeux et le cœur (Hibino, Pironkova et al. 2003). De plus β_{4c} présente une localisation nucléaire dans les cellules TSA201 et extrait de cerveau. Plus récemment, l'équipe de Horne a détecté β_{4c} dans le cerveau humain et dans les noyaux des neurones vestibulaires (Xu, Lee et al. 2011).

1.2. β_4 , un membre des protéines MAGUK

Avant même la détermination de la structure cristallographique, la structure modulaire de la sous-unité β en cinq domaines a été déterminée à partir d'études basées sur l'alignement de séquence d'acides aminés, biochimiques, fonctionnelles... Le premier, le troisième et le cinquième domaine respectivement V1, V2 et V3 sont des régions variables en termes de longueur et de séquences d'acides aminés alors que le second et quatrième domaine, C1 et C2 sont hautement conservés et respectivement homologues au domaine Src homology 3 (SH3) et guanylate kinase (GK) (voir Figure 8). Le domaine SH3 de la sous-unité β constitué de cinq feuillets β est caractérisé par son interaction avec des motifs particulièrement riches en proline. Ce site habituel de fixation des ligands est occupé par une hélice α du domaine GK qui le rend inaccessible pour la fixation d'autres partenaires à sites polyproline. Le domaine GK présente une homologie avec l'enzyme guanylate kinase. Cependant il est dépourvu d'activité enzymatique. En effet le motif riche en glycine, indispensable à la fixation de l'ATP ainsi que le motif impliqué dans la fixation du GMP essentiels pour l'activité enzymatique guanylate kinase ne sont pas conservés dans les sous-unités β . Le cœur du domaine GK est composé de cinq feuillets β pris en tenaille par cinq hélices α .

En 2004, trois groupes de recherche ont déterminé la structure cristallographique des sous-unités β_{2a} , β_3 et β_4 en interaction avec l'AID (α_1 interaction domain) ou seule ((Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004), voir Figure 9).



Figure 9. Structure cristallographique de la sous-unité β_4 .

Chen, Y.-h., M.-h. Li, Y. Zhang, L.-l. He, Y. Yamada, A. Fitzmaurice, Y. Shen, H. Zhang, L. Tong and J. Yang (2004). "Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Nature* **429**(6992): 675-680.

Ces études mettent en évidence la présence d'une région dite HOOK au cœur de la sous-unité β qui relie le domaine SH3 au domaine GK. Ce module SH3-HOOK-GK place la sous-unité β au sein de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK). Cette famille MAGUK comprend des protéines d'échafaudage telles que PSD-95, SAP-97, SAP-102, PSD-93, CASK et MAGIs impliquées dans l'organisation de complexes multiprotéiques au niveau de régions spécialisées comme les synapses et d'autres jonctions cellulaires (Zheng, Seabold et al. 2011).

L'équipe de Horne a identifié en 2006 la structure par spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) du premier domaine, c'est-à-dire l'extrémité N-terminale de la sous-unité β_4 (Vendel A.C., Rithner C.D. et al. 2006). Ce domaine comporte deux hélices α et deux feuillets β . A l'heure actuelle, la structure de l'extrémité C-terminale reste inconnue.

1.3. Implication de β_4 dans l'assemblage, l'ancrage à la membrane et la régulation des CCVD

Depuis plus de vingt ans maintenant, l'influence de la sous-unité β sur les cinétiques et la sensibilité au voltage des CCVD est connue (Lacerda, Kim et al. 1991; Singer, Biel et al. 1991). Suivant la sous-unité β associée à la sous-unité canalaire, ces paramètres sont différemment régulés (Ellinor, Zhang et al. 1993; Olcese, Qin et al. 1994; De Waard et Campbell 1995). Concernant β_4 , son effet sur les propriétés biophysiques des CCVD à haut voltage est résumé dans le Tableau 3 et est illustré Figure 10.

	Cinétique d'activation	Dépendance au voltage de l'activation	Cinétiques d'inactivation	Dépendance au voltage de l'inactivation
β_4	Accélère l'activation d'un facteur 2 ou 3. Effet moins marqué avec les sous-unités canalaire Ca_v2 .	Hyperpolarisation de -5 à -25 mV. Différences suivant les variants d'épissage.	Accélère l'inactivation d'un facteur 2 à 4.	Hyperpolarisation de -5 à -30 mV. Effet moins marqué avec les CCVD de type-L. Différences suivant les variants d'épissage.

Tableau 3. Effet de la sous-unité β_4 sur les propriétés biophysiques des CCVD à haut voltage

Buraei, Z.etJ. Yang (2010). "The beta Subunit of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels." *Physiological Reviews* **90**(4): 1461-1506.

La régulation des propriétés biophysiques des CCVD par la sous-unité β_4 , diffère suivant son variant d'épissage. Helton et Horne ont démontré en 2002 que l'épissage alternatif de la partie N-terminale à l'origine des deux variants β_{4a} et β_{4b} modifie leur influence sur les propriétés biophysiques des CCVD (Helton et Horne 2002). Les analyses électrophysiologiques réalisées dans l'ovocyte de xénope exprimant $Ca_v2.1$ ou $Ca_v2.2$ avec $\alpha_2\delta$ en présence de β_{4a} ou β_{4b} ont mis en évidence un déplacement de la courbe d'activation et d'inactivation des CCVD de type-P/Q et -N vers des potentiels plus hyperpolarisés en présence de β_{4b} qu'en présence de β_{4a} . En 2003, Hibino et al. ont examiné les effets physiologiques du variant tronqué β_{4c} sur les CCVD. Les expériences électrophysiologiques effectuées de la même façon dans l'ovocyte de xénope exprimant $Ca_v2.1$ avec $\alpha_2\delta$ en présence ou non de β_{4c} ont montré peu d'effet de β_{4c} sur les propriétés biophysiques des CCVD (Hibino, Pironkova et al. 2003).

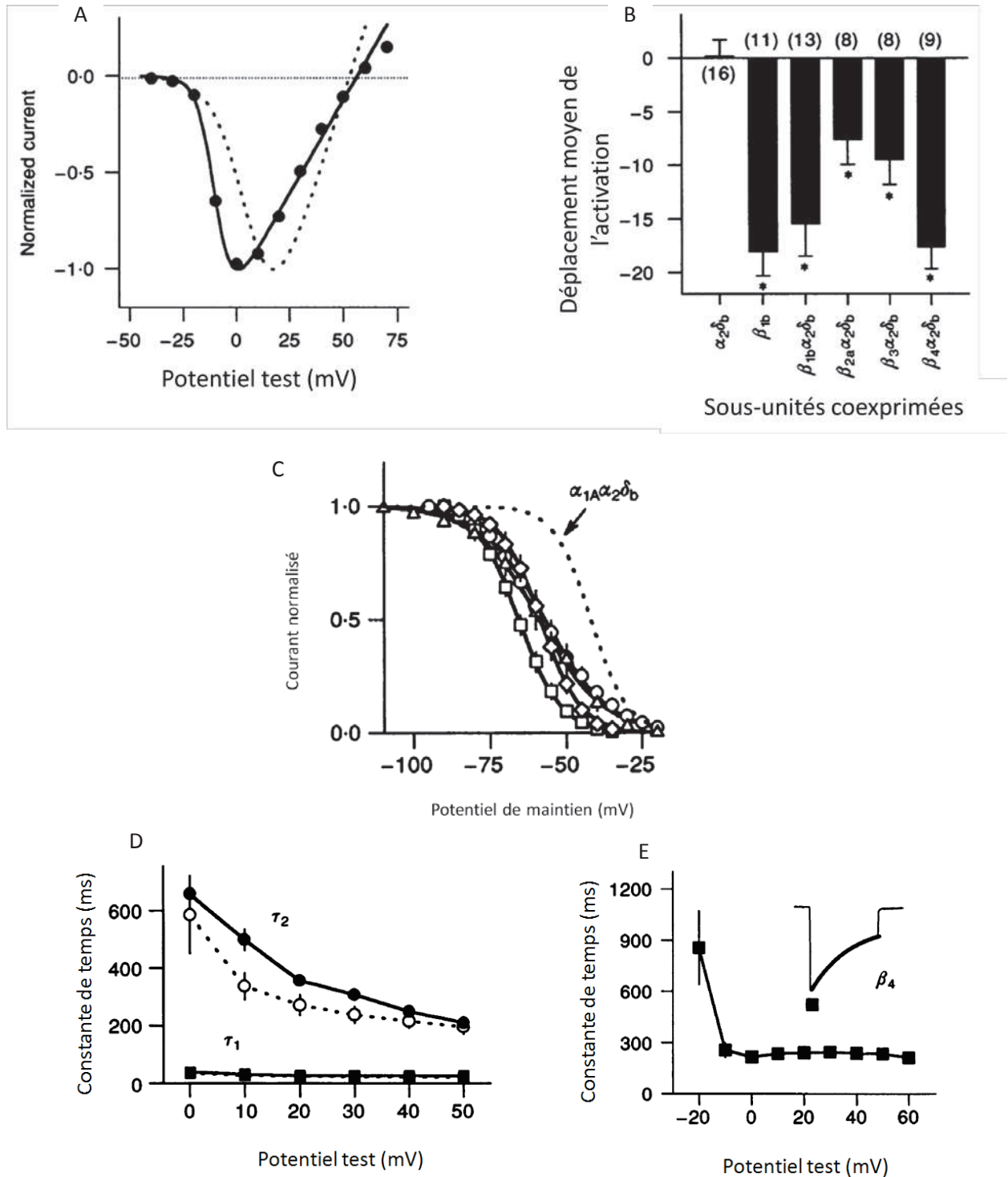


Figure 10. La sous-unité β_4 induit des modifications majeures des propriétés biophysiques du CCVD de type-P/Q. Le panel A illustre l'effet de β_{1b} sur l'hyperpolarisation de la dépendance au voltage de l'activation des CCVD de type-P/Q composé de la sous-unité canalaire Ca_v2.1 (ligne pointillée correspond à la relation entre le courant normalisé et le voltage pour Ca_v2.1 et la ligne noire continue pour Ca_v2.1 coexprimée avec β_{1b}). L'effet de β_4 est similaire voir panel B. Le panel C illustre l'effet de la sous-unité β_4 sur l'hyperpolarisation de la courbe d'inactivation (ligne pointillée correspond à la condition avec Ca_v2.1 coexprimée avec $\alpha_2\delta$ et la ligne continue avec \square correspond à la condition avec Ca_v2.1 coexprimée avec $\alpha_2\delta$ et β_4). Le panel D illustre la cinétique d'inactivation en présence de Ca_v2.1 (ligne continue) et en présence de Ca_v2.1 coexprimée avec $\alpha_2\delta$ (ligne pointillée). Le panel E montre l'accélération de l'inactivation par la sous-unité β_4 .

De Waard, M. et K. P. Campbell (1995). "Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in Xenopus oocytes." *The Journal of Physiology* **485**(Pt 3): 619-634.

β_4 est également impliquée dans l'assemblage et l'adressage du canal à la membrane (Brice, Berrow et al. 1997). Effectivement comme les autres sous-unités β , la sous-unité β_4 joue le rôle de chaperon et permet l'expression en surface des sous-unités canalaire Ca_v1 et Ca_v2 qui ne peuvent atteindre la membrane sans leur chaperon.

L'influence de β_4 sur l'assemblage, le ciblage et l'ancrage des CCVD à la membrane et sur leurs propriétés biophysiques s'explique en partie par les interactions existant entre la sous-unité β_4 et la sous-unité canalaire. Effectivement comme toutes les sous-unités β , β_4 contient un domaine d'interaction β hautement conservé (BID) qui interagit à haute affinité avec l'AID sur la boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité canalaire (Pragnell, De Waard et al. 1994; De Waard et Campbell 1995). Cette interaction est importante pour l'adressage du canal à la membrane et augmente la sensibilité au voltage des CCVD. De nouvelles données viennent nuancer l'idée d'une interaction directe entre le BID et AID. En Effet, Les structures cristallographiques de deux complexes AID- β révèlent que l'AID ne se lie pas directement au BID (Chen, Li et al. 2004; Opatowsky, Chen et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004). Au contraire, l'AID interagirait avec une fente hydrophobe dans le domaine GK nommé ABP pour AID-binding pocket. (Chen, Li et al. 2004). Un autre site d'interaction entre le domaine C-terminal de la sous-unité β_4 et la sous-unité canalaire qui intervient dans la modulation des cinétiques d'inactivation des CCVD a été identifié (Walker, Bichet et al. 1998). D'autre part les sous-unités β régulent les CCVD par le biais de protéines kinases, de protéines G et des protéines RGK. Nous n'aborderons pas ce point ici. Seule l'interaction de la sous-unité β avec les RGK sera abordée dans ce même chapitre, paragraphe 2.1.

Pour plus de précisions sur les différents aspects du rôle de la sous-unité β_4 comme sous-unité auxiliaire des CCVD abordés ici, lire (Buraei et Yang 2010).

1.4. Mutations de la sous-unité β_4 et leur implication sur la modulation des propriétés biophysiques des CCVD

Il existe des cas de mutations du gène CACNB4 reliées à des physiopathologies telles que l'épilepsie ou l'ataxie chez l'Homme. En 2000, Escayg et al., ont décrit deux mutations de la sous-unité β_4 trouvées chez deux jeunes patients (Escayg, De Waard et al. 2000). Tout d'abord la mutation R482X identifié chez un patient présentant une épilepsie myoclonique juvénile est à l'origine de la perte des 38 acides aminés C-terminaux de la protéine β_4 (voir Figure 11). La deuxième mutation correspondant à la substitution d'une cystéine par une phénylalanine (C104F) a été enregistrée chez un patient souffrant d'une ataxie convulsive (voir Figure 11).

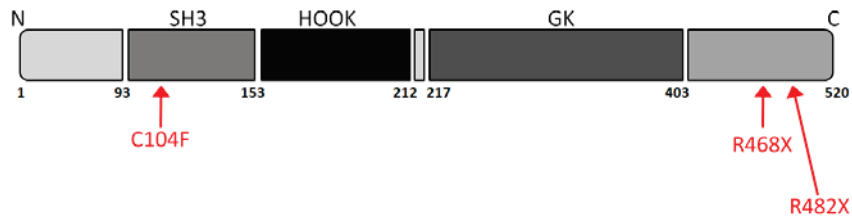


Figure 11. Localisation des mutations C104F, 4468X et 482X.

L'analyse fonctionnelle de ces mutants a été réalisée dans un système d'expression hétérologue (voir Figure 12). Ces expériences nécessitent l'injection dans des ovocytes de Xénope d'ARNm codant pour la sous-unité canalaire $Ca_v2.1$ combinée avec la sous-unité β_4 wild-type (WT) ou mutée. Une faible augmentation de densité de courant est observée pour les deux mutants. Aucun effet n'est enregistré sur la cinétique d'activation. Le mutant R482X est à l'origine d'une faible diminution de la constante de temps rapide d'inactivation alors qu'aucune altération de la cinétique d'inactivation n'est observée avec le mutant C104F. Dans l'ensemble, les effets des deux sous-unités mutantes sur l'activité des CCVD semblent relativement réduits.

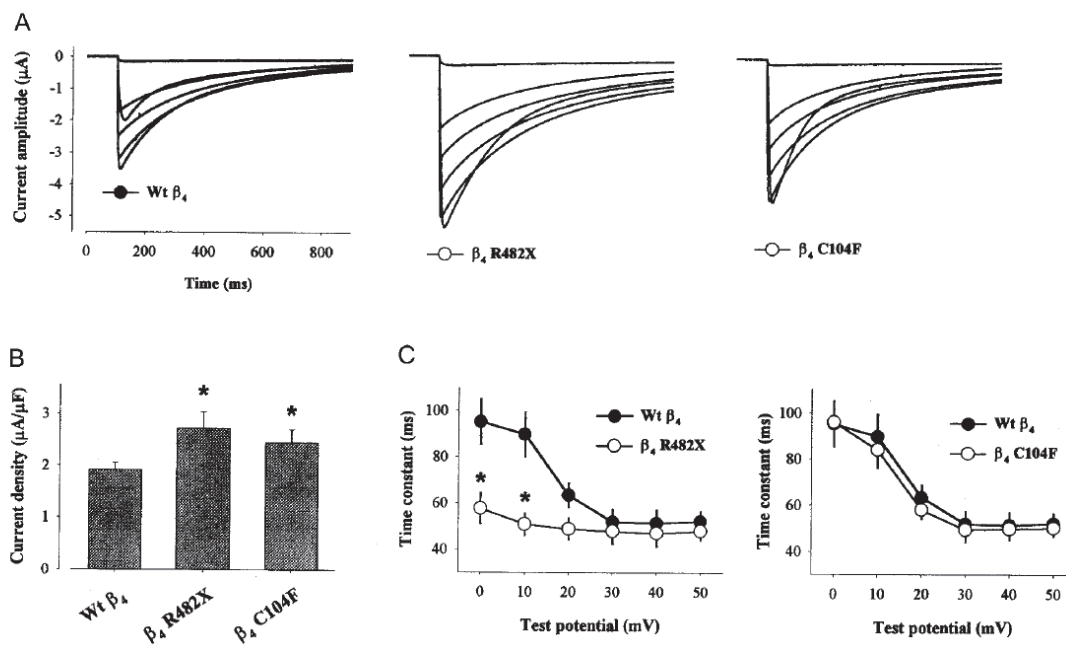


Figure 12. Analyse électrophysiologique des mutants R482X et C104F.

Ces expériences nécessitent l'injection dans des ovocytes de Xénope d'ARNm codant pour la sous-unité canalaire $Ca_v2.1$ combinée avec la sous-unité β_4 wild-type (WT) ou mutée (R482X ou C104F).

Le panel A représente les traces de courants enregistrés à des potentiels tests différents de -20, -10, 0, 10, 20 et 30 mV.

Le graphique B présente la densité moyenne de courants générés par les CCVD WT et mutés pour une dépolarisation membranaire de 0 mV.

Le panel C illustre les constantes de temps pour la composante rapide de l'inactivation avec la sous-unité β_4 wild-type (WT) ou mutée.

Escayg, A., M. De Waard, D. D. Lee, D. Bichet, P. Wolf, T. Mayer, J. Johnston, R. Baloh, T. Sander et M. H. Meisler (2000). "Coding and noncoding variation of the human calcium channel β_4 subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia." *The American Journal of Human Genetics* 66(5): 1531-1539.

Par ailleurs, en 2008, une autre mutation a été décrite. Il s'agit de la mutation R468Q identifiée sur le gène CACNB4 d'un jeune patient atteint de l'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson autrement appelé syndrome de Dravet et de son père (Ohmori, Ouchida et al. 2008). Les propriétés biophysiques du mutant R468Q ont été étudiées. Les analyses électrophysiologiques ont révélé une augmentation de l'amplitude de courant Ba^{2+} , des densités de courant et de la capacitance cellulaire dans les cellules BHK exprimant ce mutant par rapport aux cellules exprimant la sous-unité β_4 WT (voir **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, panel A et B). En ce qui concerne les courbes d'activation et d'inactivation, aucune différence n'a été observée entre l'effet de la sous-unité β_4 WT et la sous-unité β_4 mutée.

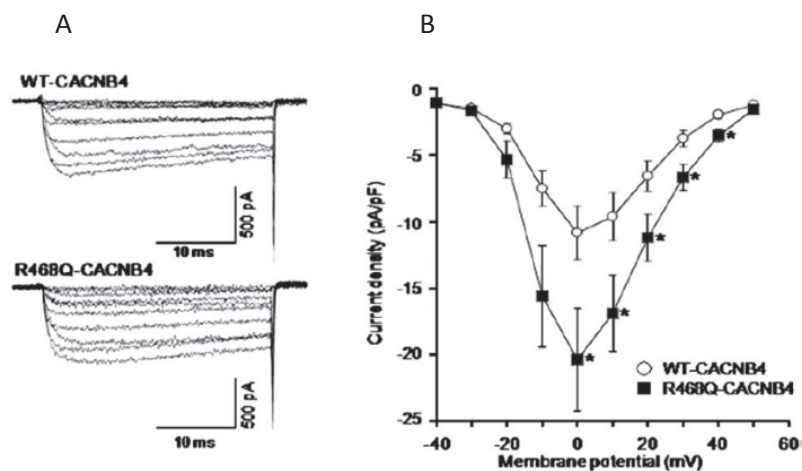


Figure 13. Comparaison des courants $Ca_v2.1$ enregistrés dans des cellules BHK exprimant la sous-unité β_4 WT ou mutée R468Q. Sur le panel A, on peut observer les tracés représentatifs des courants Ba^{2+} . Le graphique B représente la densité de courant en fonction du potentiel de membrane.

Ohmori, I., M. Ouchida, T. Miki, N. Mimaki, S. Kiyonaka, T. Nishiki, K. Tomizawa, Y. Mori et H. Matsui (2008). "A CACNB4 mutation shows that altered Cav2.1 function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy." *Neurobiology of Disease* **32**(3): 349-354.

Enfin, la mutation au niveau du gène CACNB4 décrite chez la souris, à l'origine du phénotype *léthargique* (*lh*), qui fait l'objet d'un paragraphe dans ce manuscrit (voir paragraphe 3 de ce chapitre, page 37) correspond à l'insertion de quatre nucléotides au niveau du site d'épissage en 5' (Burgess, Jones et al. 1997). Une analyse électrophysiologique a été réalisée dans les cellules de Purkinje de ces souris *lh* (Burgess, Biddlecome et al. 1999), voir Figure 14, page 32. Aucune différence significative de la dépendance au voltage de l'activation ni de la dépendance au voltage de l'inactivation n'est observée entre les souris *lh* et WT.

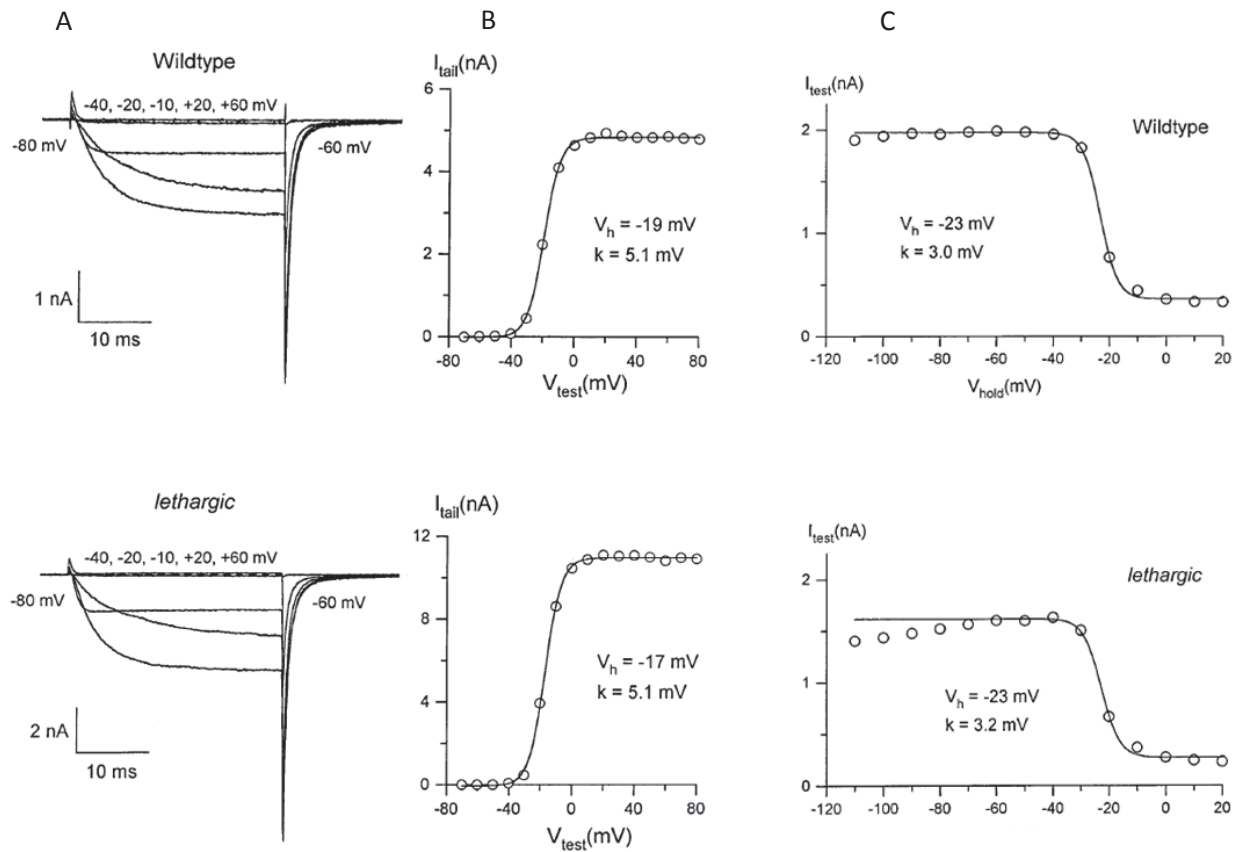


Figure 14. Comparaison des courants Ba^{2+} enregistrés dans les cellules de Purkinje WT et *lh*.

Le panel A représente les tracés des courants Ba^{2+} enregistrés dans les cellules de Purkinje WT (tracés du haut) et *lh* (tracés du bas) en réponse à des dépolarisations test de -40, -20, -10, +20 et + 60 mV de 30 ms avec les courants de queue calcique mesurés à -60 mV.

Les graphiques B représentent les courbes d'activation des courants de queue (I_{tail}) évoqués par des dépolarisations test de -70 à +80 mV (V_{test}) pour les cellules de Purkinje WT (graphique du haut) et *lh* (graphique du bas). V_h correspond au potentiel de demi-activation et k , le facteur de pente.

Les graphiques C correspondent à la courbe d'inactivation des courant Ba^{2+} dans les cellules de Purkinje WT et *lh*. Les courants entrants sont évoqués par un pulse test de -10 mV après un pulse de 4-s au voltage indiqué (V_{hold}). V_h est le potentiel de demi-inactivation et k , le facteur de pente.

Burgess, D. L., G. H. Biddlecome, S. I. McDonough, M. E. Diaz, C. A. Zilinski, B. P. Bean, K. P. Campbell et J. L. Noebels (1999). " β Subunit Reshuffling Modifies N- and P/Q-Type Ca^{2+} Channel Subunit Compositions in Lethargic Mouse Brain." [Molecular and Cellular Neuroscience](#) **13**(4): 293-311.

2. Interaction de la sous-unité β avec d'autres protéines

Nous aborderons ici les interactions existant entre les sous-unités β et des protéines autres que les sous-unités des CCVD. Cet aperçu non exhaustif nous permettra de réaliser l'étendue des fonctions accomplies par les sous-unités β .

2.1. Interaction avec les protéines RGK

Parmi la super-famille des protéines Ras, les protéines RGK constituent une sous-famille de petites protéines qui lient le GTP (Guanosine Triphosphate). Cette sous-famille comprend quatre membres, Rem (également nommée Rem1 ou Ges), Rem2, Rad et Gem (l'homologue murin est connu sous le nom de Kir). Les RGK exercent leur fonction via leur changement de conformation d'une forme active liée à GTP à une conformation inactive liée à GDP (Correll, Pang et al. 2008). Béguin et al. ont montré en 2001 que ces RGK fonctionnent comme inhibiteurs potentiels des CCVD via leur interaction directe avec la sous-unité β des CCVD (Béguin, Nagashima et al. 2001). Plus exactement ces auteurs ont découvert l'interaction *in vitro* de Kir/Gem lié à GTP avec les sous-unités β_1 , β_2 et β_3 . Par ailleurs, ils ont étudié le rôle fonctionnel de Kir/Gem sur les CCVD, en co-exprimant la sous-unité canalaire $Ca_v1.2$ ou $Ca_v1.3$ avec β_1 , β_2 ou β_3 et Kir/Gem dans des ovocytes de xénope. Ces expériences ont révélé l'inhibition des CCVD de type-P/Q et -N par Kir/Gem *via* son interaction avec les sous-unités β . Cette réduction de l'activité des CCVD s'explique par une diminution de l'expression de la sous-unité canalaire à la membrane plasmique. En 2005, ce même groupe de recherche a démontré l'interaction d'un autre membre des RGK, Rem2, avec les sous-unités β , de manière dépendante à GTP. Rem2 inhibe l'activité des CCVD en bloquant l'expression de la sous-unité canalaire à la membrane plasmique (Béguin, Mahalakshmi et al. 2005). Le mécanisme par lequel les protéines RGK régulent l'activité des CCVD a été examiné. La localisation nucléaire des RGK (plus exactement Rad, Rem et Kir/Gem) est modulée par 14-3-3 et la Ca^{2+} -calmoduline (Béguin, Mahalakshmi et al. 2005; Béguin, Mahalakshmi et al. 2006). Les protéines RGK sont capables de séquestrer la sous-unité β_3 au noyau de manière dépendante à 14-3-3 et la Ca^{2+} -calmoduline empêchant ainsi l'interaction de la sous-unité β_3 avec la sous-unité canalaire et bloquant de ce fait l'ancrage des CCVD à la membrane (Béguin, Mahalakshmi et al. 2006).

2.2. [Interaction avec HP1 \$\gamma\$](#)

Concernant l'interaction d'un variant tronqué de β_4 , β_{4c} avec HP1 γ , se référer au paragraphe 3.5 du Chapitre 1.

2.3. [Interaction avec les protéines synaptiques](#)

Il est bien établi que la sous-unité canalaire des CCVD activés à haut voltage interagit avec les protéines synaptiques telles que la syntaxine, SNAP-25 ou encore la synaptotagmine. Ces interactions jouent un rôle important dans l'amarrage des vésicules de fusion à la membrane plasmique et leur fusion (Sheng, Westenbroek et al. 1998). De récents travaux ont montré l'interaction de la sous-unité β avec des protéines synaptiques. Plus exactement, en 2007, l'équipe de Mori, a détecté par la technique du double hybride et par des expériences de co-immunoprécipitation, l'interaction de la sous-unité β_{4b} avec RIM1, un composant essentiel de la zone présynaptique active (Kiyonaka, Wakamori et al. 2007). Cette interaction engage la partie C-terminale de RIM1 et le module SH3-HOOK-GK. L'interaction de RIM1 et β_{4b} est impliquée dans la libération de neurotransmetteurs par deux mécanismes : le maintien de l'influx Ca^{2+} par inhibition de l'inactivation des CCVD et l'ancrage des vésicules contenant les neurotransmetteurs à proximité des CCVD. Il a été également montré que la partie N-terminale de β_{4a} et β_3 est engagée dans des interactions dépendantes du calcium avec la synaptotagmine I ; des concentrations élevées de Ca^{2+} (10 mM) empêchant cette interaction (Vendel, Terry et al. 2006). L'importance au niveau fonctionnel de cette interaction reste encore inconnue.

Il est important de noter que ces interactions s'ajoutent à celles existant entre la sous-unité canalaire des CCVD et les protéines synaptiques telles que la syntaxine, SNAP-25 et la synaptotagmine I et jouent un rôle important dans l'amarrage et la fusion des vésicules synaptiques (Sheng, Westenbroek et al. 1998).

2.4. [Interaction avec la dynamine](#)

La dynamine fait partie d'une large famille de GTPases impliquées dans des processus tels que l'endocytose, le transport de vésicules, la division d'organites ou la cytokinèse. La dynamine comporte au minimum trois modules, un domaine GTPase en N-terminal, un domaine conservé au centre de la protéine et un domaine GTPase en C-terminal (Praefcke et McMahon 2004). Cependant la majorité des dynamines incluant les dynamines de mammifère I, II et III, présente des domaines supplémentaires : un domaine homologue de la pleckstrine responsable de la liaison de phospholipides et un domaine riche en prolines qui interagit avec le domaine SH3 de nombreuses protéines. Un domaine SH3 est présent dans la sous-unité β des CCVD, cependant la structure cristallographique prédisait l'incompatible liaison de ce domaine avec des ligands polyproline (Chen, Li et al. 2004; Van Petegem, Clark et al. 2004). Pourtant en 2007, le laboratoire d'Hidalgo a observé in vitro l'interaction du domaine SH3 de la sous-unité β_{2a} des CCVD (β -SH3) avec la dynamine (Gonzalez-Gutierrez, Miranda-Laferte et al. 2007). Cette association entraîne la réduction du nombre de CCVD à la membrane dans l'ovocyte de xénope par internalisation des CCVD, effet qui peut-être inversé par la préincubation d'un peptide GST-Dyn⁸²⁹⁻⁸⁴² connu pour bloquer l'interaction entre la dynamine et les domaines SH3. Ceci traduit l'importance de l'interaction de la sous-unité β_{2a} avec la dynamine dans les processus d'endocytose des CCVD. Très récemment, le même laboratoire a mis en évidence l'importance de l'homodimérisation de β -SH3 par un simple pont disulfure dans le processus d'endocytose des CCVD de type-L (Miranda-Laferte, Gonzalez-Gutierrez et al. 2011). En effet la substitution d'une seule cystéine dans le mutant β -SH3 C113A abolit la capacité de dimérisation et empêche l'internalisation des CCVD bien que l'interaction de β -SH3 C113A avec la dynamine soit préservée. Cette même étude indique dans les cellules TSA 210 que la sous-unité β_{2a} des CCVD localisée à la membrane forme des oligomères. La formation de ces oligomères est réduite par Ca_v1.2. L'association de β_{2a} avec un motif AID empêche en effet la dimérisation de β_{2a} et l'internalisation des CCVD. Ceci conforte l'idée que les rôles de β_{2a} dans la régulation des paramètres sensibles au voltage des CCVD et leur internalisation sont deux fonctions exclusives de β_{2a} .

2.5. [Interaction avec la bestrophine](#)

La bestrophine-1 (Best1) correspond à un canal ionique Cl⁻ exprimé dans l'épithélium pigmentaire de la rétine dont les mutations sont à l'origine de la dégénérescence maculaire chez l'Homme et le chien (Hartzell, Qu et al. 2008). Dans un système de co-expression des CCVD de type-L et de fragments de la partie C-terminal de Best1, les motifs riches en proline entre les acides aminés 330 et

346 de Best1 ont été reconnus pour leur capacité d'interaction avec les sous-unités des CCVD via leur domaine SH3 (Yu, Xiao et al. 2008; Reichhart, Milenkovic et al. 2010). L'interaction physique de la protéine entière, Best1 avec les sous-unités β des CCVD a été confirmée cette année par l'équipe de Strauß et al. (Milenkovic, Krejcova et al. 2011). Best1 module les propriétés biophysiques des CCVD de type-L dans l'épithélium pigmentaire de la rétine. Cependant en absence des sous-unités des CCVD β_{2a} ou β_4 ou en présence de la sous-unité β_3 des CCVD, l'activité des CCVD de type-L n'est plus modulée par Best1 (Yu, Xiao et al. 2008; Reichhart, Milenkovic et al. 2010). Ces différents travaux laissent penser que Best1 régule les CCVD de type-L via leur interaction avec les sous-unités β et plus précisément avec β_{2a} ou β_4 .

2.6. Interaction avec les canaux potassiques à large conductance activés par le voltage et les ions Ca^{2+}

Les canaux potassiques à large conductance activés par le voltage et les ions Ca^{2+} (BK_{Ca}) sont activés comme leur nom l'indique coopérativement par la dépolarisation membranaire et la liaison d'ions Ca^{2+} cytoplasmiques. Ils contribuent en présence d'autres canaux ioniques, à la régulation de l'amplitude et la fréquence des décharges de potentiels d'action, l'initiation et la propagation d'ondes dendritiques Ca^{2+} , la libération d'hormones et de neurotransmetteurs et la modulation de la contraction musculaire (Salkoff, Butler et al. 2006). La sous-unité canalaire des BK_{Ca} est codée par le gène Slo1 aussi nommé *KCNMA1*. En 2008, l'équipe de Dryer a montré l'interaction de la sous-unité β_1 des CCVD avec la partie cytoplasmique C-terminale de Slo1 (Zou, Jha et al. 2008). Cette interaction module les propriétés biophysiques de ces canaux, plus précisément β_1 ralentit les cinétiques d'activation de Slo1.

2.7. Interaction avec le transporteur du Zinc 1

Comme pour toutes les cellules, les neurones doivent maintenir une certaine concentration intracellulaire en zinc, en effet des concentrations en zinc trop faibles inhibent la croissance et la division cellulaire alors que de trop fortes concentrations peuvent être toxiques pour les neurones (Colvin, Davis et al. 2000). Dans ce cadre, le transporteur de zinc 1 (ZnT-1) intervient dans le métabolisme et confère aux cellules une résistance à la toxicité du zinc. ZnT-1 a également été caractérisé comme inhibiteur des CCVD de type-L (Beharier, Etzion et al. 2007). En 2009, Lévy et al. ont remarqué que cette modulation de la fonction des CCVD de type-L se faisait par l'intermédiaire de la sous-unité β des CCVD (Levy, Beharier et al. 2009). La sous-unité β_{2a} interagit avec ZnT-1 dans les cellules HEK293. Cette interaction est responsable de la diminution d'expression à la surface de la sous-unité canalaire $\text{Ca}_v1.2$.

2.8. Interaction avec Ahnak

Il a été démontré que la phosphoprotéine Ahnak de 700 kDa, interagit avec la sous-unité β des CCVD dans les cellules cardiaques, les lymphocytes T et les ostéoblastes (Haase, Podzuweit et al. 1999; Hohaus, Person et al. 2002; Matza, Badou et al. 2008; Shao, Czymmek et al. 2009). Plus exactement des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence l'interaction d'Ahnak avec les sous-unités β_{1b} , β_{2a} et β_3 (Haase, Podzuweit et al. 1999; Alvarez, Hamplova et al. 2004; Shao, Czymmek et al. 2009). Cette interaction est impliquée dans la modulation des CCVD. En effet, Shao et al. ont remarqué en 2009, dans les ostéoblastes, que l'association d'Ahnak à la sous-unité canalaire $Ca_v1.2$ via son interaction avec la sous-unité β_2 est importante pour la signalisation calcique (Shao, Czymmek et al. 2009). En présence d'un ARN interférant (siRNA) réduisant l'expression protéique d'Ahnak, l'influx d'ions Ca^{2+} mesuré par l'intermédiaire du Fura 2, un indicateur des ions Ca^{2+} , à travers la membrane plasmique en réponse à une hypotonie croissante, diminue. L'étude menée en 2008 par Matza et al. fournit un exemple intéressant dans les lymphocytes T, de l'importance d'Ahnak dans la signalisation calcique via les CCVD (Matza, Badou et al. 2008). Utilisant des souris $Ahnak1^{-/-}$, les auteurs ont découvert qu'Ahnak1 est nécessaire à l'expression des CCVD de type-L au niveau de la membrane plasmique probablement via son interaction avec la sous-unité β . Ceci est corrélé avec une diminution de l'influx calcique suivant la stimulation du TCR (T cell antigen receptor) dans les lymphocytes T $Ahnak1^{-/-}$. De façon intéressante, dans ces cellules, l'activation du facteur NFATc qui est transloqué dans le noyau en réponse au calcium est réduite de manière significative. De plus les auteurs ont démontré que la modulation de l'influx calcique par Ahnak1 ne fait pas intervenir une régulation de l'influx calcique par les stocks intracellulaires de calcium mais spécifiquement les CCVD de type-L.

3. La souris léthargique, un modèle approprié d'étude du rôle de β_4

Les lignées de souris mutantes spontanées constituent des modèles de choix pour étudier l'organisation et le rôle des CCVD. Les mutants *tottering*, *learner*, *rolling* ou *Nagoya rocker* ont été identifiés pour leur mutation au niveau du gène *Cacna1* codant pour la sous-unité $Ca_v2.1$ des CCVD de type-P/Q (Fletcher, Lutz et al. 1996; Mori, Wakamori et al. 2000). Les souris *stargazer* et *léthargique (lh)* ont été respectivement décrites pour une mutation au niveau du gène codant pour la sous-unité γ_2 et β_4 (Burgess, Jones et al. 1997; Letts, Felix et al. 1998). Dans cette partie, nous explorerons le rôle physiologique de β_4 au travers des données rapportées sur la souris *lh*. Nous verrons en quoi c'est un

modèle de choix pour l'étude de cette sous-unité des CCVD et pourquoi il est difficile de penser que son rôle se limite à l'assemblage et la régulation de CCVD.

3.1. La souris *lh* : un phénotype complexe

Décrite pour la première fois en 1964 par Dickie, la souris *lh*, qui apparaît spontanément à partir d'une lignée de souris BALB/cGN, présente un phénotype neurocomportemental complexe. Cette souris manifeste une difficulté à se mouvoir avec une démarche lente et hésitante (Dickie 1964). Ce comportement moteur explique l'origine du nom *léthargique* utilisé pour désigner cette souris. La souris *lh* est rapidement caractérisée par les crises spontanées qu'elle présente (Dickie 1964). Les études encéphalographiques révèlent des attaques électroencéphalographiques synchronisées bilatérales avec des pointes d'ondes de 5 à 6 Hz. Ces décharges de forme épileptique sont considérées comme des décharges de pointes d'ondes si les critères suivants sont respectés : durée des décharges supérieure à 0,6 sec avec des pics de forme épileptique (c'est-à-dire inférieur à 70 msec par pic), une fréquence typique chez la souris de 5-6 Hz et un enregistrement simultané dans les deux hémisphères (Hosford, Lin et al. 1995). Pendant la durée des attaques, la souris *lh* reste immobile et non-réceptive. Chez l'Homme, l'épilepsie d'absence est caractérisée par de brefs épisodes bilatéralement synchronisés avec des décharges de pointes d'ondes de 2,5 à 4 Hz qui se manifestent elle-même comme un arrêt comportemental soudain et une conscience entravée (Weiergräber, Stephani et al. 2010). Ces caractéristiques ressemblent à celles observées chez la souris *lh*. De ce fait, cette lignée est considérée comme un modèle valide pour étudier les crises d'épilepsie-absences. L'hypokinésie observée chez la souris *lh* figure plutôt comme une stratégie apprise par les souris pour éviter les attaques que le résultat d'une altération du système nerveux moteur (Khan et Jinnah 2002). Cette hypothèse est supportée par le fait que les souris présentent moins de crises vers 1 à 3 mois comparées aux souris plus jeunes, moment correspondant à l'émergence de ce comportement hypokinétique.

D'autres troubles neurologiques ont également été identifiés. La souris *lh* manifeste une ataxie locomotrice vers 2 à 3 semaines (Sidman, Green et al. 1965). De plus il a été mis en évidence que cette souris présente une dyskinésie paroxystique caractérisée par des attaques intermittentes de mouvements involontaires anormaux qui se superposent à une ligne de base relativement normale (Devanagondi, Egami et al. 2007; Shirley, Rao et al. 2008). Ce problème moteur fut tout d'abord confondu avec les manifestations motrices de l'épilepsie mais fut par la suite clairement différencié des crises d'épilepsie-absences. Les caractéristiques qui permettent de distinguer la dyskinésie paroxystique de l'épilepsie absences sont brièvement, les enregistrements EEG (électroencéphalographie) ne reflétant pas l'épilepsie, la durée des crises (plus longues que les crises d'épilepsie), l'absence de l'inconscience présumée accompagnant les crises d'épilepsie-absences, la possibilité de crises répétées

sans période réfractaire que l'on détecte pour l'épilepsie et enfin le déclenchement des attaques par des facteurs environnementaux (non observé dans le cas de crises d'épilepsie).

A ce phénotype neurocomportemental complexe de troubles neurologiques, s'ajoutent des troubles affectant la croissance et les systèmes immunitaire et reproducteur. En effet, la souris *lh* présente un retard de croissance post-natale avec une réduction du poids et une cachexie (syndrome comprenant une perte de poids, une atrophie musculaire et une faiblesse musculaire) entre 3 et 6 mois (Dung et Swigart 1972; Dung 1975). Le système immunitaire est également largement affecté avec entre autres symptômes un développement du thymus anormal, une rate de taille réduite et une diminution du nombre de lymphocytes. Enfin cette souris souffre d'infertilité. Le maintien de la lignée est ainsi difficile et la génération d'homozygote *lh/lh* est possible exclusivement par croisement des hétérozygotes *lh/wild-type* (WT). La somme de ces troubles provoque une mortalité précoce avec un risque accru de mortalité entre 3 et 4 semaines. Il faut néanmoins souligner que les souris *lh* survivantes après 2 mois, retrouvent un poids et des fonctions immunitaires normales montrant que ces troubles sont liés à l'âge.

3.2. Une mutation du gène codant pour la sous-unité β_4 des CCVD à l'origine du phénotype *lh*

L'équipe de Noebels a été la première à mettre en évidence l'anomalie moléculaire à l'origine du phénotype *lh*. Ce groupe de recherche a identifié une mutation au niveau du gène codant pour la sous-unité β_4 des CCVD, *CACNB4* situé sur le chromosome 2 correspondant à l'insertion de quatre nucléotides au niveau du site d'épissage en 5' ((Burgess, Jones et al. 1997), voir Figure 15).

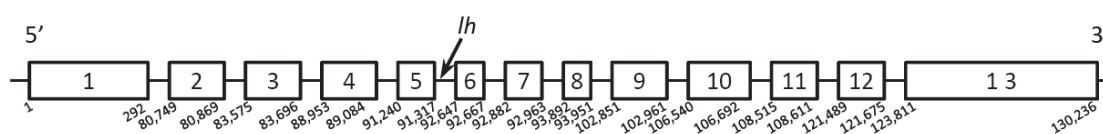


Figure 15. Organisation schématique de la séquence d'ADN de *Cacnb4*
Les exons sont signalés par des rectangles blancs et la position de la mutation *lh* est indiquée par une flèche.

Cette mutation entraîne un décalage du cadre de lecture et les 77 pb d'exon précédant la mutation sont constamment éliminés pendant le processus d'épissage. Ceci prédit une sous-unité β_4 tronquée dépourvue de 60% de la séquence C-terminale par rapport à la protéine WT. Cependant à l'heure actuelle, les efforts pour révéler l'expression d'une séquence tronquée de β_4 dans le cerveau de souris *lh* sont restés vains. Effectivement McEnery et al. n'ont pas réussi à détecter par Western blot, de β_4 tronquée dans le prosencéphale et le cervelet des souris *lh* (McEnery, Copeland et al. 1998). L'absence de cette séquence tronquée indique que le produit de traduction est hautement instable et

rapidement dégradé après synthèse. La souris *lh* est donc considérée par beaucoup comme un modèle de souris knock-out (KO) spontanée. Cette hypothèse doit cependant être considérée avec prudence car si cette séquence était exprimée, il est probable qu'elle possède une activité fonctionnelle comme certains variants courts d'épissage de β_4 comme β_{4c} (Hibino, Pironkova et al. 2003; Xu, Lee et al. 2011).

3.3. Souris *lh* : un modèle d'épilepsie d'absence

Considérée comme un modèle intéressant d'épilepsie-absence, la souris *lh* a été étudiée pour déterminer les réseaux neuronaux et les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ce phénotype. La souris *lh* a été également utilisée pour développer de nouvelles molécules antiépileptiques. L'implication des récepteurs GABA_B (récepteurs acide γ -aminobutyrique de type B) dans la genèse des crises d'épilepsie a été rapidement mise en évidence. En effet l'administration d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs GABA_B respectivement augmente ou diminue la fréquence des crises des souris *lh* (Hosford, Clark et al. 1992; Hosford, Lin et al. 1995; Hosford, Wang et al. 1995; Aizawa, Ito et al. 1997). La densité des récepteurs GABA_B augmente dans le néocortex, dans le noyau caudé-putamen et de multiples noyaux du thalamus des souris *lh* par rapport aux souris WT (Hosford, Clark et al. 1992; Hosford, Lin et al. 1995; Hosford, Lin et al. 1999). Ce n'est pas le cas pour les récepteurs GABA_A dont le nombre reste inchangé dans le néocortex des souris *lh*. Par ailleurs des niveaux d'expression en ARNm et protéine de GAD67, une glutamate décarboxylase responsable de la synthèse de GABA à partir de glutamate, plus élevés ont été détectés dans le noyau réticulaire thalamique de souris *lh* (Lin, Lin et al. 1999). Ces résultats laissent penser à une augmentation de la synthèse de GABA dans le noyau réticulaire thalamique, malheureusement cette hypothèse n'a pas encore été explorée. Cependant une étude menée par De Sarro en 2005 a examiné les niveaux d'acides aminés dans différentes régions du cerveau de souris *lh* et WT (De Luca, Di Giorgio et al. 2005). Cette étude montre que la concentration de GABA dans le diencephale des souris *lh* n'est pas significativement différente de celle détectée dans le diencephale de souris WT. Une augmentation significative de GABA dans le cortex et une diminution significative dans le cervelet des souris *lh* sont par contre rapportées. Ces modifications concernant la concentration de GABA et l'augmentation du nombre de récepteurs ne sont pas facilement corrélées avec des altérations de la libération de GABA et d'effets médiés par les récepteurs GABA_B. Hosford et al. ont exploré en 1992 la possibilité que les effets médiés par les récepteurs GABA_B contribuent aux mécanismes neuronaux qui sous-tendent l'apparition des crises d'épilepsie. Ils ont observé une inhibition significativement plus importante des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) générés par les récepteurs NMDA (N-méthyl D-aspartate) par les récepteurs au niveau de la région CA1 (corne d'Amon 1) dans des coupes d'hippocampe de souris *lh*

(Hosford, Clark et al. 1992). Dans le néocortex de souris *lh*, les récepteurs présynaptiques GABA_B inhibent de manière significativement plus importante la libération de [³H]-GABA (Lin, Wang et al. 1995). Au contraire dans le thalamus de souris *lh*, les effets médiés par les récepteurs présynaptiques GABA_B sont plus réduits par rapport aux souris WT (Caddick et Hosford 1996). Des enregistrements en patch-clamp en configuration cellule entière ne montrent pas de différence dans les courants évoqués, médiés par GABA_B dans les neurones du thalamus ventrobasal entre souris *lh* et WT (Caddick, Wang et al. 1999). De même Caddick et al. n'ont observé en 1999 aucune différence dans les effets médiés par les récepteurs présynaptiques GABA_B sur les afférences inhibitrices des neurones du thalamus ventrobasal dans les souris *lh* et WT. Si les altérations chez la souris *lh* du système GABAergique semble complexe, il est néanmoins très probable que les dommages de ce système dans le thalamus soient impliqués dans la pathogenèse de l'épilepsie-absences. Il est maintenant établi que le thalamus contribue à la genèse de l'épilepsie (Kohl, Paulsen et al. 2010). Les projections corticothalamiques permettant de synchroniser l'activité du réseau expliquent la synchronisation des décharges de pointes d'ondes lors d'épilepsie-absences généralisée dans le cortex et le thalamus. Des structures à l'origine de l'épilepsie-absences dans les souris *lh* ont été identifiées dans le thalamus, il s'agit du noyau antéro-ventro-latéral, du noyau reuniens et du noyau réticulé (Hosford, Lin et al. 1995). Ces structures présentent des caractéristiques communes : elles contiennent des sites de liaison à GABA_B, les décharges de pointes d'ondes dans le cortex sont synchronisées avec les décharges de pointes d'ondes dans ces noyaux thalamiques et enfin elles présentent une régulation des crises d'épilepsie par les récepteurs GABA_B. L'implication du noyau réticulé dans la genèse des décharges de pointes d'ondes dans l'épilepsie-absences a été démontrée dans d'autres modèles animaux, en particulier le rat GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) (Tsakiridou, Bertollini et al. 1995; Slaght, Leresche et al. 2002). Le noyau réticulé est essentiellement composé de neurones GABAergiques qui projettent au niveau du thalamus dorsal et reçoit des collatérales des fibres corticothalamiques et thalamocorticales. Les neurones GABAergiques du noyau réticulé exercent ainsi des influences sur les neurones thalamocorticaux et les circuits locaux de cellules GABAergiques et plus précisément hyperpolarisent ces cellules (Steriade et Contreras 1995). Cette hyperpolarisation est un pré-requis pour la dé-inactivation des CCVD de type-T à l'origine de la génération du bouffées de potentiels d'action rebonds (Kohl, Paulsen et al. 2010). L'implication des courants Ca²⁺ de type-T dans l'implication des décharges de pointes d'ondes, caractéristiques de l'épilepsie-absences a été rapportée chez le rat GAERS (Danober, Deransart et al. 1998; Talley, Solórzano et al. 2000). L'enregistrement des neurones thalamocorticaux mettent en évidence des amplitudes de courants Ca²⁺ de type-T plus élevées dans la souris *lh* que dans la souris WT (Zhang, Mori et al. 2002). Cette augmentation des courants Ca²⁺ de type-T ne s'explique pas par une variation de l'expression en ARNm de Ca_v3.1, Ca_v3.2 or Ca_v3.3. Une étude dirigée par Shin a investigué en 2004, le rôle de Ca_v3.1 dans la genèse de l'épilepsie d'absence chez la souris *lh*. Pour cela, une souris double mutant Ca_v3.1^{-/-}

$\beta_4^{lh/lh}$ a été générée (Song, Kim et al. 2004). Cette étude montre que la mutation nulle de $\text{Ca}_v3.1$ réduit de manière significative les décharges de pointes d'ondes chez la souris *lh* révélant le rôle important de $\text{Ca}_v3.1$ dans la genèse des crises d'épilepsie chez la souris *lh*.

3.4. Le remaniement des sous-unités β compense l'absence de β_4 dans la souris *lh*

β_4 semble être préférentiellement associée aux sous-unités canalaire $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$ respectivement des CCVD de type-P/Q et -N (Liu, De Waard et al. 1996). On sait que β_4 interagit à haute affinité avec l'AID de la boucle cytoplasmique I-II de la sous-unité $\text{Ca}_v2.1$ ((De Waard et Campbell 1995) voir paragraphe 1.3 de ce chapitre). Plusieurs études indiquent une colocalisation de β_4 et de $\text{Ca}_v2.1$ dans les neurones de Purkinje et les cellules granulaires du cervelet (Lin, Wang et al. 1995; Ludwig, Flockerzi et al. 1997; Volsen, Day et al. 1997; Lin, Barun et al. 1999). Concernant les CCVD de type-N, l'association de β_4 avec $\text{Ca}_v2.2$ est effective dans le prosencéphale et le cervelet (McEnery, Copeland et al. 1998). Chez la souris *lh*, l'absence de β_4 devrait affecter l'interaction préférentielle $\text{Ca}_v2.1$ et $\text{Ca}_v2.2/\beta_4$ et pourrait entraîner des défauts dans la localisation des CCVD de type-P/Q et -N et provoquer une diminution de l'amplitude des courants Ca^{2+} provenant de ces canaux. Plusieurs études ont exploré cette question et infirmé cette hypothèse séduisante à priori. Le laboratoire de Noebels a réalisé des expériences d'immunohistochimie sur des sections de cervelet adulte pour analyser les changements possibles dans la localisation de $\text{Ca}_v2.1$ et $\text{Ca}_v2.2$ entre les souris WT et *lh*. Aucune différence dans la localisation de ces deux sous-unités canalaire n'est observée (Burgess, Biddlecome et al. 1999). L'immunoréactivité de $\text{Ca}_v2.1$ est particulièrement marquée dans le soma et les segments dendritiques proximaux des neurones de Purkinje et présente des niveaux plus faibles dans les couches moléculaire et granulaire du cervelet. Le patron d'immunoréactivité de $\text{Ca}_v2.2$ est très différent. En effet cette sous-unité canalaire n'est pas détectée dans les neurones de Purkinje mais au niveau des couches moléculaire et granulaire (Burgess, Biddlecome et al. 1999). L'équipe de Hosford a obtenu des résultats similaires. En effet, des expériences d'histochimie par hybridation *in situ* mettent en évidence une distribution identique des ARNm de $\text{Ca}_v2.1$ et $\text{Ca}_v2.2$ entre les sections de cerveaux de souris WT et *lh* (Lin, Barun et al. 1999). De plus, les fonctions des CCVD de type-P/Q et -N ne semblent pas être altérées chez la souris *lh*. Les courants Ba^{2+} à travers les CCVD dans les cellules de Purkinje du cervelet de souris *lh* présentent des caractéristiques identiques à celles de souris WT en termes d'amplitude de courants et de dépendance au voltage de l'activation et de l'inactivation (Burgess, Biddlecome et al. 1999). De même, au niveau de la synapse hippocampique CA3-CA1, les propriétés biophysiques des CCVD ne sont pas modifiées chez la souris *lh* (Qian et Noebels 2000). Des mécanismes compensatoires pourraient expliquer le maintien de la localisation et des propriétés biophysiques des CCVD de type-P/Q et -N chez

la souris *lh*. McEnery et al. ont étudié les niveaux d'expression dans le prosencéphale et le cervelet de souris *lh* et WT (McEnery, Copeland et al. 1998). Leurs résultats indiquent une augmentation de l'expression de la sous-unité β_{1b} dans ces deux structures cérébrales. Burgess et al. ont mis en évidence un remaniement des sous-unités β qui se traduit par une augmentation de sous-unités β_{1b} et β_3 associées avec $Ca_v2.1$ et de sous-unités β_{1b} , β_2 et β_3 associées avec $Ca_v2.2$ dans le cerveau de souris *lh* (Burgess, Biddlecome et al. 1999). Ces modifications ne sont pas accompagnées de changements significatifs dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les sous-unités β_{1-3} . Ceci étaye une augmentation de la stabilité des sous-unités β due à leur association avec les sous-unités canalaire ou une augmentation de la traduction d'ARNm pré-existant. Ces deux études laissent penser que l'absence de β_4 est compensée par la réorganisation dans la composition en sous-unités β des CCVD de type-P/Q et -N. Ce remaniement des sous-unités β est tout de même imparfait. Effectivement, malgré l'association de β_{1b} avec $Ca_v2.2$ dans le cervelet, une diminution de la densité en CCVD de type-N et de l'expression de $Ca_v2.2$ a été observée (McEnery, Copeland et al. 1998). Par ailleurs ce type de mécanisme moléculaire compensatoire n'est probablement pas possible dans le thalamus, région du cerveau caractérisée par une forte expression de β_4 et par l'absence d'expression de la majorité des autres sous-unités β ((Buraei et Yang 2010) et Tableau 2, page 24). Cette observation pourrait expliquer pourquoi cette région du cerveau est particulièrement affectée par la mutation *lh* à l'origine de troubles neurologiques et plus particulièrement d'épilepsie absences.

Ces données confortent l'idée que β_4 remplit d'autres rôles que celui de sous-unité auxiliaire des CCVD. En effet si ces fonctions de chaperon et de régulation des CCVD sont compensées par le remaniement des sous-unités β , il reste néanmoins que la souris léthargique présente un phénotype neurologique très marqué qui ne s'explique pas uniquement par un dérèglement de la fonction des CCVD.

Chapitre 3. Récepteur aux hormones thyroïdiennes alpha

1. Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont produites par une glande endocrine, la thyroïde. Elles possèdent une même structure organique : la thyronine, formée par deux noyaux aromatiques reliés par un pont éther. Les hormones se différencient entre elles par le nombre et la place variables des atomes d'iode qu'elles portent (voir Figure 16). Nous nous intéresserons par la suite plus particulièrement à la tri-iodothyronine, dite T3.

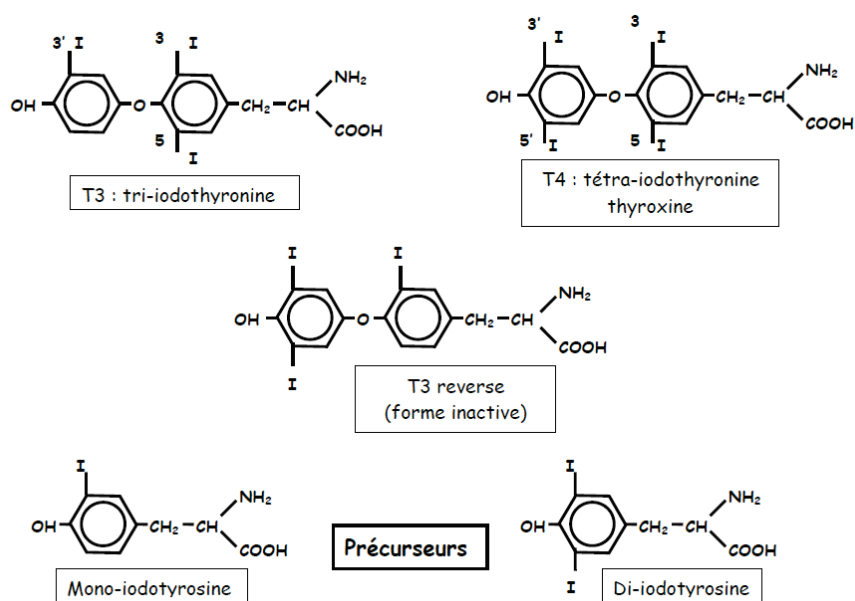
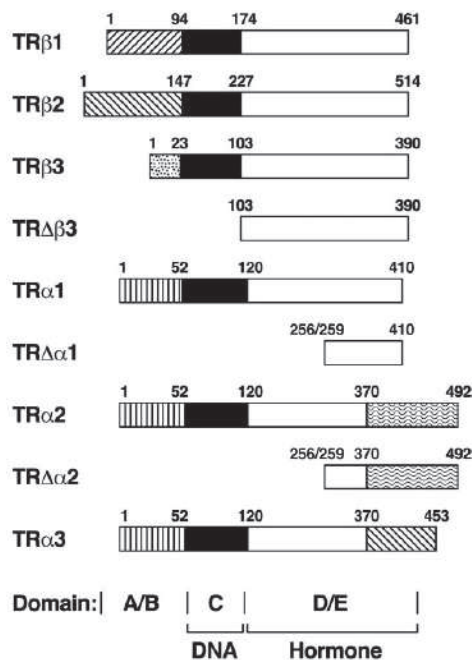


Figure 16. Structure des hormones thyroïdiennes et de leurs précurseurs
Schéma tiré du cours sur la physiologie des hormones d'A. Pérez-Martin

L'hormone thyroïdienne T3 est indispensable à la croissance et au développement, en particulier pour le système nerveux central. Les effets critiques de T3 sur le développement humain sont bien documentés. Le déficit congénital en T3 est connu pour occasionner un retard mental pouvant être sévère (crétinisme) (Hetzel et Dunn 1989). L'hypothyroïdie pendant le développement embryonnaire peut aussi être à l'origine de troubles de la cognition, de la mémoire, des capacités visuospatiales mais également de trouble du déficit de l'attention/hyperactivité. Le rôle de T3 est médié par les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR), TR α et TR β . Les TR appartiennent à la famille des récepteurs

nucléaires qui comportent les récepteurs aux rétinoïdes, à la vitamine D, aux acides gras et aux prostaglandines ainsi que les récepteurs « orphelins » sans ligand identifié (Lee et Lee Kraus 2001). TR α et TR β sont codés chez l'Homme par deux gènes distincts Thra et Thrb situés sur des chromosomes différents (respectivement 17 et 3). L'épissage alternatif est à l'origine de plusieurs isoformes incluant TR α 1, TR α 2 et TR α 3 à partir du gène Thra et TR β 1, TR β 2 et TR β 3 à partir du gène Thrb (Lazar 1993; Williams 2000). Comme les autres récepteurs nucléaires, les TR présentent une structure modulaire avec un domaine de liaison à l'ADN (domaine C), un domaine d'activation et un domaine de liaison au ligand, T3 (domaine D/E), voir Figure 17. Plus précisément le domaine de liaison à l'ADN de TR interagit avec les TREs (Thyroid Response Elements) situés dans la région promotrice des gènes cible.

TR α 1 lie T3 mais les variants TR α 2 et TR α 3 qui diffèrent de TR α 1 par la longueur et la séquence d'acides aminés de la partie C-terminale ne lient pas T3 (Cheng, Leonard et al. 2010). A ces trois isoformes s'ajoutent deux formes tronquées découvertes dans l'intestin, TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2 (Plateroti, Gauthier et al. 2001). TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2 ne possèdent pas la partie N-terminale et le domaine de liaison à l'ADN mais conserve en partie le site de liaison à T3 (voir Figure 17). Les isoformes TR β 1, TR β 2 et TR β 3



lient T3 et présentent une forte homologie de séquence du domaine de liaison à l'ADN et du domaine de liaison à T3. Par contre, la partie N-terminale est très variable entre ces isoformes. Par ailleurs une forme tronquée de TR β 3, TR $\Delta\beta$ 3 a été identifiée dans le foie et les poumons de rats (Williams 2000). Les différentes isoformes de TR α et TR β , sauf TR β 3 et TR $\Delta\beta$ 3 ont été identifiées chez l'Homme. L'ensemble des isoformes de TR est visible sur la Figure 7.

Figure 17. Représentation schématique des isoformes de TR Lee, K. C. and W. Lee Kraus (2001). "Nuclear receptors, coactivators and chromatin: new approaches, new insights." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12(5): 191-197.

Ces différentes isoformes s'expriment différemment au cours du développement et dans différents tissus. TR α 1 est exprimé de manière constitutive pendant le développement embryonnaire, alors que TR β est exprimé plus tardivement pendant le développement. TR β 1 est exprimé de façon prédominante dans les reins, le foie, le cerveau, le cœur et la thyroïde et à de plus faibles concentrations dans le muscle squelettique, les poumons et la rate (Williams 2000). TR β 2 est surtout exprimé dans le cerveau, la rétine et l'oreille interne ; on le retrouve également dans les poumons et le cœur (Williams

2000). L'expression de TR β 3 est prédominante dans les reins, le foie, et les poumons et plus faible dans les muscles squelettiques, la rate, le cerveau et le cœur (Williams 2000). Quant à TR α 1 et TR α 2, ils sont fortement exprimés dans le cerveau et plus faiblement dans les reins, les muscles squelettiques, les poumons, le cœur et le foie (Williams 2000). Il est important de souligner que TR α et TR β sont exprimés dans le cerveau, majoritairement dans le télencéphale et le cervelet. Cela dit TR α 1 représente 70 à 80% des TR présents dans le cerveau (Ercan-Fang, Schwartz et al. 1996).

2. Mécanismes d'actions de TR

TR module l'expression génique en se liant à des séquences spécifiques de l'ADN nommées TREs localisées au niveau des régions promotrices des gènes cible. Ces TREs contiennent généralement deux hexanucléotides ou plus, de type G/AGGTG/C/AA arrangés en tandem. Les TREs diffèrent selon la séquence des motifs hexamériques, le nombre de nucléotides qui les séparent et leur orientation. Un des TRE le mieux décrit correspond à la répétition directe de deux hexanucléotides séparés par 4 nucléotides, il est nommé DR4 (pour Direct Repeat 4) (Quack, Frank et al. 2002). Sachs et Shi ont montré en 2000 dans un modèle de larve de xénope que TR est fixé de manière constitutive, c'est-à-dire qu'il soit lié ou non à son ligand T3, aux TREs pendant le développement amphibien (Sachs et Shi 2000). TR est capable de réguler la transcription comme monomère, homodimère ou comme hétérodimère avec RXR (9-*cis*-Retinoic acid Receptor) qui fait également partie des récepteurs nucléaires. L'hétérodimérisation de TR avec RXR augmente de manière importante la liaison de TR aux TREs, la réponse de TR à T3 et l'activation transcriptionnelle (Zhang et Kahl 1993; Tsai et O'Malley 1994).

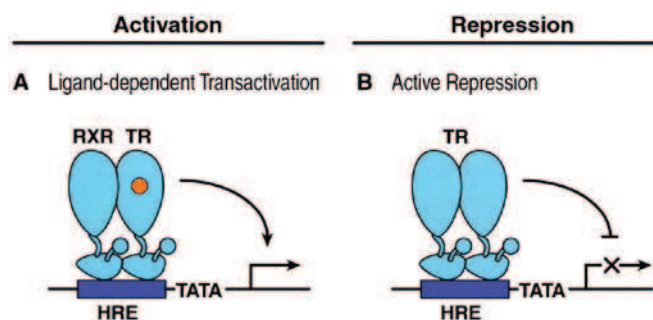


Figure 18. Régulation des TREs positifs par TR en fonction de la liaison de T3
Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." [Genes & Development](#) 14(2): 121-141.

Comme les récepteurs aux hormones stéroïdiennes, TR régule la transcription en présence et en absence du ligand. Selon qu'il se lie à des gènes positivement ou négativement régulés par T3, TR respectivement active ou réprime la transcription en présence de T3. La plupart des études se sont attachées à décrire les mécanismes impliqués dans l'activation et la répression des gènes positivement régulés, aussi dans un premier temps nous nous intéresserons plus particulièrement à ces mécanismes

et expliquerons comment TR active la transcription en présence de T3 et la réprime en absence de T3 (voir Figure 18).

2.1. Répression de la transcription par TR en absence de T3

En absence de T3, TR généralement associé à un complexe corépresseur, réprime la transcription du gène cible (Baniahmad, Köhne et al. 1992; Horlein, Naar et al. 1995; Glass et Rosenfeld 2000; Jepsen et Rosenfeld 2002). Plusieurs équipes ont caractérisé les protéines de ce complexe corépresseur. En 1995, SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormones receptor) et N-CoR (Nuclear receptor Co-repressor) ont été identifiées au sein du complexe corépresseur, par deux équipes de recherche différentes (Chen et Evans 1995; Horlein, Naar et al. 1995). Plus récemment, une étude menée par Lazar a mis en évidence l'interaction de SMRT et N-CoR avec le domaine de liaison au ligand de TR non lié (c'est-à-dire en l'absence de T3) (Hu, Li et al. 2001). Lorsque le domaine de liaison au ligand de TR est occupé par T3, SMRT et N-CoR ne peuvent pas interagir avec TR. SMRT et N-CoR jouent un rôle essentiel dans la répression de la transcription par TR non lié. Afin d'étudier le rôle de N-CoR dans la répression de la transcription par TR en absence de T3, Astapova et al. ont développé en 2008, une souris qui exprime dans le foie un mutant de la protéine N-CoR (L-NCoRDeltaID) qui ne peut plus interagir avec TR (Astapova, Lee et al. 2008). Ils ont observé la sur-expression d'un set de gène dans les souris en hypothyroïdie portant la mutation, L-NCoRDeltaID par rapport aux souris WT en hypothyroïdie, montrant le rôle clé de NCoR dans l'action de TR indépendante du ligand. Une étude similaire, utilisant une mutation génétique affectant l'interaction de N-CoR avec les récepteurs nucléaires, a confirmé en 2009 le rôle de N-CoR *via* son interaction avec TR, dans la répression transcriptionnelle.

Le complexe co-répresseur formé par SMRT et N-CoR contient également des histones déacétylases (HDACs). Des expériences par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisées dans un modèle amphibien ont indiqué, qu'en absence de T3, TR recrute Rpd3, une histone déacétylase de Xénope (Sachs et Shi 2000). Dans les cellules humaines 293T, c'est HDAC3 et non HDAC1, -2 ou -4 qui est recruté au sein du complexe co-répresseur (Ishizuka et Lazar 2003). Le rôle essentiel de HDAC3 dans la répression de la transcription par TR non lié a été démontré en utilisant un ARN interférant qui éteint l'expression de HDAC3 réduisant de manière significative l'activité de répression transcriptionnelle exercée par TR en absence de T3. Les histones déacétylases sont connues pour leur rôle dans la compaction de la chromatine. Effectivement, les régions d'hétérochromatine sont généralement hypoacétylées (Turner 1993). La structure compactée de l'hétérochromatine empêche le recrutement de la machinerie transcriptionnelle basale ce qui conduit à la répression de la transcription basale (voir 0).

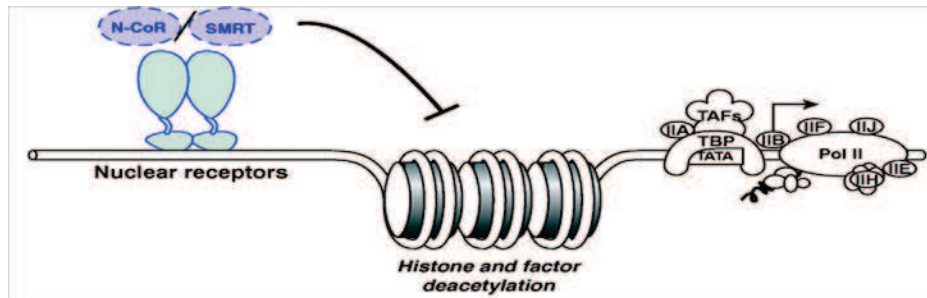


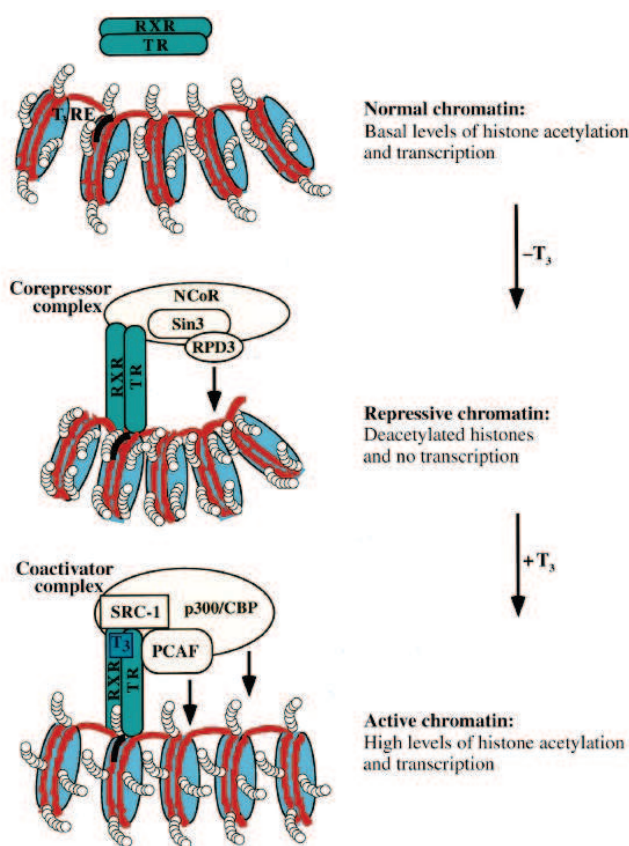
Figure 19. Répression de la transcription en absence de T3 par le complexe corépresseur N-CoR/SMRT

Jepsen, K. and M. G. Rosenfeld (2002). "Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes." [Journal of cell science](#) **115**(4): 689-698.

D'autres protéines composent le complexe co-répresseur, il s'agit de la protéine avec six répétitions WD40, TBL1, une protéine impliquée dans la signalisation intracellulaire GPS2 (G Protein Suppressor 2) et mSIN3, un co-répresseur présumé pour l'hétérodimère MAD/MAX. En 2007, une étude par spectrométrie de masse s'est donnée pour objectif de découvrir de nouveaux composants protéiques du complexe co-répresseur. De façon intéressante, une protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) a été identifiée (Jeyakumar, Liu et al. 2007). Cette même étude a montré que DNA-PK cible HDAC3 pour la phosphorylation ce qui a pour effet d'augmenter l'activité déacétylase de HDAC3 et favoriser ainsi l'état réprimé de la chromatine au niveau des séquences promotrices des gènes ciblés par TR/RXR.

2.2. Activation de la transcription par TR lié à T3

En présence de T3, la liaison de l'hormone au TR initie la transcription par libération du complexe corépresseur et le recrutement de coactivateurs (voir Figure 20). Le premier coactivateur identifié qui interagit avec TR lié à T3 est SRC-1 (Steroid Hormone Receptor 1) (Oñate, Tsai et al. 1995). SRC-2 et 3 ont été décrits par la suite. D'autres coactivateurs associés à TR ont été découverts. Il s'agit de protéines de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP, des histones acétyltransférases comme CBP (CREB Binding Protein) et p300 et le complexe TRAP/DRIP/Mediator (TR-Associated Protein/Mediator) qui permet le recrutement et l'activation de l'ARN polymérase II (Shi 2009). Parmi ces



différents coactivateurs, le rôle des SCRs a été particulièrement étudié. Ces SCRs font partie de la famille SCR/p160. Ils possèdent un domaine hautement conservé hélice-boucle-hélice et un domaine Per-ARNT-Sim A/B dans la région amino-terminale qui se comporte comme un domaine de liaison à l'ADN ou une région d'interaction pour la dimérisation d'autres facteurs de transcription (Cheng, Leonard et al. 2010). SCR-1 recrute par exemple p300/CBP qui est caractérisé pour son activité acétyltransférase et peut acétyler les histones et un grand nombre de facteurs impliqués dans la transcription (Li, O'Malley et al. 2000).

Figure 20. Modèle d'activation de la transcription par TR lié à T3- implication du complexe coactivateur dans les niveaux d'acétylation des histones

Li, Q., L. Sachs, Y.-B. Shi and A. P. Wolffe (1999). "Modification of Chromatin Structure by the Thyroid Hormone Receptor." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 10(4): 157-164.

Utilisant le modèle amphibien, Sachs et Shi ont mis en évidence en 2000, l'importance de l'acétylation des histones dans l'activation de la transcription par TR en présence de T3. Plus exactement ils ont montré une corrélation entre l'augmentation des niveaux d'acétylation des histones H4 et l'activation de gène induits par T3 (Sachs et Shi 2000). Le recrutement des histones acétyltransférases par TR est suivi par l'incorporation au sein du complexe coactivateur de TRAP/DRIP/Mediator. En effet, l'étude menée par Sharma et Fondell en 2002, laisse penser que l'acétylation des histones est une pré-

requis pour le recrutement du complexe TRAP/DRIP/Mediator (Sharma et Fondell 2002). Ce complexe facilite les interactions entre TR et la machinerie de transcription basale contribuant ainsi à l'activation de la transcription par TR en présence de T3. L'activation de la transcription fait également intervenir des mécanismes de remodelage de la chromatine autres que les modifications des niveaux d'acétylation des histones (Li, Sachs et al. 1999). Il a été effectivement démontré que l'activation de la transcription par l'hétérodimère TR/RXR lié à T3 implique des acétyltransférases mais également des complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (Wong, Shi et al. 1995; Wong, Patterton et al. 1998). La liaison de T3 au TR permet donc le recrutement de coactivateurs qui initient la transcription par différents mécanismes, les modifications des niveaux d'acétylation des histones, le remodelage de la chromatine, et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle basale.

2.3. Cas des gènes négativement régulés

Plusieurs études ont mis en évidence par le biais de micropuces à ADN, l'existence de gènes négativement régulés par T3 dans des lignées de cellules hépatiques, de fibroblastes mais également dans le foie qui est un organe cible de l'hormone thyroïdienne (Feng, Jiang et al. 2000; Moeller, Dumitrescu et al. 2005; Ventura-Holman, Mamoon et al. 2007). Pourtant peu de travaux portent sur la régulation négative par TR de ces gènes et les mécanismes de cette régulation sont encore mal compris. Il est maintenant bien établi que TR interagit avec la région promotrice des gènes négativement régulés par T3 (Chatterjee, Lee et al. 1989; Bodenner, Mroczynski et al. 1991). Plusieurs études ont mis en évidence l'implication *in vitro* de corépresseurs nucléaires comme NCoR ou SMRT dans l'activation basale de la transcription en absence de T3 (Tagami, Madison et al. 1997; Tagami, Park et al. 1999; Yang, Hong et al. 1999; Kim, Ho et al. 2005). Récemment, l'équipe de Yen a montré dans une lignée de cellules pituitaires que le complexe NCoR/HDAC3 interagit avec la région promotrice du gène qui code pour la TSH α (Thyroid Stimulating Hormone α) et initie la transcription basale de ce gène en absence de T3 (Wang, Xia et al. 2009). En présence de T3, le complexe est libéré de TR entraînant l'acétylation des histones et la répression de l'expression du gène TSH α (Wang, Xia et al. 2009). Cependant une étude fonctionnelle *in vivo* menée par Demeneix en 2001, met en doute l'implication des corépresseurs dans l'activation en absence de T3 de la transcription des gènes négativement régulés par T3. Effectivement cette étude a démontré par Northern blot et hybridation *in situ* que l'expression de NCoR et SMRT est incompatible avec la régulation physiologique de TRH (Tyrotropin-Releasing-Hormone)-gène négativement régulé par T3- dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Becker, Seugnet et al. 2001).

3. Rôle physiologique de TR α dans le cerveau

Avant d'aborder le rôle physiologique de TR α et plus globalement des TR dans le cerveau, il est nécessaire de faire plusieurs remarques.

Le syndrome RTH (Resistance to thyroid hormone) caractérisé par une sensibilité réduite des tissus aux actions de l'hormone thyroïdienne se traduit par des niveaux élevés (et variables) de T3 et T4, des difficultés d'apprentissage, un retard mental, des problèmes d'audition et un retard de croissance osseuse (Weiss et Refetoff 2000; Yoh et Privalsky 2002). La majorité des patients RTH sont hétérozygotes avec un gène *Thrb* muté ; la mutation correspondant généralement à l'incapacité de TR β à répondre à T3 de manière appropriée. Aucun patient diagnostiqué pour un syndrome RTH ne présente de mutation du gène *Thra*. Par ailleurs un scan du gène *Thra* dans plusieurs syndromes psychiatriques n'a mis en évidence aucune mutation (Feng, Yan et al. 2001). Ceci semble étayer que les mutations de *Thra* puissent être létales.

Il est important de signaler par ailleurs que le phénotype des doubles mutants TR $\alpha^{-/-}$ TR $\beta^{-/-}$ est moins sévère que celui des souris affectées par l'hypothyroïdie congénitale. Deux études ont caractérisé en 1999, le phénotype de souris TR $\alpha^{-/-}$ TR $\beta^{-/-}$. Ces souris double mutantes obtenues par inactivation des gènes *Thra* et *Thrb* présentent seulement une part réduite des phénotypes observés en cas d'hypothyroïdie congénitale, à savoir un retard de croissance, une hyperactivité de l'axe pituitaire-thyroïde, une maturation retardée des os et de l'intestin et une mortalité post-natale (Gauthier, Chassande et al. 1999; Göthe, Wang et al. 1999). Aucun récepteur à T3 n'a été détecté dans les tissus de ces souris TR $\alpha^{-/-}$ TR $\beta^{-/-}$, ainsi il est possible d'affirmer que l'absence de toutes les isoformes de TR et l'absence d'hormone en cas d'hypothyroïdie congénitale ont des effets différents. Ces travaux permettent également de privilégier l'hypothèse d'une répression inappropriée des apo-récepteurs (si l'on considère uniquement le cas des gènes positivement régulés par T3) et non d'une activation insuffisante des gènes pour expliquer les conséquences de l'hypothyroïdie congénitale. A ce sujet, Bernal conforte l'idée d'une action permissive des hormones qui libéreraient les fonctions régulées par TR. Au contraire en l'absence de ligand, la signalisation aberrante de TR expliquerait les troubles observés en cas d'hypothyroïdie (Bernal 2007).

Les souris déficientes en TR α 1 ne présentent pas de signes évidents d'altération globale du système nerveux central alors que l'isoforme TR α 1 représente 70 à 80 % des TR exprimés dans le cerveau (Ercan-Fang, Schwartz et al. 1996). De façon intéressante Morte et al. ont montré en 2002 que les souris TR α 1 $^{-/-}$ en hypothyroïdie ont une différenciation des cellules de Purkinje et une migration des cellules granulaires du cervelet normales alors que les souris WT en hypothyroïdie présentent un retard de migration des cellules granulaires et un arrêt de croissance des cellules de Purkinje (Morte, Manzano

et al. 2002). Ce travail supporte l'idée qu'une répression par l'aporécepteur $Tr\alpha 1$ et non l'absence de T3 serait à l'origine des dommages causés en cas d'hypothyroïdie et met en évidence l'importance de $TR\alpha 1$ dans les processus de développement cérébral.

Au niveau du système nerveux central, plusieurs conséquences de l'hypothyroïdie ont été rapportées, à savoir la diminution de la myélinisation, la réduction des arborisations et une migration défectueuse des cellules GABAergiques, la différenciation neuronale (Ausó, Lavado-Autric et al. 2004; Venero, Guadaño-Ferraz et al. 2005; Bernal 2007; Gilbert, Sui et al. 2007; Wallis, Sjögren et al. 2008). Nous développerons dans le prochain paragraphe, le rôle de $TR\alpha$ dans quelques uns de ces processus.

L'étude du rôle physiologique de $TR\alpha$ a fait appel à plusieurs modèles animaux. Il s'agit principalement de souris déficientes en $TR\alpha 1$, ($TR\alpha 1^{-/-}$) et de souris déficientes pour toutes les isoformes de $TR\alpha$ ($TR\alpha^{o/o}$). Un modèle également intéressant développé par l'équipe de Vennström, consiste en une souris hétérozygote ($TR\alpha 1^{+/m}$) exprimant un gène $TR\alpha 1$ avec la mutation R384C entraînant une affinité avec le ligand T3 dix fois plus faible qui agit donc comme aporécepteur (Tinnikov, Nordström et al. 2002). Ces différentes souris mutantes présentent des troubles comportementaux similaires. En effet les souris $TR\alpha 1^{-/-}$, $TR\alpha^{o/o}$ et $TR\alpha 1^{+/m}$ confrontées à différents tests comportementaux tels que le test en espace ouvert (open field), le test de nage forcée, le test de conditionnement de peur ou le test « rotarod » manifestent une augmentation de l'anxiété, une diminution du comportement exploratoire et un dysfonctionnement locomoteur (Tinnikov, Nordström et al. 2002; Guadano-Ferraz, Benavides-Piccione et al. 2003; Venero, Guadaño-Ferraz et al. 2005; Wilcoxon, Nadolski et al. 2007; Pilhatsch, Winter et al. 2010). Les souris $TR\alpha^{o/o}$ testées dans la piscine de Morris révèlent également des troubles d'apprentissage (Wilcoxon, Nadolski et al. 2007) et les souris $TR\alpha 1^{+/m}$ un déficit dans une tâche de reconnaissance d'objets à long terme (Venero, Guadaño-Ferraz et al. 2005). Les souris $TR\alpha 1^{+/m}$ ont par ailleurs été caractérisées par une résistance marquée aux crises induites par le pentylentetrazole qui est un antagoniste des canaux chlore associés au récepteur $GABA_A$, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Hadjab-Lallemend, Wallis et al. 2010). Ces différents troubles pourraient être corrélés avec des altérations de l'hippocampe. Les troubles d'apprentissage, observés chez la souris $TR\alpha^{o/o}$ sont par exemple corrélés avec une diminution chez ces souris de l'expression au niveau de l'hippocampe de gènes impliqués dans les processus d'apprentissage à savoir GAP-43 (Growth-Associated Protein 43), de la neurogranine et du récepteur aux glucocorticoïdes (Wilcoxon, Nadolski et al. 2007). Ces résultats soulignent le rôle fonctionnel de $TR\alpha$ dans les processus de mémorisation dépendante de l'hippocampe. D'autre part des modifications de la neurotransmission GABAergiques ont été détectées chez différentes souris mutantes. Guadano-Ferraz et al. ont observé en 2003 par immunomarquage de GAT-1 (GABA transporter 1) et de parvalbumine, des marqueurs spécifiques des interneurons GABAergiques, une réduction significative des terminaisons GABAergiques dans le CA1 chez ces souris $TR\alpha 1^{-/-}$ par rapport aux souris

WT (Guadano-Ferraz, Benavides-Piccione et al. 2003). Chez les souris TR α 1^{+/-m} une diminution du nombre d'une sous-population d'interneurones GABAergiques, les cellules exprimant la parvalbumine dans la même région de l'hippocampe, a également été mise en évidence (Venero, Guadaño-Ferraz et al. 2005). Ceci laisse penser à une implication spécifique de TR α 1 dans le système GABAergique et donc le circuit inhibiteur de l'hippocampe. De façon intéressante Kapoor et al. ont mis en évidence tout récemment une diminution du nombre de progéniteurs neuronaux ainsi qu'une diminution de la différenciation neuronale dans l'hippocampe de souris TR α 1^{+/-m} adulte soulignant le rôle de TR α 1 dans la neurogenèse adulte de l'hippocampe (Kapoor, van Hegerlinden et al. 2010).

Résultats

Revue 1 :

Gene regulation by voltage-dependent calcium channels

Maud Barbado, Katell Fablet, Michel Ronjat, Michel De Waard

Revue parue dans le journal Biochim Biophys Acta, Vol. 1793, No. 6, 2010.

Introduction

L'implication du calcium dans les voies de régulation de l'expression génique ont fait l'objet de nombreux travaux et de nombreuses revues. L'engagement plus spécifique des CCVD dans des voies de signalisation de régulation de la transcription est moins décrit. Dans cette revue, nous nous sommes attachés à décrire les différentes voies de signalisation par lesquelles les CCVD influence la régulation de l'expression génique.



Review

Gene regulation by voltage-dependent calcium channels

Maud Barbado, Katell Fablet, Michel Ronjat, Michel De Waard*

Grenoble Institute of Neuroscience, Inserm U 836 - Team 3 "Calcium Channels, Functions and Pathologies", Bâtiment Edmond Safra, Université Joseph Fourier, Site santé de la Tronche, BP 170, 38042 Grenoble cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2008
 Received in revised form 13 February 2009
 Accepted 16 February 2009
 Available online 27 February 2009

Keywords:

Voltage-dependent calcium channel
 Calcium
 Gene expression
 Transcription
 Signaling pathway

ABSTRACT

Ca²⁺ is the most widely used second messenger in cell biology and fulfills a plethora of essential cell functions. One of the most exciting findings of the last decades was the involvement of Ca²⁺ in the regulation of long-term cell adaptation through its ability to control gene expression. This finding provided a link between cell excitation and gene expression. In this review, we chose to focus on the role of voltage-dependent calcium channels in mediating gene expression in response to membrane depolarization. We illustrate the different pathways by which these channels are involved in excitation–transcription coupling, including the most recent Ca²⁺ ion-independent strategies that highlight the transcription factor role of calcium channels.

© 2009 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Since the discovery of calcium as a second messenger, it has been implicated in an increasingly number of biological functions (reviewed in [1]). Indeed, calcium regulates basic cell processes such as proliferation, protein synthesis, and differentiation, but is also engaged in more specialized cell functions such as muscle contraction, neurotransmitter release, electrical excitability, and synaptic plasticity [2]. This implication in ever increasing cell functions reveals the amazing versatility in signaling properties of this second messenger. Moreover, Ca²⁺ is not only a trophic factor, but is also involved in programmed cell death [3]. Ca²⁺ differs from other second messengers in that, as all the elements of the periodic table, it cannot be metabolized. The second original property of Ca²⁺ is that it is present in relatively high concentration in the extracellular space (1 to 2 mM). Consequently, a strict spatio-temporal control of intracellular Ca²⁺ concentration is essential for its involvement in a wide variety of cell functions. To this end, Ca²⁺ homeostasis is managed by a wealth of ion channels localized at both the plasma and the intracellular organelle membranes that permit elevation in cytosolic Ca²⁺ concentration, as well as by Ca²⁺-binding proteins and Ca²⁺-pumps that restrict cytoplasmic Ca²⁺ rise and organize its propagation in the cytosol and nucleus [4]. One amazing and unique property of Ca²⁺ as a second messenger is its ability to control cellular events that develop on a large time scale, from milliseconds to hours [2]. The millisecond scale gives the full measure of the importance of fast gating Ca²⁺ channels, unique pathways that promote localized

Ca²⁺ elevation. For instance, electrical excitability and neurotransmitter release entirely rely on this rapid signaling [5]. Due to the intricate balance between import, sequestration and export pathways, intracellular Ca²⁺ signals are generally transient. Long-term Ca²⁺ effects consequently occur thanks to the effective recruitment of various cytosolic and/or nuclear signaling pathways whose lifetimes are of longer durations than Ca²⁺ signals themselves. Ca²⁺ signal integration indeed explains how Ca²⁺ can be involved in development, cell differentiation and synaptic plasticity. The ability of Ca²⁺ to control both short- and long-term processes links cell differentiation and cell specialization to Ca²⁺-regulated cell activity. As an example, late-phase of long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons requires protein synthesis under the control of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and voltage-dependent calcium channels [6]. Many long-term effects of Ca²⁺ as a second messenger imply a direct or indirect effect of Ca²⁺ on gene regulation [7,8]. Recent development of high-throughput analyses methods has provided a vertiginous list of candidate genes whose expression is under the control of Ca²⁺ homeostasis [9,10]. For instance, 70% of the gene expression modifications (up- or down-regulation of 111 genes) observed in T-lymphocytes from severe-combined immunodeficiency patients results from a defect of Ca²⁺ entry [10]. In neuronal cells as well, exon expression profiling revealed modifications in the expression of several thousand transcripts in response to depolarization-induced Ca²⁺ influx [9]. In spite of the impressive number of genes potentially affected by Ca²⁺ signaling, only a small number of Ca²⁺-dependent gene regulation pathways have been deciphered in details so far. This leaves ample room for discovering new signaling pathways and gene targets of Ca²⁺ regulation.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 56 52 05 63; fax: +33 4 56 52 05 72.
 E-mail address: michel.dewaard@ujf-grenoble.fr (M. De Waard).

1.1. Molecular actors controlling Ca^{2+} -dependent gene regulation

The phenomenal buffering capacity of the cell strongly hampers Ca^{2+} diffusion in the intracellular space [11]. While the extracellular space remains the main reservoir of Ca^{2+} , intracellular sources of Ca^{2+} have been described as well that are essential in Ca^{2+} signaling and gene regulation [12]. For instance, Ca^{2+} released from the sarcoplasmic reticulum was shown to reduce the amount of mRNA coding for most nicotinic acetylcholine receptors, and thereby to control muscle fiber differentiation [13]. Although the best characterized intracellular Ca^{2+} sources concerned with gene regulation are the endoplasmic reticulum and the nucleoplasmic reticulum, Ca^{2+} from mitochondria, cytoplasmic secretion granules, and nuclear microvesicles [14] may deserve attention in the future. These Ca^{2+} stores are spatially distributed in such a way that Ca^{2+} can be mobilized in any domain of the cell allowing Ca^{2+} signaling pathways to overcome the inherent buffering capacity of the cell. More recently, Ca^{2+} nano- and microdomains have been proposed as important factors of the spatial specialization of Ca^{2+} function [5,15]. These domains, corresponding to the opening of a few Ca^{2+} channels, provide high Ca^{2+} concentration environments restricted to the proteins associated to these channels. They have been shown to play a role in Ca^{2+} -dependent processes, including gene regulation. Obviously, the role of Ca^{2+} in gene regulation will be as complex as its homeostasis. Regulation of intracellular Ca^{2+} elevation implies many key factors that are all potential players in the field of gene regulation (Fig. 1). The first type of actors that intervene in Ca^{2+} signaling and gene regulation are plasma membrane channels that sense various stimuli (voltage changes, extracellular ligand, loading level of intracellular Ca^{2+} stores). These Ca^{2+} channels comprise voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCC), receptor-activated Ca^{2+} channels, such as the NMDA receptor, and store-operated Ca^{2+} channels, such as ORAI and TRP members. The second type of players is composed of intracellular Ca^{2+} -release channels, namely ryanodine receptors and IP_3 receptors, which mobilize Ca^{2+} from internal stores.

An additional degree of complexity in Ca^{2+} signaling resides in the intricate relationship between these calcium channels.

All these channel types have been involved in gene regulation with their own specificities. For instance, over-expression of the transient receptor potential canonical type 6 (TRPC6) calcium channel was shown to promote the formation of excitatory synapses *via* a calmodulin-dependent kinase IV (CaMKIV)/cAMP-response-element binding protein (CREB)-dependent pathway [16]. CaMKIV is a Ca^{2+} -dependent kinase that phosphorylates and activates the transcription factor CREB, similarly to other kinases such as protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), CaMK kinase and mitogen-activated protein kinase (MAPK) [17,18]. CREB-mediated gene transcription is generally involved in synaptic plasticity and memory ([19] and see [20] for review), and accordingly, transgenic mice over-expressing TRPC6 show improved spatial learning and memory. As another illustration, the nuclear and cytosolic Ca^{2+} -rise induced by IP_3 -receptor activation in skeletal muscle results in the activation of an extracellular signal-regulated kinase (Erk) and CREB phosphorylation, that ends by modification of gene transcription [21]. This signaling pathway is part of the process of excitation–transcription coupling whereby gene expression and thus cell differentiation is controlled by the electric activity of motor neurons [22]. In lymphocytes, activation of the IP_3 -receptor has been shown to induce store-operated Ca^{2+} entry through ORAI that in turn activates the phosphatase calcineurin. The transcription factor NFAT (nuclear factor of activated T-cells) is dephosphorylated by calcineurin, and then migrates to the nucleus where it activates gene transcription [23]. Although activation of each of these channels results in intracellular Ca^{2+} rise, specific gene regulation pathways may be associated to the activation of a single channel type. The spatial [24] and temporal pattern of Ca^{2+} elevation also matters with regard to Ca^{2+} -regulated gene transcription [25]. For instance, cytosolic Ca^{2+} oscillations have been shown to reduce the Ca^{2+} concentration threshold for activating the pro-inflammatory transcription factors NFAT, Oct/OAP and NF κ B [26]. In the same trend of idea, the pathway of entry

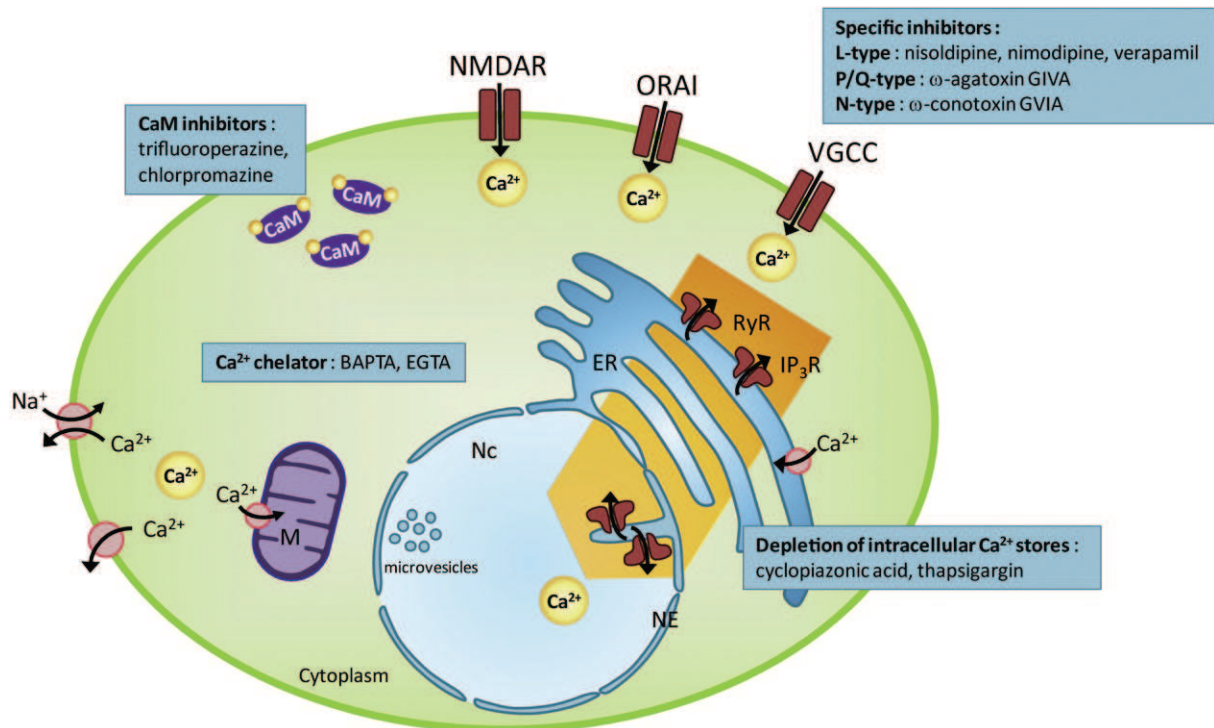


Fig. 1. Schematic representation of cytoplasmic and nuclear Ca^{2+} elevation pathways. Inhibitors of Ca^{2+} elevation pathways or Ca^{2+} -binding proteins are shown. Abbreviations are: CaM, calmodulin; ER, endoplasmic reticulum; IP_3 R, IP_3 receptors; M, mitochondria; Nc, nucleoplasm; NE, nuclear envelope; NMDAR, NMDA receptors; RyR, ryanodine receptors; VGCC, voltage-gated calcium channels.

of Ca^{2+} in hippocampal neurons, NMDA receptors versus voltage-dependent L-type channels, determines the kinetics of CREB phosphorylation and thereby the level of expression of the immediate early gene *c-fos* [27]. Finally, differences in amplitude and duration of the antigen-stimulated Ca^{2+} responses in B lymphocytes translate into distinct patterns of activation of transcription factors such as NFAT, ATF-2 and NF κ B [28].

In the remainder of this review, we shall focus on the implication of voltage-gated calcium channels in the control of gene expression. These channels represent a model of choice since they are at the core of the excitation–transcription process by transforming electrical activity in Ca^{2+} -signaling information. Since they are present at the plasma membrane, they use several original signaling pathways to vehicle information from the periphery of the cell towards the nucleus, the locus of the transcription. Voltage-dependent calcium channels being encoded by many genes, and fulfilling a wide variety of cell functions, from contraction to transmitter release, the excitation–transcription process in which each calcium channel type is involved may respond to specific functional needs (from contractile proteins to synaptic plasticity).

2. Voltage-dependent calcium channels and gene regulation

2.1. Voltage-dependent calcium channels: structure and molecular diversity

At the structural level, all voltage-dependent calcium channels share a common pore-forming subunit. Ten genes encode for low voltage-activated calcium channels (termed T-type channels, 3 types) and high voltage-activated calcium channels (7 types forming L-type channels (4 types), N-type channel (1 type), P/Q-type channel (1 type) or R-type channel (1 type)) [29]. So far, no auxiliary subunits have been clearly identified for low voltage-activated T-type calcium channels. In contrast, the subunit structure of high voltage-activated calcium channels is much better defined. All these channels possess, in addition to the pore-forming subunit, two associated auxiliary subunits: $\alpha_2\delta$, a glycosylated protein with a single transmembrane domain, and β , a regulatory subunit of the MAGUK family. The crystal structure of this latter protein has been resolved and shows that the protein is composed of an SH3 domain associated to a guanylate kinase (GK) domain. In some channels, a protein called γ subunit has been proposed to form the third auxiliary subunit of high voltage-activated channels. All these auxiliary subunits play a role in normalizing the biophysical properties of calcium channels and controlling their expression levels at the plasma membrane. These subunits are also encoded by several genes (4 for $\alpha_2\delta$ subunits, 4 for β subunits, and 8 for γ subunits) thereby greatly increasing the phenotype diversity of native calcium channels [30]. Neuronal tissues express many channel types, while other tissues express a poorer subset of voltage-gated calcium channels (one type only in skeletal muscles). In neurons, voltage-dependent calcium channels carry out several functions such as dendritic integration of incoming electrical signals and transmitter release at the synapse. This later function is accomplished mainly by P/Q-, N- and R-type channels. As a result of the importance of voltage-gated calcium channels in many physiological processes, genetic mutations of calcium channel genes induce severe pathologies such as epilepsy, autism, ataxia, migraine, myopathies, deafness and blindness [31]. The link between these genetic mutations and defects in excitation–transcription coupling remains largely unexplored so far.

2.2. First evidences that voltage-dependent calcium channel are involved in gene regulation

The initial proof that voltage-gated calcium channels are implicated in gene regulation comes from two simultaneous studies

published in 1986 [32,33]. In a first study, chronic depolarization of pheochromocytoma (PC12) cells was shown to induce an increase in *c-fos* expression levels. This effect was blocked by the L-type channel inhibitor nisoldipine, as well as by trifluoroperazine or chlorpromazine, two calmodulin antagonists. It was therefore concluded that L-type calcium channel-driven cytoplasmic Ca^{2+} elevation turns on a calmodulin-dependent expression of *c-fos* [32]. This pathway differed from the earlier-described calmodulin-independent activation of *c-fos* expression observed after application of nerve growth factor (NGF) in PC12 cells. The second study demonstrated that, in PC12 cells, the *c-fos* expression induced by nicotinic receptor activation similarly results from the activation of L-type channels, this effect being blocked by verapamil, another L-type channel inhibitor [33]. Since this paradigm also induces a depolarization-independent expression of β -actin, it was concluded that activation of nicotinic receptor turns on two Ca^{2+} -dependent gene regulation pathways: one indirectly mediated by Ca^{2+} entry through L-type channels and another one directly induced by Ca^{2+} entry through the nicotinic receptor. This study perfectly illustrates that the origin of Ca^{2+} entry defines the gene regulation process activated and consequently the nature of the modulated gene. Since these pioneering studies, different gene regulation pathways have been discovered to be under the control of voltage-dependent calcium channels. They are illustrated hereunder and summarized in Fig. 2.

2.3. Voltage-dependent calcium channels participate to several gene regulation pathways

Voltage-dependent calcium channels are increasingly depicted as multi-molecular complexes that regroup not only the channel itself and its auxiliary subunits, but also many key molecular players that translate depolarization-induced Ca^{2+} influx and/or conformational changes of the channel into functional events. The excitation–transcription process in which calcium channels are involved does not escape this basic rule. Upon activation of voltage-dependent calcium channels, gene regulation can occur following several conceptually different pathways, that all lead to the activation of transcription factors. We will develop here example of pathways that end in the activation of CREB, NFAT and downstream regulator element antagonist modulator (DREAM) transcription factors. However, it should be mentioned that calcium channel activity has also been linked to MEF2 [34], MeCP2 [35], SRF [36] and NF κ B [17,37] transcription regulators. These pathways are illustrated hereunder and key molecular players highlighted. Pathways were discriminated according to their channel-association state and their molecular nature (transcription factor or not), and the ability of Ca^{2+} to propagate at distance of the site of influx (mouth of the channel). Controversy may arise from the real level of channel-association state of Ca^{2+} -sensitive proteins in each pathway described as this point is not always well resolved experimentally. The second point on which controversy will remain is whether Ca^{2+} ions themselves have real diffusion capabilities to the nucleus or whether they require Ca^{2+} binding proteins to reach the nucleus.

2.3.1. Regulation of transcription factors by Ca^{2+} -binding proteins not directly associated to the channel

In 1993, Ca^{2+} entry through L-type calcium channels was shown to induce activation of multifunctional CaMK in hippocampal neurons [38]. This process was linked to the activation of *c-fos* promoter. At the same time, it was demonstrated that CaMKI, CaMKII and CaMKIV share the ability to phosphorylate Ser133 of the transcription factor CREB [39,40]. While phosphorylation of CREB on Ser133 is generally considered as an activating event, the situation turns out to be more complex since CREB is also phosphorylated at Ser142 by CaMKII leading to its inhibition [41]. CaMKIV is considered as the most reliable stimulating enzyme of the CREB pathway since (i) it allows the recruitment of CREB binding protein (CBP) on CREB, and (ii) its

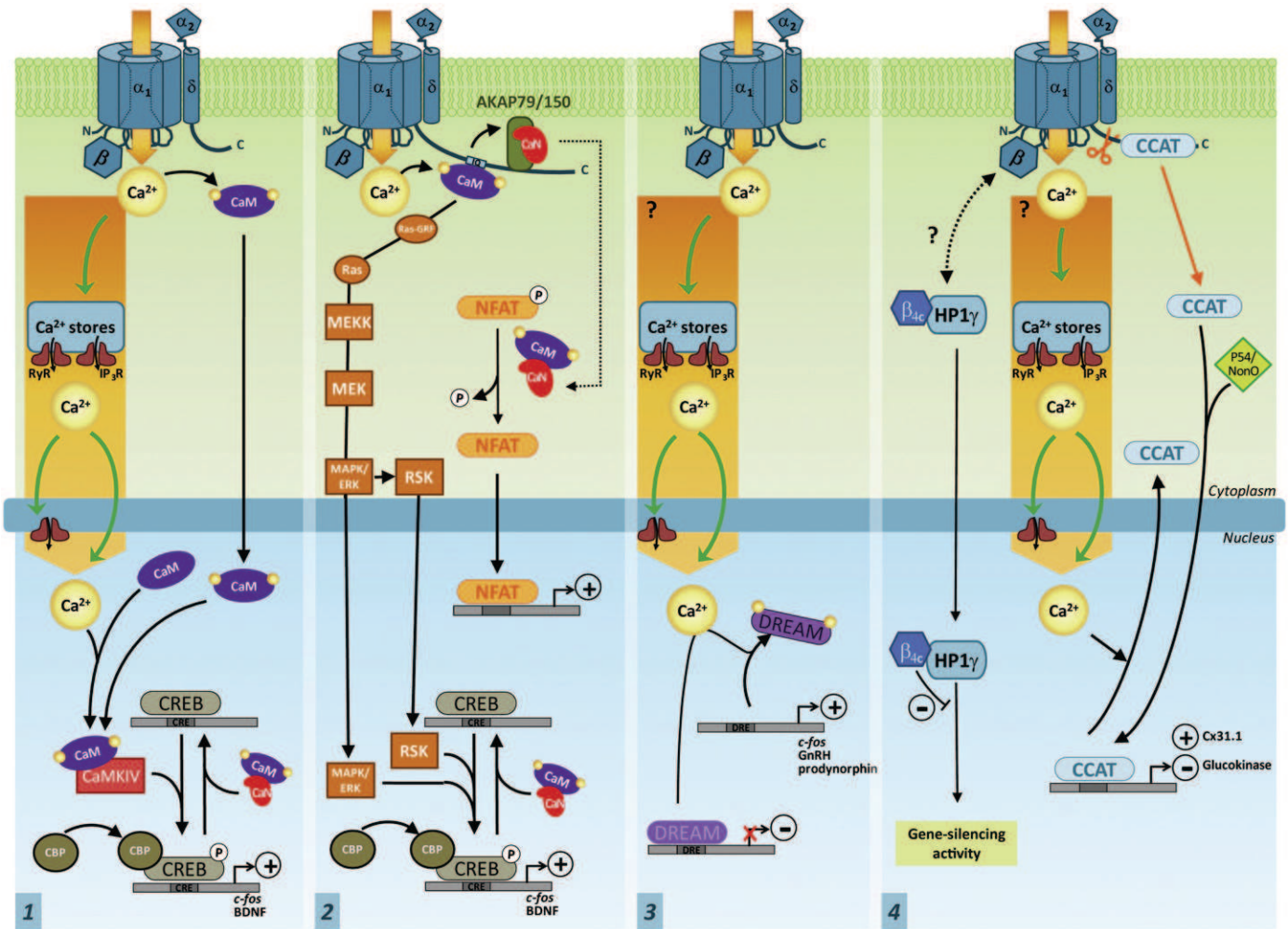


Fig. 2. Schematic gene transcription pathways regulated by voltage-gated calcium channels. 1. Activation of transcription factors by Ca²⁺-binding proteins. The example of CREB phosphorylation by CaMKIV following activation of calmodulin by Ca²⁺ entry is shown. Calmodulin activation can occur consecutively to Ca²⁺ entry through voltage-gated calcium channels, or after an amplification cascade through IP₃R- or RyR-sensitive internal stores. 2. Regulation of transcription factors by Ca²⁺-activated proteins that are part of the calcium channel signaling complex. Two examples are illustrated: MAPK regulation by calmodulin bound on the IQ domain of L-type channels, and calmodulin-activated calcineurin (CaN) regulation of cytoplasmic NFAT. Whether CaN dissociates from the channel to activate NFAT or whether NFAT is in the immediate vicinity of the channel remains unknown. 3. Regulation of Ca²⁺-binding transcription factors, such as DREAM, by voltage-gated Ca²⁺ channels. Whether the Ca²⁺ that enters voltage-dependent channels activates directly DREAM by propagating to the nucleus, or whether it is relayed and amplified by Ca²⁺ stores as depicted here is not established. 4. Calcium channel fragments or subunits acting as transcription factors. Two examples are detailed. β_{4c} is a short splice variant of β_4 subunit whose association with voltage-dependent calcium channels is challenged by the lack of well-defined guanylate kinase domain required for its association with the pore-forming subunit. It binds onto HP1 γ and inhibits its gene silencing function. CCAT is a transcription factor directly derived from the carboxy-terminus of the pore-forming subunit of L-type channels. It translocates to the nucleus where it regulates gene activity. Its export out of the nucleus is controlled by nuclear Ca²⁺. Again, whether internal Ca²⁺ stores relay Ca²⁺ entry through voltage-dependent channels is not yet established.

nuclear depletion disrupts CREB phosphorylation in hippocampal neurons [42]. These results raised the question on how nuclear CaMK are activated by Ca²⁺ entering through L-type channels. All these studies highlight the importance of both the nuclear translocation of calmodulin and the ratio between apo-calmodulin and Ca²⁺-calmodulin for the activation of nuclear CaMK. Two modes of nuclear accumulation of Ca²⁺-calmodulin have been demonstrated. On one hand, Ca²⁺ entering the cell through L-type channels activates surrounding calmodulin that translocates and accumulates within the nucleus [43,44]. Indeed, nuclear translocation is supported by the 20-fold higher diffusion coefficient of Ca²⁺-calmodulin compared to apo-calmodulin [43]. However, nuclear accumulation of Ca²⁺-calmodulin cannot be explained simply by diffusion, but is likely to require a cofactor for both Ca²⁺-calmodulin stabilization and transport. On the other hand, a CREB activation pathway, independent of Ca²⁺-calmodulin nuclear translocation, has been identified in electrically-stimulated hippocampal neurons [45]. In this study, CREB activation induced by L-type channel stimulation was still observed in the

presence of wheat germ agglutinin, a nuclear pore blocker precluding protein transfer to the nucleus. In this case, CREB activation correlates with increases in nuclear Ca²⁺ concentration that are inhibited by depletion of intracellular Ca²⁺ stores with cyclopiazonic acid or thapsigargin. The mechanism behind this regulation relies on the propagation of the Ca²⁺ signal from the cell periphery to the nucleus which is made possible by Ca²⁺ release from internal stores induced by Ca²⁺ influx following electric stimulation. This study supports earlier reports showing that nuclear injection of BAPTA-D70, a Ca²⁺ chelator specifically addressed to the nucleus, completely inhibits CREB activation following L-type channel opening [39,46]. While the importance of Ca²⁺-activated kinases in CREB phosphorylation and CRE-mediated transcription cannot be dismissed, evidence is building up for a critical role of Ca²⁺-dependent phosphatases (phosphatase 2B or calcineurin). In neurons, Ca²⁺ entry through L-type channels controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression through the activation of calcineurin [47]. Conceptually, since calcineurin is mostly present within the cytoplasm, it is assumed

that it may dephosphorylate and thereby induce the nuclear translocation of a cytoplasmic transcription factor. However, despite the proven existence of nuclear calcineurin, it was found that calcineurin dephosphorylates CREB Ser133 raising suspicion that it may also act directly within the nucleus [48]. Interestingly, L-type-dependent calcineurin activation has also been involved in the temporal control of CREB phosphorylation through a mechanism that involves a dephosphorylation-induced inhibition of L-type channel activity [49]. The dual regulation of nuclear signaling pathways by kinases and phosphatases is a general feature of the cell surface to nucleus communication [50].

Although L-type channels are the best characterized voltage-dependent calcium channels with regard to gene regulation, some studies also suggest the implication of non-L-type channels in excitation–transcription coupling. Investigation of NFATc1 nuclear translocation in response to specific patterns of electrical activity in rat sympathetic neurons shows that 10 Hertz stimulation trains promotes its Ca²⁺-dependent nuclear translocation while 1 Hertz trains are ineffective [51]. Importantly, this activity-dependent translocation of NFATc1 strictly relies on the activation of N-type calcium channels since this effect is blocked by ω -conotoxin GVIA, a specific inhibitor of these channels. In another example, depolarization of superior cervical ganglion neurons induces both CREB phosphorylation and increases in *c-fos* mRNA and protein levels [52]. This N-type channel-dependent CREB phosphorylation occurs only at low frequency stimulation, while, at high frequency stimulation, CREB regulation exclusively involves L-type channels. This selective frequency-dependent implication of calcium channel types seems to be based on inactivation kinetic differences between N- and L-type channels. Finally, specific activation of N-type calcium channels in primary sensory neurons by electric stimulation results in tyrosine hydroxylase mRNA expression [53]. This effect is reduced by inhibitors of PKA and PKC, while blockers of MAPK and CaMKII have no effect. Importantly, in all these studies, action potential-like electric stimulations were used instead of KCl-induced depolarization since this latter paradigm produces N-type calcium channel inactivation that may mask their implication in excitation–transcription coupling. P/Q-type calcium channels have also been implicated in an important gene regulation pathway. Indeed, blocking depolarization-activated P/Q-type calcium channels in cerebellar granule cells using the selective blocker ω -agatoxin IVA reduces the expression of syntaxin-1A mRNA to undetectable levels [54]. This effect is specifically linked to P/Q calcium channels since L- and N-type channel blockers have no effect on the Ca²⁺-dependent expression of syntaxin-1A. In addition, the effect of P/Q calcium channel activation on syntaxin-1A expression requires intact intracellular Ca²⁺ stores as well as functional CaMKII and IV, PKA and MAPK kinase pathways. Interestingly, syntaxin-1A is a critical SNARE protein component for neurotransmitter release that is physically associated to P/Q calcium channels. This example therefore represents a positive feedback mechanism linking synaptic signaling and gene expression.

2.3.2. Regulation of transcription factors by Ca²⁺-activated proteins associated to voltage-dependent calcium channel complexes

While this pathway also implies a modification of transcription factors by Ca²⁺-activated phosphatases or kinases, it differs from the preceding by the specific implication of regulatory proteins directly interacting with voltage-dependent calcium channel components. The first example of such a mechanism again concerns the CREB transcription factor family. It was shown that L-type channel activation by depolarization in cortical neurons induces CREB Ser133 phosphorylation by the MAPK pathway [55]. This effect is specific of L-type channel activation since blockers of other calcium channel types (N- and P/Q-types) have no effect on this depolarization-induced activation of CREB. In this case, Ca²⁺ activation of calmodulin bound to the IQ domain of Ca_v1.2 (L-type channel pore-forming subunit) is

required for the recruitment of the MAP kinase pathway. This result also highlights the importance of Ca²⁺ microdomains. Indeed, EGTA that buffers cytoplasmic Ca²⁺ without affecting Ca²⁺ elevation at the immediate proximity of the channel mouth has no effect on the L-type channel-dependent CREB phosphorylation [44]. Therefore, this CREB phosphorylation pathway involves both the L-type channel complex itself (*via* its associated calmodulin) and the Ca²⁺ permeating through the channel. A mutation of the IQ domain, that prevents calmodulin binding onto Ca_v1.2, without affecting Ca²⁺ currents, inhibits depolarization-induced activation of CREB-dependent genes indicating that free Ca²⁺-calmodulin not bound to the channel is unable to induce CREB phosphorylation. Activation of MAPK/Erk involves activation of Ras, a small G protein, followed by MEK1 phosphorylation by a MEK kinase. In turn, activated MEK1 phosphorylates and activates MAPK/Erk [56]. Activated MAPK/Erk translocates to the nucleus where it phosphorylates CREB. Alternatively, MAPK/Erk can phosphorylate RSK (p90 kDa ribosomal S6 kinase) which translocates to the nucleus and acts as a CREB kinase [57]. Ras activation may occur through the Ca²⁺-calmodulin-sensitive Ras-GRF exchange factor in neurons [58]. The prevailing view is that CREB is already bound to CREs within the promoter of CREB-regulated genes and that its phosphorylation on Ser133 by MAPK favors the recruitment of the transcriptional coactivator CREB binding protein (CBP). The role of CBP in histone acetylation and further recruitment of the RNA polymerase II transcription machinery permits chromatin remodeling and transcription.

Recently, it has been described that CaMKII directly interacts with the C-terminal domain of the pore-forming subunit of L-type channels [59]. CaMKII tethering onto L-type channels requires Ca²⁺ entry through the ionic pore and calmodulin activation. Activated CaMKII phosphorylates L-type channels and contributes to channel facilitation, but it appears also to activate the CREB pathway through a mechanism that remains to be determined [60]. Interestingly, the dual action of CaMKII on L-type channels and CREB phosphorylation may temporally adjust L-type channel signaling input on gene transcription.

In another example, by using a plasmid encoding green fluorescence protein with a promoter under the control of NFATc4, it was shown that activation of NFATc4 is triggered by neuronal depolarization [61]. This process is inhibited by blockers of L-type channels while those of N- and P/Q-type channels have no effect. The authors show that activation of NFATc4 relies on activation of calcineurin, a Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphatase that by dephosphorylating NFATc4 allows its nuclear activation [62]. Recently, Oliveria et al. have shown that calcineurin anchoring to Ca_v1.2 *via* A-kinase anchoring proteins AKAP79/150 is required to turn on the NFATc4-dependent gene regulation pathway [63]. This group demonstrates that AKAP150 specific RNAi inhibits depolarization-induced NFATc4 nuclear translocation suggesting that the absence of AKAP150 precludes calcineurin-dependent NFATc4 dephosphorylation.

These examples demonstrate that voltage-dependent calcium channels are also involved in gene regulation *via* Ca²⁺-sensing elements interacting with the calcium channel complex. Ca²⁺-sensing proteins may be bound directly to the channel itself or indirectly through a connecting protein. This new route of Ca²⁺ signaling that originates in the close molecular vicinity of the channel complex strongly reinforces the importance of strictly restricted local Ca²⁺ increases (nano/microdomains).

2.3.3. Voltage-gated calcium channels and Ca²⁺-regulated transcription factors

In the former studies described above, transcription factors were under the control of Ca²⁺-binding proteins such as calmodulin. Here, we illustrate the case of transcription factors that directly bind Ca²⁺, providing a more straightforward link between intracellular Ca²⁺ elevation and transcription regulation. However, the same

questioning is raised in this case with regard to the origin of the required Ca^{2+} elevation, nuclear versus cytoplasmic. In a search for proteins interacting with the downstream regulatory element (DRE) of the prodynorphin gene, a 29 kDa protein, DREAM, was identified that unexpectedly possesses four EF-hands [64,65]. DREAM binds to DRE as a tetramer and acts as repressor. Binding of Ca^{2+} to DREAM promotes its dissociation from DRE, possibly by favoring its conformational transition from a tetrameric state to a dimeric state [66]. In this scheme, Ca^{2+} relieves transcriptional repression of DRE-containing promoters. Other DRE-regulated genes have been identified, including *c-fos* and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) [64,67]. Using immortalized GT1-7 GnRH neurons, it was shown that nimodipine, a L-type channel blocker, prevents GnRH expression and release. Real-time monitoring of DREAM action on luciferase reporter under the control of the GnRH promoter shows that nimodipine blocks luciferase expression [67]. These data demonstrate the link between Ca^{2+} entry through L-type channels and DREAM activation. Similar inhibition of luciferase expression was observed when DREAM was neutralized using specific antibodies. DREAM possesses sequence identity with calsenilin, a presenilin-2 interacting protein, and KCHIP-3 (for potassium channel interacting protein 3), which interacts with the K_v4 amino-terminus domain. Three other members of this family have been identified since then (KCHIP-1, -2 and -4) whose DNA-binding activities have not yet been established (for review see [68]). These data indicate that KCHIP proteins have pleiotropic functions in cells, both in the cytoplasm and in the nucleus.

2.3.4. Voltage-dependent calcium channel domains that act as transcription factors

Since the pioneering studies on calcium channel implication in gene regulation, a novel concept has emerged centered around the idea that calcium channel domains themselves may act as transcription factors. The very first evidence for such an implication of calcium channel domains comes from a study of Hibino et al. [69]. In this work, the authors demonstrate that a short particular splice variant of β_4 , termed β_{4c} , interacts with the chromobox protein 2/heterochromatin protein 1 γ (CHCB2/HP1 γ), a nuclear protein involved in gene silencing and transcriptional regulation [70]. The interaction between β_{4c} and CHCB2/HP1 γ is required for nuclear translocation of β_{4c} . β subunits are normally auxiliary subunits of voltage-gated calcium channels but this short isoform lacks most of the guanylate kinase domain of β subunits and should therefore not associate with the pore-forming subunit of voltage-gated calcium channels [71]. Nevertheless, the authors report a mild regulation of the channel gating in the presence of this subunit suggesting a form of loose connection between β_{4c} and the channel moiety. CHCB2/HP1 γ recognizes and binds a lysine residue near the carboxy-terminus of histone H3 that is specifically methylated by SUV39H1. Binding of SUV39H1 and CHCB2/HP1 γ onto histone H3 favors the formation of heterochromatin, a higher order chromatin state, thereby repressing gene activity (for review see [72]). Using a GAL4-CAT reporter system, the authors show that CHCB2/HP1 γ inhibits CAT expression, and that β_{4c} decreases the gene silencing activity of CHCB2/HP1 γ . The mechanism of this regulation remains unexplained but highlights for the first time the direct implication of calcium channel sequences in the regulation of gene expression. The mechanism of this regulation remains unexplained but highlights for the first time the direct implication of calcium channel sequences in the regulation of gene expression.

More recently, a proteolytic fragment of the C-terminus of the pore-forming subunit of L-type channels ($\text{Ca}_v1.2$) was shown to act as a transcription factor [73]. This domain was called calcium channel-associated transcriptional regulator (CCAT). Using antibodies directed towards the C-terminus of $\text{Ca}_v1.2$, the authors show the presence of CCAT in the nucleus of neurons from developing and adult brains. CCAT contains a nuclear retention domain but no nuclear localization signal. In agreement, the rise of intracellular Ca^{2+} concentration,

resulting from L-type calcium channel opening, triggers the export of CCAT from the nucleus. CCAT was found associated with p54(nrb)/NonO, a transcriptional regulator of, among others, the retinoic acid and thyroid hormone receptors. Using oligonucleotide microarray, the authors identified several genes that are down- or up-regulated by CCAT. Among these genes, a gene coding for gap junction protein connexin Cx31.1 is up-regulated as shown by the effect of CCAT on the Cx31.1 promoter associated to a luciferase reporter. This protein plays an essential role in neurite extension. However, the protease responsible for CCAT production in neurons remains to be identified, as well as the mechanism of its regulation by L-type channels. Alternatively, CCAT could result from the alternative splicing of the $\text{Ca}_v1.2$ gene, a hypothesis that would be worth investigating.

Lately, we evidenced, in a study that has been the object of a communication at the 10th European Calcium Society meeting in Leuven, that the full-length β_{4a} isoform of voltage-dependent calcium channels is addressed to the nucleus of neurons. This process requires the association of β_4 with B56 δ , an auxiliary subunit of phosphatase 2A (PP2A). The complex β_{4a} /B56 δ /PP2A associates to nucleosomes and probably plays a role in the dephosphorylation of histones. The association of B56 δ to β_4 is sensitive to the conformation of β_4 and requires the interaction of the SH3 domain of β_4 with its guanylate kinase domain. This conformation-dependent interaction leaves room for various regulation of β_4 nuclear targeting. Interestingly, a mutation of β_4 , associated to human epilepsy, leads to the loss of the 38 last carboxyl-terminal amino acids of β_4 [74]. We have shown that this mutant is defective for nuclear localization because of a lack of association with B56 δ . The relevance of PP2A in transcription regulation has been previously documented [75–77]. Accordingly, a transcriptomic study evidenced that β_4 nuclear translocation induces up- or down-regulation of several genes. Some of these genes are differently regulated if the human epileptic β_4 mutant is expressed instead of wild-type β_4 . Overall, these data indicate for the first time that a full-length subunit of a calcium channel can regulate gene transcription. The signaling route whereby β_4 subunit dissociates from the channel and associate to B56 δ , a new protein partner that takes it to the nucleus, is still not understood. However, these data open exciting new perspectives for the role of voltage-dependent calcium channels in excitation–transcription coupling. The universality of the uncovered regulation (β isoforms concerned and calcium channels implicated) and the intimate process of gene regulation by β_4 will require independent investigations.

2.4. Role of voltage-dependent calcium channels in post-transcriptional regulation

Although studies on voltage-dependent calcium channel implication in regulation of gene transcription have mostly focused on transcription, Ca^{2+} also controls post-transcriptional events by influencing mRNA splicing and stability. Indeed, depleting Ca^{2+} stores with thapsigargin produces alterations in the relative abundance of no less than 3,489 different transcripts in human IMR32 neuroblastoma cells, as assessed by high density exon-centric microarray [9]. If depolarization is used instead of thapsigargin treatment, no less than 1,505 transcripts vary in their copy number illustrating again the crucial role of Ca^{2+} in gene expression. However, if one looks at the effect of thapsigargin or KCl treatment on alternative splicing, then 8,533 (thapsigargin) or 5,139 (KCl) transcripts appear to carry a modified number of copies for one or more exons. Increase in cytoplasmic calcium concentration results in (i) alteration of the abundance of a given transcript (transcriptional regulation and/or mRNA stability) and (ii) preferential alternative splicing that result in the appearance of new transcripts (post-transcriptional regulation). Interestingly, Ca^{2+} -binding proteins, plasma membrane proteins and ion transporters are part of the transcripts up-regulated by elevated intracellular Ca^{2+} concentration indicating that Ca^{2+} itself controls the

expression of proteins involved in Ca^{2+} homeostasis. In a more specific study on IMR32 cells, a transcript variant encoding a new form of the plasma membrane Ca^{2+} ATPase PMCA is detected exclusively in response to KCl depolarization [78]. In the same trend, chronic KCl depolarization of cortical neurons modulates the splicing of neurexin 2a [79], a synaptic adhesion protein. This splicing produces the selective exclusion of exon 11 of neurexin 2 α and necessitates calcium channel activity as witnessed by its blockade by CdCl_2 . Other studies have been conducted on the mechanisms of the alternative splicing regulation by Ca^{2+} . Exon 21 of the NMDA receptor type 1 gene encodes a protein sequence that controls several functions of the receptor, among which is targeting to the plasma membrane. The splicing of this exon varies during development [80]. Depolarization of P19 embryonic carcinoma cells results in the exclusion of exon 21 from the transcript. This effect requires the activation of CaMKIV and depends of two CaRRE (CaMKIV-Responsive RNA Element) motifs of exon 21 [81].

Regarding the mRNA stability issue, it was shown that the long-form mRNA stability of $\text{Ca}_v2.2$ pore-forming subunit of N-type calcium channels, is increased by KCl-induced depolarization and L-type channel activation [82]. This results in the increase of N-type channel density at the plasma membrane of sympathetic neurons. This process, whereby the activity of one calcium channel type controls the expression level of another calcium channel, may represent an important feedback mechanism during development and/or adaptation and should be carefully considered in the interpretation of data coming from calcium channel knock-out or transgenic mice.

2.5. Altered gene regulation due to pathological mutations of voltage-dependent calcium channels

Genes coding for calcium channel subunits are known to carry mutations associated to various pathologies [83,84]. Researches on channelopathies generally focus on biophysical defects of the mutated calcium channels, miss-folding and/or miss-targeting issues, and more rarely on possibly associated gene expression deregulation [85]. However, considering the numerous pathways implicating voltage-dependent calcium channels in the regulation of gene expression, the causal link between calcium channel mutations and pathologies may also reside in transcription or post-transcription defects. Some preliminary evidences illustrate that pathologies associated to voltage-dependent calcium channel gene mutations result from the alteration of gene expression. The rolling mouse Nagoya, carrying a mutation of the gene coding for $\text{Ca}_v2.1$ of P/Q calcium channels, is an ataxic mutant mouse with severe ataxic gait. It shows altered mRNA and protein expression levels of the ryanodine receptors type 1 and 3 [86]. mRNA levels of ryanodine receptor type 1 are also found to be altered in tottering mice that carry another type of $\text{Ca}_v2.1$ mutation [87]. Considering the role of voltage-dependent calcium channels in gene regulation, transcriptomic alterations are likely to be at the basis of an ever growing list of channelopathies.

3. Perspectives

In this review, we illustrated the different routes that link without ambiguity voltage-dependent calcium channels and gene expression regulation, at both the transcriptional and post-transcriptional levels. In some cases, these routes have been linked to the expression of specific genes involved in physiological functions such as circadian rhythms, learning and memory, and control of neuronal survival and death (for review [88]). The understanding of the relationship between specific extracellular stimuli, Ca^{2+} -signaling pathway and specific physiological response represents the ultimate goal of these studies.

Other pathways exist between Ca^{2+} ions and gene regulation that are not connected so far to voltage-gated calcium channels. Indeed, several transcription factors are known to be regulated by Ca^{2+} , directly or indirectly, or to be part of the calcium channel signaling

complexes. For instance, a specific class of transcription factors, termed basic helix–loop–helix (bHLH) proteins is regulated by the EF-hand-containing Ca^{2+} -binding proteins calmodulin and S100. Seven classes of bHLH transcription factors have been described, some acting as transcription factors (e.g. class I) and others as repressors (e.g. class IV and VI) [89]. bHLH proteins bind to DNA onto a consensus E-box sequence, CANNTG, through their basic DNA-binding domain and following the formation of dimers or higher oligomerization states. Ca^{2+} -calmodulin may regulate bHLH transcription factors according to one of the following mechanisms: i) by precluding class I and II bHLH binding to DNA, or ii) by preventing the oligomerization of bHLH required for their DNA-binding activity [68]. Since several Ca^{2+} -calmodulin-dependent gene regulation pathways rely on Ca^{2+} entry through voltage-dependent calcium channels, it will be interesting to investigate the possible link between Ca^{2+} -calmodulin regulation of bHLH factors and voltage-gated calcium channel activity.

In another series of observations, CASK, a member of membrane-associated guanylate kinase family, has been shown to interact with Tbr-1, a T-box transcription factor [90] that is implicated in cerebellar development. When associated to Tbr-1, CASK redistributes to the nucleus and is present in a T element complex that binds to a specific T-box DNA sequence. Interestingly, CASK interacts also with the C-terminal domain of $\text{Ca}_v2.2$, the pore-forming subunit of N-type calcium channels, but not with the homologous domain of L- or R-type calcium channels [91]. CASK association with one isoform of $\text{Ca}_v2.2$ directs the channel towards presynaptic nerve terminals in hippocampal neurons, suggesting that, besides its role as transcription factor, it also influences channel targeting [92]. The importance of this CASK/channel complex in excitation–transcription coupling, specifically from synapse to nucleus, is still not established but will merit further investigation.

While regulation of transcription factors by channel activity has been widely illustrated, a completely new signaling pathway linking transcription factors to ion channels has recently been discovered. Caraveo et al. showed that TFII-I, a ubiquitously expressed transcription factor present in both the cytoplasm and the nucleus, regulates the agonist-induced Ca^{2+} -entry through TRPC3 calcium channels [93]. Down-expression of TFII-I using siRNA technology results in an increase of agonist-induced Ca^{2+} influx. This effect of TFII-I is maintained upon replacement of wild-type TFII-I by a nuclear localization-deficient TFII-I mutant; a result indicating that TFII-I regulates TRPC3 by a gene transcription-independent mechanism. The authors identified phospholipase $\text{C}\gamma$ as a specific partner of TFII-I. Phospholipase $\text{C}\gamma$ was shown to play a role in the agonist-induced plasma membrane incorporation of *de novo* TRPC3 channels [93], a process that would be modulated by its association with TFII-I.

This review illustrates the amazing interplay existing between calcium channels, Ca^{2+} ions, Ca^{2+} -binding proteins and transcription factors during the processing of information between the plasma membrane, sometimes as remotely as the synapse, and the nucleus. The presence of some transcription factors directly in the calcium channel molecular complexes indicates the incredible level of local integration in information processing. Conversely, the idea that channel fragments may directly act as transcription factors implies a simplification of the signaling scheme underlying excitation–transcription coupling. We bet that novel conceptually interesting pathways linking calcium channels to gene transcription will soon emerge to further enrich our understanding of this fascinating research world.

References

- [1] M.D. Bootman, M.J. Berridge, The elemental principles of calcium signaling, *Cell* 83 (1995) 675–678.
- [2] M.J. Berridge, The versatility and complexity of calcium signalling, *Novartis Found. Symp.* 239 (2001) 52–64 discussion 64–57, 150–159.

- [3] M.J. Berridge, M.D. Bootman, P. Lipp, Calcium—a life and death signal, *Nature* 395 (1998) 645–648.
- [4] M.D. Bootman, M.J. Berridge, H.L. Roderick, Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity, *Curr. Biol.* 12 (2002) R563–R565.
- [5] I. Bucurenciu, A. Kulik, B. Schwaller, M. Frotscher, P. Jonas, Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and Ca²⁺ sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse, *Neuron* 57 (2008) 536–545.
- [6] Y.Y. Huang, E.R. Kandel, Age-related enhancement of a protein synthesis-dependent late phase of LTP induced by low frequency paired-pulse stimulation in hippocampus, *Learn. Mem.* 13 (2006) 298–306.
- [7] A. Ghosh, M.E. Greenberg, Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences, *Science* 268 (1995) 239–247.
- [8] G.E. Hardingham, H. Bading, Calcium as a versatile second messenger in the control of gene expression, *Microsc. Res. Tech.* 46 (1999) 348–355.
- [9] A.E. McKee, N. Neretti, L.E. Carvalho, C.A. Meyer, E.A. Fox, A.S. Brodsky, P.A. Silver, Exon expression profiling reveals stimulus-mediated exon use in neural cells, *Genome. Biol.* 8 (2007) R159.
- [10] S. Feske, J. Giltman, R. Dolmetsch, L.M. Staudt, A. Rao, Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 316–324.
- [11] N.L. Allbritton, T. Meyer, L. Stryer, Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate, *Science* 258 (1992) 1812–1815.
- [12] M.A. Carrasco, E. Jaimovich, U. Kemmerling, C. Hidalgo, Signal transduction and gene expression regulated by calcium release from internal stores in excitable cells, *Biol. Res.* 37 (2004) 701–712.
- [13] L. Adams, D. Goldman, Role for calcium from the sarcoplasmic reticulum in coupling muscle activity to nicotinic acetylcholine receptor gene expression in rat, *J. Neurobiol.* 35 (1998) 245–257.
- [14] M.T. Alonso, C. Villalobos, P. Chamero, J. Alvarez, J. Garcia-Sancho, Calcium microdomains in mitochondria and nucleus, *Cell Calcium* 40 (2006) 513–525.
- [15] M.A. Carrasco, C. Hidalgo, Calcium microdomains and gene expression in neurons and skeletal muscle cells, *Cell Calcium* 40 (2006) 575–583.
- [16] J. Zhou, W. Du, K. Zhou, Y. Tai, H. Yao, Y. Jia, Y. Ding, Y. Wang, Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses, *Nat. Neurosci.* 11 (2008) 741–743.
- [17] B. Mellstrom, M. Savignac, R. Gomez-Villafuertes, J.R. Naranjo, Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 421–449.
- [18] B. Mayr, M. Montminy, Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 599–609.
- [19] L. Minichiello, A.M. Calella, D.L. Medina, T. Bonhoeffer, R. Klein, M. Korte, Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation, *Neuron* 36 (2002) 121–137.
- [20] S.W. Flavell, M.E. Greenberg, Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.* 31 (2008) 563–590.
- [21] J.A. Powell, M.A. Carrasco, D.S. Adams, B. Drouet, J. Rios, M. Muller, M. Estrada, E. Jaimovich, IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle, *J. Cell. Sci.* 114 (2001) 3673–3683.
- [22] B.R. Wamhoff, D.K. Bowles, G.K. Owens, Excitation–transcription coupling in arterial smooth muscle, *Circ. Res.* 98 (2006) 868–878.
- [23] M. Oh-hora, A. Rao, Calcium signaling in lymphocytes, *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 250–258.
- [24] D.D. Ginty, Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial? *Neuron* 18 (1997) 183–186.
- [25] S. Chawla, H. Bading, CREB/CBP and SRE-interacting transcriptional regulators are fast on–off switches: duration of calcium transients specifies the magnitude of transcriptional responses, *J. Neurochem.* 79 (2001) 849–858.
- [26] R.E. Dolmetsch, K. Xu, R.S. Lewis, Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression, *Nature* 392 (1998) 933–936.
- [27] G.E. Hardingham, S. Chawla, F.H. Cruzalegui, H. Bading, Control of recruitment and transcription-activating function of CBP determines gene regulation by NMDA receptors and L-type calcium channels, *Neuron* 22 (1999) 789–798.
- [28] R.E. Dolmetsch, R.S. Lewis, C.C. Goodnow, J.I. Healy, Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration, *Nature* 386 (1997) 855–858.
- [29] M. De Waard, C.A. Gurnett, K.P. Campbell, Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels, *Ion Channels* 4 (1996) 41–87.
- [30] J. Arikath, K.P. Campbell, Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex, *Curr. Opin. Neurobiol.* 13 (2003) 298–307.
- [31] E.C. Cooper, L.Y. Jan, Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 4759–4766.
- [32] J.I. Morgan, T. Curran, Role of ion flux in the control of *c-fos* expression, *Nature* 322 (1986) 552–555.
- [33] M.E. Greenberg, E.B. Ziff, L.A. Greene, Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription, *Science* 234 (1986) 80–83.
- [34] Z. Mao, A. Bonni, F. Xia, M. Nadal-Vicens, M.E. Greenberg, Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2, *Science* 286 (1999) 785–790.
- [35] W.G. Chen, Q. Chang, Y. Lin, A. Meissner, A.E. West, E.C. Griffith, R. Jaenisch, M.E. Greenberg, Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2, *Science* 302 (2003) 885–889.
- [36] R.P. Misra, A. Bonni, C.K. Miranti, V.M. Rivera, M. Sheng, M.E. Greenberg, L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 25483–25493.
- [37] P.L. Greer, M.E. Greenberg, From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function, *Neuron* 59 (2008) 846–860.
- [38] H. Bading, D.D. Ginty, M.E. Greenberg, Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways, *Science* 260 (1993) 181–186.
- [39] S. Chawla, G.E. Hardingham, D.R. Quinn, H. Bading, CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV, *Science* 281 (1998) 1505–1509.
- [40] H. Yokokura, O. Terada, Y. Naito, H. Hidaka, Isolation and comparison of rat cDNAs encoding Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I isoforms, *Biochim. Biophys. Acta* 1338 (1997) 8–12.
- [41] P. Sun, H. Enslen, P.S. Myung, R.A. Maurer, Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity, *Genes. Dev.* 8 (1994) 2527–2539.
- [42] H. Bito, K. Deisseroth, R.W. Tsien, CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression, *Cell* 87 (1996) 1203–1214.
- [43] P.G. Mermelstein, K. Deisseroth, N. Dasgupta, A.L. Isaksen, R.W. Tsien, Calmodulin priming: nuclear translocation of a calmodulin complex and the memory of prior neuronal activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 15342–15347.
- [44] K. Deisseroth, E.K. Heist, R.W. Tsien, Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons, *Nature* 392 (1998) 198–202.
- [45] G.E. Hardingham, F.J. Arnold, H. Bading, Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity, *Nat. Neurosci.* 4 (2001) 261–267.
- [46] G.E. Hardingham, S. Chawla, C.M. Johnson, H. Bading, Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression, *Nature* 385 (1997) 260–265.
- [47] A.A. Genazzani, E. Carafoli, D. Guerini, Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 5797–5801.
- [48] H. Enslen, P. Sun, D. Brickey, S.H. Soderling, E. Klamo, T.R. Soderling, Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 15520–15527.
- [49] F.C. Liu, A.M. Graybiel, Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum, *Neuron* 17 (1996) 1133–1144.
- [50] J.E. Darnell Jr., STATs and gene regulation, *Science* 277 (1997) 1630–1635.
- [51] E.O. Hernandez-Ochoa, M. Contreras, Z. Cseresnyes, M.F. Schneider, Ca²⁺ signal summation and NFATc1 nuclear translocation in sympathetic ganglion neurons during repetitive action potentials, *Cell Calcium* 41 (2007) 559–571.
- [52] R. Zhao, L. Liu, A.R. Rittenhouse, Ca²⁺ influx through both L- and N-type Ca²⁺ channels increases *c-fos* expression by electrical stimulation of sympathetic neurons, *Eur. J. Neurosci.* 25 (2007) 1127–1135.
- [53] T.A. Brosenitsch, D.M. Katz, Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-type calcium channels, *J. Neurosci.* 21 (2001) 2571–2579.
- [54] K.G. Sutton, J.E. McRory, H. Guthrie, T.H. Murphy, T.P. Snutch, P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A, *Nature* 401 (1999) 800–804.
- [55] R.E. Dolmetsch, U. Pajvani, K. Fife, J.M. Spotts, M.E. Greenberg, Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel–calmodulin complex through the MAP kinase pathway, *Science* 294 (2001) 333–339.
- [56] L.B. Rosen, D.D. Ginty, M.J. Weber, M.E. Greenberg, Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras, *Neuron* 12 (1994) 1207–1221.
- [57] A.E. West, E.C. Griffith, M.E. Greenberg, Regulation of transcription factors by neuronal activity, *Nat. Rev., Neurosci.* 3 (2002) 921–931.
- [58] C.L. Farnsworth, N.W. Freshney, L.B. Rosen, A. Ghosh, M.E. Greenberg, L.A. Feig, Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF, *Nature* 376 (1995) 524–527.
- [59] A. Hudmon, H. Schulman, J. Kim, J.M. Maltez, R.W. Tsien, G.S. Pitt, CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation, *J. Cell. Biol.* 171 (2005) 537–547.
- [60] D.G. Wheeler, C.F. Barrett, R.D. Groth, P. Safa, R.W. Tsien, CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation–transcription coupling, *J. Cell. Biol.* 183 (2008) 849–863.
- [61] I.A. Graef, P.G. Mermelstein, K. Stankunas, J.R. Neilson, K. Deisseroth, R.W. Tsien, G.R. Crabtree, L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons, *Nature* 401 (1999) 703–708.
- [62] C.R. Beals, N.A. Clipstone, S.N. Ho, G.R. Crabtree, Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction, *Genes Dev.* 11 (1997) 824–834.
- [63] S.F. Oliveria, M.L. Dell'Acqua, W.A. Sather, AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca²⁺ channel activity and nuclear signaling, *Neuron* 55 (2007) 261–275.
- [64] A.M. Carrion, W.A. Link, F. Ledo, B. Mellstrom, J.R. Naranjo, DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor, *Nature* 398 (1999) 80–84.
- [65] A.M. Carrion, B. Mellstrom, J.R. Naranjo, Protein kinase A-dependent derepression of the human prodynorphin gene via differential binding to an intragenic silencer element, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 6921–6929.
- [66] J.D. Lusin, M. Vanarotti, C. Li, A. Valiveti, J.B. Ames, NMR structure of DREAM: implications for Ca(2+)-dependent DNA binding and protein dimerization, *Biochemistry* 47 (2008) 2252–2264.
- [67] G.M. Leclerc, F.R. Boockfor, Calcium influx and DREAM protein are required for GnRH gene expression pulse activity, *Mol. Cell. Endocrinol.* 267 (2007) 70–79.

- [68] B. Mellstrom, J.R. Naranjo, Ca²⁺-dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector, *Semin. Cell Dev. Biol.* 12 (2001) 59–63.
- [69] H. Hibino, R. Pironkova, O. Onwumere, M. Rousset, P. Charnet, A.J. Hudspeth, F. Lesage, Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta 4 subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 307–312.
- [70] J.C. Eissenberg, T.C. James, D.M. Foster-Hartnett, T. Hartnett, V. Ngan, S.C. Elgin, Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 9923–9927.
- [71] Y.H. Chen, M.H. Li, Y. Zhang, L.L. He, Y. Yamada, A. Fitzmaurice, Y. Shen, H. Zhang, L. Tong, J. Yang, Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels, *Nature* 429 (2004) 675–680.
- [72] D. Moazed, Common themes in mechanisms of gene silencing, *Mol. Cell* 8 (2001) 489–498.
- [73] N. Gomez-Ospina, F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu, R. Dolmetsch, The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)₁L2 encodes a transcription factor, *Cell* 127 (2006) 591–606.
- [74] A. Escayg, M. De Waard, D.D. Lee, D. Bichet, P. Wolf, T. Mayer, J. Johnston, R. Baloh, T. Sander, M.H. Meisler, Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia, *Am. J. Hum. Genet.* 66 (2000) 1531–1539.
- [75] S.J. Nowak, C.Y. Pai, V.G. Corces, Protein phosphatase 2A activity affects histone H3 phosphorylation and transcription in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 6129–6138.
- [76] S. Zolnierowicz, Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1225–1235.
- [77] M. Martin, M. Potente, V. Janssens, D. Vertommen, J.C. Twizere, M.H. Rider, J. Goris, S. Dimmeler, R. Kettmann, F. Dequiedt, Protein phosphatase 2A controls the activity of histone deacetylase 7 during T cell apoptosis and angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 4727–4732.
- [78] D.A. Zacharias, E.E. Strehler, Change in plasma membrane Ca²⁺-ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca²⁺, *Curr. Biol.* 6 (1996) 1642–1652.
- [79] G. Rozic-Kotliroff, N. Zisapel, Ca²⁺-dependent splicing of neurexin IIalpha, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 226–230.
- [80] J.A. Lee, Y. Xing, D. Nguyen, J. Xie, C.J. Lee, D.L. Black, Depolarization and CaM kinase IV modulate NMDA receptor splicing through two essential RNA elements, *PLoS Biol.* 5 (2007) e40.
- [81] J. Xie, D.L. Black, A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels, *Nature* 410 (2001) 936–939.
- [82] S. Schorge, S. Gupta, Z. Lin, M.W. McEnery, D. Lipscombe, Calcium channel activation stabilizes a neuronal calcium channel mRNA, *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 785–790.
- [83] J. Jen, Calcium channelopathies in the central nervous system, *Curr. Opin. Neurobiol.* 9 (1999) 274–280.
- [84] N.M. Lorenzon, K.G. Beam, Calcium channelopathies, *Kidney. Int.* 57 (2000) 794–802.
- [85] N. Weiss, A. Sandoval, R. Felix, A. Van den Maagdenberg, M. De Waard, The S218L familial hemiplegic migraine mutation promotes de/inhibition of Ca(v)₂1 calcium channels during direct G-protein regulation, *Pflugers Arch.* 457 (2008) 315–326.
- [86] K. Sawada, E. Hosoi, M. Bando, H. Sakata-Haga, N.S. Lee, Y.G. Jeong, Y. Fukui, Differential alterations in expressions of ryanodine receptor subtypes in cerebellar cortical neurons of an ataxic mutant, rolling mouse Nagoya, *Neuroscience* 152 (2008) 609–617.
- [87] M. Cicale, A. Ambesi-Impombato, V. Cimini, G. Fiore, G. Muscettola, L.C. Abbott, A. de Bartolomeis, Decreased gene expression of calretinin and ryanodine receptor type 1 in tottering mice, *Brain Res. Bull.* 59 (2002) 53–58.
- [88] K. Deisseroth, P.C. Mermelstein, H. Xia, R.W. Tsien, Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms, *Curr. Opin. Neurobiol.* 13 (2003) 354–365.
- [89] M.E. Massari, C. Murre, Helix–loop–helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 429–440.
- [90] Y.P. Hsueh, T.F. Wang, F.C. Yang, M. Sheng, Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2, *Nature* 404 (2000) 298–302.
- [91] A. Maximov, T.C. Sudhof, I. Bezprozvanny, Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24453–24456.
- [92] A. Maximov, I. Bezprozvanny, Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons, *J. Neurosci.* 22 (2002) 6939–6952.
- [93] G. Caraveo, D.B. van Rossum, R.L. Patterson, S.H. Snyder, S. Desiderio, Action of TFII-I outside the nucleus as an inhibitor of agonist-induced calcium entry, *Science* 314 (2006) 122–125.

Conclusion

Dans cette revue sont décrites les différentes voies de signalisation qui relient les CCVD à la régulation de l'expression génique. Ces voies de signalisation peuvent impliquer de manière indirecte les CCVD via les ions Ca^{2+} qui les traversent. Ces ions Ca^{2+} sont alors considérés comme des seconds messagers qui vont activer directement ou non certains facteurs de transcription. Cette revue recense également certains travaux qui ont montré une implication directe des CCVD dans la régulation de l'expression génique par des composants des CCVD tels que les sous-unités β faisant ainsi évoluer le concept du couplage excitation-transcription.

Revue 2 :

Lethargic mice: an interesting animal model to investigate voltage-gated calcium channel β_4 subunit function

Katell Fablet et Michel De Waard

Revue acceptée à Nova publishers.

Introduction

De nombreux travaux ont utilisés comme modèle d'études, la souris *lh* afin d'en caractériser le phénotype neurocomportemental complexe et les origines de l'apparition de ce phénotype. Aucune revue de la littérature ne s'était donnée pour objectif de faire une synthèse de ces différents travaux pour mieux comprendre le phénotype *lh* et son origine physiologique. Cette revue a été écrite dans ce but. Elle met également en évidence la pertinence du choix de la souris *lh* comme modèle d'étude de la fonction de la sous-unité β_4 des CCVD.

Lethargic mice: an interesting animal model to investigate voltage-gated calcium channel β_4 subunit function

Katell Fablet^{1,2*} and Michel De Waard^{1,2}

¹Unité Inserm U836, Grenoble Institute of Neuroscience, Site Santé, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 09, France.

²Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

*Correspondence should be addressed to Katell Fablet, E-mail : katell.fablet@ujf-grenoble.fr

Tel.: +0033 456520567; fax : +0033 456520669

ABSTRACT

Lethargic (lh) mice are spontaneous mutant mice presenting a loss of β_4 subunit of voltage-gated calcium channels (VGCC) due to a mutation in the gene encoding for β_4 , *Cacnb4*. These *lh* mice are characterized by a complex phenotype with notably severe neurobehavioral defects. They comprise gait ataxia, paroxysmal dyskinesia, hypokinetic behavior and absence epilepsy seizures. The epileptopathogenesis has been extensively investigated in this mutant strain. Disturbances of the GABA_B receptor system with the involvement of T-type VGCC in the thalamus may explain the appearance of absence epilepsy. Considering the role of β subunits in VGCC assembly, targeting and modulation of voltage-sensitive parameters, loss of β_4 has severe consequences for VGCC functions. Data from *lh* mice gave insight into an interesting phenomenon called “subunit reshuffling”. Indeed, a compensation mechanism by β subunits has been observed in certain brain regions of *lh* mice. Far from being complete, “subunit reshuffling” is evidence of neuronal plasticity that may attenuate the severe defects caused by the absence of β_4 in *lh* mice. Where compensation is not possible, the absence of β_4 highlights additional roles of β_4 possibly in gene regulation.

INTRODUCTION

Voltage-gated calcium channels (VGCC) play many biological functions, such as hormones and neurotransmitters release, neuromuscular coupling and gene regulation. These channels comprise alpha1 (α_1 or Ca_v), a large membrane subunit constituting the pore-forming subunit of VGCC and up to three auxiliary subunits of type beta (β), gamma (γ), and alpha2delta ($\alpha_2\delta$) (Fig. 1A). Spontaneous mutant mice strains constitute tremendous animal models to study the organization and the role of VGCC. The *tottering*, *learner*, *rolling* or *Nagoya rocker* mutant mice were identified for a mutation in the *Cacna1* gene encoding the α_1 subunit of P/Q-type VGCC (Fletcher, Lutz et al. 1996; Mori, Wakamori et al. 2000). In addition, *stargazer* and *lethargic (lh)* mice have been respectively described for a γ_2 and a β_4 mutation (Burgess, Jones et al. 1997; Letts, Felix et al. 1998). This chapter will focus on *lh* mice and aim at describing the neuropathological defects affecting this strain mutant mice and delineating neural networks and cellular mechanisms at the origin of the *lh* phenotype. In addition, this review will evidence that β_4 role is not limited to assembly and regulation of VGCC.

LETHARGIC MICE DISPLAY A COMPLEX PHENOTYPE

First described by Dickie in 1964, *lh* mice, which spontaneously arose from the BALB/cGn mice line, show a complex neurobehavioral phenotype. These mice exhibit a difficulty in moving forward with a slow and hesitant motor behavior (Dickie 1964). It is because of this behavior that the name *lh* has been given to this mice strain. These mice were early characterized by the spontaneous seizures that they exhibit (Dickie 1964). Electroencephalographic studies revealed bilateral synchronous electrographic seizures of 5- to 6-Hz spike waves. Epileptiform bursts were considered as spike-wave discharges (SWD) if they met all the following criteria : duration of bursts >0.6 sec with epileptiform spikes (i.e., <70 msec per spike), a typical frequency for mice of 5-6 Hz and simultaneously recorded in the both hemispheres (Hosford, Lin et al. 1995). For the duration of seizures, *lh* mice stay immobile and unresponsive. In humans, typical absence seizures are characterized by brief episodes of bilaterally synchronous 2.5 to 4 Hz spike wave discharges that manifest themselves as sudden behavioral arrest and impaired consciousness (Weiergräber, Stephani et al. 2010). These characteristics resemble those observed in *lh* mice and because of this resemblance, this mutant strain is considered as a valid and useful model to study absence epileptic seizures. The hypokinetic behavior of the mice turns out more to be a strategy learned by the mice to avoid attacks than the result of an impaired neuromotor system (Khan and Jinnah 2002). This hypothesis is supported by the fact that mice display fewer seizures over 1-3 months of age compared to younger mice, a time lapse coincident with the emergence of this hypokinetic behavior. Other neurologic defects have been described for this strain mutant as well. *Lh* mice exhibit an ataxic gait at 2-3 weeks (Sidman, Green et al. 1965). Moreover, it has been shown that *lh* mice display paroxysmal dyskinesia characterized by intermittent attacks of involuntary abnormal movements superimposed on a relatively normal baseline (Devanagondi, Egami et al. 2007; Shirley, Rao et al. 2008). This defect primarily confused with manifestations of motor epilepsy has been clearly distinguished from absence epileptic seizures. Briefly, the distinguishable characteristics that were identified are the EEG records not reflecting epilepsy, the duration of seizures (longer than epileptic seizures), the absence of presumed unconsciousness accompanying absence epileptic seizures, the possibility of repeated seizures without the usual postictal refractory period detected in motor epilepsy and, finally, the trigger of attacks by environmental factors not observed for epileptic seizures.

To that complex panel of neurologic disorders, these mice suffer also from other defects regarding body growth, and the immune and reproductive systems. Indeed, mice show a postnatal growth retardation with a reduction in body weight (Dung and Swigart 1972; Dung 1975) and cachexia (i.e. syndrome comprising a loss of weight, muscle atrophy, and weakness) between 3 and 6 weeks of age (Dung and Swigart 1972). The immune system is largely affected in this mutant strain as well (Dung and Swigart 1972) with, among other symptoms, an abnormal thymus development, a smaller spleen and decreased lymphocyte cell numbers. Finally, these mice also suffer from low-fertility. Maintenance of the strain is therefore difficult. The generation of homozygote *lh/lh* is possible almost exclusively by crossing *lh*/wild-type (WT) heterozygotes. Because of the sum of all these defects, *lh* mice are hit by premature death with a prevalence of high mortality rates between 3-4 weeks of age. It is nevertheless

important to notice that *lh* mice, surviving past two months of age, recover much of their body weight and immune functions, suggesting that these defects are age-related.

A MUTATION IN THE β_4 SUBUNIT OF VOLTAGE-GATED CALCIUM CHANNEL GENE IS AT THE ORIGIN OF THE *Lh* PHENOTYPE

Burgess et al. were the first in 1997 to highlight the molecular defect underlying the *lh* phenotype. This research group identified a mutation within the gene of β_4 subunit of VGCC, *Cacnb4* on chromosome 2 (Burgess, Jones et al. 1997). β subunits are encoded by four distinct genes. Thus four isoforms of β subunits, including β_4 , have been identified (Fig. 1B). Each one of these isoforms also contains several splice variants (Buraei and Yang 2010). β subunits have a modular structure and can be divided in five domains. Domains D2 and D4 are particularly conserved among β isoforms and correspond respectively to the Scr Homology 3 (SH3) and Guanylate Kinase (GK) domains which are linked by a HOOK sequence. These structural features of β subunits suggest that these subunits belong to the larger family of membrane-associated guanylate kinases (MAGUK). β_4 was first cloned by Castellano et al. in 1993 (Castellano, Wei et al. 1993) and his crystal structure has been found in 2004 by Chen et al. (Chen, Li et al. 2004, Fig. 1B). This protein presents on Western blot a molecular weight of approximately 58 kD. β subunits chaperone the pore-forming subunit to the cell membrane for VGCC assembly and targeting and sets voltage-sensitive parameters for channel opening and closing (De Waard and Campbell 1995; Brice, Berrow et al. 1997). The *lh* mutation corresponds more precisely to the insertion of four nucleotides within a 5' splice site of *Cacnb4* gene (Fig. 1C). This mutation leads to a translational frame shift and 77 bp exon preceding the mutation is consistently skipped during *Cacnb4* pre-mRNA processing in *lh* brain. This predicts a truncated β_4 subunit of VGCC protein missing 60% of the C-terminal sequence relative to the wild-type protein. However to date, attempts to show such a truncated sequence expressed in neurons were unsuccessful. McEnery et al. failed to detect by Western blotting this truncated β_4 subunit in forebrain and cerebellum of *lh* mice (McEnery, Copeland et al. 1998). The absence of this truncated sequence indicates that the translated product is highly unstable and degraded rapidly after synthesis. *Lh* mice is therefore considered by many as a spontaneous β_4 knock-out model. This assumption should however be carefully accepted considering that if such a truncated β_4 sequence would be expressed, it most likely could possess some functional activity as much as some short splice variants of the β_4 subunit, such as β_{4c} (Hibino, Pironkova et al. 2003; Xu, Lee et al. 2011).

Place Figure 1 here.

***Lh* MICE: A MODEL OF ABSENCE EPILEPTIC SEIZURES**

Considered as an interesting mouse model of absence epilepsy, *lh* mice were studied to delineate neural networks and molecular and cellular mechanisms at the origin of this phenotype. In addition, *lh* mice were also used as an animal model to develop new antiepileptic drugs. Early, the implication of GABA_B receptors in the genesis of seizures has been highlighted. Indeed the administration

of GABA_B receptor agonists and antagonists respectively increases and decreases seizures frequency in *lh* mice (Hosford, Clark et al. 1992; Hosford, Lin et al. 1995; Hosford, Wang et al. 1995; Aizawa, Ito et al. 1997). It has been shown that GABA_B receptor density increases in the neocortex but also in multiple nuclei of thalami and in caudate-putamen of *lh* mice compared to WT mice (Hosford, Clark et al. 1992; Hosford, Lin et al. 1995; Hosford, Lin et al. 1999). This is not the case for GABA_A receptors whose numbers remain unchanged in the neocortex of *lh* mice. In the same way, significantly higher GAD₆₇ (a glutamate decarboxylase that synthesizes GABA from glutamate) mRNA and protein expressions have been detected in the nucleus reticularis (NRT) of the thalamus of *lh* mice (Lin, Lin et al. 1999). These data suggest that there is an increase in GABA synthesis in NRT but unfortunately this question has not been investigated in detail by complementary studies. There is however a study that explored amino acid levels in different brain areas of *lh* and WT mice (De Luca, Di Giorgio et al. 2005). The concentration of GABA in the diencephalon remains unchanged between *lh* and WT mice but there is a significantly higher concentration of GABA in the cortex and a significantly lower concentration in the cerebellum of *lh* mice. Modifications concerning GABA concentration and increase of GABA_B receptors are not correlated with clear alterations in GABA release or GABA_B receptor mediated effects. Hosford et al. explored in 1992 the possibility that GABA_B receptor mediated effects contribute to the neuronal mechanisms underlying absence seizures. They observed a significantly greater inhibition of N-methyl D-aspartate (NMDA) excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) by GABA_B receptor in CA1 of hippocampal slice of *lh* brain (Hosford, Clark et al. 1992). In neocortex of *lh* mice, presynaptic GABA_B receptors inhibit to a significantly greater degree [³H]-GABA release (Lin, Wang et al. 1995). On the contrary in the thalamus of *lh* mice, the presynaptic GABA_B receptor-mediated effect is reduced. In thalamic ventrobasal neurons, whole cell voltage-clamp recordings showed no differences in evoked GABA_B-mediated currents in *lh* or wild-type mice (Caddick and Hosford 1996). Similarly, Caddick et al. observed in 1999 no differences in effects mediated by presynaptic GABA_B receptors on inhibitory afferents to ventrobasal neurons in *lh* mice (Caddick, Wang et al. 1999). Even if GABA receptor system defects seem complex, alterations of this system in the thalamus of *lh* mice might be predominantly involved in the pathogenesis of absence epilepsy. It is now well established that the thalamus contributes to epileptogenesis (Kohl, Paulsen et al. 2010). Reciprocally, corticothalamic projections permit synchronized network activity that explains synchronous pathological spike-and-wave discharges during generalized absence epilepsy in the cortex and in the thalamus. Candidate structures regulating absence seizures in *lh* mice have been identified in the thalamus: the antero-ventro-lateral nucleus, the reuniens nuclei and the reticular nucleus (Hosford, Lin et al. 1995). These structures present shared features: they contain enriched GABA_B binding sites, present spike-wave discharges in frontal neocortex, synchronous with spike-wave discharges in thalamic nuclei, and show regulation of absence seizures by GABA_B receptors. The involvement of reticular nucleus in the genesis of spike and wave discharges in absence epilepsy has been demonstrated in other animal models and particularly in the Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) (Tsakiridou, Bertollini et al. 1995; Slaght, Leresche et al. 2002). The reticularis nucleus is exclusively composed of GABAergic neurons that project to the dorsal thalamus and receive axon collaterals from both corticothalamic and thalamocortical fibers. GABAergic neurons of the reticularis nucleus exert influences on thalamocortical neurons and local-circuit GABAergic cells and more precisely hyperpolarize these cells (Steriade and Contreras 1995). This hyperpolarization is a prerequisite for de-inactivation of T-type calcium channels thereby enhancing the generation of rebound action potential burst (Kohl,

Paulsen et al. 2010). The implication of T-type calcium currents in the generation of spike and wave discharges characteristic of absence epilepsy has already been reported in GAERS (Danober, Deransart et al. 1998; Talley, Solórzano et al. 2000). In *lh* mice, recordings of thalamocortical neurons showed higher T-type Ca^{2+} current levels compared with WT mice (Zhang, Mori et al. 2002). This enhancement of T-type currents is not explained by a variation in $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ or $\text{Ca}_v3.3$ mRNA expression. Another study investigated the role of $\text{Ca}_v3.1$ in the genesis of absence epilepsy in *lh* mice. For this purpose Song et al. constructed a double mutant $\text{Ca}_v3.1^{-/-}/\beta_4^{lh/lh}$ mice (Song, Kim et al. 2004). They showed that the $\text{Ca}_v3.1$ null mutation drastically reduces spike and wave discharges in *lh* mice revealing the important role of $\text{Ca}_v3.1$ in the genesis of absence seizures in *lh* mice.

RESHUFFLING OF β SUBUNITS COMPENSATES THE LACK OF β_4 IN *Lh* MICE

β_4 seems to preferentially associate with $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$ of respectively, P/Q- and N-type channels (Liu, De Waard et al. 1996). β_4 has been proved to interact with high affinity with the alpha interaction domain of the cytoplamic loop I-II of $\text{Ca}_v2.1$ subunit (De Waard and Campbell 1995). Moreover several studies proved a co-localization of β_4 and $\text{Ca}_v2.1$ in cerebellar Purkinje cells and granule cells (Lin, Wang et al. 1995; Ludwig, Flockerzi et al. 1997; Volsen, Day et al. 1997; Lin, Barun et al. 1999). Concerning N-type channels, association of β_4 with $\text{Ca}_v2.2$ has been observed in the forebrain and the cerebellum (McEnery, Copeland et al. 1998). In *lh* mice, the loss of β_4 would affect the preferential $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2/\beta_4$ interaction. This modification may itself trigger defects in P/Q- and N-type channel localization and decrease in calcium current amplitudes. Several studies investigated this question and surprisingly invalidated this *a priori* seducing hypothesis. Immunohistochemical experiments on adult cerebellum sections analyzed potential changes in the localization of $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$ in WT and *lh* mice (Burgess, Biddlecome et al. 1999). In fact, Burgess et al. observed no differences between *lh* and WT mice with regard to the localization of these two pore-forming subunits. $\text{Ca}_v2.1$ immunoreactivity is mostly abundant in soma and proximal dendritic segments of Purkinje neurons and at lower levels in the molecular and granular layers. The $\text{Ca}_v2.2$ immunoreactivity is very distinct from $\text{Ca}_v2.1$. This channel type is not detected in Purkinje neurons but is present in molecular and granular layers (Burgess, Biddlecome et al. 1999). Results from *in situ* hybridization histochemistry show also an identical distribution of $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$ mRNA in *lh* and WT mice brain sections (Lin, Barun et al. 1999). More precisely, $\text{Ca}_v2.1$ mRNA is highly expressed in cerebellar and dentate granule cells populations and $\text{Ca}_v2.2$ mRNA is mostly present in granule cells olfactory bulb and in the granule cells layer of cerebellum. In addition, the functions of both P/Q and N-type Ca^{2+} channels do not seem to be altered in *lh* mice. Indeed Ba^{2+} currents through VGCC in *lh* cerebellar Purkinje cells are not different from normal mice in terms of voltage-dependence of activation, voltage-dependence of inactivation and current amplitude (Burgess, Biddlecome et al. 1999). Moreover, in the hippocampal CA3-CA1 synapse, the Ca^{2+} influx profile is not significantly changed for *lh* mice (Qian and Noebels 2000). Compensatory molecular mechanisms could explain the conserved localization and biophysical properties of P/Q- and N-type channels in *lh* mice. McEnery et al. studied β subunit expression levels in forebrain and cerebellum of *lh* and normal mice (McEnery, Copeland et al. 1998). Their data indicated an increase in β_{1b} expression in the forebrain

and in the cerebellum of *Lh* mice supporting enhancement of Cav2.2/ β_{1b} reassembly in *Lh* forebrain. Burgess et al. showed also the presence of a subunit reshuffling and found more β_{1b} and β_3 associated with Cav2.1 and more β_{1b} , β_2 and β_3 associated with Cav2.2 in *Lh* mice brain (Burgess, Biddlecome et al. 1999). These modifications are not accompanied by significant changes in transcriptional regulation of the β_{1-3} subunit genes. This may suggest enhanced stability of β subunits due to the association of β subunits with the pore-forming subunit or an increase in pre-existing mRNA translation. These two studies suggested that the lack of β_4 is compensated by the reorganization in β subunit composition of P/Q- and N-type calcium channels. This “subunit reshuffling” is in fact quite imperfect. Indeed, in spite of the reassembly of Cav2.2 with β_{1b} in the cerebellum, significant decreases in N-type VGCC density and in Cav2.2 expression have been observed (McEnery, Copeland et al. 1998). This type of compensatory molecular mechanism is probably not possible in the thalamus, a brain region characterized by a strong expression of β_4 and by the absence of expression of the majority of other β subunits (Buraei and Yang 2010). This observation may explain why this brain area is particularly affected by the *Lh* mutation at the basis of the severe neurologic defects and more particularly the absence epilepsy.

***Lh* MICE: NEW PERSPECTIVES**

Lh mice have been extensively studied as a model of absence epileptic seizures but have been underestimated as a potent model for others pathologies. Indeed, this mutant mice strain has been poorly investigated to delineate the neuroanatomical basis for paroxysmal dyskinesia, a neurologic defect clearly identified in *Lh* mice (Khan and Jinnah 2002; Shirley, Rao et al. 2008). To date only one study has set out to understand neuroanatomical substrates at the origin of this neurobehavioral phenotype. This study pointed out that cerebellectomy in *Lh* mice remove paroxysmal dyskinesia revealing the involvement of the cerebellum in the occurrence of this neurological disorder (Devanagondi, Egami et al. 2007). In addition, *Lh* mice suffer from gait ataxia, this could be interesting to examine this coordination movement dysfunction through this mutant mice strain. Moreover, defects relative to the immune and reproductive systems, which *Lh* mice suffer from, could also be interestingly explored in this mutant strain. As we have already mentioned, the effect of the mutation of β_4 subunit gene, which leads to the loss of β_4 protein, is compensated by other β subunits and notably β_{1b} . In brain regions, such as in the thalamus, where we can postulate that there is no compensation, targeting of VGCC to the membrane, VGCC assembly and voltage-sensitive parameters setting for channel opening and closing may be defective, implying disturbances of the calcium homeostasis. The β subunit reshuffling hypothesis, which is supported by various research groups in the world, implies that β subunits isoforms are relatively comparable in terms of plasma membrane targeting, assembly of VGCC, gating of VGCC pore-forming subunits, protein environment and cell function. However, we should wonder whether it is judicious to limit β subunits in their unique role as VGCC chaperones. We will discuss hereunder hypothetical other roles of β subunits. Indeed, several β_4 isoforms resulting of alternative splicing have been identified (Fig. 1D), and some of them have been shown to regulate gene expression. In 2002, Helton and Horne revealed that alternative splicing of the N-terminus of the β_4 subunit yields both β_{4a} and β_{4b} subunits. The structural difference between these two splice variants lies

in domain D1 that contains, respectively, 15 and 49 amino acids. D1 of β_{4a} and β_{4b} could definitively not be considered as homologous (Helton and Horne 2002). β_{4a} is expressed in the spinal cord, in the medulla, the putamen, and the temporal and occipital lobes, whereas β_{4b} is expressed in the frontal lobe (Helton, Kojetin et al. 2002). Both splicing variants are expressed in the cerebellum but with different cellular distribution. β_{4a} is found in Purkinje cell dendrites and in the granule cell layer and β_{4b} is detected in Purkinje cell bodies and throughout the fibers of Bergmann glia traversing the molecular layer. A novel splice variant, a truncated β_{4c} protein of about 23 kDa has recently been identified in human brain (Xu, Lee et al. 2011). The sequence of this splice variant appears homologous to the chicken β_{4c} described in an earlier report (Hibino, Pironkova et al. 2003) and contains the β_{4a} N-terminus, the SH3 domain, the HOOK sequence, a truncated GK domain and an additional small C-terminal sequence of 13 amino acids. Chicken β_{4c} was found to regulate gene expression (Hibino, Pironkova et al. 2003). Interestingly, Western blot analysis of cerebellar/brainstem homogenates revealed the presence of the human β_{4c} in the nuclei purified fraction and immunohistochemistry experiments demonstrated the localization of human β_{4c} in vestibular nuclei (Xu, Lee et al. 2011). The same study illustrated the interaction of β_{4c} with the chromoshadow domain of heterochromatin protein 1 γ (HP1 γ). HP1 γ is involved in gene silencing. The sequence and structure of this protein can be divided into three regions, the chromodomain, a module at the amino terminus responsible for HP1 γ binding to di- and trimethylated lysine 9 of histone H3, the carboxy-terminal chromoshadow domain involved in homo- and/or heterodimerization and interaction with other proteins and a variable linker between the chromodomain and the chromoshadow, containing a nuclear localization sequence. The interaction of human β_{4c} with HP1 γ may influence gene regulation. β_{4c} may indeed attenuate or on the contrary promote gene repression role of HP1 γ on specific genes. This hypothesis is credible, indeed chicken β_{4c} have been shown to regulate transcriptional repression activity of chromobox protein 2/HP1 γ (Hibino, Pironkova et al. 2003). Recently, Subramanyam et al. have reported the nuclear localization of β_{4b} in cerebellar granule and Purkinje cells, that strengthens a postulate role of β_4 in gene regulation (Subramanyam, Obermair et al. 2009). This observation may be related to microarray data set GSE6275 from Gene Expression Omnibus comparing gene expression in WT and *lh* mice cerebellum. The statistical analyses showed 66 genes up-regulated and 48 genes down-regulated in *lh* cerebellum (for details, see Fig. 2). Thus a new role of β_4 in gene regulation may be considered. Finally, an additional study highlighted novel roles of β_4 that should be independent of its VGCC chaperone function. This study used a zebrafish model. For this specie, two β_4 genes have been identified, $\beta_{4.1}$ and $\beta_{4.2}$ (Ebert, McAnelly et al. 2008). $\beta_{4.1}$ and $\beta_{4.2}$ morpholino knockdown have been constructed and showed an abnormal embryogenesis with defects in epiboly. This phenotype is rescued by the injection of human β_{4a} or β_{4b} , proving that human β_4 subunits are functionally efficient in zebrafish and suggesting that the cell biological functions of β_4 found in zebrafish could be relevant to other species. The functions of $\beta_{4.1}$ and $\beta_{4.2}$ in epiboly have been proved to be independent of Ca²⁺ channel activity. Thus, the complex neurobehavioral phenotype observed in *lh* mice may well be attributed to a defective role of β_4 as VGCC chaperone, but could also be linked to a default in gene regulation. It is likely that the *lh* mice will turn out useful for the investigation of these additional functional roles of the β_4 subunit.

Place Figure 2 here.

CONCLUSION

The data from *lh* mice gave us an interesting insight into cellular mechanisms responsible for the appearance of absence epilepsy and, to a lesser extent, of paroxysmal dyskinesia. Up to now, β subunits have been mostly considered exclusively as VGCC chaperons and studies investigating *lh* mice designed in that sense have by a majority explored defects concerning VGCC. Recent studies have suggested other roles played by β subunits. The potential involvement of β subunits and particularly β_4 in gene regulation open new lines of research. It will be interesting to investigate the likely modification of gene regulation in *lh* mice and reconsider if this potential alteration could in part explain the appearance of the severe neurobehavioral defects which *lh* mice suffer from.

REFERENCES

- Aizawa, M., Y. Ito, et al. (1997). "Pharmacological profiles of generalized absence seizures in lethargic, stargazer and [gamma]-hydroxybutyrate-treated model mice." Neuroscience Research **29**(1): 17-25.
- Brice, N., N. Berrow, et al. (1997). "Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody." Eur J Neurosci. **9**(4): 749-59.
- Buraei, Z. and J. Yang (2010). "The beta Subunit of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels." Physiological Reviews **90**(4): 1461-1506.
- Burgess, D. L., G. H. Biddlecome, et al. (1999). "beta Subunit Reshuffling Modifies N- and P/Q-Type Ca²⁺Channel Subunit Compositions in Lethargic Mouse Brain." Molecular and Cellular Neuroscience **13**(4): 293-311.
- Burgess, D. L., J. M. Jones, et al. (1997). "Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (*lh*) mouse." Cell **88**(3): 385-92.
- Caddick, S. J. and D. A. Hosford (1996). "GABAB-activated gK⁺ in thalamic neurons in the lethargic (*lh/lh*) mouse model of generalized absence seizures." Neuroscience Letters **205**(1): 29-32.
- Caddick, S. J., C. Wang, et al. (1999). "Excitatory But Not Inhibitory Synaptic Transmission Is Reduced in Lethargic (*Cacnb4lh*) and Tottering (*Cacna1atg*) Mouse Thalami." J Neurophysiol **81**(5): 2066-2074.
- Castellano, A., X. Wei, et al. (1993). "Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit." Journal of Biological Chemistry **268**(17): 12359-12366.
- Chen, Y.-h., M.-h. Li, et al. (2004). "Structural basis of the [alpha]1-[beta] subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels." Nature **429**(6992): 675-680.
- Danober, L., C. Deransart, et al. (1998). "Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat." Progress in Neurobiology **55**(1): 27-57.
- De Luca, G., R. M. Di Giorgio, et al. (2005). "Amino acid levels in some lethargic mouse brain areas before and after pentylenetetrazole kindling." Pharmacology Biochemistry and Behavior **81**(1): 47-53.
- De Waard, M. and K. P. Campbell (1995). "Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes." The Journal of Physiology **485**(Pt 3): 619-634.
- Devanagondi, R., K. Egami, et al. (2007). "Neuroanatomical substrates for paroxysmal dyskinesia in lethargic mice." Neurobiology of Disease **27**(3): 249-257.
- Dickie, M. (1964). "Lethargic (*lh*)." Mouse News Lett **30**: 31.

- Dung, H. (1975). " Growth retardation, high mortality, and low reproductivity of neurological mutant mice. ." Anat Rec **181**: 347-348.
- Dung, H. C. and R. H. Swigart (1972). "Histo-pathologic observations of the nervous and lymphoid tissues of lethargic mutant mice." Tex Rep Biol Med **30**(1): 23-39.
- Ebert, A. M., C. A. McAnelly, et al. (2008). "Genomic organization, expression, and phylogenetic analysis of Ca²⁺ channel β 4 genes in 13 vertebrate species." Physiol. Genomics **35**(2): 133-144.
- Fletcher, C. F., C. M. Lutz, et al. (1996). "Absence Epilepsy in Tottering Mutant Mice Is Associated with Calcium Channel Defects." Cell **87**(4): 607-617.
- Helton, T. D. and W. A. Horne (2002). "Alternative Splicing of the beta 4 Subunit Has alpha 1 Subunit Subtype-Specific Effects on Ca²⁺ Channel Gating." J. Neurosci. **22**(5): 1573-1582.
- Helton, T. D., D. J. Kojetin, et al. (2002). "Alternative Splicing of a beta 4 Subunit Proline-Rich Motif Regulates Voltage-Dependent Gating and Toxin Block of Cav2.1 Ca²⁺ Channels." J. Neurosci. **22**(21): 9331-9339.
- Hibino, H., R. Pironkova, et al. (2003). "Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta4 subunit." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(1): 307-312.
- Hibino, H., R. Pironkova, et al. (2003). "Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta4 subunit." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(1): 307-312.
- Hosford, D., S. Clark, et al. (1992). "The role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice." Science **257**(5068): 398-401
- Hosford, D., F. Lin, et al. (1999). "Studies of the lethargic (lh/lh) mouse model of absence seizures: regulatory mechanisms and identification of the lh gene." Adv Neurol. **79**: 239-52.
- Hosford, D. A., F. H. Lin, et al. (1995). "Neural network of structures in which GABAB receptors regulate absence seizures in the lethargic (lh/lh) mouse model." The Journal of Neuroscience **15**(11): 7367-7376.
- Hosford, D. A., Y. Wang, et al. (1995). "Characterization of the antiabsence effects of SCH 50911, a GABA-B receptor antagonist, in the lethargic mouse, gamma-hydroxybutyrate, and pentylentetrazole models." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **274**(3): 1399-1403.
- Khan, Z. and H. A. Jinnah (2002). "Paroxysmal Dyskinesias in the Lethargic Mouse Mutant." J. Neurosci. **22**(18): 8193-8200.
- Kohl, M. M., O. Paulsen, et al. (2010). The Roles of GABAB Receptors in Cortical Network Activity. Advances in Pharmacology, Academic Press. **Volume 58**: 205-229.
- Letts, V. A., R. Felix, et al. (1998). "The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel [gamma] subunit." Nat Genet **19**(4): 340-347.
- Lin, F.-h., S. Barun, et al. (1999). "Decreased 45Ca²⁺ uptake in P/Q-type calcium channels in homozygous lethargic (Cacnb4lh) mice is associated with increased beta3 and decreased beta4 calcium channel subunit mRNA expression." Molecular Brain Research **71**(1): 1-10.
- Lin, F.-H., S. Lin, et al. (1999). "Glutamate decarboxylase isoforms in thalamic nuclei in lethargic mouse model of absence seizures." Molecular Brain Research **71**(1): 127-130.
- Lin, F.-h., Y. Wang, et al. (1995). "GABAB Receptor-Mediated Effects in Synaptosomes of Lethargic (lh/lh) Mice." Journal of Neurochemistry **65**(5): 2087-2095.
- Liu, H., M. De Waard, et al. (1996). "Identification of Three Subunits of the High Affinity omega-Conotoxin MVIIC-sensitive Ca²⁺ Channel." Journal of Biological Chemistry **271**(23): 13804-13810.
- Ludwig, A., V. Flockerzi, et al. (1997). "Regional Expression and Cellular Localization of the alpha1 and beta Subunit of High Voltage-Activated Calcium Channels in Rat Brain." The Journal of Neuroscience **17**(4): 1339-1349.

- McEnery, M. W., T. D. Copeland, et al. (1998). "Altered Expression and Assembly of N-type Calcium Channel alpha1B and beta Subunits in Epileptic lethargic(lh/lh) Mouse." Journal of Biological Chemistry **273**(34): 21435-21438.
- Mori, Y., M. Wakamori, et al. (2000). "Reduced Voltage Sensitivity of Activation of P/Q-Type Ca²⁺ Channels is Associated with the Ataxic Mouse Mutation Rolling Nagoya (tg rol)." The Journal of Neuroscience **20**(15): 5654-5662.
- Qian, J. and J. L. Noebels (2000). "Presynaptic Ca²⁺ Influx at a Mouse Central Synapse with Ca²⁺ Channel Subunit Mutations." The Journal of Neuroscience **20**(1): 163-170.
- Shirley, T. L., L. M. Rao, et al. (2008). "Paroxysmal dyskinesias in mice." Movement Disorders **23**(2): 259-264.
- Sidman, R. L., M. C. Green, et al. (1965). Catalog of the Neurological Mutants of the Mouse.
- Slaght, S. n. J., N. Leresche, et al. (2002). "Activity of Thalamic Reticular Neurons during Spontaneous Genetically Determined Spike and Wave Discharges." The Journal of Neuroscience **22**(6): 2323-2334.
- Song, I., D. Kim, et al. (2004). "Role of the alpha1G T-Type Calcium Channel in Spontaneous Absence Seizures in Mutant Mice." J. Neurosci. **24**(22): 5249-5257.
- Steriade, M. and D. Contreras (1995). "Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity." The Journal of Neuroscience **15**(1): 623-642.
- Subramanyam, P., G. Obermair, et al. (2009). "Activity and calcium regulate nuclear targeting of the calcium channel beta4b subunit in nerve and muscle cells." Channels **3**(5).
- Talley, E. M., G. Solórzano, et al. (2000). "Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat." Molecular Brain Research **75**(1): 159-165.
- Tsakiridou, E., L. Bertollini, et al. (1995). "Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy." The Journal of Neuroscience **15**(4): 3110-3117.
- Volsen, S. G., N. C. Day, et al. (1997). "The expression of voltage-dependent calcium channel beta subunits in human cerebellum." Neuroscience **80**(1): 161-174.
- Weiergräber, M., U. Stephani, et al. (2010). "Voltage-gated calcium channels in the etiopathogenesis and treatment of absence epilepsy." Brain Research Reviews **62**(2): 245-271.
- Xu, X., Y. J. Lee, et al. (2011). "The Ca²⁺ Channel beta4c Subunit Interacts with Heterochromatin Protein 1 via a PXVXL Binding Motif." Journal of Biological Chemistry **286**(11): 9677-9687.
- Zhang, Y., M. Mori, et al. (2002). "Mutations in High-Voltage-Activated Calcium Channel Genes Stimulate Low-Voltage-Activated Currents in Mouse Thalamic Relay Neurons." J. Neurosci. **22**(15): 6362-6371.

FIGURES CAPTIONS

Figure 1: Auxiliary subunits making up VGCC and the different β splice variants

A- VGCCs comprise α_1 , a large membrane subunit and up to three auxiliary subunits of type β , γ , and $\alpha_2\delta$.

B- Cristal structure of β_4 from Chen et al. (Chen, Li et al. 2004).

C- Schematic DNA sequence organization of *Cacnb4* with exons (white rectangles), the position of the *lh* mutation is represented by an arrow.

D- β_4 subunits form part of MAGUK protein family and contain notably SH3 and GK domains. Three β_4 splice variants have been identified in human, β_{4a} , β_{4b} , β_{4c} . Hypothetical structure of the truncated β_4 from *lh* mice is also represented. The C-terminal sequence of this putative protein is yet unknown

Figure 2: Differential gene expression in cerebellum of *lh* versus WT mice

Microarray data set GSE6275 from Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

statistically analyzed compare gene expression in WT and *lh* mice cerebellum.

65 genes are up-regulated and 48 genes are down-regulated regulated in *lh* cerebellum compared with WT (over twofold expression change, $p < 0.05$). Among these genes, the potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2 (*Kcne2*), the guanine nucleotide binding protein gamma 4 (*Gng4*), the solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter member 5 (*Slc4a5*), the harakiri (*Hrk*), calmodulin-like 4 (*Calml4*), the transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3 (*Trpm3*), the claudin 2 (*Cldn2*), the homer homolog 2 (*Homer2*) are up-regulated. In contrast the regulating synaptic membrane exocytosis 3 (*Rims3*), the calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (*Camk4*), the RAR-related orphan receptor gamma (*Rorc*), the SH3 domain binding glutamic acid-rich protein (*Sh3bgr5*), the carbonic anhydrase 9 (*Car9*), the leucine zipper doxn-regulated in cancer 1 (*Ldoc*) are down-regulated in *lh* cerebellum compared with WT.

Figure 1

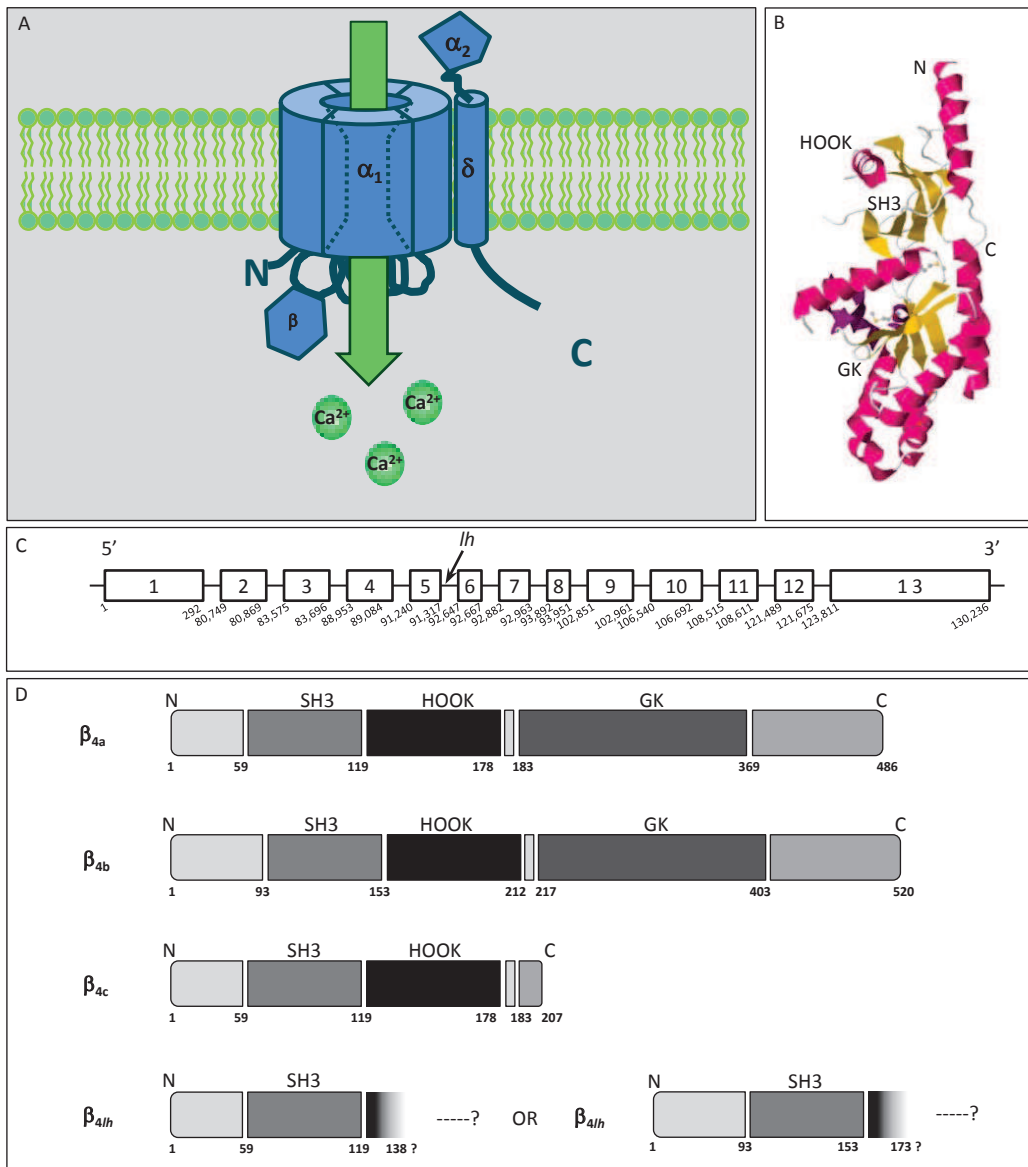
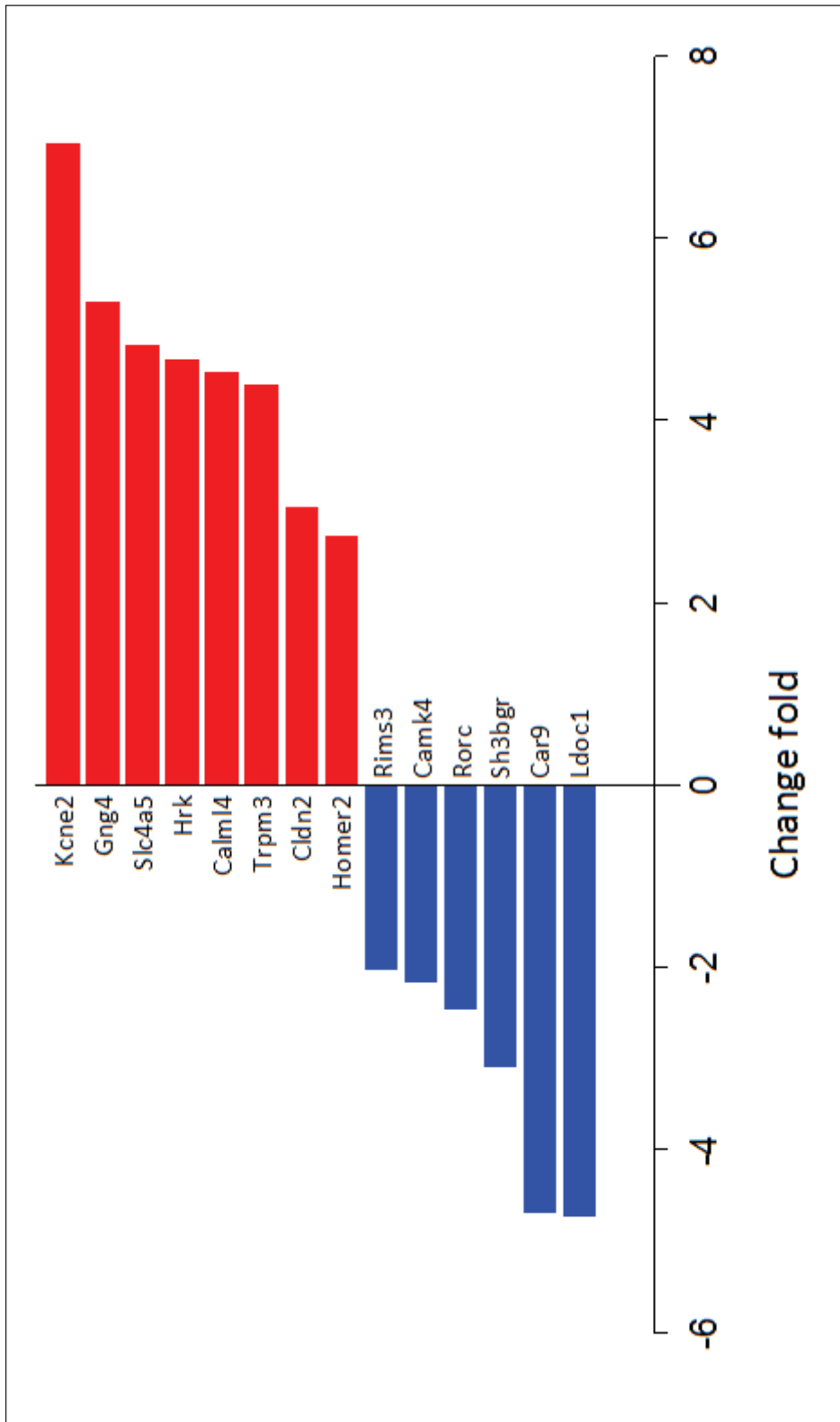


Figure 2



Conclusion

Dans cette revue, nous avons recensé les éléments de la littérature montrant en quoi la souris *lh* peut-être considérée comme un modèle pertinent de l'épilepsie-absences. Nous avons vu par ailleurs que le phénotype *lh* ne se limite pas à cette pathologie et se révèle très complexe. Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la genèse de l'épilepsie-absences restent encore mal compris. Cependant l'implication d'un dérèglement du système GABAergique dans le thalamus à l'origine de cette pathologie semble incontestable. A l'heure actuelle aux vues de différentes études, on peut envisager la souris *lh* comme un KO naturel pour la sous-unité β_4 des CCVD. La souris *lh* constitue donc à ce titre un modèle intéressant pour la compréhension de la fonction de la sous-unité β_4 .

Article 1 :

Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy

Abir Tadmouri*, Shigeki Kiyonaka*, Maud Barbado*, Matthieu Rousset*, Katell Fablet*, Karin Pernet-Gallay, Christophe Arnoult, Takafumi Miki, Karin Sadoul, Sylvie Gory-Faure, Caroline Lambrecht, Florian Lesage, Satoshi Akiyama, Saadi Khochbin, Sylvain Baulande, Veerle Janssens, Annie Andrieux, Ricardo Dolmetsch, Michel Ronjat, Yasuo Mori, Michel De Waard.

*Ces auteurs ont contribué équitablement au travail.

Article en processus de resoumission à *Nature cell biology*

Introduction

Cet article s'inscrit à l'image de quelques récentes publications (Hibino, Pironkova et al. 2003; Gomez-Ospina, Tsuruta et al. 2006; Zhang, Yamada et al. 2010) dans un nouveau concept qui concerne la régulation directe de l'expression génique par des composants des CCVD. Ce travail a débuté par la surprenante découverte de la présence de la sous-unité β_4 des CCVD dans le noyau de neurones d'hippocampe considérée jusqu'alors comme une sous-unité auxiliaire des CCVD localisée dans le cytoplasme. La localisation nucléaire de β_4 a depuis été rapportée dans les cellules granulaires et les cellules de Purkinje de cervelet (Subramanyam, Obermair et al. 2009). Ce constat a fait émerger plusieurs questions auxquelles ce travail s'est efforcé de répondre. Les premières concernent la localisation nucléaire de β_4 tandis que les deuxièmes relèvent du rôle de cette sous-unité des CCVD dans le noyau. Pour mener cette étude, nous avons utilisé comme contrôle, la souris *lh*, souris déficiente pour la sous-unité β_4 .

Dans un premier temps, il est apparu intéressant de comprendre comment β_4 est transloquée dans le noyau des neurones. β_4 fait partie de la famille des protéines MAGUK caractérisées par un domaine SH3 et un domaine GK reliés par une région HOOK. L'interaction intramoléculaire SH3/GK de β_4 est importante pour sa fonction de régulation de l'activité des CCVD. Il était donc intéressant de vérifier si cette interaction est également importante pour sa localisation nucléaire. Afin d'étudier cet aspect, plusieurs variants tronqués de β_4 pour lesquels il manque les domaines SH3 ou GK ainsi que des variants avec une mutation au niveau de ces domaines ont été construits. Par ailleurs des variants tronqués sans la partie N-terminale ou C-terminale ou avec des mutations ont été utilisés. La localisation cellulaire (à savoir cytoplasmique et/ou nucléaire) de ces différents variants a été examinée afin d'étudier l'importance de la structure modulaire de β_4 dans sa translocation nucléaire. Particulièrement, la localisation du mutant β_{1-481} issu du gène CACNB4 portant la mutation humaine R482X, à l'origine d'une forme d'épilepsie juvénile myoclonique et responsable de la délétion du domaine C-terminale de la protéine (Escayg, De Waard et al. 2000) a été étudiée. La sous-unité β_4 n'ayant pas de signal de localisation nucléaire (NLS), assez rapidement, la recherche de partenaires protéiques est apparue essentielle pour comprendre les mécanismes d'entrée de β_4 dans le noyau. Pour cela un criblage par la technique du double hybride a été réalisé avec une banque d'ADN complémentaire de cerveau de souris en prenant β_4 et β_{1-481} comme amorce. Une sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 2A (PP2A), B56 δ , est apparue comme un partenaire intéressant de β_4 qui n'interagit pas avec β_{1-481} . Cette interaction a été vérifiée par CoIP (co-immunoprécipitation). L'effet de B56 δ sur la translocation nucléaire de β_4 a donc été étudié plus en détail. Par ailleurs, il a semblé opportun de suivre la localisation de β_4 au cours de la différenciation neuronale dans une culture de neurones d'hippocampe.

De plus l'importance de l'activité électrique sur la translocation nucléaire de β_4 a été analysée en utilisant des toxines comme la tétrodotoxine (TTX) qui bloque de manière très sélective le pore des canaux sodiques voltage-dépendants et donc l'activité électrique et la bicuculline/4-aminopyridine (4-AP) qui bloquent respectivement les récepteurs GABA_A et les canaux potassiques provoquant ainsi une augmentation de l'activité électrique.

Dans un deuxième temps, le rôle de β_4 dans le noyau a été exploré. Tout d'abord l'influence de β_4 sur l'expression génique par le biais de puces à ADN a été examinée. Ces analyses transcriptomiques réalisées dans le cervelet de souris *lh* par rapport aux souris WT ont donné lieu à une liste de gènes surexprimés et sous-exprimés en l'absence de β_4 . L'effet de β_4 sur l'expression d'un certain nombre de gènes a été confirmé par qRT-PCR (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). La régulation de ces gènes par β_4 pouvait faire appel à différentes modifications : la régulation de facteurs de transcription liés à ces gènes ou des modifications épigénétiques au niveau de ces gènes.

La première possibilité a tout d'abord été envisagée. Pour l'explorer, un gène fortement surexprimé dans le cervelet de souris *lh*, il s'agit du gène codant pour la tyrosine hydroxylase (TH) a été choisi. Pour identifier une possible interaction de β_4 avec le promoteur du gène TH, nous avons eu recours à la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Par ailleurs, la technique du double hybride, avait permis d'identifier un facteur de transcription, TR α interagissant avec β_4 . L'interaction de β_4 avec ce facteur de transcription par co-immunoprécipitation (CoIP) ainsi que la régulation par β_4 de la transcription dépendante de TR α grâce à des tests d'activité luciférase ont été examinés. De plus l'interaction de TR α au niveau de la séquence promotrice de TH a été vérifiée.

Les possibles modifications de la chromatine par β_4 ont ensuite été envisagées. Des expériences de CoIP ont été réalisées afin d'étudier l'interaction de β_4 avec les histones H2B, H3 et H4. Les résultats précédents montrant une interaction de β_4 avec B56 δ (sous-unité régulatrice de la PP2A), il est apparu pertinent de regarder l'activité phosphatase de β_4 interagissant avec B56 δ et plus précisément la déphosphorylation des histones H3 au niveau de Ser¹⁰, modification connue pour réguler l'état de la chromatine. D'autre part, deux études ont mis en évidence l'interaction de β_{4c} (un court variant d'épissage de la sous-unité β_4) avec HP1 γ , une protéine impliquée dans la répression de l'expression génique (Hibino, Pironkova et al. 2003; Xu, Lee et al. 2011). L'interaction de β_4 avec HP1 γ en présence B56 δ a donc été examinée.

Matériel et méthodes

Cultures de lignées cellulaires

Les cellules Tsa 201 sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de Gibco supplémenté avec 5% de sérum de veau foetal et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine). Le milieu est changé tous les deux jours et les cellules sont repiquées à 10% tous les 3 jours.

Les cellules NG108.15 sont maintenues en culture dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal, 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine) et 1/50 d'Hypoxantine-Aminoptérine-Thymidine (HAT) de Eurobio. La différenciation des cellules NG108.15 est induite par déprivation de sérum (1% de sérum) et ajout de 1 mM de db AMPc (Sigma).

Transfections cellulaires

Le protocole de transfection utilisé pour les **cellules Tsa 201** est la transfection au phosphate de calcium.

Pour 1 boîte de 10 cm de diamètre de cellules à 30-40% de confluence :

- Préparer 2 tubes :

- tube A avec 500 μ L de HBS 1X

- HBS 2X :

- 280 mM NaCl

- 50 mM HEPES

- 1,5 mM Na₂HPO₄

Mesurer le pH après filtration qui doit être égal à 7,05

- tube B avec 50 μ L de CaCl₂ à 2,5 M

+ ADN (maximun 20 μ g d'ADN par boîte)

+ H₂O, qsp 500 μ L.

- Ajouter le contenu du tube B goutte à goutte dans le tube A.

- Déposer sur les cellules dans la boîte, goutte à goutte, 1 mL de mélange de transfection.

- Incuber pendant la journée ou sur la nuit et changer le milieu.

Le protocole de transfection utilisé pour les **neurones** est un peu différent.

Les neurones sont transfectés au 6^{ème} jour de culture.

Pour une boîte de 35 mm de diamètre :

- Remplacer le milieu de culture des neurones par 2 mL de milieu de transfection NMEM-B27, penser à garder le milieu de culture.
- Mélanger 3 µg d'ADN avec une solution 250 mM de CaCl₂ pour obtenir un volume total de 60 µL.
- Ajouter goutte à goutte 60 µL de BBS 2X, mélanger doucement en tapotant toutes les 2 à 3 gouttes.
- Mélanger en chassant l'air 5 fois.
- Déposer immédiatement goutte à goutte sur les cellules.
- Incuber les cellules sans CO₂ pendant 1h45 à 37°C.
- Laver les cellules délicatement pendant 5 à 10 min avec du tampon de lavage préchauffé à 37°C.
- Remettre 2,5 mL de milieu de culture sur les cellules (utiliser le « vieux » milieu de culture complé par du neuf et refiltré).

NMEM-B27 pH7,8

Vol pour 200 mL	Solution mère	Cf
20 mL	MEM 10 X	10X
2 mL	Sodium Pyruvate 100 mM	1 mM
3 mL	Hepes 1M	15 mM
2 mL	L-Glutamine 200 mM	2 mM
4 mL	B27 50X	1X
316 mg	D-glucose	10 mM

Tampon de transfection BBS 2X

- 50 mM Bes
- 1,5 mM Na₂HPO₄
- 280 mM NaCl

Tampon de lavage pH7,3

Vol pour 250 mL	Solution mère	Cf
6,75 mL	NaCl 5 M	135 mM
5 mL	Hepes 1 M	20 mM
2 mL	KCl 500 mM	4 mM
45 mg	Na ₂ HPO ₄	1 mM
500 µL	CaCl ₂ 1 M	2 mM
250 µL	MgCl ₂ 1 M	1 mM
0,5 g	D-glucose	10 mM

Le protocole de transfection pour les **cellules NG108.15** nécessite l'agent de transfection jetPEI™ (polyplus transfection). Le protocole de transfection est fourni avec le kit jetPEI™. Je l'ai également utilisé pour la transfection de cellules Tsa 201 utilisées pour l'immunocytochimie.

Immunocytochimie

Ce protocole peut s'appliquer pour l'immunomarquage des cultures primaires d'hippocampe et les cellules transfectées par des vecteurs exprimant la GFP (dans ces cas l'étape de mise en présence de l'anticorps primaire et secondaire est inutile).

- Laver des cellules avec du tampon phosphate D-PBS (Invitrogen).
- Fixer les cellules par immersion dans du méthanol (100%) à -20°C pendant 6 min.
- Laver des cellules avec du D-PBS.
- Marquage du cytoplasme : pour cela incuber les cellules dans de la concanavine conjuguée à la Rhodamine (diluée au 1/100^{ème} dans du PBS) pendant 3 min à température ambiante.
- Laver des cellules avec du D-PBS.
- Perméabilisation de la membrane : incuber les cellules 15 min dans une solution de triton 1% (dilué dans du PBS).
- Laver des cellules 2 fois avec du D-PBS.
- Saturer les sites non spécifiques avec de la BSA 6%.
- Mettre en présence de l'anticorps primaire : pour visualiser la sous-unité β₄ endogène, on incube les cellules pendant 1h avec un anticorps de chèvre dirigé contre les 14 derniers acides aminés du côté

carboxyterminal de la protéine (Goat anti-CACNB4-Everest Biotech) dilué au 1/500^{ème} dans une solution de BSA 6%, triton 0,1% diluée dans du PBS.

- Mettre en présence de l'anticorps secondaire : un anti-chèvre couplé au fluorochrome Alexa-488 (Molecular Probes) dilué au 1/500^{ème} pendant 1h.
- Laver 2 fois avec de l'eau pour éliminer les sels.
- Mettre en présence du ToPro3 (1/100^{ème}) pendant 15 min qui permet un marquage spécifique de l'ADN et donc du noyau.
- Ajouter le milieu de montage (Fluorescent mounting medium, Dako) avant montage de la lamelle.

Imagerie confocale et calcul des ratios noyau/cytoplasme de la sous-unité

β_4

Les images de microscopie confocale sont obtenues avec un microscope Leica DMI 4000B ou Zeiss LSM510. Grâce aux différents marquages (voir immunocytochimie), on obtient donc 3 images pour un même champ correspondant au marquage nucléaire, au marquage cytoplasmique et au marquage de β_4 . Les valeurs du ratio noyau/cytoplasme (NCR) correspondent à une mesure moyenne sur 50 cellules.

Les images sont traitées dans Image J et une macro réalisée par Eric Denarier (équipe 1 du GIN) permet d'obtenir les intensités de fluorescence de β_4 dans le noyau et dans le cytoplasme ainsi que le ratio noyau/cytoplasme de ces intensités.

Préparation d'homogénat protéique

● A partir de cellules Tsa 201 transfectées : protocole pour 3 boites de 10 cm de diamètre de cellules à confluence 90% :

- Lyser les cellules dans 400 μ L de tampon de lyse I.
- Laisser ½ h dans la glace et vortexer de temps en temps.
- Soniquer l'échantillon :

La sonication est effectuée avec un sonicateur à sonde Bioruptor.

Programme :

- intervalle : 1 sec on, 5 sec off
- niveau : 20%
- temps totale : 3 min

Volume : 400 µL d'échantillon dans un falcon de 15 ml disposé dans la glace (pour éviter de chauffer la solution).

- Centrifuger à 3800 rpm pendant 5 min à 4°C et récupérer le surnageant.

Tampon de lyse I

Vol pour 400 µL	Solution mère	Cf
40 µL	Tris pH 7,4 150 mM	15 mM
6 µL	MgCl ₂ 100 mM	1,5 mM
24 µL	KCl 1 M	60 mM
6 µL	NaCl 1 M	15 mM
2 µL	triton 100%	0,5%
qsp 400 µL	H ₂ O mQ	

Ajouter cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) (1X)

● Pour la précipitation des histones H3, la préparation de l'homogénat protéique, voici le tampon de lyse utilisé :

Vol pour 400 µL	Solution mère	Cf
40 µL	Tris pH 7,4 150 mM	15 mM
6 µL	MgCl ₂ 100 mM	1,5 mM
24 µL	KCl 1 M	60 mM
6 µL	NaCl 1 M	15 mM
20 µL	NaF 1M	50 mM
2 µL	triton 100%	0,5% à ajouter après la sonication
qsp 400 µL	H ₂ O mQ	

Ajouter cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) (1X)

● Pour la préparation des homogénats protéiques utilisés pour faire les tests d'activité phosphatase, le tampon de lyse est différent :

- 40 mM Tris-HCl, pH 8,4
- 34 mM MgCl₂
- 4 mM EDTA
- 4 mM DTT
- 0,5% triton

Immunoprécipitation

Immunoprécipitation de protéines taggées myc :

- Incuber 400 μ L d'extraits protéiques avec 3 μ g d'anticorps anti-myc biotinylé (Santa Cruz biotechnology Inc) pendant 3 h sous agitation à 4°C.
- Ajouter 40 μ L de billes magnétiques couplées à la streptavidine pendant 45 min sous agitation à 4°C.
- Laver les billes 2 fois au PBS-tween 0,1% puis 2 fois au PBS pour éliminer les liaisons spécifiques.
- Eluer les billes dans une solution dénaturante (2% SDS, 1,2 M Tris-HCl pH 6,8, 40% glycérol, 20% β mercapto-éthanol et bleu de bromophénol).

Pour l'immunoprécipitation de β_4 endogène, on incube 400 μ L d'extrait protéique avec 15 μ L d'anticorps anti- β_4 (Everest Biotech) et 40 μ L de billes magnétiques couplées aux protéines G.

Les immunoprécipitats sur analysés par Western blot.

Test d'activité phosphatase

L'activité PP2A des immunoprécipitats a été mesurée en utilisant la protéine Sensolyte™ ρ NPP (Anaspec) :

- Pour 25 μ L de billes resuspendues dans de tampon (voir dernier point sur la préparation d'homogénat protéique), on ajoute 25 μ L de ρ NPP à 200 mM.
- Incuber 1h à 37°C.
- Mesurer la DO à 405 nm.

Test d'activité luciférase

Les cellules Tsa 201 sont préalablement transfectées, mises en culture dans une plaque 96 puits à fond blanc et traitées ou non avec l'hormone T3 à 100 nM pendant 24h. Pour chaque condition, l'expérience est réalisée par triplicat, à trois reprises différentes.

- Ajouter 50 μ L de réactif Dual-Glo™ luciférase (Promega) au 50 μ L de milieu.

Résultats

- Mesurer la luminescence au bout de 15 min (correspond à l'activité luciférase firefly du vecteur luciférase firefly sous contrôle du promoteur TH) : luminescence du rapporteur.
- Ajouter ensuite 50 μ L de réactif Dual-Glo™ Stop & Glo® (Promega).
- Mesurer la luminescence au bout de 15 min (correspond à l'activité luciférase *Renilla* du vecteur contrôle luciférase *Renilla* sous contrôle d'un promoteur faible) : luminescence contrôle.
- Calculer le rapport : luminescence du rapporteur/ luminescence contrôle.

Protocole d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Inspiré du protocole d'A. Fournier

• J0 Préparation des tissus

- Disséquer les cerveaux de souris adultes et les partager en hémicerveaux.
- Les congeler aussitôt dans l'azote.
- Les stocker à -80°C.

• J1 Fixation, lyse du tissu et immunoprécipitation

Pour 1 hémicerveau, soit environ 175 mg de tissu

Fixation (Cross-link) du tissu au paraformaldéhyde (PFA) :

- Broyer le tissu dans un mortier (préalablement refroidi à -80°C), obtenir une poudre et la transférer dans un falcon de 15 mL.
- Ajouter 10 mL de solution 1% PFA (625µL de PFA à 16% dilué dans 10mL de milieu PBS 1X) et mélanger par retournement.
- Incuber 10 min à température ambiante sous agitation légère.

Arrêt de la fixation :

- Ajouter à la solution de PFA, 500 µL Glycine à 2,5 M (9,4 g de Glycine dans 50 mL H₂O mQ)
- Bien mélanger le tube.
- Incuber 5min à température ambiante sous agitation légère.
- Centrifuger 5 min à 260 g à température ambiante.

Lavages :

- Laver l'échantillon dans 10mL de PBS 1X froid
- Centrifuger 5min à 300 g à 4°C et éliminer le surnageant.
- Ajouter 5 mL de WASH I (avec des inhibiteurs de protéases 1X).
- Incuber 10 min dans la glace.
- Centrifuger 5min à 300 g à 4°C et éliminer le surnageant.
- Ajouter 5mL de WASH II (avec des inhibiteurs de protéases 1X).
- Incuber 10min dans la glace.

- Centrifuger 5min à 300 g à 4°C et éliminer le surnageant.

Lyse des cellules :

- Resuspendre le culot dans 1 mL de tampon de lyse (avec des inhibiteurs de protéases 1X) et transférer dans un tube de 1,5mL.
- Incuber 2h à 4°C.

Sonication :

La sonication est effectuée avec un sonicateur à sonde Bioruptor.

Programme :

- intervalle : 3 sec on, 8 sec off
- niveau : 20%
- temps totale : 1 min 30 sec

Volume : 1 mL d'échantillon dans un falcon de 15 ml disposé dans la glace (pour éviter de chauffer la solution)

- Transférer dans un tube Eppendorf 1,5mL safe-lock
- Centrifuger 5 min à 20000 g à 4°C et récupérer le surnageant.
- Centrifuger à nouveau le surnageant 5 min à 20000g à 4°C et récupérer le surnageant.
- Conserver l'échantillon à 4°C.

Dosage de l'échantillon :

- Prendre 4 µL d'échantillon dans 240 µL de H₂O
- Lire l'absorbance à 260 nm et à 280 nm,
- Calculer la **concentration en ADN** dans l'échantillon (sachant que 1 d'absorbance mesuré à 260 nm équivaut à une concentration de 50 µg d'ADN/mL)
- Calculer la **concentration en protéines** de l'échantillon grâce à la formule suivante :
[protéines] en mg/mL = $(1,55 \times A_{280nm}) - (0,76 \times A_{260nm})$

Vérification de la taille des fragments de chromatine par migration sur gel :

- Déposer l'équivalent de 1 µg d'ADN sur gel d'agarose 1%
- Faire migrer pendant 30 min à 100 V.

Les fragments de chromatine doivent se trouver entre 500 et 1000 pb.

Préparation des billes :

Pour le préclear :

Prévoir 50 µL billes de protéines G-dynabeads /hémicerveau.

- Laver préalablement les billes deux fois avec du PBS 1X et une fois avec le tampon de lyse.
- Resuspendre les billes avec 1 mL de solution de tampon de lyse avec BSA 5% et de l'ADN de sperme de saumon à 0,5 mg/mL.
- Saturer les billes dans cette solution pendant 1h30 à 4°C sur roue.
- Laver les billes trois fois avec du tampon de lyse.
- Resuspendre dans 100 µL lysis buffer.

Pour l'immunoprécipitation :

Prévoir 50 µL billes de protéines G-dynabeads /condition

- Laver préalablement les billes deux fois avec du PBS 1X et une fois avec le tampon de lyse.
- Resuspendre les billes avec 1 mL de solution de tampon de lyse avec BSA 5% et de l'ADN de sperme de saumon à 0,5 mg/mL.
- Saturer les billes dans cette solution pendant 1h30 à 4°C sur roue.
- Laver les billes une fois avec du tampon de lyse puis deux fois avec du tampon de dilution.
- Resuspendre dans 50 µL de tampon de dilution (avec des inhibiteurs de protéases 1X).

Pre-clear :

- Ajouter à l'échantillon 50 µL de billes de protéines G-dynabeads préalablement lavées et saturées.
- Incuber 30 min à 4°C sur roue.
- Eliminer les billes et récupérer l'échantillon

Nouveau dosage :

- Refaire un dosage comme précédemment décrit.
 - Ajuster la concentration de l'échantillon pour obtenir 100 µL d'échantillon avec une concentration en protéines de 15 mg/mL.
- Conserver 100 µL d'échantillon qui ne sera pas utilisé pour l'immunoprécipitation et correspondra à l'input.

Immunoprécipitation (1) :

- Ajouter au 100 µL d'échantillon, 350 µL de tampon de dilution (avec des inhibiteurs de protéases 1X).
- Ajouter 10 µg d'anticorps par condition, volume total = 500µL.
- Incuber sur la nuit à 4°C sur roue.

• **J2 Lavages, élution et reverse crosslink**

Immunoprécipitation (2) :

- Ajouter 50 µL de billes préalablement saturées et reprises dans du tampon de dilution (avec des inhibiteurs de protéases 1X).
- Incuber 1h à 4°C sur roue.
- Récupérer les billes avec le support aimanté (et récupérer le surnageant = non lié).
- Conserver les billes.

Lavages :

- Ajouter 1mL/immunoprécipitation.
- Incuber 10 min à 4°C sur roue.

1 x RIPA

1 x HI Salt

1 x LiCl

2 x TE

Transvaser après dernier lavage dans un tube DNA-low bind.

Analyses des protéines :

-Vérifier que la protéine d'intérêt a bien été immunoprécipitée par western blot.

Tubes IP : ajouter 20 µL de tampon de charge dénaturant à 1X (dilué dans du PBS).

- Vérifier dans l'échantillon de départ que la protéine a bien été extraite à partir du tissu de départ par western blot.

Tube Input : prévoir environ 1 à 2 µg de protéine à déposer sur gel (en fonction du dosage).

Analyse de l'ADN :

Tubes IP : **élution**

- Ajouter 200 µL de tampon d'élution.
- Incuber 15 min à température ambiante (TA) sur roue.
- Centrifuger 5 min 1500 g TA.
- Récupérer le surnageant (dans des tubes Eppendorf safe-lock 1,5mL).
- Recommencer et combiner les 2 éluats.

Tube Input :

Compléter le volume restant après IP à 400 µL avec l'Elution Buffer.

Reverse crosslink :

- Ajouter 20 µL de NaCl 4 M / tube de 400 µL (200 mM final), agiter pour éliminer le précipitat.
- Incuber O/N à 65°C.

Attention : ne pas oublier l'input

• **J3 Traitements RNase-pK, extraction et précipitation de l'ADN**

Digestion à la protéinase K / RNase :

- Ajouter 8 µL EDTA 0,5M (10 mM final)
et 16 µL Tris 1M pH6,5 (40 mM final).
- Après, ajouter 0,8 µL RNase à 10 mg/mL (20 µg/mL final).
- Incuber 30 min à 37°C.
- Ajouter 40 µL Protéinase K à 10 mg/mL (1 mg/mL final).
- Incuber 2h à 37°C.
- Incuber 45min à 85°C (pour arrêter la protéinase K).

Extraction Phénol/Chloroforme :

- Ajouter 1 volume (450-500µL) de phénol/chloroforme (pH8).
- Vortexer chaque tube 45 sec.
- Centrifuger 5min à 15000 g à TA.
- Récupérer la phase supérieure (= phase aqueuse, environ 450 µL, ne pas prendre l'interphase blanche) dans des tubes Eppendorf DNase free de 1,5 mL.
- Refaire à nouveau un lavage phénol/chloroforme.
- Ajouter 1 volume (450µL) de chloroforme-isoamyl (permet d'éliminer le phénol).
- Vortexer chaque tube 15 sec.
- Centrifuger 5min à 15000 g à TA.
- Récupérer la phase supérieure (~400-450µL) dans des tubes Eppendorf safe-lock 1,5 mL.

Précipitation :

- Ajouter :
1/10ème de volume de NaAc 2,5 M pH 5,2 (40µL)
2 µL de Glycogen à 20mg/mL

2 volumes de EtOH 100% froid (-20°C) (800µL).

- Bien mélanger.
- Laisser précipiter à -20°C sur la nuit.

• **J4 Lavage et resuspension dans du tampon Tris/EDTA (TE)**

- Centrifuger 25 min à 20000 g à 4°C.
- Vider le surnageant (attention au culot).
- Laver le culot avec 500µL EtOH 70% froid.
- Centrifuger 10 min à 20000 g à 4°C.
- Vider le surnageant (attention au culot).
- Laisser sécher les culots (qui deviennent transparents)
- Resuspendre les culots dans du TE dilué au ½ (volume à déterminer en fonction du culot : 10 à 16 µL pour les IP ; 20 à 30 µL pour les Input).

• **J5 Dosage et dilution des ADN pour q-PCR**

- Dosage des échantillons au nanodrop (dépôt de 1 µL).
- Dilution : diluer les échantillons à 12,5 ng d'ADN/µL dans de l'H₂O (utilisation de 25 ng par point pour la Q-PCR)

q-PCR :

- Volume total : 10 µl/point de PCR
 - Déposer 25 ng d'ADN/point de PCR, c'est-à-dire 2 µL d'échantillon (après dilution)
 - Déposer 8 µl de solution « mix »/point de PCR
 - 5 µl master mix 2X (référence : LightCycler 480 SYBr Green Master (5x1ml) 04707515001).
 - 0,5 µl mix amorces 10 µM de chaque (up and down).
 - 2,5 µl H₂O.

Ne pas oublier de faire un blanc (échantillon=H₂O) pour chaque couple d'amorces).

- Remplir la plaque. Attention aux contaminations.
- Sceller la plaque avec un film adhésif.
- Centrifuger la plaque (environ 2000 g quelques secondes) pour descendre et mixer les échantillons/mix.

Solutions utilisées

WASH I

Vol pour 400 mL	Solution mère	Cf
10 mL	Triton X-100 10%	0,25%
8 mL	EDTA 0,5 M	10 mM
400 µL	EGTA 0,5 M	0,5 mM
4 mL	HEPES 1 M	10 mM
qsp 400 mL	H ₂ Omq	

Conserver à TA ou à 4°C

Extemporément + inhibiteurs de protéases (10X)

WASH II

Vol pour 400 mL	Solution mère	Cf
20 mL	NaCl 4 M	200 mM
800 µL	EDTA 0,5 M	1 mM
400 µL	EGTA 0,5 M	0,5 mM
4mL	HEPES 1 M	10 mM
qsp 400 mL	H ₂ Omq	

Conserver à TA ou 4°C

Extemporément + inhibiteurs de protéases (10X)

Tampon de lyse

Vol pour 10 mL	Solution mère	Cf
500 µL	20% SDS	1%
200 µL	EDTA 0,5 M	10 mM
500 µL	Tris pH 7,5 1 M	50 mM
qsp 10 mL	H ₂ Omq	

A faire extemporément à TA

Extemporément + inhibiteurs de protéases (10X)

Tampon de dilution

Vol pour 50 mL Solution mère		Cf
10 µL	10% SDS	0,01%
5,5 mL	10% Triton	1,1%
120 µL	0,5 M EDTA	1,2 mM
836 µL	1 M Tris pH8	16,7 mM
2087,5µL	4 M NaCl	167 mM
qsp 50 mL	H ₂ Omq	

Conserver à 4°C

Extemporément + inh protéase (10X)

RIPA

Vol pour 40 mL Solution mère		Cf
1,5 mL	NaCl 4 M	150 mM
2 mL	Tris pH8 1 M	50 mM
200 µL	20% SDS	0,1%
2 mL	NaDoc 10%	0,5%
4 mL	NP40 10%	1%
Qsp 40 mL	H ₂ Omq	

Conserver à 4°C**HI Salt**

Vol pour 40 mL Solution mère		Cf
5 mL	NaCl 4 M	500 mM
2 mL	Tris pH8 1 M	50 mM
200 µL	20% SDS	0,1%
4 mL	NP40 10%	1%
Qsp 40 mL	H ₂ Omq	

Conserver à 4°C

LiCl

Vol pour 40 mL Solution mère		Cf
10 mL	LiCl 1 M	250 mM
2 mL	Tris pH8 1 M	50 mM
2 mL	NaDoc 10%	0,5%
4 mL	NP40 10%	1%
Qsp 40 mL	H ₂ Omq	

Conserver à 4°C**TE**

Vol pour 400 mL	Solution mère	Cf
4 mL	Tris pH8 1 M	10 mM
800 µL	EDTA 0,5 M	1 mM
Qsp 400 mL	H ₂ Omq	

Conserver à 4°C**Tampon d'éluion**

Vol pour 5 mL	Solution mère	Cf
500 µL	SDS 20%	2%
500 µL	1 M NaHCO ₃	100 mM (1 M : 1,68 g/20 mL H ₂ Omq)
50 µL	DTT 1 M	10 mM
qsp 5 mL	H ₂ Omq	

A faire extemporanément à TA

Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy

Abir Tadmouri^{1,2*}, Shigeki Kiyonaka^{3*}, Maud Barbado^{1,2*}, Matthieu Rousset^{4,5*}, Katell Fablet^{1,2*}, Karin Pernet-Gallay^{1,2}, Christophe Arnoult^{1,2}, Takafumi Miki³, Karin Sadoul^{2,6}, Sylvie Gory-Faure^{1,2,7}, Caroline Lambrecht⁸, Florian Lesage⁹, Satoshi Akiyama³, Saadi Khochbin^{2,6}, Sylvain Baulande¹⁰, Veerle Janssens⁸, Annie Andrieux^{1,2,7}, Ricardo Dolmetsch⁴, Michel Ronjat^{1,2,⊕}, Yasuo Mori³ and Michel De Waard^{1,2,⊕}

¹Unité Inserm U836, Grenoble Institute of Neuroscience, Site Santé, 38700 La Tronche, France.

²Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

³Laboratory of Molecular Biology, Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 615-8510, Japan.

⁴Department of Neurobiology, Stanford University School of Medicine, 299 Campus Drive, Stanford, CA 94305, USA.

⁵CRBM, CNRS UMR5237, 34293 Montpellier, France.

⁶Inserm U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France.

⁷Commissariat à l'Énergie Atomique, Grenoble, France.

⁸Laboratory of protein phosphorylation and proteomics, University of Leuven, PO-box 901, B-3000, Leuven, Belgium.

⁹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Sophia Antipolis, F-06560 Valbonne, France.

¹⁰PartnerChip, Bat. G2, 2, rue Gaston Crémieux, 91000 Evry, France.

***These authors contributed equally to this work.**

⊕ Contacts: Dr. Michel De Waard - Tel.: (33) 4 56 52 05 63 – Fax: (33) 4 56 52 05 72 –

E-mail: michel.dewaard@ujf-grenoble.fr

& Dr. Michel Ronjat – Tel. : (33) 4 56 52 05 64 – E-mail : michel.ronjat@ujf-grenoble.fr

Summary

Calcium current through voltage-gated calcium channels (VGCC) controls gene expression. Here, we describe a novel signaling pathway in which the VGCC Cacnb4 subunit directly couples neuronal excitability to transcription. Electrical activity induces Cacnb4 association to B56 δ , a regulatory subunit of PP2A phosphatase, followed by i) nuclear translocation of Cacnb4/B56 δ /PP2A, ii) association with the tyrosine hydroxylase (TH) gene promoter through the nuclear transcription factor thyroid hormone receptor alpha (TR α), and iii) histone binding through association of Cacnb4 with HP1 γ concomitantly with Ser¹⁰ histone H3 dephosphorylation by PP2A. This signaling cascade leads to TH gene repression by Cacnb4 and is controlled by the state of interaction between the SH3 and guanylate kinase (GK) modules of Cacnb4. The human R482X CACNB4 mutation, responsible for a form of juvenile myoclonic epilepsy, prevents association with B56 δ and nuclear targeting of the complex by altering Cacnb4 conformation. These findings demonstrate that an intact VGCC subunit acts as a repressor recruiting platform to control neuronal gene expression.

Voltage-gated calcium channels (VGCC) are heteromultimeric complexes that translate electric signals into calcium influx¹, thereby controlling synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability and gene expression²⁻⁴. In VGCC, the pore-forming subunit is associated to auxiliary subunits, among which the cytoplasmic Cacnb4 (β_4) plays an essential function in channel expression level at the plasma membrane and biophysical properties⁵. Mutations in the genes encoding VGCC induce diverse neuronal pathologies, such as epilepsy, ataxia, autism, and migraine⁶. In humans, a mutation of *CACNB4*, leading to a 38 amino acid truncation of β_4 C-terminus, has been associated to juvenile myoclonic epilepsy⁷. In mice, a four-nucleotide insertion into a splice donor site of *Cacnb4* results in a truncation of 60% of the protein sequence and a *lethargic* (*lh*) phenotype⁸. How these mutations may affect VGCC-mediated function still remains an open question. Calcium entering through VGCC has been implicated in gene regulation by activating calcium-binding proteins that propagate the signal to the nucleus⁹⁻¹² or by diffusing to the nucleus with or without signal amplification by intracellular stores¹³⁻¹⁵. Evidences for alternative pathways have been reported. First, an atypical short β_4 splice variant, β_{4c} , was shown to interact with heterochromatin protein 1 gamma (HP1 γ), a nuclear protein involved in gene silencing and transcription regulation^{16, 17}. However, β_{4c} lacks the domain required for association with the pore subunit¹⁸ and therefore cannot couple neuronal activity to gene regulation. A second pathway implicates CCAT, a C-terminal fragment of Cacna1c VGCC, as a calcium-regulated transcription factor¹⁹. In this case, calcium influx triggers CCAT nuclear export providing a calcium-dependent

link between neuronal activity and transcription. The origin of this fragment (channel proteolysis or alternative splicing) remains unknown.

Here, we show that β_4 directly couples neuronal excitability to gene expression along a signaling pathway that is disrupted by the human R482X mutation. We found that electrical activity promotes the formation of a new nuclear complex in which β_4 plays the role of an organizing platform that brings together a transcription factor for DNA binding, a phosphatase for histone dephosphorylation and HP1 γ for nucleosome association. Formation of this complex controls gene activity as witnessed by the case of tyrosine hydroxylase (TH) gene.

RESULTS

β_4 nuclear localization

β_4 is highly expressed in the hippocampal CA1 region of adult wild-type (wt) C57Bl/6 mice brain but not in *lh* mice brain (Fig. 1a). β_4 labeling is strongest in soma and coincides with NeuN nuclear labeling, suggesting that a fraction of β_4 protein may be localized in cell nuclei, in agreement with previous observations²⁰. Western blot analyses of wt brain lysates show a unique 58 kDa band, corresponding to β_4 , absent in *lh* (Fig. 1b). Western blot analyses of cytoplasmic *versus* nuclear fractions of wt brain lysates show the presence of β_4 in the nucleus (Fig. 1c). Electron microscopy (EM) demonstrates the presence of β_4 in the nucleus of CA1 hippocampal neurons (Fig. 1d & Fig. S1). In primary cultures of hippocampal neurons, β_4 is undetectable at 3 days *in vitro* (DIV) (data not shown), while it is predominantly expressed within the cytoplasm/plasma membrane at 5 DIV (Fig. 1e, left panels). In contrast, the protein is densely located in the nucleus at 18 DIV (Fig. 1e, right panels). The nuclear to cytoplasmic density ratios (NCR values) of β_4 increases as a function of time from 0.07 (3 DIV) to 3.81 (18 DIV) on average indicating the differentiation-dependent progressive targeting of β_4 to neuronal nuclei (Fig. 1f). NCR value increase is accompanied by a histogram broadening witnessing higher β_4 subcellular distribution variability among neurons. β_4 nuclear appearance coincides with that of VGCC currents and electrical activity at 5 DIV (not shown). EM analysis of hippocampal neurons at 5 and 18 DIV also illustrate the increase of β_4 nuclear density at 18 DIV (Fig. 1g). Synchronized neuronal differentiation of NG108-15 cells, induced by serum deprivation and 1 mM cAMP²¹, is accompanied by VGCC expression. In undifferentiated NG108.15 cells, β_4 is exclusively cytoplasmic, while present in nuclei after 13 days of differentiation (Fig. 1h). Mean NCR values illustrate that nuclear β_4 expression is triggered by neuronal differentiation (Fig. 1i).

β_4 epilepsy mutation alters nuclear targeting

To search for a β_4 nuclear targeting domain, truncated β_4 -EGFP constructs were expressed in CHO cells (Fig. 2a). In CHO and HEK293 cells, β_4 -EGFP spontaneously locates in the nucleus (NCR = 10.1 ± 3.3 for CHO cells). In contrast, truncated constructs are deficient in nuclear targeting suggesting that β_4 has no nuclear localization sequence (NLS) (Fig. 2b,c). Indeed, five constructs display a distribution similar to EGFP alone (NCR ~ 1). Two constructs, that contain β_4 guanylate kinase (GK) domain, show preferential cytoplasm distribution (NCR = 0.27 ± 0.2 and 0.26 ± 0.2 for $\beta_{216-402}$ -EGFP and $\beta_{216-519}$ -EGFP, respectively). β_4 -EGFP truncation therefore results in 10 to 40-fold decrease of nuclear targeting efficiency. These data were confirmed by Western blot analyses of nuclear and cytoplasmic fractions of transfected HEK293 cells (not shown).

We engineered a β_{1-481} -EGFP mutant (Fig. 2a) corresponding to the human juvenile myoclonic epilepsy mutation⁷ and assessed its cellular distribution in CHO cells (Fig. 2b,c). Nuclear accumulation of β_{1-481} -EGFP mutant is strongly reduced (NCR = 0.98 ± 0.62 ; 10.3-fold lower than β_4 -EGFP NCR). This mutation induces a loss in nuclear targeting as shown by Western blot analyses of nuclear and cytoplasmic fractions of CHO cells (Fig. 2d). Finally, β_{1-481} -EGFP mutant is completely excluded from hippocampal neuron nuclei at 7 DIV (NCR = 0.32 ± 0.18 ; Fig. 2e,f). This corresponds to a 9.5-fold decrease in NCR value compared to β_4 -EGFP (3.15 ± 1.76), a reduction similar to that measured in CHO cells. Double imaging of immunolabeled endogenous β_4 and β_{1-481} -EGFP indicates the extent of nuclear exclusion of the mutant (Fig. 2g). In conclusion, β_4 lacks a NLS but its structural integrity is required for nuclear targeting. The human epilepsy mutation alters this structural integrity and hinders nuclear targeting.

The SH3/GK interaction controls β_4 nuclear targeting

Interaction between β SH3 and GK domains regulates channel activity^{22, 23}. Its role was therefore investigated on β_4 nuclear targeting. Three constructs were designed: β_{1-166} -EGFP, $\beta_{200-519}$ -myc, and $\beta_{200-481}$ -myc (with the juvenile epilepsy deletion) (Fig. 3a). In agreement with Fig. 2c, none of these constructs show a specific nuclear targeting in CHO cells (Fig. 3b). Expressed together, β_{1-166} -EGFP and $\beta_{200-519}$ -myc reconstitute a nuclear-targeting-competent complex (Fig. 3c; NCR = 6.9 ± 1.6 for β_{1-166} -EGFP, and 7.1 ± 1.1 for $\beta_{200-519}$ -myc). In contrast, expression of β_{1-166} -EGFP with $\beta_{200-481}$ -myc fails to form a nuclear complex (Fig. 3c, right panels). Co-immunoprecipitation experiments show that $\beta_{200-481}$ -myc no longer interacts with β_{1-166} -EGFP contrary to $\beta_{200-519}$ -myc

(Fig. 3d). These data suggest that the human mutation prevents β_4 nuclear targeting by disrupting the SH3/GK interaction. This issue was further addressed by investigating the effect of two mutations (SH3 L125P or GK P225R) known to disrupt the SH3/GK interaction^{23, 24} (Fig. 3e). As shown, $\beta_{1-166-L125P}$ -EGFP no longer interacts with $\beta_{200-519}$ -myc (Fig. 3f). Also, both β_{L125P} -EGFP and β_{P225R} -EGFP are completely excluded from hippocampal neuron nuclei (Fig. 3g). NCR values, 0.43 ± 0.15 (L125P) and 0.43 ± 0.11 (P225R), correspond to a 7.3-fold decrease in mutant β_4 nuclear localization (Fig. 3h). These results demonstrate that intact SH3/GK interaction is required for β_4 nuclear targeting and reveal a previously unrecognized structural role of the last C-terminal 38 amino acid sequence in modulating the SH3/GK interaction.

The phosphatase 2A B56 δ subunit triggers β_4 nuclear localization

Absence of an NLS within β_4 suggests that its nuclear targeting requires a protein partner, whereas defective β_{1-481} , β_{L125P} and β_{P225R} nuclear localization indicates that interaction with this partner depends on SH3/GK interaction state. Yeast two-hybrid screenings were performed with a mouse brain complementary DNA library using β_4 as bait. The 62 positive clones were subjected to two-hybrid β -galactosidase assays using β_4 and β_{1-481} as baits. B56 δ , a 594 amino acid protein containing a poorly-defined NLS at its C-terminus, was revealed to interact with β_4 but not with β_{1-481} (Fig. 4a). B56 δ is one of the two regulatory subunits of phosphatase 2A (PP2A), along with B56 γ , known to target PP2A to the nucleus²⁵. Co-immunoprecipitation confirms that β_4 -EGFP, but not β_{1-481} -EGFP, interacts with B56 δ -myc expressed in HEK293 cells (Fig. 4b). As expected, Cacna1e and RIM1²⁶ were also identified as β_4 partners (not shown). In contrast to B56 δ , both proteins interact equally well with β_4 and β_{1-481} . These yeast two-hybrid assays also reveal that Cacnb3 (β_3), another β isoform, also interacts with B56 δ (Fig. 4c). β_{4c} , a short β_4 splice variant, known to interact with the HP1 γ chromo shadow domain¹⁶, does not interact with B56 δ . Conversely, β_4 does not interact with HP1 γ in these conditions (Fig. 4c). Truncated β_4 constructs were analyzed for B56 δ interaction by yeast two-hybrid assays (Fig. 4d). β_{49-519} is the only truncated construct interacting with B56 δ indicating that the N-terminus is not essential for this interaction. As observed earlier, B56 δ does not interact with β_{1-481} , but also not with β_{L125P} suggesting that binding to β_4 requires an intact SH3/GK interaction (Fig. 4d). Endogenous B56 δ is expressed in HEK293 cells in agreement with spontaneous nuclear targeting of β_4 (Fig. S2a). Exogenous B56 δ -myc co-localizes with nuclear β_4 -EGFP and further increases β_4 -EGFP nuclear targeting in CHO cells (Fig. 4e). In agreement with binding data, B56 δ -myc expression has no

effect on β_{1-481} -EGFP distribution in CHO cells (Fig. 4f). Expression of B56 δ -myc in non-differentiated NG108-15 cells produces a marked nuclear re-localization of endogenous β_4 (Fig. 4g; 11.8-fold increase in NCR). The influence of B56 δ on endogenous β_4 nuclear localization was further investigated using B56 $\delta^{-/-}$ mice²⁷. Hippocampal neurons from B56 $\delta^{-/-}$ mice show a significant 1.65-fold decrease in NCR value at 11 DIV (Fig. 4h). Similarly, the density of immunogold-labeled endogenous β_4 is significantly decreased by 1.61-fold in B56 $\delta^{-/-}$ adult hippocampal neurons compared to wt hippocampal neurons (Fig. 4i). In conclusion, B56 δ is a SH3/GK conformation-sensitive β_4 partner that promotes nuclear distribution of β_4 . β_{1-481} deficient nuclear targeting originates from its inability to interact with B56 δ . Finally, results with the B56 $\delta^{-/-}$ mice suggest that B56 δ is not the unique contributor of β_4 accumulation in neuronal nuclei.

β_4 forms a complex with B56 δ and active PP2A

Immunoprecipitation of endogenous β_4 from wt mice brain results in coprecipitation of B56 δ and PP2A (Fig. 5a). As expected, neither B56 δ nor PP2A are immunoprecipitated from *lh* mice brain by β_4 antibodies. Similarly, PP2A is not precipitated by β_4 antibodies using B56 $\delta^{-/-}$ mice brain indicating that PP2A/ β_4 association requires B56 δ . In HEK293 cells, endogenous PP2A is found in complex with β_4 -myc only when B56 δ -EGFP is coexpressed (Fig. 5b). As expected, β_{1-481} -myc mutant does not precipitate endogenous PP2A in the presence of B56 δ -EGFP (Fig. 5b). β_4 -myc/B56 δ -EGFP complex immunoprecipitated from HEK293 cells shows PP2A phosphatase activity (Fig. 5c).

Membrane depolarization triggers β_4 association to B56 δ

β_4 -EGFP, expressed together with Cacna1a and Cacna2d2, pore-forming and auxiliary subunits of VGCC, loses its nuclear distribution in HEK293 cells (Fig. 5d, NCR = 0.25 ± 0.1 , i.e. 40-fold reduction). As expected, β_{1-481} -EGFP mutant distribution remains cytoplasmic in the presence of VGCC (Fig. 5d, right panel). In the presence of Cacna1a and Cacna2d2, B56 δ -myc no longer interacts with β_4 -EGFP (Fig. 5e). These data indicate that (i) B56 δ does not form a higher order molecular complex with the channel and (ii) β_4 association to Cacna1a overrides its interaction with B56 δ . In addition, B56 δ -EGFP does not affect VGCC kinetics and current densities in HEK293 cells (Fig. S3a,b). Also, Ca²⁺ currents were not modified in hippocampal neurons from B56 $\delta^{-/-}$ mice (Fig. S3c,d), confirming that B56 δ does not associate to the channel complex.

Previous reports evidenced that β /channel interaction is reversible²⁸⁻³⁰, but the impact of membrane depolarization on this interaction has not been studied. Membrane depolarization of HEK293 cells enhances β_4 -myc interaction with B56 δ -EGFP, while it does not promote any interaction between β_{1-481} -myc and B56 δ -EGFP (Fig. 5f). In the presence of VGCC, the depolarization-induced B56 δ -myc/ β_4 -EGFP interaction requires external Ca^{2+} (Fig. S4). In these conditions, β_4 -myc precipitates endogenous PP2A only upon membrane depolarization (Fig. 5g). In contrast, β_{1-481} -myc does not precipitate PP2A upon depolarization. Finally, blocking electrical activity of 11 DIV hippocampal neurons by 1 μM tetrodotoxin (TTX) produces a significant 2.1-fold reduction of β_4 NCR value measured at 18 DIV (Fig. 5h). This TTX effect is not observed in B56 $\delta^{-/-}$ hippocampal neurons, demonstrating that β_4 nuclear accumulation induced by electrical activity relies on B56 δ . Note the 2.45-fold reduction in NCR value between wt and B56 $\delta^{-/-}$ control neurons at 18 DIV in agreement with B56 δ role in β_4 nuclear accumulation. Conversely, a 1 hr stimulation of neuronal electric activity by a bicuculline/4-AP cocktail produces a significant $23.5 \pm 1.9\%$ increase in NCR value that is not observed with B56 $\delta^{-/-}$ hippocampal neurons (Fig. 5i). Depolarization of the plasma membrane therefore represents an important signaling event that allows β_4 /B56 δ interaction and favors β_4 nuclear accumulation.

β_4 represses TH gene expression by interacting with the thyroid hormone receptor alpha

To determine whether β_4 regulates transcription of endogenous genes, we analyzed a publicly available microarray data set comparing gene expression in wt and *lh* mice cerebellum (data set GSE6275 from Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). A volcano plot representation of our statistical analysis identifies 56 up-regulated and 38 down-regulated genes (over twofold expression change, $p < 0.05$) in *lh* mice cerebellum (Fig. S5). Based on gene ontology annotations, clustering of regulated transcripts in functional groups illustrate that many encode proteins with functions related to signaling and ion transport (Fig. S5). Among these genes, those coding for TH and for BC031748 cDNA sequence are the most up- and down-regulated, respectively (Fig. 6a). The effect of β_4 on gene expression was confirmed on a set of genes by qRT-PCR experiments using purified mRNA from wt and *lh* mice cerebellum (Fig. 6b). From both approaches, TH gene shows the greatest variation in expression level; an interesting observation considering its relevance in epilepsy³¹⁻³³. The up-regulation of TH expression in *lh* mice cerebellum indicates that β_4 acts as a repressor on this gene. Interaction of β_4 with the promoter region of TH gene was investigated by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. ChIP of the TH gene promoter from hippocampal neurons in culture, using

antibodies against β_4 , shows specific precipitation at 18 DIV but not 1 DIV (Fig. 6c). As a control, ChIP of the 3'-UTR region of TH gene were negative at 18 DIV. Similar results were obtained for ChIP experiments of the transmembrane protein 100 gene promoter (Fig. S6), suggesting that the TH promoter is not an isolated case. In wt mice brain, β_4 antibodies immunoprecipitate $1.89 \pm 0.42\%$ of TH promoter input, corresponding to a 6.3-fold enrichment over control (Fig. 6d). In contrast, no specific TH promoter immunoprecipitation is observed using *lh* mice brain (Fig. 6d). In agreement with the presence of nuclear β_4 in the absence of B56 δ , β_4 antibodies also immunoprecipitate $1.37 \pm 0.06\%$ of TH promoter input (3.3-fold enrichment; Fig. S7a). This indicates that nuclear β_4 may also associate with the TH promoter in the absence of B56 δ . Yeast two hybrid screening, using β_4 as bait, was used to identify a transcription factor that targets β_4 to the TH gene. The thyroid hormone receptor alpha (TR α) came out as a positive candidate (Fig. 6e). TR α is a nuclear receptor that contains a T3 hormone binding domain and a DNA binding domain interacting with Thyroid Receptor Elements (TRE). Interaction of TR α with β_4 was confirmed by coimmunoprecipitation experiments in HEK293 cells (Fig. 6f). ChIP using TR α antibodies show the interaction of TR α with the TH gene promoter regardless of the presence of β_4 or B56 δ (Fig. 6g). Enrichments of the TH gene promoter were 4.92-, 4.77- and 4.27-fold for wt, *lh* and B56 δ KO brains, respectively. This result is in agreement with the presence of putative TRE in the promoter region and in the coding sequence of the TH gene. The effect of TR α on TH gene promoter was tested using a luciferase reporter (Fig. 6h). TR α has little effect on its own on the expression of luciferase, while its activation by the T3 hormone leads to a 4.4-fold repression of luciferase expression (Fig. 6h). Interestingly, β_4 , like T3, activates the repressing function of TR α (4.8-fold repression). The effect of β_4 on TR α activity may therefore constitute a first step of TH gene repression in agreement with (i) the up-regulation of this gene in the absence of β_4 and (ii) its maintained repression in B56 δ ^{-/-} brain (Fig. 6i). The β_4 /TR α interaction may also participate to nuclear β_4 localization in the absence of B56 δ .

B56 δ induces the recruitment of HP1 γ by β_4 and contributes to association of the signaling complex with histones

ChIP experiments using B56 δ antibodies reveal the presence of B56 δ within the β_4 complex associated to the promoter of the TH gene (Fig. 7a). Control experiments using B56 δ KO mice brain demonstrate the specificity of the signal, while the absence of TH precipitation in *lh* brain denotes a key role of β_4 in targeting B56 δ to the TH promoter. The presence of PP2A in the

complex associated to the TH promoter was also confirmed by using PP2A antibodies (Fig. 7b). TH promoter precipitation by PP2A antibodies was strongly diminished in *lh* brain indicating the importance of β_4 in recruiting PP2A to the TH gene (Fig. S7b). However, in $B56\delta^{-/-}$, the TH promoter was still immunoprecipitated by PP2A antibodies (Fig. S7b), indicating that, in this mice model, a compensatory mechanism takes place that allows association of PP2A to the TH promoter independently of its B56 δ -mediated association with β_4 (Fig. 5a). Next, we questioned the role of B56 δ and PP2A in TH gene regulation. Phosphorylation of histones regulates chromatin state and gene transcription³⁴. Within the nucleus of wt CA1 hippocampal neurons, 45% of β_4 gold-labeled is associated to heterochromatin (black arrows; n=195/440, Fig. 1d), whereas the remaining fraction is associated to euchromatin. Expression of β_4 -myc together with B56 δ in HEK293 cells leads to a general dephosphorylation of Ser¹⁰ of histone H3 (Fig. 7c), in agreement with earlier findings that PP2A dephosphorylates histone H3³⁵. In addition, immunoprecipitated β_4 -myc/B56 δ -EGFP/PP2A-HA complex allows dephosphorylation of a Ser¹⁰ phosphorylated histone H3 N-terminal peptide (Fig. 7d). Finally, ChIP experiments using anti-histone H3 and anti-phosphorylated H3 Ser¹⁰ antibodies shows that the absence of β_4 in *lh* brain is accompanied by an increase of histone H3 S¹⁰ phosphorylation at the TH promoter (Fig. 7e). This increase is not observed in $B56\delta^{-/-}$ mice brain coherent with PP2A presence at the TH promoter (Fig. S7c). Ser¹⁰ dephosphorylation of histone H3 has been associated to recruitment of HP1 γ ³⁶. Interestingly, HP1 γ has been shown to interact with a PXVXV motif on β_{4c} ¹⁷, a short splice variant of β_4 . Although this motif is also found in full length β_4 (Fig. 7f), no interaction with HP1 γ has been detected by yeast two hybrid (Fig. 4c and ref.¹⁶). We nevertheless questioned whether the interaction of β_4 with B56 δ could favor its interaction with HP1 γ . Indeed, expression of B56 δ -EGFP strongly enhances immunoprecipitation of HP1 γ -EGFP by β_4 -myc (Fig. 7g). The basal level of precipitation of HP1 γ -EGFP by β_4 -myc is due to the presence of endogenous B56 δ in HEK293 cells (Fig. S2a). The B56 δ -dependence of HP1 γ / β_4 interaction, together with the PP2A-induced dephosphorylation of histone H3 Ser¹⁰, prompted us to investigate the interaction of this complex with histones. Immunoprecipitation of mice brain β_4 leads to the precipitation of histone H3 (Fig. 7h). The specificity of this association is witnessed by the lack of histone H3 precipitation from *lh* brain. Importantly, β_4 association with histone H3 is lost in $B56\delta^{-/-}$ mice brain, in agreement with the specific role of B56 δ in β_4 /HP1 γ interaction. In HEK293 cells, immunoprecipitation of β_4 -myc leads to the co-precipitation of all histones (H2B, H3 and H4) (Fig. 7i), constitutive of nucleosomes. This is in agreement with the endogenous expression of B56 δ (Fig. S2a) and HP1 γ (Fig. S2b) in these cells. Expression of B56 δ further enhances β_4 -

myc/histone interaction (Fig. 7i). Similarly, B56 δ -myc requires the expression of β_4 -EGFP to precipitate histone H3, in agreement with the fact that HP1 γ binds β_4 and not B56 δ (Fig. 7j). B56 δ -myc expressed together with β_{L125P} -EGFP or β_{1-481} -EGFP mutants, deficient for B56 δ association, no longer precipitate histone H4 further supporting the B56 δ -dependence of β_4 /HP1 γ interaction (Fig. 7k). Neuronal differentiation strongly increases the association of endogenous β_4 with histone H3 in NG108-15 (Fig. 7l), which correlates with the differentiation-dependent β_4 nuclear targeting (Fig. 1h,i). In the presence of B56 δ -EGFP and channel subunits, membrane depolarization increases β_4 -myc, but not β_{1-481} -myc, association to histone H3 (Fig. S7d). Coherent with its role as PP2A regulatory subunit, B56 δ -EGFP expression in HEK293 cells results in dephosphorylation of Ser¹⁰ of β_4 -myc-associated histone H3 (Fig. 7m). Finally, ChIPs experiments using anti-HP1 γ antibodies demonstrate the association of HP1 γ to the TH promoter (Fig. 7n). The strong decrease of this association in *lh* brain illustrates the role of β_4 in recruiting HP1 γ to the TH gene. In B56 $\delta^{-/-}$ brain, the presence of PP2A at the TH promoter also ensures the recruitment of HP1 γ (Fig. S7e).

DISCUSSION

Here, we characterized a novel signaling pathway in which, under membrane depolarization, the VGCC β_4 subunit acquires a gene regulatory function by successively recruiting the B56 δ /PP2A complex, the transcription factor TR α and the heterochromatin protein HP1 γ . The resulting nuclear platform, structured by β_4 , binds to specific gene promoters, dephosphorylates histones associated to these promoters and orients HP1 γ interaction with the dephosphorylated histones. The formation of this complex allows gene repression, first by a direct effect of β_4 on TR α , and secondly by HP1 γ recruitment known to promote heterochromatin formation (Fig. 8). This later step may lead to long-term gene repression, while the first step is conceptually more dynamic. In *lh* brain, the absence of β_4 triggers a complete disorganization of this signaling pathway that results in the up-regulation of TH expression. This demonstrates the key role of β_4 in organizing the repression of the TH gene. In B56 $\delta^{-/-}$ brain, TH gene repression is coherent with the presence of PP2A and HP1 γ at the TH promoter and indicates the existence of compensatory mechanisms in this mice model. B56 γ , that also targets PP2A to the nucleus²⁵, and β_3 , another VGCC subunit, that has also the ability to be addressed to the nucleus³⁷ and bind a transcription factor³⁸, might participate to this compensation process. The juvenile epilepsy mutant that normally associates with VGCC⁷, is defective for B56 δ association. This mutant no longer forms a complex with

PP2A, and is unable to translocate to the nucleus and to interact with HP1 γ and histones (Fig. 8). Therefore, this mutation induces the full destabilization of the β_4 signaling pathway. At the structural level, formation of the B56 δ / β_4 complex requires the interaction between the β_4 SH3 and GK modules. The nuclear targeting defect induced by the human mutation resides in the loss of this interaction highlighting an unexpected role of β_4 C-terminal domain in controlling β_4 conformation state. Association of B56 δ with β_4 promotes β_4 /HP1 γ interaction further indicating the exquisite modularity of β_4 as an adaptor protein.

In earlier reports, B56 δ /PP2A was shown to regulate gene expression through a complex interplay between DARPP-32 phosphorylation state³⁹, phosphatase 1 (PP1) activity, and histone H3 phosphorylation level⁴⁰. PP1 complexes have been associated to other histone-modifying enzymes, such as histone deacetylases or kinases, with chromatin remodeling capabilities^{41, 42} and with transcription repressors or activators^{43, 44}. Here, we illustrate that, like PP1, PP2A belongs to a signaling macromolecular complex which ultimately regulates gene expression by modulating the histone code. This complex is organized by the VGCC β_4 subunit that plays the role of a platform that, besides PP2A, also recruits a nuclear receptor and a heterochromatin protein, HP1 γ . By homology with PP1, this protein complex is likely to be enriched by other nucleosome-modifying enzymes in the near future. It should be emphasized that long-term modifications accompanying epileptic disorders have previously been associated to changes in post-translational state of histones and to alterations in transcriptional programs^{45, 46}. This work thus opens exciting perspectives for understanding the underlying molecular causes of epilepsy in which VGCC subunits have been implicated.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Hiroshi Hibino (Osaka University, Japan) for providing CHCB2 constructs used for coimmunoprecipitation, confocal imaging and yeast two hybrid assays. We thank Dr. Rosalie Sears (Oregon Health & Sciences University, Portland, USA) for the pD30-PP2A-HA-C clone. We acknowledge financial support of Inserm. M.B. is a postdoctoral fellow of Association Française contre les Myopathies.

Author contributions

A.T. and K.F. studied the nuclear localization of β_4 and its structural determinants. Sh.K., T.M., S.A. made several cDNA constructs and performed yeast two-hybrid and ChIP experiments. M.B., K.F and Mi.R. performed RT-PCR, immunoprecipitation and ChIP experiments. C.A. did

electrophysiological recordings. S.G-F. and A.A. provided their expertise with hippocampal neuron cultures. K.S. performed mass spectrometry experiments and Sa.K. contributed to discussion, design and interpretation of data regarding nuclear function of β_4 complex. F.L. performed CHCB2 experiments. K.P-G. did EM experiments. S.B. performed transcriptomic analyses. C.L. and V.J. provided the B56 $\delta^{-/-}$ mice line and analytical tools. R.D., Mi.R., Y.M. and M.D.W. coordinated the study. Mi.R. and M.D.W. wrote the manuscript.

References

1. Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P. & Striessnig, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 411-425 (2005).
2. Greer, P.L. & Greenberg, M.E. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* **59**, 846-860 (2008).
3. Flavell, S.W. & Greenberg, M.E. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **31**, 563-590 (2008).
4. Deisseroth, K., Mermelstein, P.G., Xia, H. & Tsien, R.W. Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 354-365 (2003).
5. Arikath, J. & Campbell, K.P. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 298-307 (2003).
6. Bidaud, I., Mezghrani, A., Swayne, L.A., Monteil, A. & Lory, P. Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1169-1174 (2006).
7. Escayg, A. *et al.* Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* **66**, 1531-1539 (2000).
8. Burgess, D.L., Jones, J.M., Meisler, M.H. & Noebels, J.L. Mutation of the Ca²⁺-channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* **88**, 385-392 (1997).
9. Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M. & Greenberg, M.E. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* **294**, 333-339 (2001).
10. Rosen, L.B., Ginty, D.D., Weber, M.J. & Greenberg, M.E. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* **12**, 1207-1221 (1994).
11. Graef, I.A. *et al.* L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* **401**, 703-708 (1999).

12. Oliveria, S.F., Dell'Acqua, M.L. & Sather, W.A. AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type Ca²⁺ channel activity and nuclear signaling. *Neuron* **55**, 261-275 (2007).
13. Carrion, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B. & Naranjo, J.R. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* **398**, 80-84 (1999).
14. Hardingham, G.E., Arnold, F.J. & Bading, H. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* **4**, 261-267 (2001).
15. Hardingham, G.E., Chawla, S., Johnson, C.M. & Bading, H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* **385**, 260-265 (1997).
16. Hibino, H. *et al.* Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta 4 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 307-312 (2003).
17. Xu, X. *et al.* The Ca²⁺ channel beta4c subunit interacts with heterochromatin protein 1 via a PXVXL binding motif. *J Biol Chem* **286**, 9677-9687.
18. Chen, Y.H. *et al.* Structural basis of the alpha(1)-beta subunit interaction of voltage-gated Ca(2+) channels. *Nature* **429**, 675-680 (2004).
19. Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L. & Dolmetsch, R. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* **127**, 591-606 (2006).
20. Subramanyam, P. *et al.* Activity and calcium regulate nuclear targeting of the calcium channel beta(4b) subunit in nerve and muscle cells. *Channels (Austin)* **3** (2009).
21. Chemin, J., Nargeot, J. & Lory, P. Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neuritogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J Neurosci* **22**, 6856-6862 (2002).
22. Takahashi, S.X., Miriyala, J., Tay, L.H., Yue, D.T. & Colecraft, H.M. A CaVbeta SH3/guanylate kinase domain interaction regulates multiple properties of voltage-gated Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* **126**, 365-377 (2005).
23. McGee, A.W. *et al.* Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits. *Neuron* **42**, 89-99 (2004).
24. Takahashi, S.X., Miriyala, J. & Colecraft, H.M. Membrane-associated guanylate kinase-like properties of beta-subunits required for modulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7193-7198 (2004).
25. McCright, B., Rivers, A.M., Audlin, S. & Virshup, D.M. The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem* **271**, 22081-22089 (1996).
26. Kiyonaka, S. *et al.* RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci* **10**, 691-701 (2007).
27. Louis, J.V. *et al.* Mice lacking phosphatase PP2A subunit PR61/B'delta (Ppp2r5d) develop spatially restricted tauopathy by deregulation of CDK5 and GSK3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 6957-6962 (2011).

28. Restituto, S., Cens, T., Rousset, M. & Charnet, P. Ca(2+) channel inactivation heterogeneity reveals physiological unbinding of auxiliary beta subunits. *Biophys J* **81**, 89-96 (2001).
29. Sandoz, G. *et al.* Cavbeta-subunit displacement is a key step to induce the reluctant state of P/Q calcium channels by direct G protein regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6267-6272 (2004).
30. Spafford, J.D. *et al.* Uncoupling of calcium channel alpha1 and beta subunits in developing neurons. *J Biol Chem* **279**, 41157-41167 (2004).
31. Hess, E.J. & Wilson, M.C. Tottering and leaner mutations perturb transient developmental expression of tyrosine hydroxylase in embryologically distinct Purkinje cells. *Neuron* **6**, 123-132 (1991).
32. Donato, R. *et al.* The ducky(2J) mutation in Cacna2d2 results in reduced spontaneous Purkinje cell activity and altered gene expression. *J Neurosci* **26**, 12576-12586 (2006).
33. Bengzon, J., Hansson, S.R., Hoffman, B.J. & Lindvall, O. Regulation of norepinephrine transporter and tyrosine hydroxylase mRNAs after kainic acid-induced seizures. *Brain Res* **842**, 239-242 (1999).
34. Jenuwein, T. & Allis, C.D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080 (2001).
35. Nowak, S.J., Pai, C.Y. & Corces, V.G. Protein phosphatase 2A activity affects histone H3 phosphorylation and transcription in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **23**, 6129-6138 (2003).
36. Fischle, W. *et al.* Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116-1122 (2005).
37. Beguin, P. *et al.* Nuclear sequestration of beta-subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca²⁺ channel regulation. *J Mol Biol* **355**, 34-46 (2006).
38. Zhang, Y. *et al.* The beta subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem* **285**, 2527-2536 (2010).
39. Ahn, J.H. *et al.* Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2979-2984 (2007).
40. Stipanovich, A. *et al.* A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* **453**, 879-884 (2008).
41. Murnion, M.E. *et al.* Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem* **276**, 26656-26665 (2001).
42. Hsu, J.Y. *et al.* Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**, 279-291 (2000).
43. Jin, Q. *et al.* The protein phosphatase-1 (PP1) regulator, nuclear inhibitor of PP1 (NIPP1), interacts with the polycomb group protein, embryonic ectoderm development (EED), and functions as a transcriptional repressor. *J Biol Chem* **278**, 30677-30685 (2003).
44. Canettieri, G. *et al.* Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. *Nat Struct Biol* **10**, 175-181 (2003).

45. Huang, Y., Doherty, J.J. & Dingledine, R. Altered histone acetylation at glutamate receptor 2 and brain-derived neurotrophic factor genes is an early event triggered by status epilepticus. *J Neurosci* **22**, 8422-8428 (2002).
46. Sng, J.C., Taniura, H. & Yoneda, Y. Histone modifications in kainate-induced status epilepticus. *Eur J Neurosci* **23**, 1269-1282 (2006).
47. Bichet, D. *et al.* The I-II loop of the Ca²⁺ channel α 1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* **25**, 177-190 (2000).
48. Magnusdottir, A. *et al.* The structure of the PP2A regulatory subunit B56 gamma: the remaining piece of the PP2A jigsaw puzzle. *Proteins* **74**, 212-221 (2009).
49. Liou, W., Geuze, H.J. & Slot, J.W. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* **106**, 41-58 (1996).
50. Peris, L. *et al.* Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* **185**, 1159-1166 (2009).
51. Robert, J.J., Geoffroy, M.C., Finiels, F. & Mallet, J. An adenoviral vector-based system to study neuronal gene expression: analysis of the rat tyrosine hydroxylase promoter in cultured neurons. *J Neurochem* **68**, 2152-2160 (1997).
52. Martens, E. *et al.* Genomic organisation, chromosomal localisation tissue distribution and developmental regulation of the PR61/B' regulatory subunits of protein phosphatase 2A in mice. *J Mol Biol* **336**, 971-986 (2004).
53. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, 34 (2002).
54. Dahl, J.A. & Collas, P. A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (microChIP). *Nat Protoc* **3**, 1032-1045 (2008).

Figure legends

Figure 1 Presence of β_4 in the nucleus of neurons. **(a)** Immunohistochemical confocal images of 20 μ m coronal sections of adult wt (upper panels) or *lh* (lower panels) mice brains showing the distribution of endogenous β_4 in the hippocampus (green, left panels). Neuronal nuclei were labeled with NeuN (blue, middle panels). Right panels illustrate merged images. The inserts show 100X images of the CA1 region. **(b)** Western blots of adult wt and *lh* mice brain lysates indicating the presence of β_4 only in wt mice. Actin staining was used as an internal control. **(c)** β_4 immunoblotting from cytoplasmic and nuclear fractions of adult wt mice brain. **(d)** EM image of an ultrathin cryosection of the CA1 hippocampal region showing the intranuclear presence of β_4 labelled with antibody-coated 15 nm gold particles. Black and white arrows indicate the position of gold particles associated to heterochromatin and euchromatin, respectively. **(e)** Confocal images of hippocampal neurons from embryonic E18 mice brains in primary culture at 5 DIV (left panels) and 18 DIV (right panels). Green: immunocytochemical staining of β_4 ; red:

membrane staining with concanavalin A (ConA) conjugated to rhodamine; blue: nuclear staining with ToPro3. **(f)** DIV-dependent evolution of β_4 NCR values in neurons (n=50 cells for each data point). **(g)** Nuclear density of β_4 in hippocampal neurons at 5 and 18 DIV as assessed by EM (n=28 and 20 nuclei, respectively). **(h)** Confocal images of NG108.15 cells 1 day before (-1 DIV) and 13 days (13 DIV) after induction of neuronal differentiation with 1 mM cAMP and serum reduction. Color code is as in **(e)**. **(i)** Mean NCR values expressed in percent as a function of culture time *in vitro*. DIV 0 represents the induction time of neuronal differentiation.

Figure 2 Nuclear targeting and structural integrity of β_4 are disrupted by the human juvenile epilepsy mutation. **(a)** Schematic representation of different truncated β_4 constructs in pEGFP-C1. The β_{1-481} -EGFP mutant is also shown. **(b)** Confocal images of CHO cells expressing some representative constructs, including β_4 -EGFP and mutant β_{1-481} -EGFP. Expression time is 24 hrs after transfection. **(c)** Mean NCR values of EGFP fluorescence for each condition in transfected CHO cells. ***, $p \leq 0.01$. **(d)** Western blot detecting EGFP in nuclear and cytoplasmic fractions of CHO cells after two days of transfection with EGFP, β_4 -EGFP or β_{1-481} -EGFP. Cytoplasmic β_{1-481} -EGFP is less stable than cytoplasmic β_4 -EGFP, as witnessed by the presence of lower molecular weight bands. **(e)** Confocal images of hippocampal neurones transfected at 7 DIV with β_{1-481} -EGFP (upper panels) or β_4 -EGFP (lower panels). Images were acquired at 9 DIV on β -tubulin III-positive cells. **(f)** NCR values for each construct. ***, $p \leq 0.01$. **(g)** Confocal images of hippocampal neurons transfected with β_{1-481} -EGFP showing the comparative distribution of endogenous β_4 (red) and exogenous β_{1-481} -EGFP (green).

Figure 3 The SH3/GK interaction is required for β_4 nuclear localization. **(a)** EGFP- or myc-tagged β_4 -truncated constructs used for confocal microscopy and co-immunoprecipitation experiments. **(b)** Confocal images of CHO cells transfected with individual constructs. **(c)** Confocal images of CHO cells expressing β_{1-166} -EGFP with $\beta_{200-519}$ -myc, or β_{1-166} -EGFP with $\beta_{200-481}$ -myc (upper panels). Mean NCR values of EGFP or anti-myc fluorescence summarizing the effect of the co-expressions on nuclear localization (lower panels). ***, $p \leq 0.001$. **(d)** Immunoprecipitation experiments in CHO cells investigating the association of β_{1-166} -EGFP with $\beta_{200-519}$ -myc or $\beta_{200-481}$ -myc. Left panel: immunoprecipitation via anti-myc antibodies and Western blot of EGFP, except first lane showing β_4 -EGFP expression level in cell lysates. Right panel: Western blot with polyclonal anti- β antibody⁴⁷ indicating equivalent $\beta_{200-519}$ -myc and $\beta_{200-481}$ -myc immunoprecipitation levels. β_{1-166} -EGFP expression confirmed by cell EGFP fluorescence (not

shown). (e) Schematic representation of β_{L125P} -EGFP, $\beta_{1-166-L125P}$ -EGFP and β_{P225R} -EGFP mutants. (f) Lack of co-immunoprecipitation shows the absence of $\beta_{200-519}$ -myc/ $\beta_{1-166-L125P}$ -EGFP interaction. Expression of β_{1-166} -EGFP and $\beta_{200-519}$ -myc was verified by the cell fluorescence and Western blot as in (d). (g) Confocal images of hippocampal neurons showing the cytoplasmic localization of β_{L125P} -EGFP and β_{P225R} -EGFP. Cells were transfected for 48 hrs at 6 DIV. (h) Mean NCR values for β_4 -EGFP, β_{L125P} -EGFP and β_{P225R} -EGFP fluorescence in hippocampal neurons. ***, $p \leq 0.001$.

Figure 4 B56 δ / β_4 interaction contributes to β_4 nuclear localization. (a) Yeast two hybrid results indicating the interaction level of β_4 and β_{1-481} with B56 δ as a function of time (left). The interactions were scored as the ratio of β -galactosidase activity to His prototrophy. Schematic representation of mouse B56 δ showing the NLS amino acid sequence (right). The position of seven HEAT repeats are shown by homology with B56 γ ⁴⁸. (b) Co-immunoprecipitation experiments determining the interaction between β_4 -EGFP or β_{1-481} -EGFP with B56 δ -myc in HEK293 cells. Left panel: expression of B56 δ -myc was confirmed by Western blot (Mr 69 kDa). Right panel: pull-down with anti-myc antibody, and Western blot with anti-EGFP antibody. (c) Interactions of β isoforms with B56 δ and CHCB2 in yeast two hybrid assay. (d) Interactions of truncated and mutated β_4 constructs with B56 δ using yeast two hybrid assay. (e) Confocal images showing the localization of β_4 -EGFP in CHO cells in the presence of B56 δ -myc (left panels). Mean NCR values illustrating the effect of B56 δ -myc on β_4 -EGFP localization (right panel). (f) Confocal images of CHO cells expressing both β_{1-481} -EGFP and B56 δ -myc (left panels). Mean NCR values summarizing absence of B56 δ -myc effect on β_{1-481} -EGFP localization (right panel). (g) Confocal images showing the cell distribution of endogenous β_4 in undifferentiated NG108.15 cells in the absence or presence of B56 δ -myc (left panels). B56 δ -myc was transfected 24 hrs before confocal imaging. Panels in green present the endogenous β_4 detected with an anti- β_4 . Mean NCR values showing that B56 δ -myc induces the redistribution of endogenous β_4 to the nucleus (right panel). ***, $p \leq 0.001$. (h) Mean NCR values of endogenous β_4 from wt and B56 δ ^{-/-} hippocampal neurons at 11 DIV. ***, $p \leq 0.001$. (i) Average immunogold-labeled endogenous β_4 in nuclei from pyramidal neurons from wt and B56 δ ^{-/-} mice hippocampus measured by EM (n=36 and 51 nuclei, respectively). ***, $p \leq 0.001$.

Figure 5 β_4 association to B56 δ /PP2A is inhibited by channel expression and activated by membrane depolarization. **(a)** β_4 immunoprecipitates B56 δ and PP2A from wt mice brain but not from *lh* or B56 $\delta^{-/-}$ mice as shown by Western blots. **(b)** Left panel: immunoprecipitation of endogenous PP2A by B56 δ -myc or β_4 -myc \pm B56 δ -EGFP expressed in HEK293 cells. Right panel: similar experiments using β_{1-481} -myc \pm B56 δ -EGFP. **(c)** Endogenous PP2A phosphatase activity associated to immunoprecipitated β_4 -myc \pm B56 δ -EGFP expressed in HEK293 cells. Dephosphorylation of *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP), a generic phosphatase substrate, was measured by absorbance of the metabolite at 405 nm. **(d)** Confocal images of HEK293 cells 2 days after transfection with β_4 -EGFP together with Cacna1a and Cacna2d2 subunits (VGCC) (left panel). Mean NCR values of EGFP fluorescence in various transfection conditions (n=50 for each condition, right panel). **(e)** Western blot analysis of β_4 -EGFP subunit immunoprecipitated by B56 δ -myc \pm VGCC expressed in HEK293 cells. Control IP represents precipitation in absence of anti-myc antibodies. **(f)** Western blot analysis of B56 δ -EGFP immunoprecipitated by β_4 -myc (left panels) or β_{1-481} -myc (right panels) expressed in HEK293 cells together with VGCC, without or with a 30 min depolarization by 140 mM KCl. **(g)** Effect of HEK293 membrane depolarization (140 mM KCl, 30 min) on β_4 -myc or β_{1-481} -myc complex formation with PP2A in the presence of B56 δ -EGFP and VGCC. **(h)** Mean NCR values of β_4 immunofluorescence in wt or B56 $\delta^{-/-}$ hippocampal neurons at 18 DIV (control or 1 μ M TTX). TTX was added at 11 DIV in the culture media (n=50 for each condition). **(i)** Effect of a 1 hr application of 40 μ M bicuculline and 400 μ M 4-AP on average β_4 NCR value in wt and B56 $\delta^{-/-}$ hippocampal neurons. NS, non significant; ***, p<0.001.

Figure 6 β_4 regulates gene expression by interacting with a transcription factor. **(a)** Histogram showing up-regulated (in red) and down-regulated (in green) genes displaying a > 2-fold change in *lh* versus wt cerebellum mRNA levels as detected with transcriptomic probe sets. **(b)** qRT-PCR experiments showing up-regulation of TH, TAC1, KLB and down-regulation of BC031748 and RIF1 in *lh* versus wt cerebellum. Mean \pm S.D. of 3 experiments performed in triplicate. Data were normalized using 3 housekeeping genes (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, transferin receptor, and peptidylprolyl isomerase A). **(c)** Agarose gel of representative ChIP assay on hippocampal neurons at 1 or 18 DIV with anti- β_4 antibodies. **(d)** TH promoter immunoprecipitation in presence or absence (control) of anti- β_4 antibodies, expressed as percentage of input, from wt or *lh* mice brain (n=4-22, left panel). ***, p<0.001. **(e)** Yeast two hybrid results indicating the interaction level of β_4 with TR α as a function of time (upper panel).

The interactions were scored as the ratio of β -galactosidase activity to His prototrophy. Schematic representation of mouse TR α showing the localization of the DNA Binding Domain (DBD) and the Ligand Binding Domain (LBD) (lower panel). (f) Western blot analysis of TR α -EGFP immunoprecipitated by β_4 -myc expressed in HEK293 cells. (g) TH promoter immunoprecipitation by anti-TR α antibodies, expressed as percentage of input, from wt, *lh* or B56 $\delta^{-/-}$ mice brain (n=4-20, left panel). ***, p<0.001. (h) Schematic representation of the luciferase reporter system under the control of TH promoter (upper panel). Luciferase expression measured in the absence and presence of T3 in HEK293 cells transfected with the luciferase reporter alone or together with TR α \pm β_4 (lower panel). An everted repeat type 6 TRE is present in the promoter region of TH gene (TGGCCTTGCCTGAGGCCA) at position -341 to -323. (i) Fold change in TH mRNA expression level in B56 $\delta^{-/-}$ cerebellum compared to wt measured by qRT-PCR. Mean \pm S.D. of 3 experiments performed in triplicate and data normalization as in (b).

Figure 7 Association of β_4 to HP1 γ and histones requires B56 δ . (a) TH promoter immunoprecipitation by anti-B56 δ antibodies, expressed as percentage of input, from wt, *lh* or B56 $\delta^{-/-}$ mice brain (n=2-8). **, p<0.05. (b) TH promoter immunoprecipitation by anti-PP2A antibodies, expressed as percentage of input, from wt mice brain (n=12). **, p<0.05. (c) Western blot of H3 and H3 Ser¹⁰P in HEK293 cells expressing β_4 -myc alone or with B56 δ -EGFP. (d) Mass spectrometry data showing dephosphorylation of the phosphorylated N-terminal histone H3 peptide (amino acids 5 to 13 phosphorylated on Ser¹⁰) by β_4 -myc immunoprecipitated from HEK293 cells, cotransfected with B56 δ -EGFP and PP2A-HA. (e) TH promoter immunoprecipitation by anti-Ser¹⁰P H3 or anti-H3 antibodies, expressed as percentage of input, from wt or *lh* mice brain (n=3-22). *, p<0.1. (f) Schematic representation of β_{4c} and β_4 illustrating the localization of the HP1 γ binding motif (critical residues are shadowed). (g) Western blot of HP1 γ -EGFP following immunoprecipitation by anti-myc antibodies from HEK293 cells expressing various combinations of HP1 γ -EGFP, B56 δ -EGFP and β_4 -myc. (h) Immunoprecipitation of histone H3 from wt, *lh* or B56 $\delta^{-/-}$ brain by anti- β_4 antibodies. (i) Immunoprecipitation of H3, H2B and H4 histones from HEK293 cells by β_4 -myc in the absence or presence of B56 δ -EGFP. Control: immunoprecipitation in non-transfected cells (NT). (j) Immunoprecipitation of histone H3 in HEK293 cells by B56 δ -myc in the absence or presence of β_4 -EGFP. (k) Lack of co-immunoprecipitation of histone H4 and B56 δ -myc in HEK293 cells in the presence of β_{L125P} -EGFP or β_{1-481} -EGFP mutants. (l) Immunoprecipitation of histone H3 by

anti- β_4 antibodies in non-differentiated and differentiated NG108-15 cells. **(m)** Western blot illustrating the dephosphorylation of histone H3 immunoprecipitated by β_4 -myc in the presence of B56 δ -EGFP in HEK293 cells. Total histone H3 (phosphorylated and dephosphorylated) are revealed with histone H3 antibody (lower panel), whereas Ser¹⁰P is detected by anti-phosphorylated histone H3 antibody (upper panel). **(n)** TH promoter immunoprecipitation by anti-HP1 γ antibodies, expressed as percentage of input, from wt or *lh* mice brain (n=4-14). **, p<0.05.

Figure 8 Schematic illustration of the novel excitation-transcription pathway mediated by β_4 and of the defective step produced by the epileptic truncation of β_4 .

METHODS

Mice lines

Lethargic (B6EiC3H-a/A-*lh*) and wild-type mice (strain B6EiC3H) were obtained from Jackson Labs and genotyped as previously described⁸. B56 δ ^{-/-} mice were generated by exchanging 146 bp of exon 3, exons 4 to 14, and 45 bp of exon 15 of the *Ppp2r5d* gene with a neomycine cassette through homologous recombination²⁷. Animal procedures were run with the approval of the local ethical committee.

Electron microscopy

Mice were fixed by intracardiac perfusion during 10 minutes with 50 ml of fixation buffer (2% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.3). The hippocampus was then isolated and kept in fixation buffer during 2 days. A transversal slice was made in the mid third of the hippocampus and dissection of the CA1/CA3 area in this slice was performed under a binocular magnifier. Hippocampal neurons were cultured in B100 plates during 5 or 18 days and fixed 2 hrs with fixation buffer. Cells were gently detached with a cell scraper, centrifuged and embedded in 10% gelatine. The cell pellet was then cut in small pieces. 1 mm³ cell or tissue samples were then incubated during 4 hrs in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Cryosections were made at -120°C using a cryo-ultramicrotome (Leica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methylcellulose⁴⁹. Cryosections were first incubated with primary anti- β_4 (Everest Biotech, 1:100), then incubated with rabbit anti-goat antibodies (Jackson, 1:400) and revealed with protein A-gold conjugated (CMC, Utrecht). Labelled cryosections were viewed at 80 kV with a 1200EX JEOL TEM microscope and images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus). Gold particles were counted and surface area measured with iTEM software (analySIS).

Hippocampal neurons and NG108-15 cells cultures

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as previously described⁵⁰. Astrocyte proliferation was blocked by 10 μ M arabinoside cytosine (AraC) four days after plating. Predominance of neurons was witnessed by Tuj1 labeling and lack of GFAP staining. NG108.15 cells were differentiated two days after plating by decreasing fetal calf serum to 1% and addition of 1 mM dibutyryl cAMP. Cell lines were transfected using jetPEI and neurons at 9 DIV using calcium phosphate.

Plasmid constructions

cDNA constructs coding for EGFP-tagged β_4 fragments were generated by PCR amplification using rat β_4 -EGFP plasmid as template (Genbank accession code L02315) and subcloned into pEGFP-C1 using *HindIII* and *KpnI* sites. Myc-tagged β_4 fragments were subcloned into pcDNA3.1(+) using *HindIII* and *XbaI* sites. For yeast two-hybrid assays, rat β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , and β_4 mutants were subcloned into pGBK-T7 vector²⁶. QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) or overlap extension method was used to produce β_{L125P} -EGFP, β_{P225R} -EGFP, $\beta_{1-166-L125P}$ -EGFP and $\beta_{P220A-V222A}$ -myc. Mouse B56 δ (Genbank accession code NM009358), HP1 γ (NM_007624) and TR α (NM_178060) were cloned from mouse brain Marathon-Ready cDNA (Clontech) using PCR and inserted into pCMV-tag3 vector and pEGFP-C2 vector using *EcoRI* and *SaII* site. All constructs were sequenced. Human Cacna1a (Genbank accession code AF004883) and rat Cacna1a (code NM012919) were also used for expression experiments. The TH-luciferase reporter gene was as previously described⁵¹ and contains 5,200 bps of the TH promoter upstream of the *Firefly* luciferase coding region.

Patch clamp recordings

Ca²⁺ currents were recorded at room temperature (22-24°C) in a bath medium containing (in millimolar): 5 CaCl₂, 10 TEACl, 1 MgCl₂, 128 NaCl, 10 D-glucose, 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). Patch pipettes were filled with a solution containing (in millimolar): 110 CsCl, 3 Mg-ATP, 0.5 Na-GTP, 3 MgCl₂, 10 EGTA-Cs, 10 HEPES (pH 7.4 with CsOH), and had a resistance of 2-4 M Ω . All traces were corrected on-line for leak and capacitance currents, digitized at 10 kHz and filtered at 2 kHz.

Cytochemical stainings

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. After PBS washing, plasma membranes were stained 5 min with 5 μ g/ml concanavalin A-rhodamine. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100. Myc-tagged constructs were visualized using biotinylated anti-myc antibodies (1:600, Santa Cruz) and Cy3-Streptavidin (1:300, Amersham). Endogenous β_4 was labeled for 1-2 hrs with a goat antibody directed against its carboxyl-terminus (1/1,000

dilution, Everest Biotech), followed by Alexa488 conjugated anti-goat (1:500, Molecular Probes). Cell nuclei were visualized using ToPro3 dye (T3605; Molecular Probes Inc). Images were obtained with a confocal microscope (Leica SP2). NCR values correspond to the average measure of 50 cells. In each cell, fluorescence intensities were measured in forty different ROI (20 for the cytoplasm and 20 for the nucleus). Merged pictures were obtained by using Adobe Photoshop software.

Yeast two hybrid assays

Rat β_4 , subcloned into pGBK-T7, was used as bait to screen a mouse brain pACT2 library expressed in the yeast strain AH109 (Clontech)²⁶. 5.0×10^6 transformants were cultured with synthetic medium lacking adenine, histidine, leucine, and tryptophan. His⁺ colonies were assayed in yeast cells for β -galactosidase activity by a filter assay. Signal strengths of interactions were evaluated visually after every 1 hr of color development. For mapping of the β_4 region that interacts with B56 δ or HP1 γ , yeast strain Y187 was co-transformed with each β bait vector and the B56 δ or HP1 γ prey vector. The interactions were evaluated by β -galactosidase activity on a filter.

Subcellular fractionation and Western blotting

Transfected HEK293 cells were lysed with 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche). Nuclei and cytoplasm were separated by 5 min centrifugation at 2,000 rpm. Pellets corresponding to nuclei were sonicated in lysis buffer. For mice brain subcellular fractionation, brains were homogenized in 0.32 M sucrose, 20 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM DTT, 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail (Roche). The homogenate was centrifuged 10 min at 800 \times g. The resulting crude nuclear pellet was washed twice with homogenization buffer, resuspended in a volume equivalent to the cytoplasmic fraction, and sonicated. Nuclear and cytoplasmic (supernatant) proteins, from equal volumes, were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot. EGFP tagged-proteins were visualized using anti-EGFP antibodies (1:300, Santa Cruz or 1:5,000 Rockland) and anti- β_4 as described²⁶.

Immunoprecipitation experiments

Transfected cells were lysed 30 min in 10 mM Tris pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche), sonicated and centrifuged 5 min at 1,500 \times g. Similar procedure applies for mice brain, except that they were homogenized first in lysis buffer. Protein extracts were incubated with streptavidin beads (Dynabeads® Streptavidin M-280, Dynal) precoated with 3 μ g of biotinylated anti-myc antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.). For immunoprecipitation of endogenous β_4 , protein extracts

were incubated with 40 μ l of dynabeads® protein G (Dyna) precoated with anti- β_4 antibodies (Everest Biotech). Beads were washed with PBS/0.1% Tween 20. Immunoprecipitated proteins were eluted with denaturing buffer and analyzed by Western blot. For immunoprecipitation of phosphorylated histones, lysis buffer was supplemented with 50 mM NaF phosphatase inhibitor. For immunoprecipitation and ChIP, primary antibodies were used at 10 μ g: anti- β_4 from Everest or as described²⁶, anti-histone H2B from Upstate, anti-histone H3, anti-phosphorylated Ser¹⁰ histone H3, anti-histone H4, anti-HP1 γ , and anti-TR α from Abcam, anti-B56 δ as described in⁵², anti-PP2A from Bethyl laboratories Inc., and anti-actin from Sigma-Aldrich.

PP2A activity

PP2A activity of immunoprecipitates was measured using SensoLyte™pNPP protein phosphatase kit from AnaSpec. Incubation lasted 1 hr at 37°C in assay buffer in the presence of *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP). OD was measured at 405 nm.

Statistical analysis of microarray data

Microarray analysis has been performed from publicly available raw data (Affymetrix CEL files) of biological triplicates (*lh* mice *versus* wild-type mice cerebellum) (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Statistical analysis was pursued using moderated *t*-test and a 2 fold-change cut-off for differential expression gene identification. Statistical significance was provided for $p < 0.05$. A volcano Plot graph was generated using hierarchical clustering analysis through ArrayAssist software (Stratagene).

Quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted from wt, *lh* or B56 $\delta^{-/-}$ cerebellum using the RNeasy kit, supplemented with DNase I (Qiagen). cDNAs were synthesized from 1 μ g total RNA using random hexamer primers (Promega) and Superscript II (Invitrogen). Primers recognizing mice sequences were designed with the Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) or by Sigma service (Fig. S8). Real time PCR was performed with a light cycler 480 instrument using the Lightcycler LC480 SYBR green I master (Roche) according to the manufacturer's instructions. The cycling protocol was 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 3 steps each (10 sec at 95°C, 5 sec at 60°C, and 10 sec at 72°C). The specificity of the amplification was checked by generating a melting curve ranging from 65 to 95°C. Multiple normalization of gene expression⁵³ was performed using 3 housekeeping genes (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, transferrin receptor, and peptidylprolyl isomerase A).

ChIP

Frozen adult mice brain (wt, *lh* or B56 $\delta^{-/-}$) brain were first crunched into powder in a mortar filled with liquid nitrogen. This powder was resuspended in 1% formaldehyde (in PBS) and incubated

for 20 min at RT. Cross linking was stopped by addition of glycine (125 mM final concentration) and incubation 5 min. Fixed tissues were thus washed with i) cold PBS (5 min), ii) 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 10 mM EDTA and Triton X-100 0.25%, pH 7.4 (10 min), and iii) 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM EDTA and 200 mM NaCl, pH 7.4 (10 min). Samples were then solubilized in 1 ml of buffer containing 50 mM Tris, pH 7.4, 10 mM EDTA, 1% SDS for 2 hrs at 4°C, sonicated until reaching an average 500-1,000 bps DNA fragment size, and centrifuged 5 min at 20,000 g. 100 µl of lysate ($DO_{280} = 0.266$) were incubated overnight at 4°C in 1 ml of 0.01% SDS, 1.1% Triton X100, 1.2 mM EDTA, 16 mM Tris pH 8.0 and 170 mM NaCl, 1 mM PMSF, and protease inhibitor cocktail, with or without 10 µg antibodies. Immunoprecipitation was performed by adding dynabeads protein G (Invitrogen). Different washing steps and elution were performed as described⁵⁴. Cross-links were reversed overnight at 65°C. DNA samples were sequentially treated with RNase A and proteinase K. DNA was extracted by phenol/chloroform and ethanol precipitated with glycogen as a carrier. DNA pellet was dissolved in water and real-time quantitative PCR analyses were performed on 25 ng of DNA in duplicate with selected primers (Fig. S8). On cultured hippocampal neurons, ChIP experiments were conducted on 5×10^6 cells using the Magna ChIP™ (MILLIPORE) according to the manufacture's protocol. The PCR cycling protocol was 10 min at 94°C followed by 38 cycles of 3 steps each (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C or 61°C, and 30 sec at 72°C), and 7 min at 72°C. Annealing temperature for the promoter region of TH was 55°C and for the 3'UTR of TH was 61°C.

Mass spectrometry

The histone H3 peptide phosphorylated at Ser¹⁰ QTARKS_pTGGC was obtained from Smartox biotechnologies (Grenoble, France). Immunoprecipitates were washed with (in mM) 40 Tris pH 8.4, 34 MgCl₂, 4 EDTA, 4 DTT, and incubated overnight at 37°C with 1 mM peptide. Dephosphorylation was evaluated by MALDI-TOF (Applied 4800) mass spectrometry. Briefly, 1 µl of peptide solution was spotted directly onto the MALDI target, dried and 1 µl of 20% α-Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (Sigma) was added in 50% acetonitril, 0.1% trifluoroacetic acid.

Figure 1

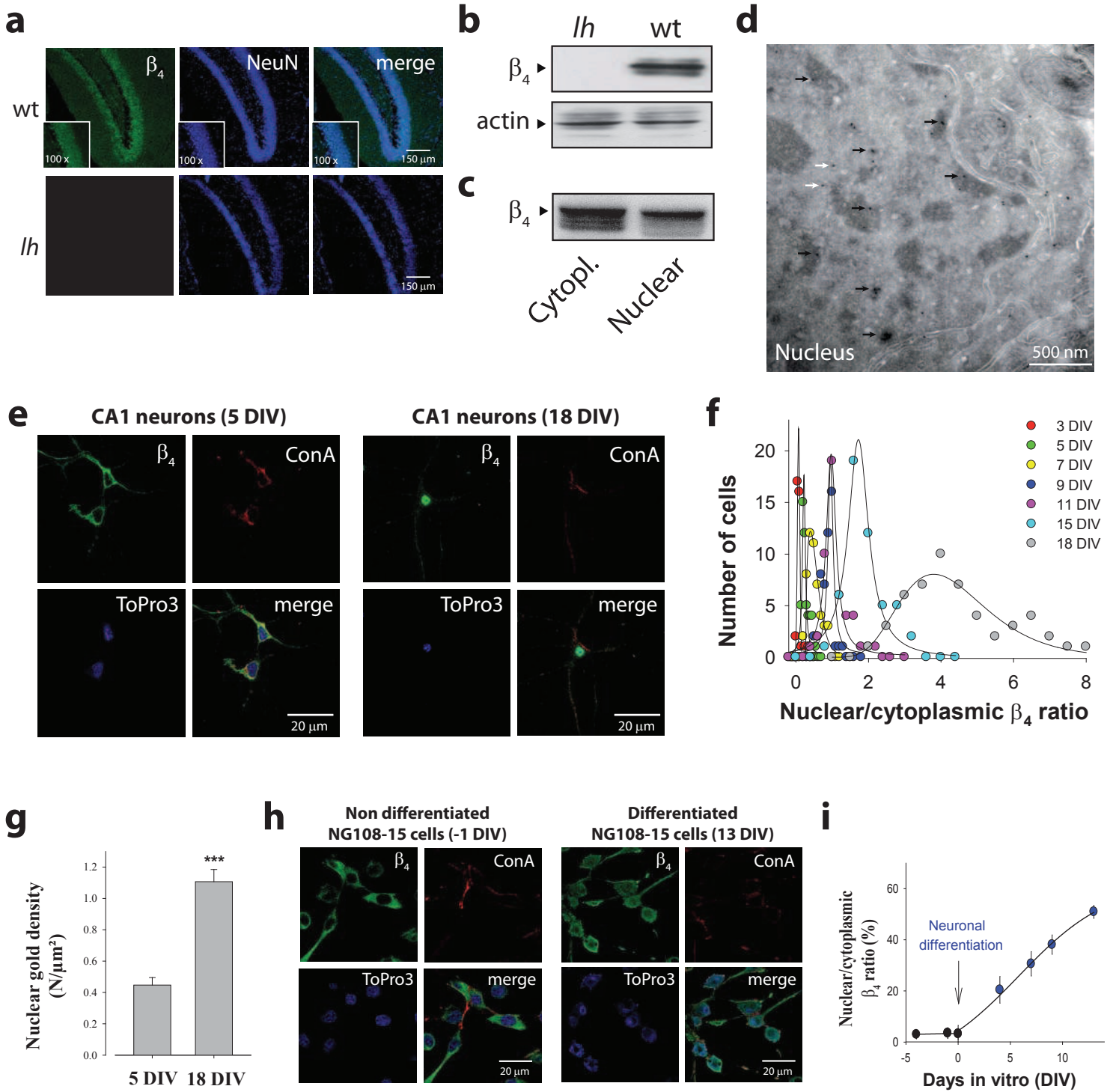


Figure 2

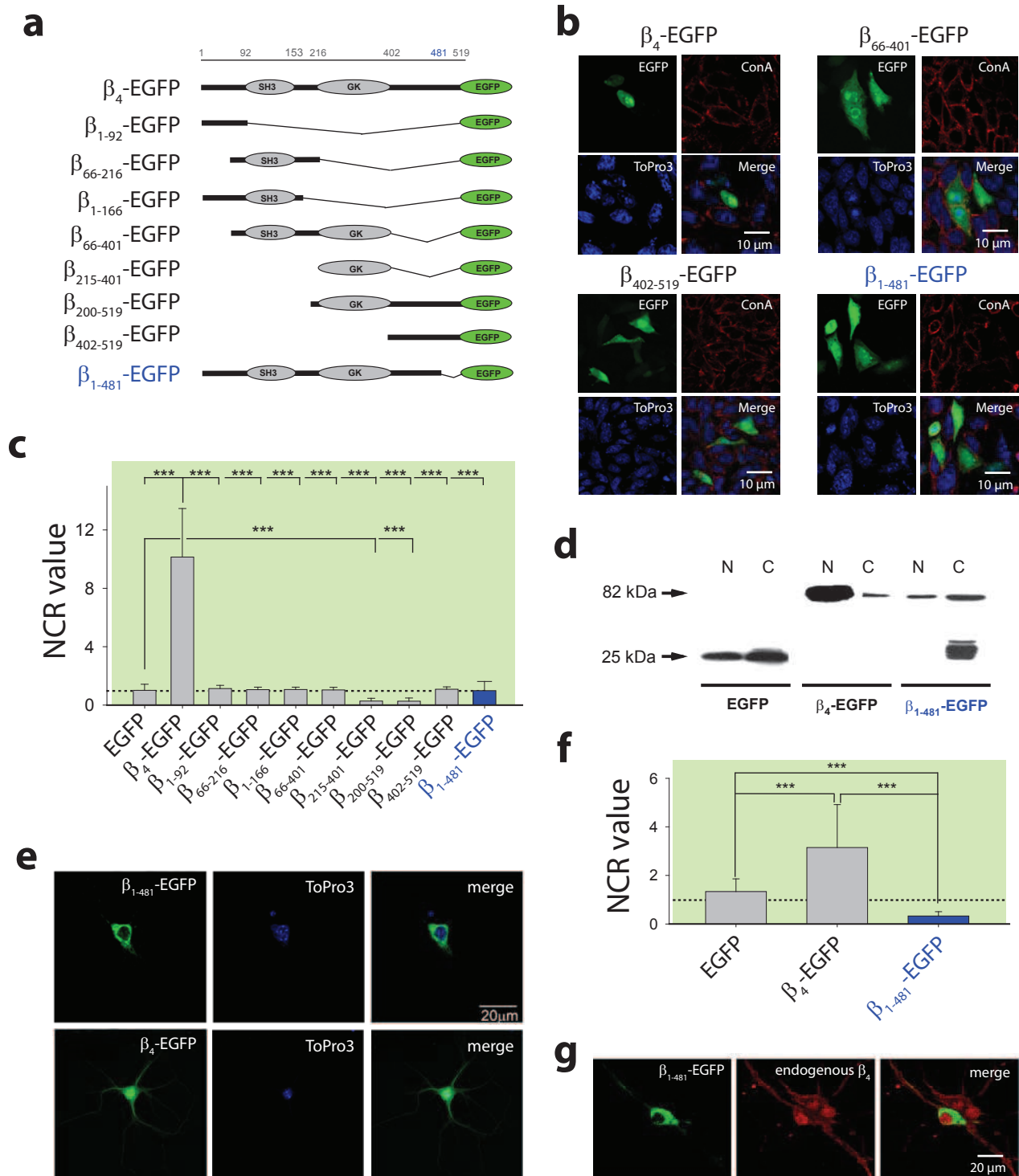


Figure 3

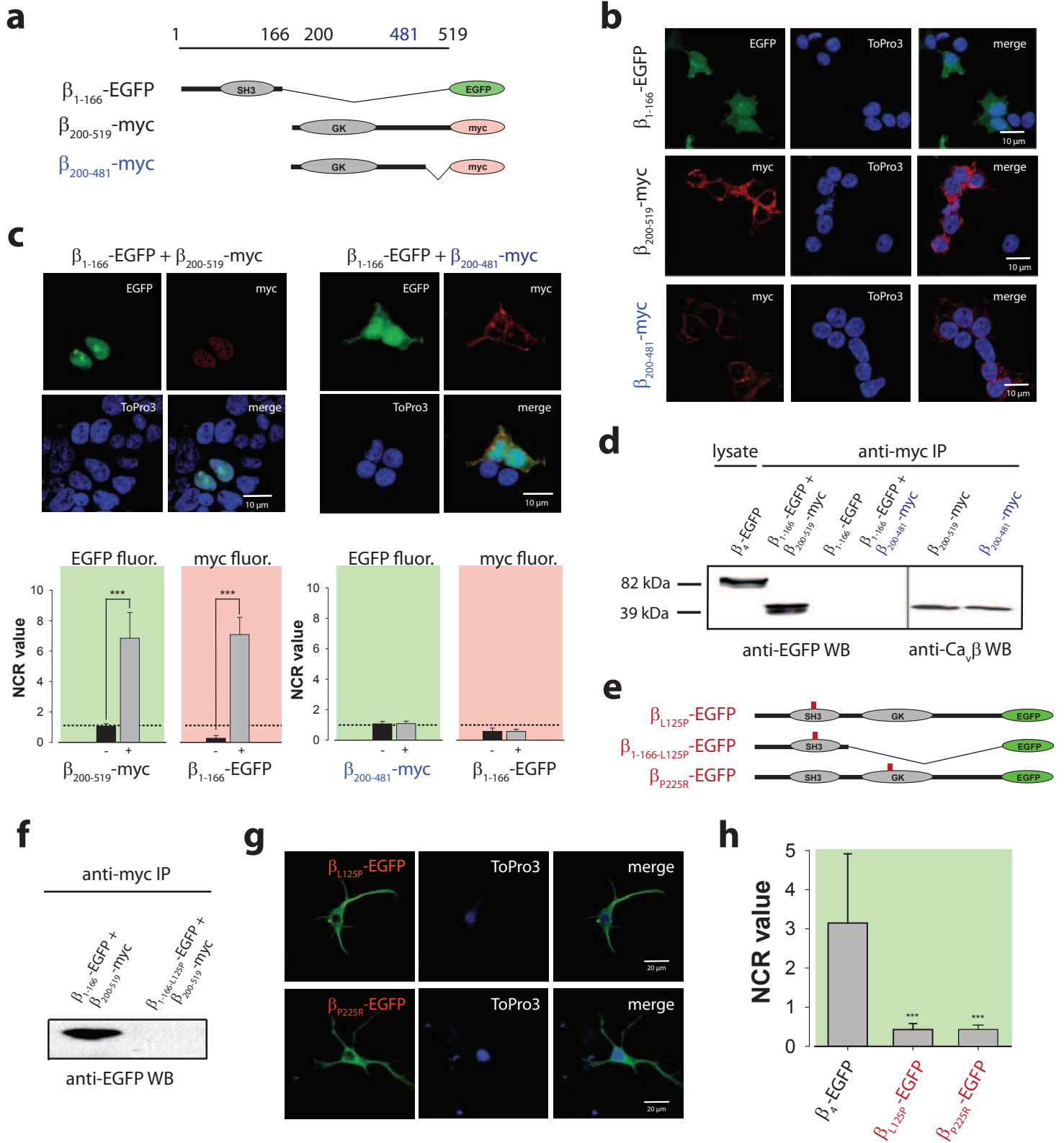


Figure 4

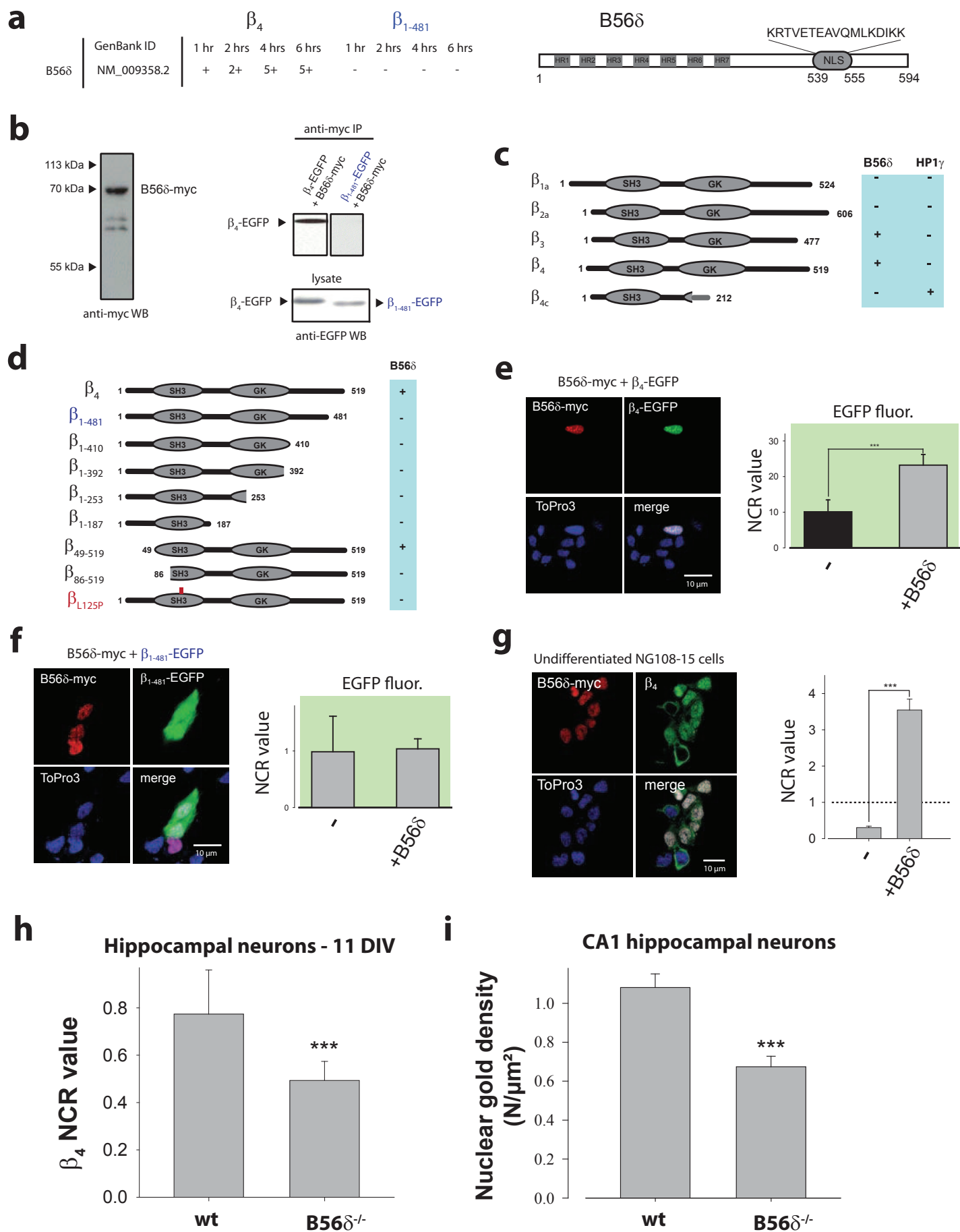


Figure 5

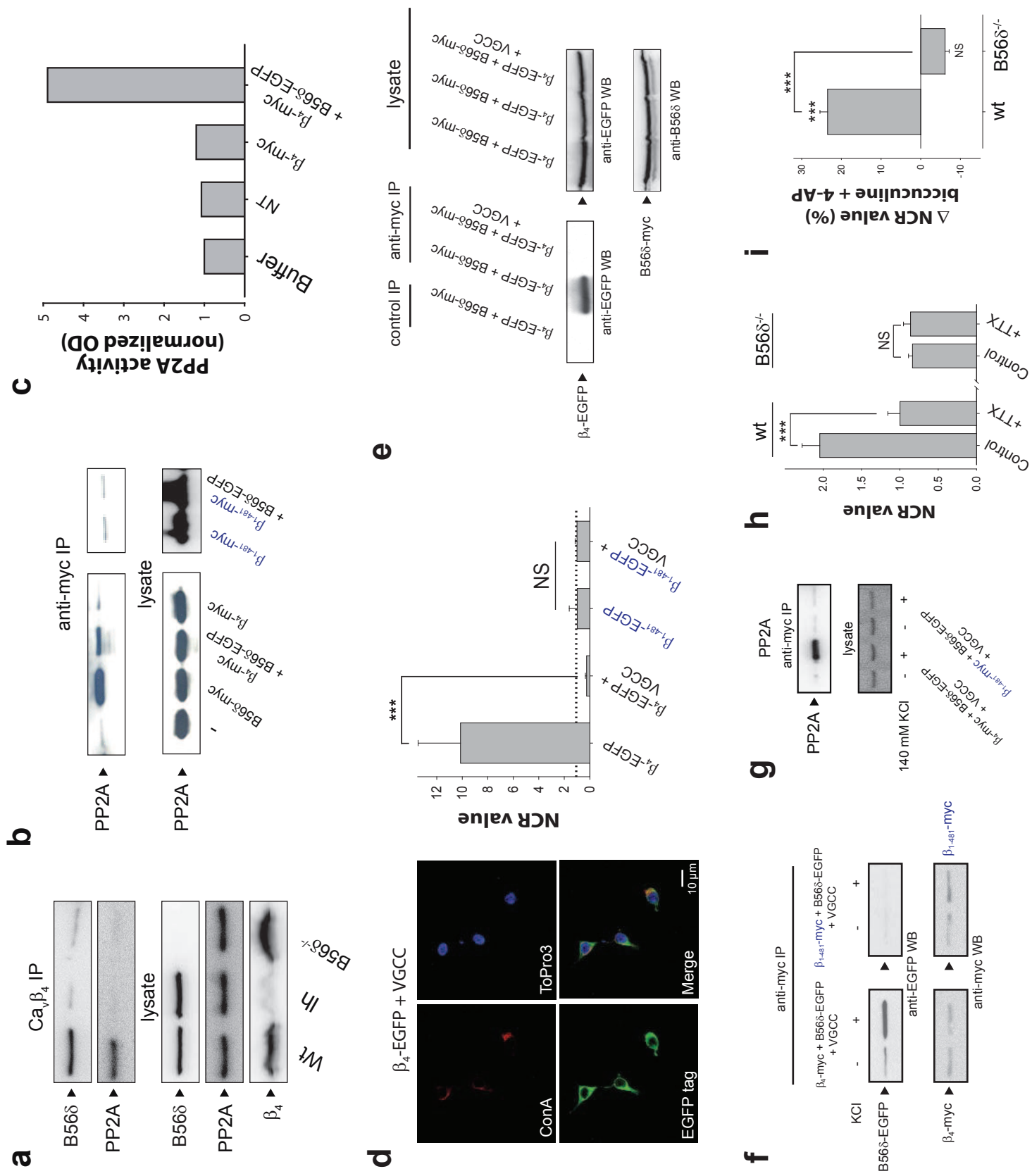
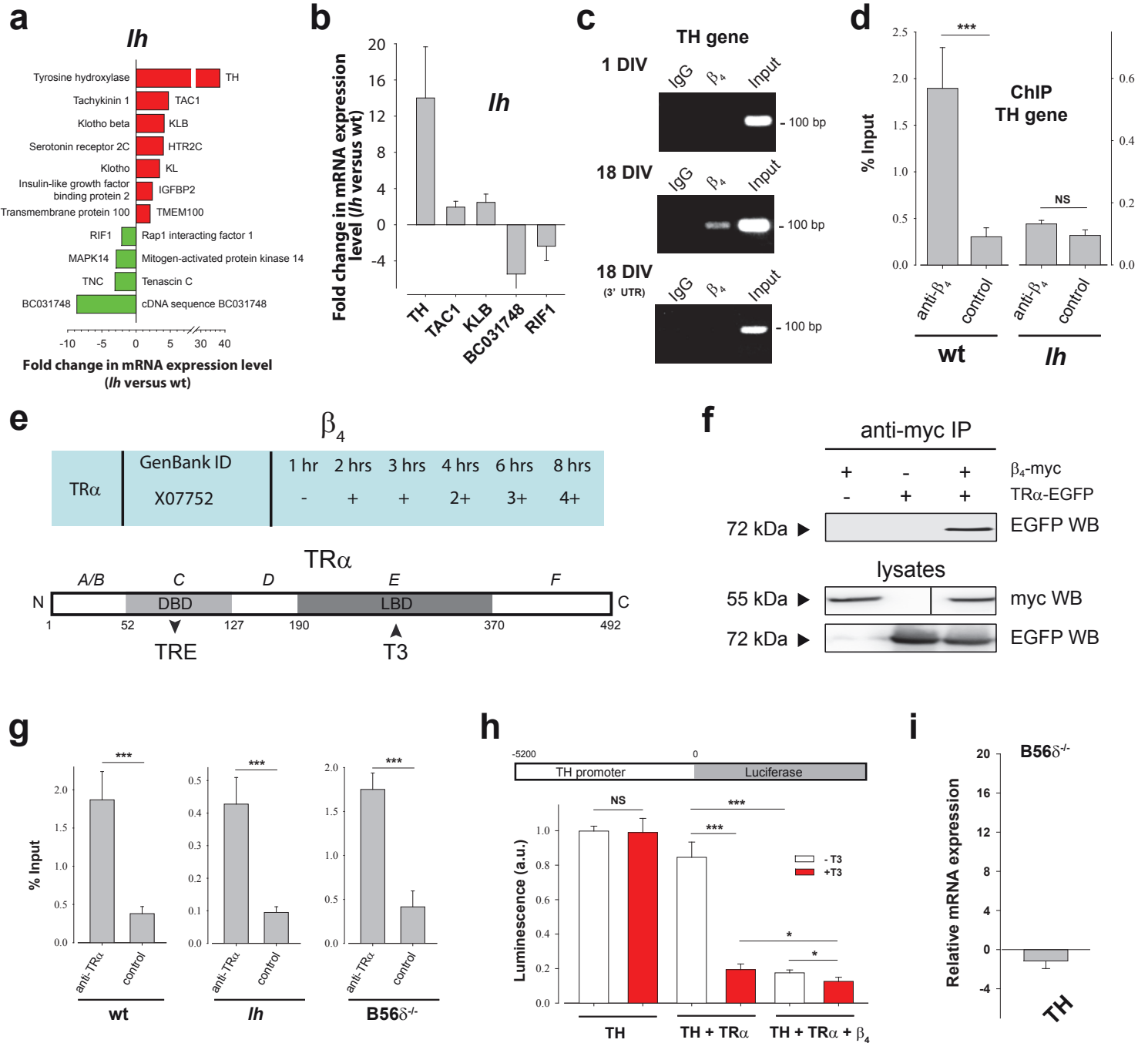


Figure 6



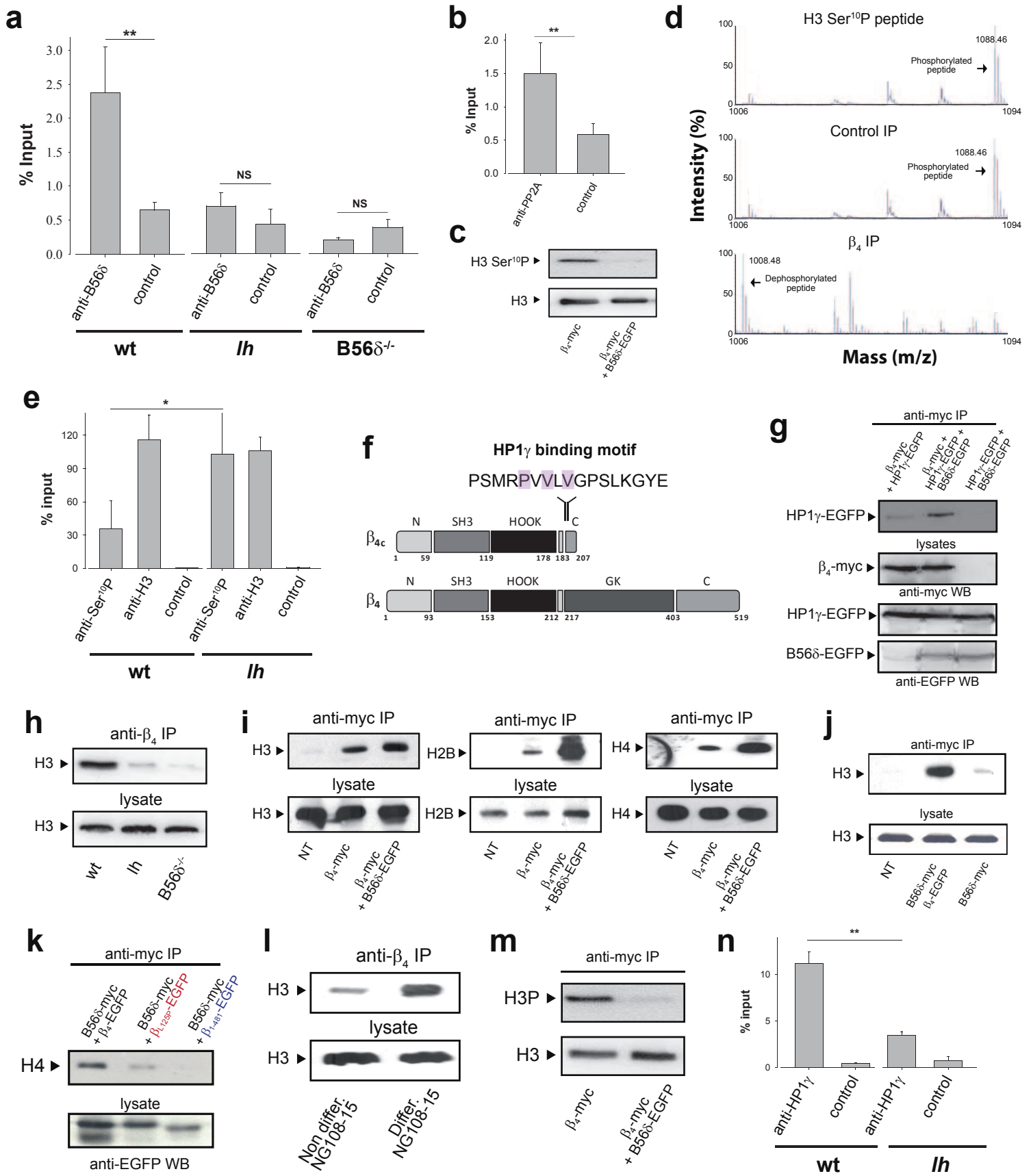
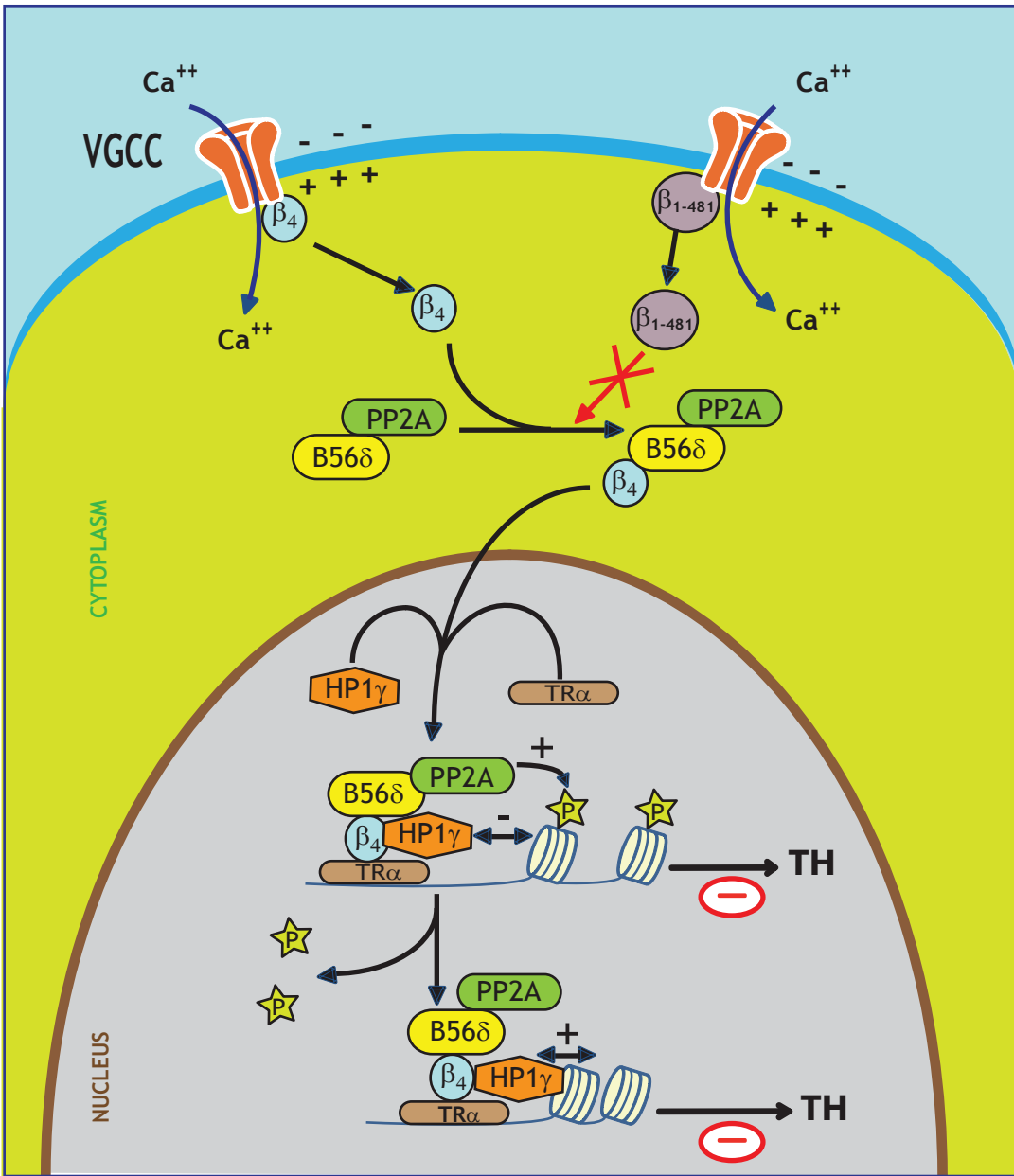


Figure 8



Supplementary data

Figure S1 EM image of the pyramidal layer of wt mice. CA3 pyramidal neurons were selected according to their typical alignment, size and shape for analysis of β_4 distribution.

Figure S2 Endogenous expression of B56 δ and HP1 γ as witnessed by Western blots.

Figure S3 B56 δ does not affect VGCC currents. (a) Representative HEK293 whole cell current recordings of *Cacna1a/Cacna2d2*/ β_4 in the absence (upper traces) or presence of B56 δ -EGFP (lower traces) at various test potentials as indicated. (b) Mean current densities at +30 mV for VGCC in the absence or presence B56 δ -EGFP (n=20). (c) Representative whole cell current recordings from wt and B56 $\delta^{-/-}$ hippocampal neurons at 7-9 DIV. Traces from -40 to 40 mV by 10 mV steps. Holding potential -80 mV. (d) Mean current densities at 0 mV for calcium channels in wt and B56 $\delta^{-/-}$ neurons.

Figure S4 Depolarization-induced interaction between B56 δ -myc and β_4 -EGFP requires external Ca^{2+} . B56 δ -myc and β_4 -EGFP were expressed in HEK293 cells in the presence of *Cacna1a/Cacna2d2* (VGCC). Cells were depolarized 30 min by 140 mM KCl in the presence or absence of 2 mM Ca^{2+} .

Figure S5 Differential transcriptional activity in *lh* versus wt mice cerebellum. (a) Volcano Plot representing the distribution of all 45,000 probe sets according to fold-change and p-value from statistical comparison between *lh* and wt cerebellum. Probe sets with adjusted p-value < 0.05 and fold-change > 2 are in red while probe sets with fold-change < - 2 are in green. (b) Pie chart showing functional classification of regulated probe sets by β_4 . Functional groups have been established using annotations from the Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org/>). The data gathered from total RNA of EGFP-transfected cells were used as a reference. (c) Statistical test on GO categories performed via <http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>.

Figure S6 ChIP of the transmembrane protein 100 (TMEM100) promoter gene. Agarose gel illustrating the immunoprecipitation of the TMEM100 gene promoter from hippocampal neurons at 1 or 18 DIV with anti- β_4 or anti-H3 antibodies.

Figure S7 Influence of B56 δ in the signalling pathway. (a) TH promoter immunoprecipitation by anti- β_4 antibodies from B56 $\delta^{-/-}$ mice brain compared to control (without antibodies) (n=6). **, p<0.05. (b) TH promoter immunoprecipitation by anti-PP2A antibodies, expressed as percentage of input, from *lh* or B56 $\delta^{-/-}$ mice brain (n=3). ***, p<0.001. (c) TH promoter immunoprecipitation by anti-Ser¹⁰P H3 or anti-H3 antibodies, expressed as percentage of input, from B56 $\delta^{-/-}$ mice brain (n=2-4). *, p<0.1. (d) KCl-induced membrane depolarization effect (140 mM, 30 min) on the interaction of β_4 -myc with histone H3 in the presence of B56 δ -EGFP and VGCC subunits. Representative example of n=2 experiments in HEK293 cells. (e) TH promoter immunoprecipitation by anti-HP1 γ antibodies, expressed as percentage of input, from B56 $\delta^{-/-}$ mice brain (n=8). ***, p<0.001.

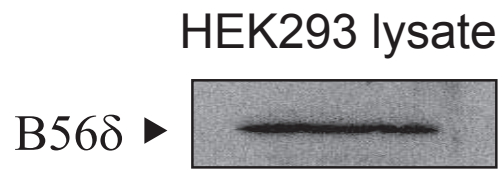
Figure S8 Primer sequences used in this study.

Figure S1



Figure S2

a



b

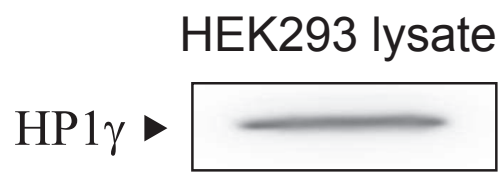


Figure S3

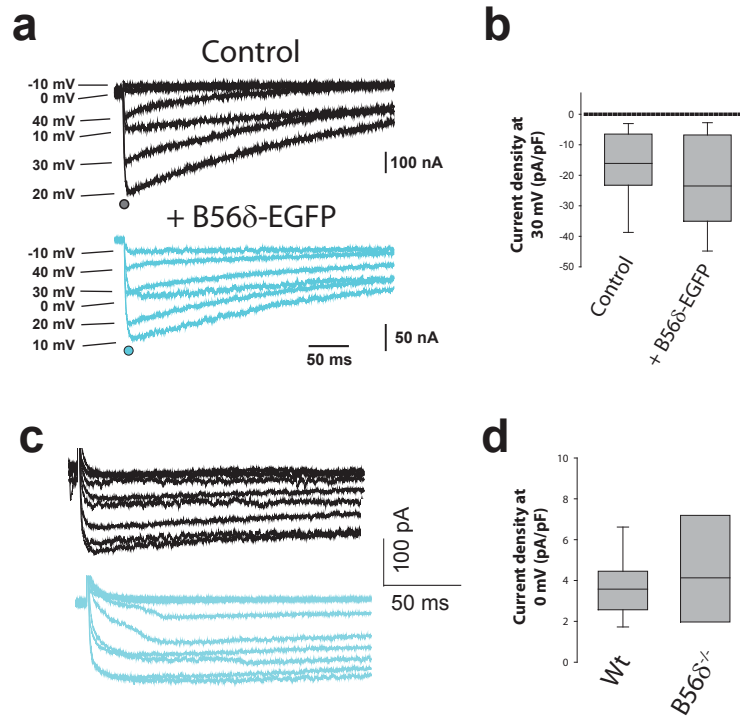


Figure S4

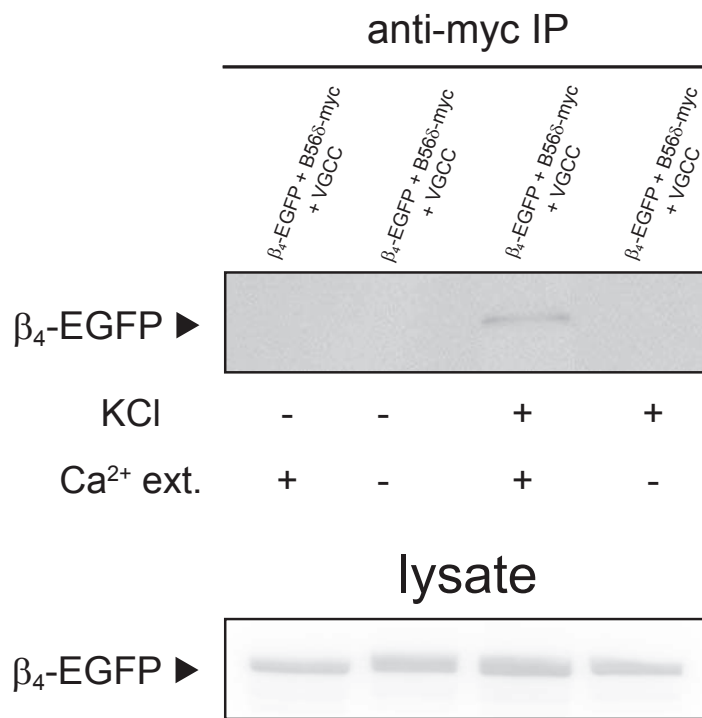
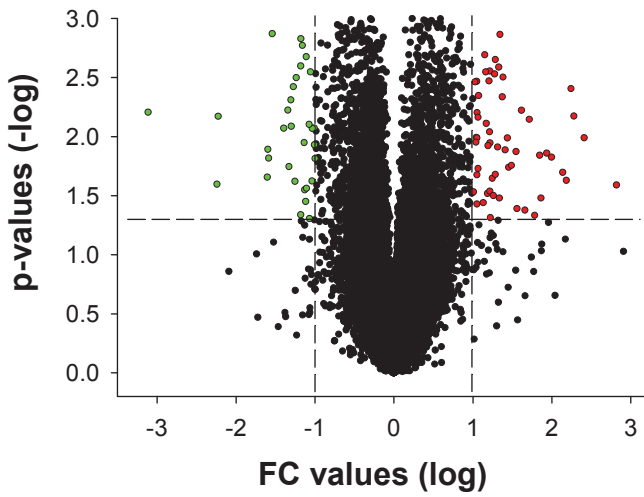
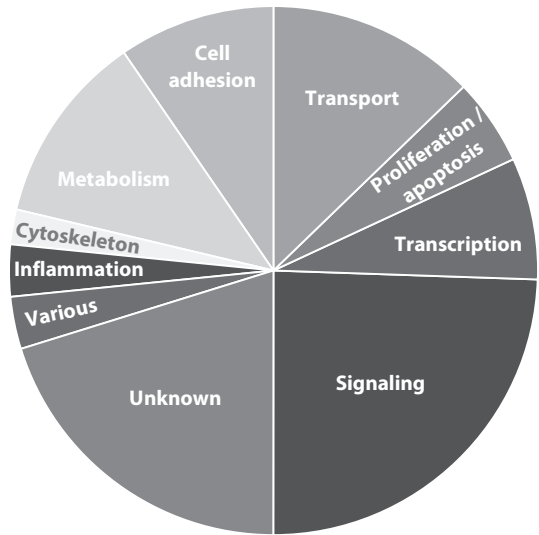


Figure S5

a



b



c

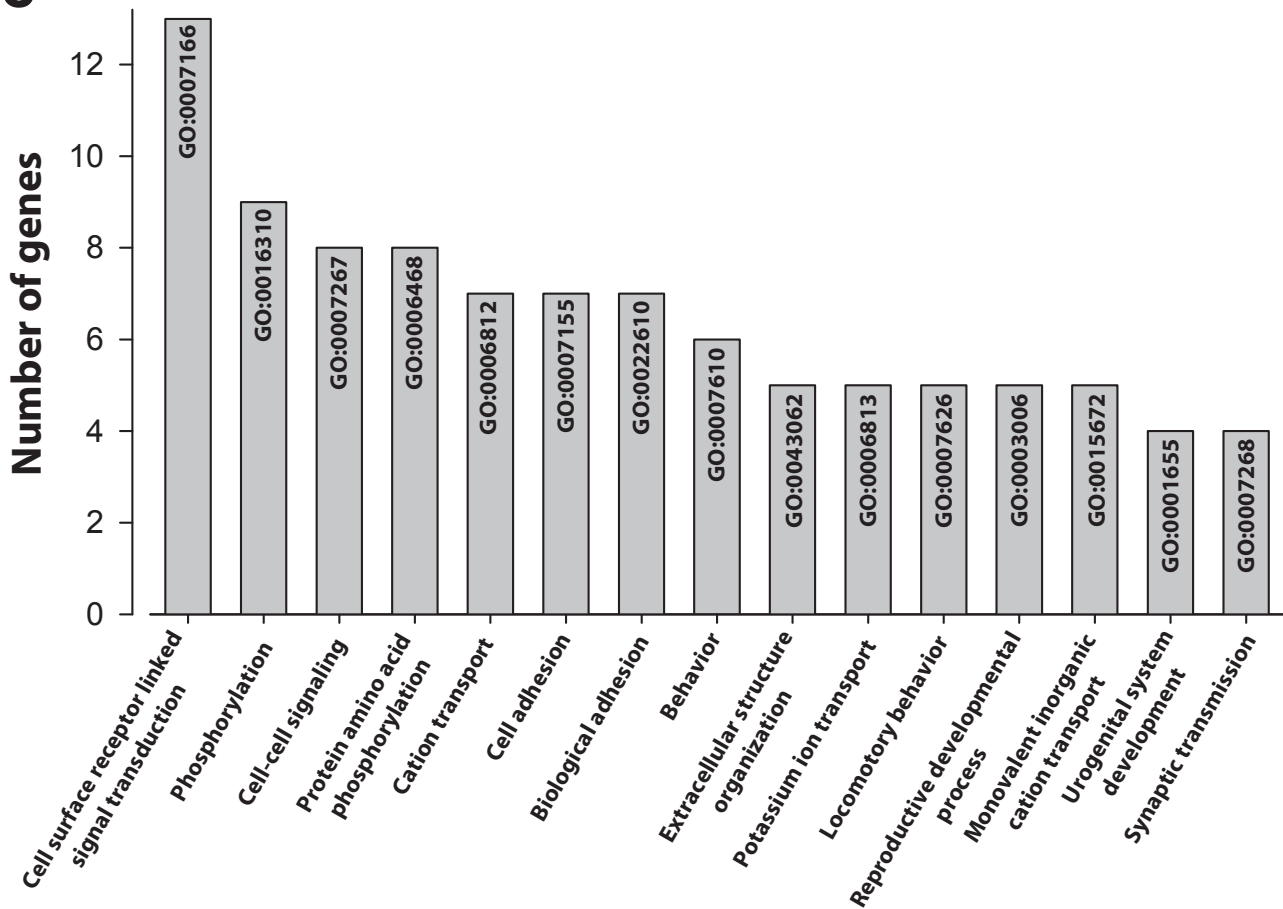


Figure S6

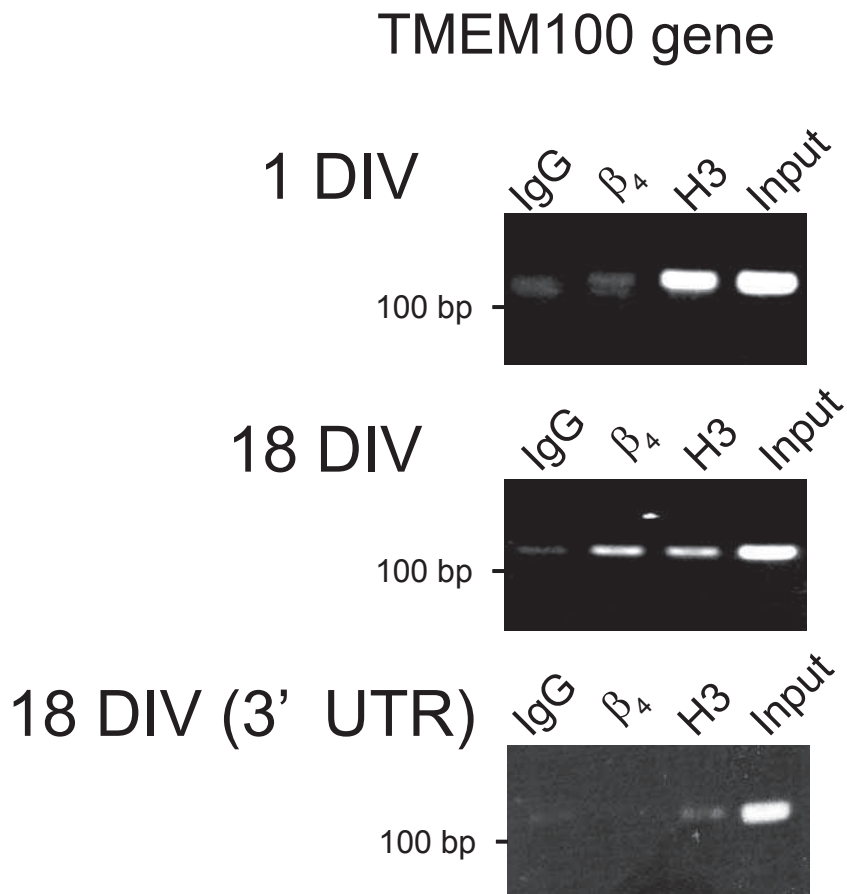


Figure S7

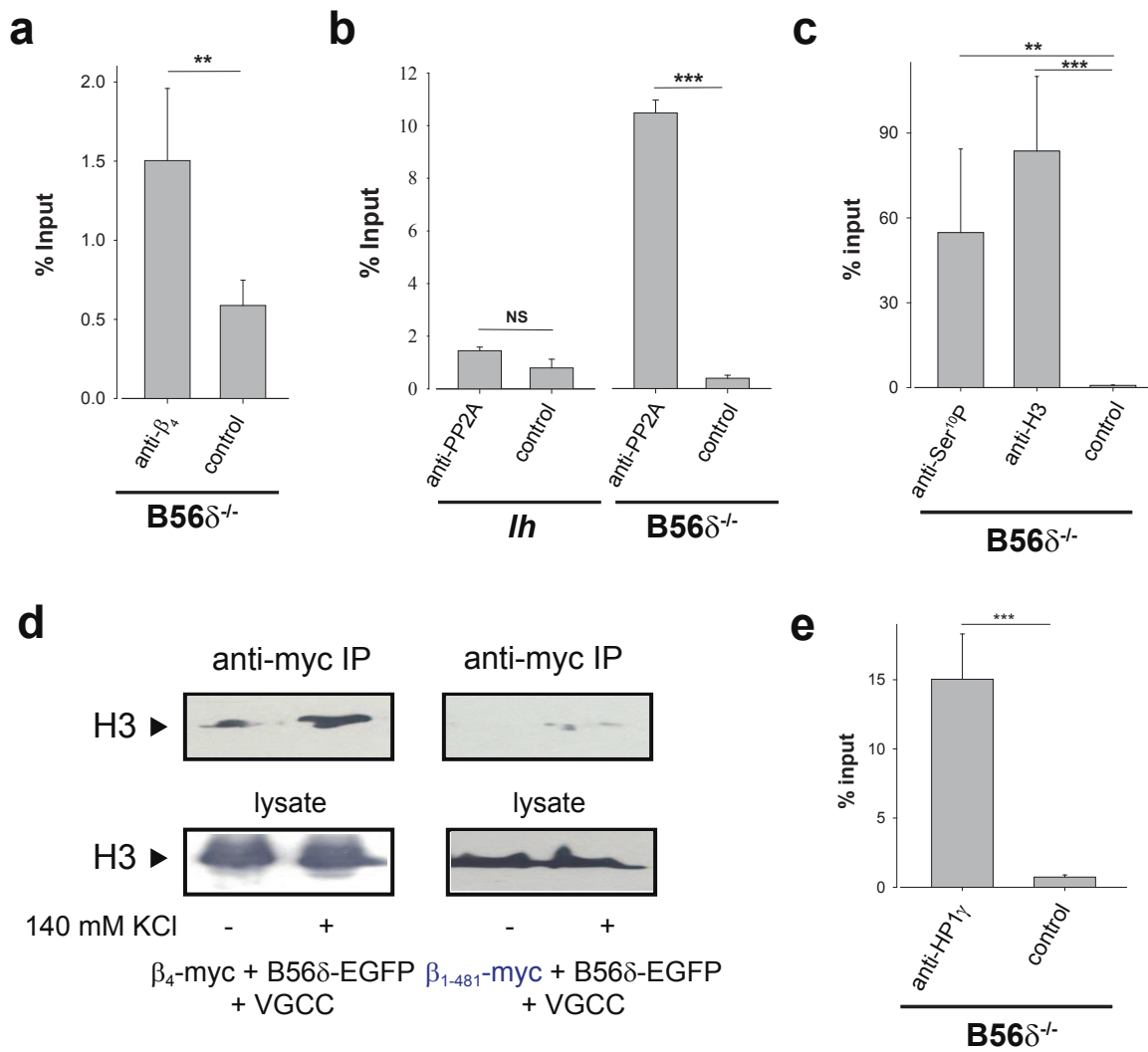


Figure S8

Real-time ChIP PCR primers

Region		Sequence	Length (bp)	Product size (bp)
TH promoter (-790/-602)	F	CAGTTGGCTCCTGAGAGTCC	20	181
	R	GAAGTGCCAAAGGACAGAGC	20	
TH 3'UTR	F	GTGTGTGGCTGGACCCTTTGA	21	127
	R	GTAGAATACAGCATGAAGGGC	21	

Real-time RT-PCR primers

mRNA		Sequence	Length (bp)	Product size (bp)
TH	F	CTCAGGAACTATGCCTCTC	19	85
	R	GACTGTCCAGTACATCAATG	20	
TAC1	F	GCAAAAAGAGCTTTAAATTCTGT	22	78
	R	CAGGGGTTTATTTACGTCTTC	21	
KLB	F	CTGAGTCTGTTCTTAAGCC	19	138
	R	ACTGGGATGGTCTTGTTT	18	
RIF1	F	GGCTTTTAGTGATTCTGTTCT	21	89
	R	TCATACTCCACATTCTCCAG	20	
BC031748	F	TCATAGATTGGCAGGACTTAT	21	125
	R	AGGTTACAGACAGCAAGAA	19	
GADPH	F	AGAACATCATCCCTGCATCC	20	232
	R	ACCTGGTCCTCAGTGTAGCC	20	
Peptidylprolyl isomerase A	F	CGAGCTGTTTGCAGACAAAG	20	227
	R	AGATGCCAGGACCTGTATGC	20	
Transferin receptor	F	AGTAGGAGCCCAGAGAGACG	20	188
	R	ACTCAGTGGCACCAACAGC	19	

Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de régulation du couplage excitation-transcription par une sous-unité des CCVD, la sous-unité β_4 . La translocation de β_4 du cytoplasme vers le noyau fait intervenir B56 δ associé à PP2A. Le mutant β_{1-481} qui n'interagit pas avec B56 δ n'est pas transloqué au noyau. Les mutants β_{L125P} et β_{P225R} avec une mutation respectivement sur le domaine SH3 et GK ont également une localisation cytoplasmique montrant l'importance de l'intégrité de l'interaction SH3/GK pour la localisation nucléaire de β_4 . La dépolarisation de la membrane représente un signal important permettant le décrochage de β_4 du canal et l'interaction β_4 /B56 δ qui favorise la translocation nucléaire de β_4 . En effet dans des cellules HEK transfectées, en présence de la sous-unité canalaire Ca_v2.1 et de la sous-unité $\alpha_2\delta$, β_4 n'interagit pas avec B56 δ alors que dans les mêmes conditions à la suite d'une dépolarisation membranaire, on observe l'interaction β_4 /B56 δ .

Dans le noyau, β_4 est responsable de la répression de l'expression du gène TH. Il est possible, à l'issu de cette étude d'avancer un modèle de régulation de l'expression génique par β_4 . Tout d'abord, β_4 au sein du complexe avec B56 δ /PP2A interagit avec TR α . Cette association cible ce complexe au niveau de la région promotrice du gène TH. β_4 /B56 δ /PP2A alors associé aux histones, déphosphoryle les histones H3 au niveau de Ser¹⁰ dans cette région promotrice. Cette modification de la chromatine favorise le recrutement de HP1 γ au niveau de la région promotrice du gène TH. HP1 γ impliquée dans la formation d'hétérochromatine pourrait expliquer la répression du gène TH par β_4 .

La mutation humaine R482X à l'origine de la délétion d'une partie du domaine C-terminal de β_4 responsable d'une forme d'épilepsie juvénile myoclonique perturbe la localisation nucléaire de β_4 . En effet, le mutant β_{1-481} incapable de s'associer à B56 δ /PP2A et de migrer au noyau, n'interagit pas avec les histones. La voie de signalisation permettant la régulation de l'expression génique n'est donc plus assurée par le mutant.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis de caractériser une nouvelle voie de régulation de l'expression génique par la sous-unité β_4 des CCVD. La localisation nucléaire de β_4 a été mise en évidence dans les neurones d'hippocampe et les cellules NG108.15 différenciées. Auparavant, β_4 avait été détectée dans le noyau de myocytes cardiaques, cellules granulaires et cellules de Purkinje de cervelet (Colecraft, Alseikhan et al. 2002; Subramanyam, Obermair et al. 2009). Nous avons identifié un nouveau partenaire de β_4 , la sous-unité régulatrice de PP2A, B56 δ permettant à β_4 de migrer au noyau. Cependant les résultats obtenus dans les neurones d'hippocampe de souris B56 $\delta^{-/-}$ montrent une diminution de seulement un tiers du ratio noyau/cytoplasme de β_4 par rapport aux souris WT. Ceci peut s'expliquer par une compensation chez ces souris déficientes en B56 δ d'autres isoformes de la sous-unité régulatrice B56 ou simplement refléter l'existence d'autres partenaires protéiques permettant à β_4 de transloquer au noyau. Il serait intéressant de soulever ce dernier point et de rechercher de nouveaux partenaires de β_4 pour son transport au noyau. A ce sujet, les récents travaux menés par l'équipe de Yang en 2010 ouvrent des perspectives intéressantes. En effet l'interaction de β_4 avec le facteur de transcription Pax6(s), une nouvelle isoforme de Pax6 laisse imaginer d'autres voies de signalisation pour la régulation de l'expression génique (Zhang, Yamada et al. 2010).

Nous nous étions spécialement intéressés à la mutation humaine R482X sur le gène CACNB4, responsable d'un type d'épilepsie myoclonique juvénile (Escayg, De Waard et al. 2000). D'après l'étude dirigée en 2000 par Meisler, le mutant β_{1-481} n'entraîne que très peu de modifications des propriétés biophysiques des CCVD ainsi la perturbation de la fonction de sous-unité auxiliaire des CCVD de β_{1-481} ne peut expliquer que trop partiellement l'apparition des crises d'épilepsie chez les patients qui portent cette mutation. La sous-unité mutante β_{1-481} est défectueuse pour la translocation nucléaire. Le phénotype des patients affectés par cette mutation pourrait donc plutôt s'expliquer par l'absence de β_4 au noyau et plus précisément par une dérégulation des processus normalement régulés par β_4 à savoir le contrôle de l'expression d'un set de gènes. Une autre mutation, C104F à l'origine d'épilepsie et d'ataxie humaine a été identifiée (Escayg, De Waard et al. 2000). Cette mutation localisée au niveau du domaine SH3 de β_4 pourrait affecter la conformation de la protéine, il serait intéressant d'étudier sa localisation (nucléaire et/ou cytoplasmique) dans un système d'expression hétérologue. Les travaux d'Ohmori et al. ont par ailleurs mis en évidence en 2008, une mutation localisée dans la partie C-terminale de β_4 , la mutation R468Q retrouvée chez un jeune patient atteint d'une sévère épilepsie myoclonique (Ohmori, Ouchida et al. 2008). L'analyse électrophysiologique dans un système d'expression hétérologue a montré que $\beta_{4-R468Q}$ entraîne une augmentation de la densité de courant Ba^{2+} par rapport à la sous-unité β_4 native. Les modifications des propriétés électrophysiologiques des CCVD régulés par $\beta_{4-R468Q}$ pourraient donc expliquer l'origine de la pathologie. Cependant il serait judicieux de regarder si ce mutant $\beta_{4-R468Q}$ transfecté dans des neurones est capable d'être transloqué dans le noyau

et d'étudier ses propriétés de régulation de l'expression génique. Par ailleurs il serait intéressant de recenser plus globalement les mutations de β_4 identifiées pour d'autres pathologies neurologiques afin de vérifier si ces mutations affectent sa localisation nucléaire et son contrôle de régulation de l'expression génique.

La sous-unité β_3 des CCVD est également capable d'être transloquée au noyau dans des cellules PC12 (Béguin, Mahalakshmi et al. 2006) et interagit et régule l'activité du facteur de transcription Pax6(S) (Zhang, Yamada et al. 2010). Les résultats obtenus par la technique du double hybride ont de plus montré l'interaction de β_3 avec B56 δ . D'autre part, des expériences de CoIP ont révélé l'interaction de β_3 mais également de β_1 et β_2 avec TR α . L'ensemble de ces éléments fournit donc de bonnes raisons de s'intéresser aux autres sous-unités β et notamment à β_3 quant à son rôle possible dans la régulation de l'expression génique. Dans un premier temps, il faudrait confirmer par CoIP dans un modèle d'expression hétérologue, l'interaction de β_3 et B56 δ . Par ailleurs, la localisation de β_3 dans des neurones devrait être examinée. L'étude de Subramanyam et al. en 2009 a montré une localisation très majoritairement cytoplasmique de β_3 lorsqu'elle est exprimée de manière hétérologue dans des myotubes dysgéniques contrairement à β_{4b} très majoritairement nucléaire (Subramanyam, Obermair et al. 2009). Cependant ces résultats doivent être relativisés quant à la localisation de β_3 puisque le muscle squelettique (c'est également le cas de β_{4b}) n'est pas un tissu où β_3 s'exprime naturellement. Si les résultats relatifs à la localisation nucléaire de β_3 et son interaction avec B56 δ s'avèrent positifs, il serait intéressant d'étudier plus précisément son rôle dans le noyau et voir si un mécanisme semblable à celui décrit pour β_4 existe.

Cette étude a montré l'importance de la dépolarisation de la membrane pour l'interaction β_4 /B56 δ en présence des CCVD. Des travaux antérieurs ont étayé les propriétés dynamiques de l'association entre la sous-unité β et la sous-unité canalaire (Restituto, Cens et al. 2001; Spafford, van Minnen et al. 2004). Cela dit, l'impact de la dépolarisation membranaire sur cette interaction reste à être étudié. De plus le mécanisme de décrochage de β_4 au canal en présence de la dépolarisation membranaire doit être précisé. La présence d'ions Ca²⁺ dans le milieu extracellulaire comme nous l'avons montré, est nécessaire à l'interaction β_4 /B56 δ permise par la dépolarisation membranaire en présence des CCVD. On peut se demander si l'entrée spécifique des ions Ca²⁺ via les CCVD de type-P/Q est importante pour le décrochage de β_4 au canal. On pourrait avoir recours aux inhibiteurs spécifiques des canaux de type-P/Q, tels que l' ω -agatoxine IVA, l' ω -agatoxine IIIA ou l' ω -conotoxine MVIIC et vérifier s'ils perturbent le décrochage de β_4 au canal et en conséquence l'interaction β_4 /B56 δ . Il serait également envisageable de suivre par vidéo-microscopie la sous-unité β_4 taggée avec une molécule fluorescente et exprimée de manière hétérologue dans des cellules HEK et d'observer à la suite d'une dépolarisation membranaire, sa dynamique de décrochage du canal.

Nous avons mis en évidence une voie de régulation et plus précisément de répression de l'expression du gène TH par β_4 . Cette voie de signalisation fait intervenir plusieurs protéines en association avec β_4 , à savoir TR α , B56 δ , PP2A et HP1 γ . Il est bien sûr envisageable que d'autres protéines fassent partie de ce complexe de régulation. Il serait important de les déterminer notamment par CoIP via β_4 en utilisant pour la révélation des Western blots, des anticorps dirigés contre des protéines connues. On pourrait notamment tester les protéines qui interagissent avec TR α , tels que SMRT, NCoR ou HDAC et interviennent dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes. Par ailleurs dans cette voie de régulation, des modifications de la chromatine sont mises en jeu. Il s'agit de la déphosphorylation des histones H3 au niveau de Ser¹⁰, essentielle au recrutement de HP1 γ au niveau de la séquence promotrice du gène TH. Il serait intéressant de vérifier si d'autres modifications de la chromatine ont lieu au niveau de la séquence promotrice du gène TH en présence de β_4 . On pourrait notamment regarder par CHIP dans la région promotrice du gène TH si des différences de méthylation des histones H3 au niveau de la lysine 9 (K⁹) sont observées entre les souris WT et *lh*. En effet la méthylation des histones H3 au niveau de K⁹ est connue pour servir de site d'accrochage de HP1 (Bannister, Zegerman et al. 2001; Lachner, O'Carroll et al. 2001).

Un mécanisme de répression du gène TH par β_4 a été avancé. On peut se demander si ce mécanisme de régulation de l'expression génique est spécifique au gène TH ou si c'est un mécanisme de régulation global, commun à d'autres gènes sur-exprimés dans la souris *lh*. Les résultats montrant une déphosphorylation globale des histones H3 au niveau de Ser¹⁰ associés à β_4 /B56 δ laisse penser que ce mécanisme de régulation et notamment les modifications de la chromatine pourraient constituer une voie de signalisation commune à la régulation de la transcription de plusieurs gènes. Pour le vérifier, il serait nécessaire par des expériences de CHIP, d'étudier l'interaction des différents acteurs de cette voie de régulation à savoir β_4 , TR α , B56 δ et HP1 γ avec les régions promotrices des gènes que nous avons identifiés comme étant sous-régulés par β_4 .

Les gènes identifiés grâce aux puces à ADN et sous-exprimés dans le cervelet de souris *lh* versus WT devraient également faire l'objet d'une étude. Il serait important de déterminer le ou les mécanismes à l'origine de l'activation de la transcription de ces gènes par β_4 dans les souris WT. Suivant la présence ou non de T3 et suivant les gènes cibles, TR α peut être engagé dans la répression ou l'activation transcriptionnelle. Il serait donc intéressant de vérifier dans un premier temps par CHIP, l'interaction de TR α et β_4 au niveau des séquences promotrices des gènes identifiés comme étant positivement régulés par β_4 comme nous l'avons fait pour le gène TH. En fonction de ces premiers résultats, on pourrait ensuite envisager d'examiner l'interaction de protéines connues pour s'associer à TR α et impliquées dans l'activation transcriptionnelle telles que SRC, CBP, TRAP, etc... avec la région

promotrice de ces gènes. Un moyen de s'assurer que TR α intervient globalement dans la régulation des gènes identifiés serait de mesurer l'effet du statut thyroïdien (hyperthyroïdie ou hypothyroïdie) de la souris *lh* et WT sur l'expression des gènes préalablement identifiés comme étant positivement ou négativement régulés par β_4 . Une autre solution serait d'avoir recours à la souris KO pour TR α . Ce modèle nous permettrait d'ailleurs dans un premier temps de vérifier par la technique de ChIP que β_4 se fixe bien au promoteur du gène TH *via* TR α .

La forte surexpression de TH observée dans le cervelet chez les souris *lh* est un fait assez intrigant. La question de ces conséquences physiologiques sur les phénotypes de ces souris semble tout à fait légitime. TH est une enzyme appartenant à la famille des hydrolases des acides aminés aromatiques qui catalyse la première réaction de la voie de synthèse des catécholamines. Particulièrement TH convertit la tyrosine en DOPA (Nagatsu, Levitt et al. 1964). Les souris WT expriment le gène TH à de faibles niveaux dans les cellules de Purkinje (Hess et Wilson 1991; Austin, Schultzberg et al. 1992; Abbott, Isaacs et al. 1996). L'augmentation de l'expression de TH en ARNm et protéines a déjà été rapportée dans les cellules de Purkinje de souris adultes tottering, leaner et Nagoya (souris identifiées pour leur mutation au niveau du gène *Cacna1* codant pour la sous-unité Ca $_v$ 2.1 des CCVD et présentant un phénotype ataxique) par rapport aux souris WT (Hess et Wilson 1991; Sawada, Komatsu et al. 1999). Il a été étayé que cette sur-expression de TH pourrait refléter une augmentation des niveaux de Ca $^{2+}$ intracellulaires et être impliquée dans la pathogenèse de ces souris mutantes (Sawada et Fukui 2001). Il serait donc intéressant de regarder si la surexpression de TH (en ARNm) observée dans le cervelet des souris *lh*, s'accompagne d'une augmentation de cellules de Purkinje exprimant TH. La phosphorylation joue un rôle important dans la régulation de l'activité de la tyrosine hydroxylase, il a d'ailleurs été noté que l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases provoque une augmentation de l'activité de TH. Afin d'estimer l'implication de la surexpression de TH chez les souris *lh* sur l'apparition du phénotype *lh* avec notamment les troubles d'ataxie motrice, on pourrait donc tester l'effet de l'acide okadaïque ou d'un inhibiteur de la tyrosine hydroxylase sur l'aggravation ou l'amélioration de ce phénotype. Cette sur-expression de TH dans le cervelet des souris *lh* n'est en tout cas pas anodine et pourrait expliquer en partie le phénotype neurologique très complexe de ces souris encore très mal compris.

De façon étonnante, notre étude transcriptomique réalisée dans le cervelet n'a pas révélé de modification chez la souris *lh* de l'expression de gènes impliqués dans le système GABAergique (récepteurs GABA ou enzymes responsables de la synthèse de GABA). Il est vrai que la concentration de GABA diminue significativement dans le cervelet de souris *lh* par rapport aux souris WT (De Luca, Di Giorgio et al. 2005). De plus, dans d'autres régions du cerveau notamment le thalamus, des modifications du système GABAergique avec une augmentation de la densité des récepteurs GABA $_b$ et

une augmentation de l'expression de GAD67, une glutamate décarboxylase ont été détectées (Hosford, Clark et al. 1992; Hosford, Lin et al. 1995; Lin, Barun et al. 1999). Les résultats de notre étude transcriptomique pourraient s'expliquer par une compensation par d'autres sous-unités β , telles que β_{1b} , β_2 ou β_3 également exprimées dans le cervelet (Vance, Begg et al. 1998; Pagani, Song et al. 2004). Dans le cadre de la compréhension de la pathogenèse *lh*, il serait vraiment essentiel d'une part d'analyser les données d'études transcriptomiques déjà entreprises dans l'hippocampe et le cortex de souris *lh* versus WT et d'autre part de réaliser une étude transcriptomique dans les régions thalamiques dont on connaît l'importance dans l'apparition des troubles neurologiques dont souffrent la souris *lh*. Connaissant l'influence de TR α sur la neurotransmission GABAergique, ces études apparaissent d'autant plus intéressantes. Effectivement les souris déficientes en TR α 1 présentent une diminution des terminaisons GABAergiques dans le CA1 de l'hippocampe (Guadano-Ferraz, Benavides-Piccione et al. 2003). Sachant par ailleurs l'importance de ce facteur de transcription dans la voie de régulation par β_4 de la transcription, c'est un point qu'il est important de soulever.

Le travail déjà réalisé ouvre donc de nombreuses pistes de recherche. La voie de signalisation que nous avons décrite et par laquelle la sous-unité β_4 convertit un signal électrique en réponse transcriptionnelle laisse entrevoir le potentiel de cette sous-unité en dehors de sa fonction de sous-unité régulatrice des CCVD. Les rôles joués par β_4 dans le noyau doivent être explorés plus en détail. D'autre part, ces recherches permettent d'appréhender différemment les mécanismes physiopathologiques à l'origine du phénotype *lh* qui demandent à être approfondis.

Annexes

Annexe 1

The Spatial Organization of Proton and Lactate Transport in a Rat Brain Tumor

Emmanuelle Grillon, Régine Farion, Katell Fablet, Michel De Waard, Chung Ming Tse, Mark Donowitz, Chantal Rémy, Jonathan A. Coles

Article paru dans le journal PLoS One Vol.2, No.2, 2011.

The Spatial Organization of Proton and Lactate Transport in a Rat Brain Tumor

Emmanuelle Grillon^{1,2}, Régine Farion^{1,2}, Katell Fablet^{1,2}, Michel De Waard^{1,2}, Chung Ming Tse³, Mark Donowitz³, Chantal Rémy^{1,2}, Jonathan A. Coles^{1,2,4*}

1 Unit 836, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, La Tronche, Isère, France, **2** Grenoble Institut des Neurosciences, Université Joseph Fourier, Grenoble, France, **3** Gastroenterology Division, Departments of Physiology and Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, United States of America, **4** Centre for Biophotonics, University of Strathclyde, Glasgow, United Kingdom

Abstract

Tumors create a heterogeneous acidic microenvironment which assists their growth and which must be taken into account in the design of drugs and their delivery. In addition, the acidic extracellular pH (pHe) is itself exploited in several experimental techniques for drug delivery. The way the acidity is created is not clear. We report here the spatial organization of key proton-handling proteins in C6 gliomas in rat brain. The mean profiles across the tumor rim of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1, and the lactate-H⁺ cotransporter MCT1, both showed peaks. NHE1, which is important for extension and migration of cells *in vitro*, showed a peak 1.55 times higher than in extratumoural tissue at 0.33 mm from the edge. MCT1 had a broader peak, further into the tumor (maximum 1.76 fold at 1.0 mm from the edge). In contrast, MCT4 and the carbonic anhydrase CAIX, which are associated with hypoxia, were not significantly upregulated in the rim. The spatial distribution of MCT4 was highly correlated with that of CAIX, suggesting that their expression is regulated by the same factors. Since protons extruded by NHE1 diffuse away through extracellular clefts, NHE1 requires a continuous source of intracellular protons. From the stoichiometries of metabolic pathways that produce or consume H⁺, and the greater availability of glucose compared to oxygen in most parts of a tumor, we support the classic view that most of the net proton efflux from C6 gliomas originates in glycolytic formation of lactate and H⁺ inside the tumor, but add that some lactate is taken up into cells in the rim on MCT1, and some lactate diffuses away, leaving its associated protons available to re-enter cells for extrusion on NHE1. Therapeutic inhibition of NHE1, MCT1 or CAIX is predicted to affect different parts of a tumor.

Citation: Grillon E, Farion R, Fablet K, De Waard M, Tse CM, et al. (2011) The Spatial Organization of Proton and Lactate Transport in a Rat Brain Tumor. PLoS ONE 6(2): e17416. doi:10.1371/journal.pone.0017416

Editor: Joseph Najbauer, City of Hope National Medical Center and Beckman Research Institute, United States of America

Received: October 25, 2010; **Accepted:** February 1, 2011; **Published:** February 24, 2011

Copyright: © 2011 Grillon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Supported by program grant U836 of INSERM and Action Concertée Incitative 2008-2009 INCa (C.R.), NIDDK R01 DK26523 and DK61765 and Hopkins Basic Research Digestive Diseases Development Core Center R24 DK 64388 (M.D.). Some imaging and expenses of JAC were supported by the Sir David Anderson Bequest from the University of Strathclyde. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Jonathan.Coles@glasgow.ac.uk

Introduction

For a systemically administered drug to act preferentially on a tumor, the drug must recognize some specific characteristic of the tumor. The most widely-exploited characteristic is the rapid replication of DNA, which suffers from being shared by cells of the bone marrow, gut and hair roots. Inhibition of angiogenesis has given disappointing results in the long term [1]. Another specific characteristic of tumors, which concerns us here, is their unusually acidic extracellular pH (pHe). Most normal cells have an intracellular pH (pHi) of 7.1–7.2 and are bathed by extracellular fluid with a lower H⁺ activity corresponding to a pH of 7.4. In tumor cells, the transmembrane gradient of H⁺ activity is reversed: pHi can be greater than 7.3 [2–5], and pHe is typically in the range 6.4–7.0 [6–12]. The acidic pHe contributes to the invasiveness of tumors [2,10,11,13,14] and clinical trials are in progress using a pro-drug that is cleaved in the acidic environment to release an inhibitor of proton pumps [11]. Tumors overexpress extracellular proteinases [15], and these too are being used, in animal models, to target molecules by cleaving linkers and activating cell penetrating peptides [16]. Available data suggest

that both the secretion and the catalytic activity of proteinases, including matrix metalloproteinases (MMPs), are increased at acidic pHs [17,18] and that they promote the progression of tumors [19].

In addition to the unusual absolute value of pHe in tumors, the unusual transmembrane pH gradient can also be exploited to target drugs. Most simply, the pH gradient causes intracellular accumulation of drugs that are weak acids, while weak bases tend to be excluded (although the actual distribution may be dominated by other processes, such as extrusion of the drug on a drug transporter) [20–22]. More sophisticated use of the pH gradient includes attaching a drug or a fluorescent marker to a pH-sensitive carrier [23–25]. A different use that has been suggested for the acidic pHe is to image it non-invasively by magnetic resonance techniques as an aid to diagnosis or for following the effects of therapy [8,26].

In order to optimize therapeutic strategies that exploit the acidic pHe, or target the mechanisms underlying it, it would be useful to understand what causes it. Extracellular H⁺ ions can diffuse freely through extracellular clefts and so the accumulation of H⁺ represented by an acidic pHe can only be maintained if H⁺ ions

(or some other acid equivalent) are continually generated within, and exported from, the tumor cells [10,27,28]. The main source is the conversion of glucose to equal numbers of lactate-ions and H^+ ions: $C_6H_{12}O_6 = 2C_3H_5O_3^- + 2H^+$ [29–31]. In the steady state, lactate-must leave the cell at a rate equal to its production. Driven by their concentration gradient, lactate-ions leave the cells in one-to-one association with H^+ ions, either by diffusion of neutral lactic acid, or on a cotransporter of the MCT class [31,32]. The isoforms MCT1 (SLC16A1) and MCT4 (SLC16A3) are upregulated in at least some tumors [33,34]. In the steady state, the concentrations of products of ancillary reactions, such as conversion of NAD to NADH, are recycled so they do not contribute to any net flux of acid equivalents. Hence, production of lactic acid decreases pHe without (in the steady state) acid-loading the cells. Despite producing large amounts of lactate, even in the presence of oxygen [29,30,35–37] parts of tumors also oxidize glucose completely to CO_2 [5,30]. In the steady state, all the CO_2 generated must effectively leave the cell, and it can do this by diffusion through the lipid membrane [38,39] or perhaps through aquaporins [40]. On arrival in the extracellular space, CO_2 reacts with water in the presence of carbonic anhydrase ($CO_2 + H_2O = H^+ + HCO_3^-$) and thereby makes a contribution to extracellular acidity [5]. CO_2 is also in equilibrium with H^+ and HCO_3^- within the cell, so if HCO_3^- were to continually leave the cell, oxidative metabolism would tend to decrease pHi. However, HCO_3^- is generally transported into, rather than out of, cells [41,42] and removal of CO_2/HCO_3^- increases pHi in U118 glioma cells [2]. The synthesis from glucose and glutamine of molecules for cell growth appears in most cases to consume H^+ (see Discussion). Thus the net effect of metabolism, in conjunction with export of its products, appears not to decrease pHi in the steady state, but it does decrease pHe.

However, the unusual inward gradient of $[H^+]$ into tumor cells subjects them to an abnormally large influx of acid equivalents that leak through ion channels or are carried on imperfectly specific transporters. It is therefore unsurprising that mechanisms for exporting acid equivalents are upregulated in tumors. Upregulation has been reported of the Na^+/H^+ exchanger NHE1 (SLC9A12, ref. [3]), and of the plasma membrane $V-H^+$ -ATPase [43]. NHE1 is interesting because numerous studies have shown that in cancer cells growing or migrating *in vitro* it is concentrated at the leading edge of "invadopodia" [3,44–47]. NHE1, which is the primary regulator of pHi in almost all normal cells, uses the inward electrochemical gradient of Na^+ to extrude protons. Its greater activity at the leading edge of migrating cells causes a local increase in pHi and a decrease in pHe, both of which promote cell extension [46]. Raised pHi remodels the cytoskeleton, while lowered pHe modifies attachment to substrate and disrupts extracellular matrix [46,48]. In addition to modifying pH, the NHE1 molecule contributes to cell migration by interacting directly with other macromolecules [47,49]. Inhibition of NHE1 slows tumor growth [3,50,51]. These results suggest that in tumors *in vivo*, NHE1 may have a role beyond regulation of pHi and might be concentrated near the growing borders. As part of the present work, we tested this hypothesis for the case in a rat model of glioma, grown from the C6 cell line.

If NHE1 is extruding protons and creating a locally acidic pHe, then where do these protons come from? (They cannot simply re-enter the cell close to where they are extruded as this would destroy the acidic pHe.) Sonveaux et al [14] provide a hint: they showed that in SiHa tumors, MCT1 is highly expressed in the rim of the tumor, where the energy metabolism is likely to be oxidative. They suggest that here MCT1, instead of exporting lactate, takes it up, as a substrate for oxidative metabolism. They do not discuss proton fluxes, but protons will presumably

accompany lactate. Although, as we shall show in the Discussion, these protons do not constitute the internal source for NHE1, Sonveaux et al [14] do introduce the idea of fluxes between tumor cells. We have therefore compared the spatial distribution of MCT1 in C6 rat gliomas to that of NHE1.

To obtain a fuller picture, we also looked at two other proteins associated with H^+ transport. These are the MCT isoform, MCT4 (SLC16A3), which is present on astrocytes [52], can be induced by hypoxia via the Hypoxia-Inducible Factor 1α (HIF- 1α [34]), and is upregulated in parts of some tumors [53,54]. We have also looked at an isoform of the enzyme carbonic anhydrase, CAIX, which is also upregulated *in vitro* by HIF- 1α and, like MCT4, has been found in hypoxic parts of tumors [55–60]. Carbonic anhydrases, which catalyse the reaction $H^+ + HCO_3^- = CO_2 + H_2O$, can facilitate the diffusion of proton equivalents through extracellular space [5,61]. The presence of a carbonic anhydrase close to an H^+ transporter can increase the transporter's efficacy [62].

Our results show that gene expression in the growing border of a C6 glioma is spatially organized and confirm the hypothesis that expression of NHE1 is upregulated in the growing rim of a tumor *in vivo*. We also introduce a new technique for identifying pairs of proteins whose expression is regulated by common factors. Taken together with stoichiometric constraints, and the knowledge that low pHe favors tumor growth, the results suggest that lactate and H^+ ions flow between cells in a way that is a compromise between efficient use of oxygen and glucose for cell growth, and the creation of localized pH microenvironments.

Results

NHE1 and MCT1 peak in the tumor rim

Coronal brain sections were selected that passed approximately through the equator of the C6 gliomas; the shorter diameters ranged from 1.94 to 8.0 mm (Fig. 1 A–C). In general, on each section, we stained nucleic acids with Hoechst 33342 and immunolabeled two of four proteins involved in proton transport: NHE1, MCT1, MCT4 and CAIX. The mean labeling intensities of large regions of interest (ROIs) within each labeled glioma were compared to the mean intensities in extratumoral tissue. The ratios were as follows. NHE1: mean = 1.15, s.e.m. = 0.10, n = 10 tumors, P for difference from 1 = 0.15. MCT1: 1.392 ± 0.078 , n = 10, P = 0.0007. MCT4: 1.34 ± 0.18 n = 8, P = 0.105. CAIX: 1.14 ± 0.14 n = 7, P = 0.36. Note that only for MCT1 was the ratio significantly greater than 1. All four proteins were detected in both normal brain and in the gliomas. Increased Hoechst labeling near the perimeters of the gliomas was evident (Figs 1B,C). For none of the four proteins was a convincing pattern of labeling apparent on visual inspection of the tumor rim, but patterns became evident on measured intensity profiles. In each section, we selected 1–3 sites on the tumor border where the Hoechst staining indicated a well-defined rim confronting neuronal tissue (rather than the brain surface). We imaged rows of 10–20 microscope fields to give composite images of bands of tissue each $387.5 \mu m$ wide with their long axes perpendicular to the border. The "tile scan" corresponding to the narrow rectangle in Fig. 1C is shown in Fig. 1D for the Hoechst fluorescence, and the part of this covering the glioma rim is expanded in Fig. 1E together with the corresponding images for NHE1 and MCT1. The intensity profiles along the images for each band were measured. We defined the edge of the tumor to be where the rise in Hoechst staining began (Figs. 1F,G, 2A). In almost all cases, NHE1 immunofluorescence showed a peak 0.25 – 0.4 mm into the tumor (Fig. 1F). We obtained 22 NHE1 profiles from 10 tumors, normalized each one so that the average intensity over 1 mm

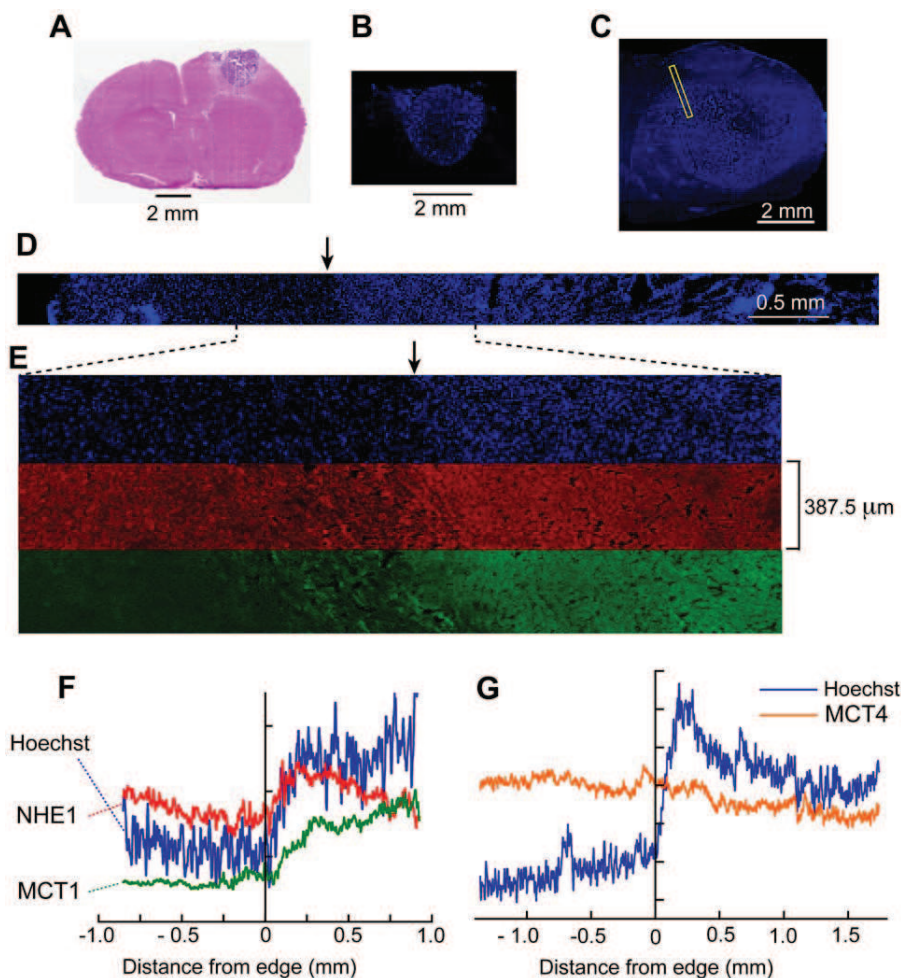


Figure 1. Immunofluorescence profiles across the tumor border. (A) A section of a small C6 glioma stained with haematoxylin-eosin; (B) part of an adjacent section with nucleic acids stained with Hoechst 33342. (C) Another glioma stained with Hoechst and showing a strip crossing the border that was tilescanned. (D) The Hoechst tilescan of the strip indicated in (C). (E) Portions of the tilescan for Hoechst (blue) NHE1 (red) and MCT1 (green). (F) Intensity profiles of the strips in (E) with positive distances directed into the glioma. From the Hoechst profile, it was possible to identify the approximate position of the tumor border on the micrographs (arrows in D and E). (G) Intensity profiles from another section labeled for MCT4 showing it does not increase markedly in the rim. doi:10.1371/journal.pone.0017416.g001

outside the tumor ($-1 \text{ mm} < x < 0$) was set at 1 and averaged them. No profiles were excluded from analysis.

In the mean NHE1 profile (Fig. 2B), the peak is well-defined. In contrast, the mean intensity of CAIX labeling showed no significant change across the rim (Fig. 2C). This absence of a peak in CAIX labeling suggests that the NHE1 peak was not an artifact, due, for example, to uneven tissue shrinkage. (In agreement with reports on other types of tumor, more intense CAIX labeling was present in small areas deep in the tumor, in tissue that was probably hypoxic [see 63]) The distance from the tumor edge of the NHE1 peak varied somewhat between individual profiles, so when the profiles were averaged (to give Fig 2B) the peak was somewhat flattened out. To avoid this, we also measured the peak amplitude and its position on the individual profiles, obtained average values for each tumor and calculated the overall means. Calculated in this way, the mean intensity of the NHE1 peak was 1.55 times the intensity outside the tumor (SEM = 0.10, $n = 10$ tumors, $P = 0.0005$). This figure still slightly underestimates the true difference in the expression of NHE1 protein between the peak and extratumoral tissue because no correction was made for non-specific labeling by the secondary

antibody (see Supporting Information, Text S1, Figure S1). The anti-NHE1 peak was on average 0.330 ± 0.027 mm from the edge. This position was not significantly different from the mean position of the Hoechst peak (0.379 ± 0.029 mm).

Labeling of MCT1, which can transport lactate and H^+ either out of or into cells [64], peaked near the rim (Fig. 2D); the average distance of the MCT1 peak from the edge was 1.05 ± 0.14 mm (9 gliomas) significantly greater than the distance of the NHE1 peak ($P = 0.0001$). Mean values for the peaks and their distances from the tumor edge for Hoechst, NHE1 and MCT1 are shown in Fig. 2F. For MCT4, as for CAIX, we did not detect a significant increase in labeling in the rims of these gliomas (Fig 2E). The means of the ratios of the intensity at 1 mm from the edge to the intensity outside were, for MCT4, 1.31, S.D. = 0.47, $n = 8$ and, for CAIX, 1.17, S.D. = 0.35, $n = 7$.

MCT4 and CAIX are spatially correlated

Profiles of labeling intensity for MCT4 and CAIX, unlike NHE1 and MCT1, showed no clear organization at the rim of the

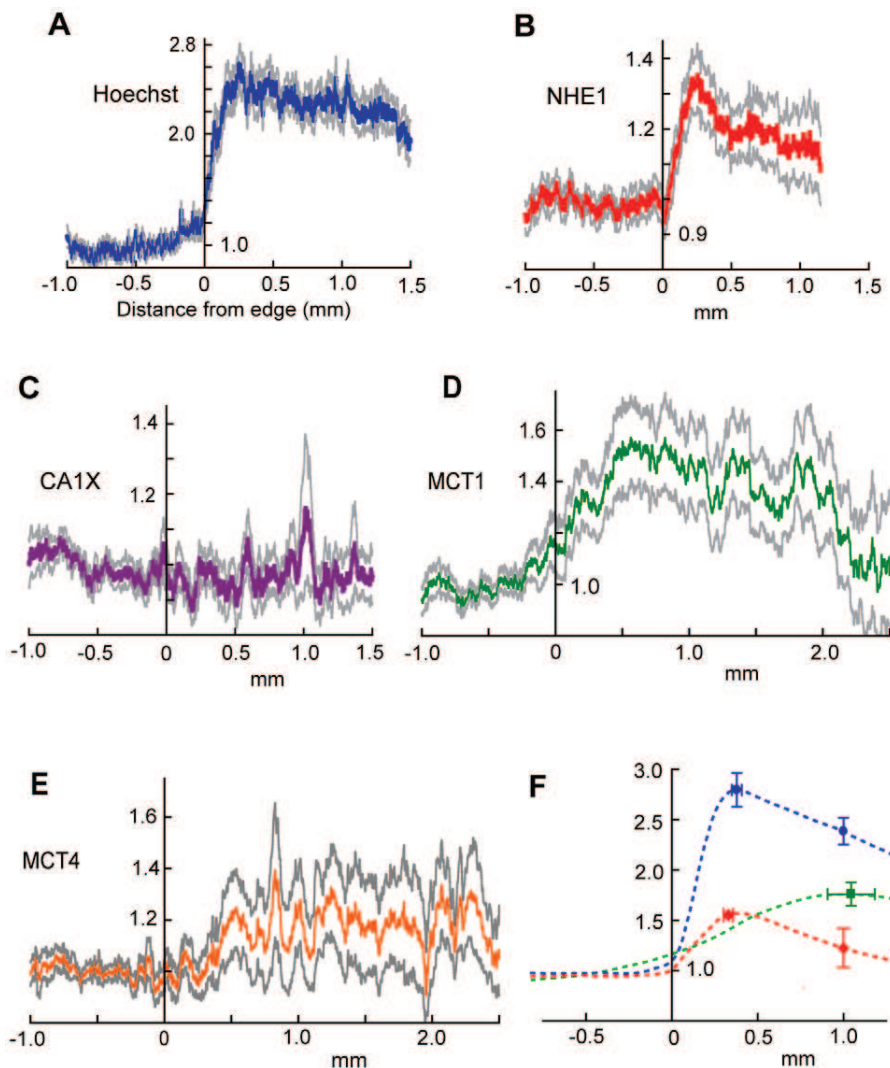


Figure 2. Organization of NHE1 and MCT1 in the tumor rim. (A – E). Labeling intensity (relative to outside the glioma) for Hoechst (average of 27 strips), NHE1 (22), CA1X (22), MCT1 (18) and MCT4 (16). Gray lines are an indication of SEM (see Methods). Note that the ordinate scales are not all the same. (F) Mean relative intensities \pm SEM for peaks (Hoechst, NHE1 and MCT1) and values at 1 mm for Hoechst and NHE1. Schematic curves have been sketched in. The mean values were calculated from measurements on individual profiles and therefore do not correspond exactly with the averaged profiles in (A,B,D).
doi:10.1371/journal.pone.0017416.g002

tumor (Fig. 2 C,E), nor did they show significant correlation on a pixel by pixel comparison (pixel size 0.76 – 1.5 μ m). However, on the larger scale of the 0.3875 mm wide bands, the intensity of the two tended to vary in parallel, both outside and inside the tumors, as illustrated in Fig. 3A. From the data that gave Fig. 3A, and other similar profiles, we plotted the intensity of CA1X for each data point against the corresponding intensity of MCT4 at the same spatial position. The points lay close to a straight line characterized by a correlation coefficient r^2 close to one (Fig. 3 B,F). Part of this correlation is simply due to irregularities in the structure of the tissue in the sections. However, the correlation between the intensities of the unspecific labeling by the pairs of secondary antibodies in the absence of primary antibodies was significantly lower (Fig. 3 C,F). And correlation between Hoechst labeling and each of the proteins was low, even in the case of anti-NHE1 labeling and Hoechst labeling, which peak at about the same distance from the edge (Fig. 3 D,F). The relation between

MCT1 and NHE1 may have reflected differences between the intra- and extratumoral compartments (Fig. 3 E); when the average Pearson correlation coefficient was calculated, it was significantly less than for the pair CA1X-MCT4 (Fig. 3F). Mean correlation coefficients were calculated for profiles from each tumor with the appropriate labeling and the averages for the tumors were calculated (Fig. 3F). The mean correlation for CA1X/MCT4 was significantly higher than for the other pairs of labels.

Discussion

The tumor rim is structured

The present results show that certain proteins are expressed in an organized way in the rim of a C6 glioma that confronts non-tumoral tissue of the brain parenchyma. Expression of the Na^+/H^+ exchanger, NHE1, peaks at about 0.3 mm in from the edge, MCT1 has a broader peak with a maximum at about 1 mm, and,

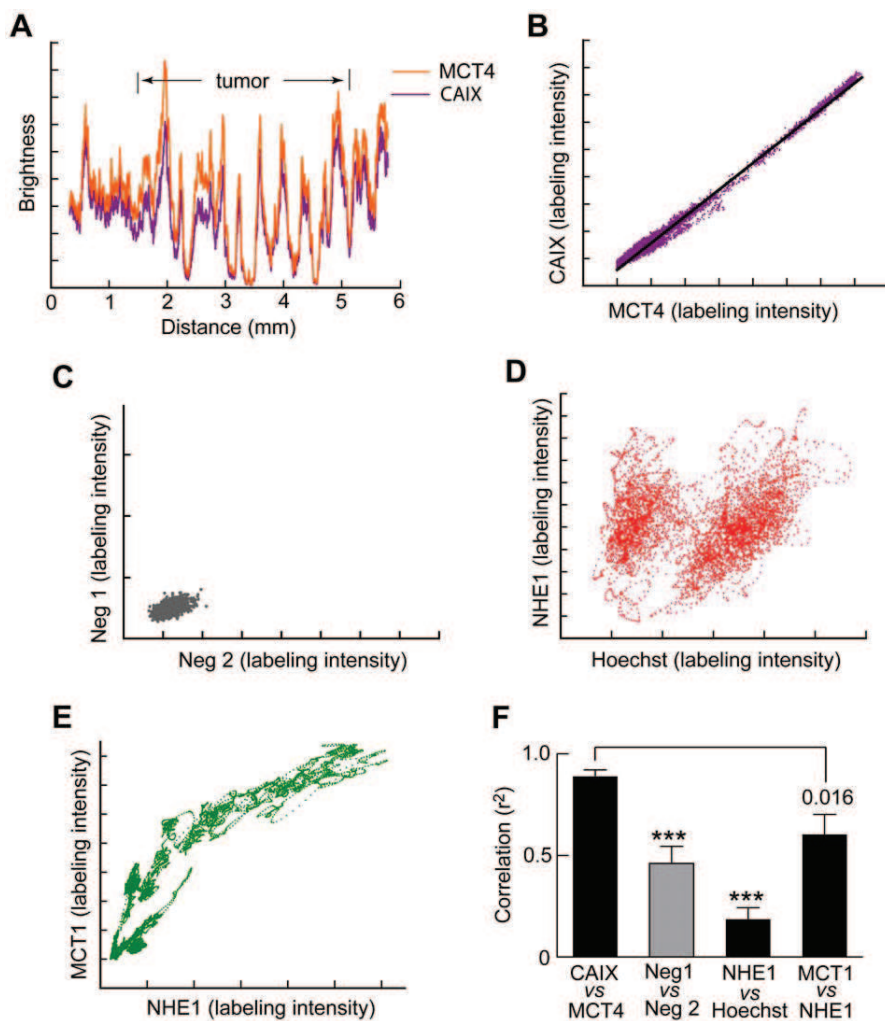


Figure 3. Profiles of CAIX and MCT4 are correlated. (A) Profiles of the intensities of labeling of CAIX and MCT4 along a sample strip 0.3875 mm wide passing through extratumoral tissue and a C6 glioma. The brightness values were scaled to give considerable overlap of the two profiles. (B) The values for CAIX and MCT4 in (A) are highly correlated. (C) The intensity profiles of the secondary antibodies in the absence of primaries show less correlation (ordinate, green fluorescent secondary; abscissa, red fluorescent secondary). (D) NHE1 labeling correlates only weakly with Hoechst labeling. (E) There is moderate correlation of MCT1 with NHE1. (A,B,D,E) are from the same glioma. (F) Average values of r^2 . First column from 8 glioma-bearing brains; other columns from 4,6 and 7 brains respectively (sections labeled for the appropriate pairs were not made for all brains). doi:10.1371/journal.pone.0017416.g003

in contrast, CAIX and MCT4 are not significantly upregulated in the rim (Fig. 2). The organized distribution of NHE1 and MCT1 prompts consideration of how these proteins might be involved in fluxes of lactate and protons within tumors. Protons can be transported through tissue in many ways. In extracellular and intracellular fluid, protons can be effectively transported as H_3O^+ ions, or on diffusible pH buffer molecules [65]. Movement of CO_2 , or, in the reverse direction, of HCO_3^- , is also tantamount to a flux of protons. Effective proton transport across membranes can be mediated by ion channels and H^+ transporters (such as NHE1 and the MCTs) and also by passage of CO_2 , or, in the reverse direction, by HCO_3^- . For brevity, we will generally use “proton transport” to cover all these processes.

NHE1 expression is upregulated near the edge of the tumor

In “invadopodia” of cells in culture, NHE1 molecules interact with intracellular and extracellular structural proteins to contrib-

ute to cell migration. NHE1 also increases pH_i and, provided there is a source of intracellular protons to be extruded, decreases pH_e , leading to remodeling of the cytoskeleton, dismantling of the extracellular matrix, and cell migration and division [66]. Our observation that expression of NHE1, together with labeling of nucleic acids, peaks near the edge of the C6 glioma, would appear to be compatible with NHE1 having these functions *in vivo*.

The factor by which the number of NHE1 molecules per unit area of membrane is increased in the rim of a C6 glioma is difficult to estimate. The long, fine, processes that greatly increase the membrane areas of neurons and astrocytes, are much reduced in glioma cells. Because of this difference, a given number of NHE1 molecules per unit volume of tissue would correspond to a higher number per unit area of membrane in the glioma than outside it. A contrary tendency arises from the smaller volumes of the glioma cells, particularly in the rim, as evidenced by the greater density of nuclei (e.g., Figs 1 F,G, 2A). However, whatever the area of membrane, an increased number of NHE1 molecules per unit

volume of tissue should allow increased extrusion of protons per unit volume. *In vitro*, NHE1 expression can be upregulated by BAX inhibitor 1 [67] and its activity is increased by epidermal growth factor [3,48].

The role of MCT1

Extreme hypoxia prevents the oxidation of pyruvate in mitochondria and most of the pyruvate produced by glycolysis is then converted to lactate. Cancer cells in culture, and tumors as a whole, also produce much lactate even when oxygen is available [29,30,68]. In exercising striated muscle, it is well established that lactate, exported from white fibers (with predominantly glycolytic metabolism), is taken up on the MCT1 transporter by red fibers with a predominantly oxidative metabolism [32]. Sonveaux *et al* [14] found that MCT1 is upregulated in the rim of SiHa tumors, and that SiHa cells in culture show considerable oxidative metabolism. They suggest that lactate released by cells in hypoxic regions of SiHa tumors is taken up into cells near the edge of the tumor, which, being relatively close to the blood vessels in normal tissue, may receive enough oxygen to oxidize lactate. The peak in MCT1 in the rim of C6 gliomas would allow a similar transfer of lactate from hypoxic to oxygenated regions. Tumors showing this arrangement might prosper. Glucose, about 5 mM in blood, is more plentiful than oxygen, which has a concentration of no more than 2.5 mM in blood (mainly in hemoglobin) and much less in tissue. More oxygen than glucose is required for oxidation of glucose (6 molecules of oxygen per glucose) and, for a parasitic tumor, glucose has no “cost”, while adequate oxygenation deep into a tumor requires the growth of a well-perfused neovasculature. Hence, tumors that consume oxygen and lactate in the rim and allow glucose to diffuse deeper into the tumor might grow more rapidly than those that lack this arrangement.

Creation of an acidic microenvironment

Where do the protons extruded by NHE1 in the rim of the tumor come from? Since an extracellular accumulation of H^+ will dissipate by diffusion of H^+ through extracellular space [10,28], a tumor, as a whole, can only maintain an acidic pHe by constantly extruding protons (or some equivalent process, such as constantly taking up HCO_3^-). Any cyclic process whereby protons enter the cell from the extracellular space and are then extruded at almost the same place would not change pHe: the protons must be generated within the cell (or come from other cells – see below). A major source of intracellular H^+ ions is glycolytic production of lactate. Lactic acid and its precursor, pyruvic acid, are >99% unprotonated at physiological pHs [69]; the stoichiometry of glycolysis for these unprotonated forms is shown in Fig. 4A and it is seen that, in the steady state (when the concentrations of NADH, NAD^+ , ADP, ATP etc. remain constant), lactate ions and H^+ ions are produced in equal numbers. Extracellular lactate diffuses away through extracellular clefts, so an outwardly directed gradient of $[lactate^-]$ is created which drives the equimolar cotransport of H^+ [31]. Since each lactate⁻ crosses the cell membrane in association with a proton, glycolysis does not subject the cell to continuous loading with internally-generated protons, and is not a direct source of protons for other transporters such as NHE1.

Complete oxidation of glucose produces CO_2 and H_2O . Normally the net flux of CO_2 is exported by diffusion, and does not lead to production of intracellular H^+ (Fig. 4A). In principle, CO_2 and H_2O can react within the cell to produce bicarbonate and H^+ ions and if the bicarbonate is exported, this is a potential source of intracellular protons [5]. However, in the extracellular space, bicarbonate will recombine with H^+ , thereby tending to increase pHe and negate the effects of proton extrusion. Hence, to

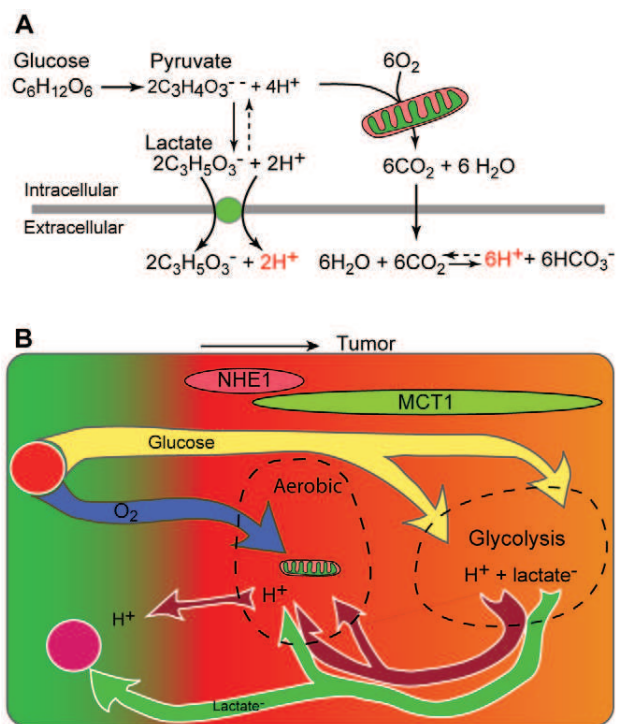


Figure 4. Roles of MCT1 and NHE1 in C6 gliomas. (A) Stoichiometry of the main pathways of glucose metabolism. Note that the protons associated with lactate production are exported by cotransport with lactate. The consequences of CO_2 production are potentially more variable than shown. (B) Scheme of fluxes of glucose, oxygen, lactate and H^+ in the glioma rim, suggested by the profiles of NHE1 and MCT1. Some of the lactate exported from deeper, hypoxic regions is taken up on MCT1 in the rim of the tumor and oxidized to CO_2 . Ground colors indicate pHe: red is acid, green is alkaline. doi:10.1371/journal.pone.0017416.g004

a first approximation, oxidative phosphorylation is not a useful source of intracellular protons for producing an acid pHe. Synthesis of the components of growing cells, such as fatty acids and proteins, will, in general, be associated with net incorporation of protons [69]. We have not found measurements relating to this, but an extreme possibility for the stoichiometry of saturated fatty acid synthesis from glucose is: $(n+2) C_6 H_{12}O_6 + 12n H \rightarrow 6(CH_3-(CH_2)_n-CO_2H) + 6nH_2O$; i.e., a considerable consumption of protons. Hence, growing and dividing cells, which particularly require a source of protons for extrusion on NHE1, also require protons for anabolism.

The spatial organization of proton fluxes

Tumors release lactate to the blood stream, even though (at least in the case of human colonic carcinomas) the tumor as a whole fails to extract all the available oxygen from the blood [30]. Transformation of a stem cell into a successful tumor is such a rare event that it is possible for tumor cells to differ from normal cells in ways that are complex and apparently coherent in favoring tumor growth [70,71]. A consequence beneficial to the tumor of releasing lactate, rather than using it all to produce large amounts of ATP in the TCA cycle, or to provide hydrocarbon backbones for the synthesis of macromolecules, is the provision of the associated protons to create the acidic microenvironment that promotes growth. The present results, showing a peak of NHE1 expression in the tumor rim, suggest a refinement. H^+ ions diffusing through extracellular

space from deeper in the tumor, enter cells near the rim on transporters or through ion channels and are then available for extrusion on NHE1. This arrangement would not change the total number of H^+ ions in the extracellular space, but would create the localized decreases in pHe (and increases in pH_i) that are part of the processes of cell extension and division [46,48]. Since the protons were produced in association with lactate, excess lactate would diffuse out of the tumor. In contrast, if protons are taken up into rim cells by cotransport with lactate and the lactate is oxidized to CO_2 and H_2O , then the stoichiometry of the reaction requires that these protons are consumed and unavailable for export on NHE1. We are therefore suggesting a conceptual division of the influx of protons into cells in the rim. Some protons enter in association with lactate on MCTs, particularly MCT1, and are consumed in the oxidation of lactate to CO_2 ; others enter by other routes and are extruded on NHE1 (Fig. 4B).

MCT4 and CAIX

Weak CAIX immunoreactivity was found throughout the brain parenchyma, as has been reported by others [72]. Expression in the glioma rim was variable, and on average, not significantly different from extratumoral tissue [56,59]. Like CAIX, MCT4 was present throughout the parenchyma, in accordance with its reported presence in astrocytes [52]. As in SiHa and Wdr tumors there was little overall upregulation [14]. Strikingly, there was close correlation in space between MCT4 and CAIX on the large scale of hundreds of microns (Fig. 3B,F), but not on a finer scale of microns. *In vitro*, expression of both CAIX and MCT4 is increased by HIF-1 α common upregulatory mechanism, perhaps acting via HIF-1 α , might lead to the observed spatial correlation. A close spatial association between a pair of other isoforms of these proteins, MCT1 and CAII, has been reported [62,73]. CAIX as well as CAII is upregulated in tumors, and six other known isoforms are present in the brain [74], so our sampling of only CAIX tells us little about the distribution of total CA activity.

Implications for cancer therapy

Inhibition of either MCT1 or NHE1 has been shown to slow tumor growth in animal models [14,50,51]. In our proposed scheme (Fig. 4B), the cells at the rim of the tumor use NHE1 to create the low pHe that favors their extension, migration and proliferation. MCT1 supports not only outward but also inward fluxes of lactate involved in the supply of the hydrocarbon elements necessary for growth, the ATP necessary to maintain proton extrusion, and the protons themselves. NHE1, MCT1, and associated proteins may be molecular targets worth investigating further.

Conclusion

The arrangement of NHE1 and MCT1 in the rim of C6 gliomas adds to arguments suggesting that net lactate production is beneficial to a tumor because it allows the creation of appropriate intracellular and extracellular pH microenvironments. We need to know if this is true also for other types of tumor and to study the effects, in real time, of inhibiting these, and other, transporters.

Materials and Methods

Ethics statement

All procedures involving animals conformed to European Council Directive 86/609/EEC and the study was approved by the Ethical Committee of the Grenoble-Institut des Neurosciences, agreement ID 004. Facilities for animal housing and procedures were approved by the French Ministry of Agriculture, licence A 38

516 10008 and all experimenters held personal licenses. Tumor size was monitored non-invasively by MRI and the rats were sacrificed before the appearance of marked clinical symptoms.

Preparation of the tumor model

C6 cells [75] from the American Type Culture Collection were grown in DMEM containing 25 mM glucose and 2 mM L-glutamine (product 31966-021 from Invitrogen, Cergy Pontoise, France) to which was added 10% FBS (Invitrogen) and antibiotics. The rat glioma model was prepared as described [76]: male Wistar rats (200–230 g) were anesthetized with isoflurane and 10^5 C6 cells in DMEM were injected stereotaxically in the right caudate nucleus. About 20–25 days after the tumor implantation, the rat was decapitated, the brain was rapidly removed and frozen in isopentane at $-80^\circ C$, and 10 μm cryosections were cut at $-20^\circ C$.

Antibodies

In agreement with the vendor's data sheet, we found that the monoclonal anti-NHE1 antibody clone 4E9 (Chemicon MAB3140) did not clearly label sections of brain. In contrast, strong labeling was observed with antiserum 1950 raised against a fusion protein of the C-terminal of human NHE1 (pMAL/NHE1/635-815). This had previously used on pancreatic and kidney tissue [77] and we further demonstrated its specificity (see Supporting Information, Text S1, Figure S2).

For MCT1 we used VPA 1286 from Abcys, Paris, at 1/300. This is a chicken polyclonal antibody raised against a 25 AA peptide from the cytoplasmic C terminal of rat MCT1. Affinity purified rabbit anti MCT4 was MCT45-A from Alpha Diagnostic, San Antonio, used at 1/300. The monoclonal antibody M25 against carbonic anhydrase IX (CAIX) has been described [72]. Secondary antibodies were anti rabbit Alexa 568, anti-mouse Alexa 488 or anti-chicken Alexa 488, all at 1/500 and from Invitrogen.

Immunohistochemistry

The sections were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde, washed and incubated for 1 h in 3% BSA at room temperature, then incubated with the first antibody in 3% BSA for 16 h at $4^\circ C$. After 3 rinses in PBS, the secondary antibody was applied for 1 h at room temperature. After three more rinses, the sections were mounted in GelMount (MM, France) containing bisbenzimidazole Hoechst 33342 trichlorohydrate.

Imaging

Tile scans were made on a Leica DM6000B microscope with a TCS SP5 confocal system. For profiles, a $\times 40$ oil immersion objective (Leica HCX PL APO) was used with the numerical aperture reduced to 0.75 to provide uniform illumination of the field. The pinhole was set at 200 μm to increase the depth of field and reduce errors due to changes in the plane of the section, and each frame was 512 \times 512 pixels. Analysis was done with ImageJ and GraphPad Prism. To average profiles, the individual raw profiles were smoothed twice over 13 points and the edge of the tumor defined as $x=0$ on a graph of the Hoechst labeling. The abscissae for the profiles of the other labels (e.g., NHE1 and MCT1) were shifted by the same amount. The profiles from all the tumors were averaged, the S.E.M. for each x value being calculated by Prism.

Supporting Information

Figure S1 Immunolabeling of tissue sections. (A) NHE1 labeling outside a tumor. (B) Negative control (no primary

antibody) on an adjacent section. (C) Higher magnification of double labeling for NHE1 (red) and MCT1 (green) showing MCT1 labeling along blood vessels in extratumoral tissue. (TIF)

Figure S2 Specificity of the anti-NHE1 antiserum. (A) Western blot of antiserum 1950 on a protein extract of a brain bearing a C6 glioma showing bands at 95 and 65 kDa. (B) The preparation of CterNHE1-GST revealed with Coomassie blue in SDS-PAGE on a 10% gel (a) and revealed on Western blots by antiserum 1950 (b) and monoclonal antibody 4E9 (c). After depletion by the NHE1 construct, antiserum 1950 no longer detected the construct (d). Labeling of brain sections was more intense with undepleted antiserum 1950 (C) than with the depleted antiserum (D). Antiserum 1950 did not label the NHE3 isoform in PS 120 fibroblasts (E). WT fibroblasts transfected to express NHE1 show a band at the appropriate MWt (arrow), whereas this is not present for WT fibroblasts and fibroblasts transfected to express NHE3. Scale bars in (C,D) 100 μ m. (TIF)

References

- Bergers G, Hanahan D (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 592–603.
- McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM (2000) Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Amer J Physiol Cell Physiol* 278: C676–688.
- Chiang Y, Chou CY, Hsu KF, Huang YF, Shen MR (2008) EGF upregulates Na^+/H^+ exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness. *J Cell Physiol* 214: 810–819.
- Gillies RJ, Liu Z, Bhujwala Z (1994) ^{31}P -MRS measurements of extracellular pH of tumors using 3-aminopropylphosphonate. *Am J Physiol* 267: C195–203.
- Swietach P, Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Harris AL (2010) New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene*.
- Wike-Hooley JL, Haveman J, Reinhold HS (1984) The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol* 2: 343–366.
- Ojugo AS, McSheehy PM, McIntyre DJ, McCoy C, Stubbs M, et al. (1999) Measurement of the extracellular pH of solid tumours in mice by magnetic resonance spectroscopy: a comparison of exogenous ^{19}F and ^{31}P probes. *NMR Biomed* 12: 495–504.
- Garcia-Martin ML, Herigault G, Remy C, Farion R, Ballesteros P, et al. (2001) Mapping extracellular pH in rat brain gliomas in vivo by ^1H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites. *Cancer Res* 61: 6524–6531.
- Gillies RJ, Raghunand N, Garcia-Martin ML, Gatenby RA (2004) pH imaging. A review of pH measurement methods and applications in cancers. *IEEE Eng Med Biol Mag* 23: 57–64.
- Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ (2006) Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res* 66: 5216–5223.
- De Milito A, Canese R, Marino ML, Borghi M, Iero M, et al. (2010) pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* 127: 207–219.
- Zhang X, Lin Y, Gillies RJ (2010) Tumor pH and its measurement. *J Nucl Med* 51: 1167–1170.
- Mathupala SP, Parajuli P, Sloan AE (2004) Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an in vitro study. *Neurosurgery* 55: 1410–1419.
- Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, et al. (2008) Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118: 3930–3942.
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161–174.
- Olson ES, Jiang T, Aguilera TA, Nguyen QT, Ellies LG, et al. (2010) Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for *in vivo* fluorescence and MR imaging of proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 4311–4316.
- Bourguignon LYW, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E (2004) CD44 interaction with Na^+/H^+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 279: 26991–27007.
- Gioia M, Fasciglione GF, Monaco S, Iundusi R, Sbardella D, et al. (2010) pH dependence of the enzymatic processing of collagen I by MMP-1 (fibroblast collagenase), MMP-2 (gelatinase A), and MMP-14 ectodomain. *J Biol Inorg Chem Epub June 12: Doi 10.1007/s00775-010-0680-8*.
- Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, et al. (1996) Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 74: 413–417.
- Gerweck LE, Seetharaman K (1996) Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 56: 1194–1198.
- Gerweck LE, Vijayappa S, Kozin S (2006) Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* 5: 1275–1279.
- Raghunand N, Mahoney B, van Sluis R, Baggett B, Gillies RJ (2001) Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia* 3: 227–235.
- Andreev OA, Dupuy AD, Segala M, Sandugu S, Serra DA, et al. (2007) Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 7893–7898.
- Segala J, Engelman DM, Reshnetnyak YK, Andreev OA (2009) Accurate analysis of tumor margins using a fluorescent pH low insertion peptide (pHLIP). *Int J Mol Sci* 10: 3478–3487.
- Min KH, Kim JH, Bae SM, Shin H, Kim MS, et al. (2010) Tumoral acidic pH-responsive MPEG-poly(beta-amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy. *J Control Release* 144: 259–266.
- Gallagher FA, Kettunen MI, Day SE, Hu DE, Ardenkjaer-Larsen JH, et al. (2008) Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ^{13}C -labelled bicarbonate. *Nature* 453: 940–943.
- Voegtlin C, Kahler H, Fitch RH (1933) The action of the parenteral administration of sugars on the hydrogen-ion concentration of normal and malignant tissues in living animals. *Science* 77: 567–568.
- Webb SD, Sherratt JA, Fish RG (2001) Modelling tumour acidity and invasion. *Novartis Found Symp* 240: 169–181; discussion 181–165.
- Warburg O, Wind E, Negelin E (1927) The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8: 519–530.
- Holm E, Hagmuller E, Staedt U, Schlickeiser G, Gunther HJ, et al. (1995) Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res* 55: 1373–1378.
- Provent P, Benito M, Hiba B, Farion R, Lopez-Larrubia P, et al. (2007) Serial in vivo spectroscopic nuclear magnetic resonance imaging of lactate and extracellular pH in rat gliomas shows redistribution of protons away from sites of glycolysis. *Cancer Res* 67: 7638–7645.
- Halestrap AP, Price NT (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343: 281–299.
- Froberg MK, Gerhart DZ, Enerson BE, Manivel C, Guzman-Paz M, et al. (2001) Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport* 12: 761–765.
- Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP (2006) The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281: 9030–9037.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, et al. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19345–19350.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029–1033.
- Feron O (2009) Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 92: 329–333.

Text S1 Tests showing the efficacy of the anti-NHE1 antiserum.

(DOC)

Acknowledgments

We thank David R. Blatchford and the Centre for Biophotonics, Strathclyde University, for assistance with the imaging, Dr Silvia Pastorekova (Bratislava, Slovakia) for a gift of anti-CAIX antibody, Dr Laurent Counillon (Nice, France) for the gift of a fusion construct and Dr Christoph Segebarth (Grenoble, France) for provision of laboratory facilities.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JAC CR MDW. Performed the experiments: EG RF KF JAC. Analyzed the data: JAC EG CR MDW. Contributed reagents/materials/analysis tools: CMT MD. Wrote the manuscript: JAC CR MD.

38. Thomas RC (1984) Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery. *J Physiol* 354: 3P–22.
39. Missner A, Kugler P, Saparov SM, Sommer K, Mathai JC, et al. (2008) Carbon dioxide transport through membranes. *J Biol Chem* 283: 25340–25347.
40. Musa-Aziz R, Chen LM, Pelletier MF, Boron WF (2009) Relative CO₂/NH₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5406–5411.
41. Kersh AE, Hartzler LK, Havlin K, Hubbell BB, Nanagas V, et al. (2009) pH regulating transporters in neurons from various chemosensitive brainstem regions in neonatal rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1409–1420.
42. Majumdar D, Bevensee MO (2010) Na-coupled bicarbonate transporters of the solute carrier 4 family in the nervous system: function, localization, and relevance to neurologic function. *Neuroscience*.
43. Sennoune SR, Martínez-Zaguilan R (2007) Plasmalemmal vacuolar H⁺-ATPases in angiogenesis, diabetes and cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39: 427–433.
44. Pouyssegur J, Sardet C, Franchi A, L'Allemain G, Paris S (1984) A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4833–4837.
45. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ (2005) The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 5: 786–795.
46. Stuwe L, Muller M, Fabian A, Wanning J, Mally S, et al. (2007) pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution. *J Physiol (Lond)* 585: 351–360.
47. Stock C, Schwab A (2009) Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Arch* 458: 981–992.
48. Busco G, Cardone RA, Greco MR, Bellizzi A, Colella M, et al. (2010) NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the perinvadopodial space. *FASEB J Epub June 14*: Doi 10.1096/fj09-149518.
49. Denker SP, Barber DL (2002) Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J Cell Biol* 159: 1087–1096.
50. Lagarde AE, Franchi AJ, Paris S, Pouyssegur JM (1988) Effect of mutations affecting Na⁺: H⁺ antiport activity on tumorigenic potential of hamster lung fibroblasts. *J Cell Biochem* 36: 249–260.
51. Rotin D, Steele-Norwood D, Grinstein S, Tamock I (1989) Requirement of the Na⁺/H⁺ exchanger for tumor growth. *Cancer Res* 49: 205–211.
52. Bergersen LH (2007) Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* 145: 11–19.
53. Ord JJ, Streeter EH, Roberts IS, Cranston D, Harris AL (2005) Comparison of hypoxia transcriptome in vitro with in vivo gene expression in human bladder cancer. *Br J Cancer* 93: 346–354.
54. Pinheiro C, Reis RM, Ricardo S, Longatto-Filho A, Schmitt F, et al. (2010) Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol* 2010: 427694.
55. Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, et al. (2009) Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 69: 358–368.
56. Haapasalo JA, Nordfors KM, Hilvo M, Rantala IJ, Soini Y, et al. (2006) Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clin Cancer Res* 12: 473–477.
57. Lancaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, et al. (2001) Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 61: 6394–6399.
58. Parkkila S, Parkkila AK, Saarnio J, Kivela J, Karttunen TJ, et al. (2000) Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors. *J Histochem Cytochem* 48: 1601–1608.
59. Proescholdt MA, Mayer C, Kubitzka M, Schubert T, Liao SY, et al. (2005) Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors. *Neuro Oncol* 7: 465–475.
60. Korkolopoulou P, Perdiki M, Thymara I, Boviatis E, Agrogiannis G, et al. (2007) Expression of hypoxia-related tissue factors in astrocytic gliomas. A multivariate survival study with emphasis upon carbonic anhydrase IX. *Hum Pathol* 38: 629–638.
61. Swietach P, Patiar S, Supuran CT, Harris AL, Vaughan-Jones RD (2009) The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths. *J Biol Chem* 284: 20299–20310.
62. Becker HM, Deitmer JW (2008) Nonenzymatic proton handling by carbonic anhydrase II during H⁺-lactate cotransport via monocarboxylate transporter 1. *J Biol Chem* 283: 21655–21667.
63. Zoula S, Rijken PF, Peters JP, Farion R, Van der Sanden BP, et al. (2003) Pimonicidazole binding in C6 rat brain glioma: relation with lipid droplet detection. *Br J Cancer* 88: 1439–1444.
64. Halestrap AP, Meredith D (2004) The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447: 619–628.
65. Engasser JM, Horvath C (1974) Dynamic role of buffers: facilitated transport of protons, weak acids and bases. *Physiol Chem Phys* 6: 541–543.
66. Stock C, Cardone RA, Busco G, Krahlhng H, Schwab A, et al. (2008) Protons extruded by NHE1: digestive or glue? *Eur J Cell Biol* 87: 591–599.
67. Lee GH, Yan C, Shin SJ, Hong SC, Ahn T, et al. (2010) BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: the alteration of mitochondrial function. *Oncogene* 29: 2130–2141.
68. Bolanos JP, Almeida A, Moncada S (2010) Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci* 35: 145–149.
69. Lane AN, Fan TW, Higashi RM (2009) Metabolic acidosis and the importance of balanced equations. *Metabolomics* 5: 163–165.
70. Hunter T, Marais R (2010) Genetic and cellular mechanisms of oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 20: 1–3.
71. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB (2008) Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 18: 54–61.
72. Kallio H, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, et al. (2006) Expression of carbonic anhydrases IX and XII during mouse embryonic development. *BMC Dev Biol* 6: 22.
73. Becker HM, Hirnet D, Fecher-Trost C, Sultemeyer D, Deitmer JW (2005) Transport activity of MCT1 expressed in *Xenopus* oocytes is increased by interaction with carbonic anhydrase. *J Biol Chem* 280: 39882–39889.
74. Supuran CT (2008) Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 7: 168–181.
75. Benda P, Sameda K, Messer J, Sweet WH (1971) Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 34: 310–323.
76. Julien C, Payen JF, Tropres I, Farion R, Grillon E, et al. (2004) Assessment of vascular reactivity in rat brain glioma by measuring regional blood volume during graded hypoxic hypoxia. *Br J Cancer* 91: 374–380.
77. Moulin P, Guiot Y, Jonas JC, Rahier J, Devuyst O, et al. (2007) Identification and subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger and a novel related protein in the endocrine pancreas and adrenal medulla. *J Mol Endocrinol* 38: 409–422.

Annexe 2

Regulation of T-type calcium channels by the exocytosis machinery

Norbert Weiss, Shahid Hameed, José M. Fernández-Fernández, Katell Fablet, Maria Karmazinova, Cathy Poillot, Lina Chen, Isabelle Bidaud, Arnaud Monteil, Sylvaine Huc-Brandt, Lubica Lacinova, Philippe Lory, Gerald W. Zamponi, Michel De Waard.

Article en cours de soumission.

Regulation of T-type calcium channels by the exocytosis machinery

Norbert Weiss^{a,b,c}, Shahid Hameed^a, José M. Fernández-Fernández^d, Katell Fablet^{b,c}, Maria Karmazinova^e, Cathy Poillot^{b,c}, Lina Chen^a, Isabelle Bidaud^f, Arnaud Monteil^f, Sylvaine Huc-Brandt^f, Lubica Lacinova^e, Philippe Lory^f, Gerald W. Zamponi^{a,1} and Michel De Waard^{b,c,1}

^aHotchkiss Brain Institute, Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, T2N4N1 Calgary, Canada; ^bGrenoble Institute of Neuroscience, INSERM U836, 38706 La Tronche, France; ^cUniversity Joseph Fourier, 38000 Grenoble, France; ^dLaboratory of Molecular Physiology and Channelopathies, Department of Experimental and Health Science, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain; ^eLaboratory of Biophysics, Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, 83334 Bratislava, Slovakia; ^fInstitute of Functional Genomic, Département of Physiology, CNRS UMR 5203, INSERM U661, University of Montpellier 1 et 2, 34094 Montpellier, France.

¹To whom correspondence should be addressed to:

Dr. Gerald W. Zamponi, Hotchkiss Brain Institute, Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, 1A25A Health Research & Innovation Center, 3330 Hospital Drive N.W, T2N 4N1 Calgary, Canada; Tel: 403-220-8687; Fax: 403-210-8106; Email: zamponi@ucalgary.ca

Or

Dr. Michel De Waard, Grenoble Institute of Neurosciences, INSERM U836, Laboratory of Ion Channels, Functions and Pathologies, Bâtiment Edmond J. Safra, Chemin Fortuné Ferrini, 38706 La Tronche, France; Tel: +33 (0)4 56 52 05 63; Fax: +33 (0)4 56 52 06 37; Email: dewaardm@ujf-grenoble.fr

Abstract

T-type calcium channels represent a key pathway for Ca^{2+} entry near the resting membrane potential. Increasing evidence supports a unique role of these channels in fast and low-threshold exocytosis in an action potential-independent manner, but the underlying molecular mechanisms have remained unknown. Here, we report the existence of a syntaxin-1A/ $\text{Ca}_v3.2$ T-type calcium channel signaling complex that relies on molecular determinants that are distinct from the synaptic protein interaction site (*synprint*) found in synaptic high-voltage-activated calcium channels. This interaction potently modulated $\text{Ca}_v3.2$ channel activity, by reducing channel availability. Other members of the T-type calcium channel family were also regulated by syntaxin-1A, but to a smaller extent. Overexpression of T-type channels in MPC 9/3L-AH chromaffin cells induced low-threshold secretion that could be prevented by uncoupling the channels from syntaxin-1A. Altogether, our findings provide compelling evidence for the existence of a syntaxin-1A/T-type Ca^{2+} channel signaling complex and provide new insights into the molecular mechanism by which these channels control low-threshold exocytosis.

Introduction

Ca²⁺ entry through the high-voltage-activated (HVA) N- and P/Q-type Ca²⁺ channels into presynaptic nerve terminals supports a transient Ca²⁺ microdomain that is essential for synaptic exocytosis (1-3). To ensure fast and efficient neurotransmitter release, the vesicle-docking / release machinery must be located near the source of Ca²⁺ entry. In many cases, this close localization is achieved by direct interaction of SNARE proteins with the Ca²⁺ channels (4-6). Indeed, syntaxin-1A/1B, SNAP-25 and synaptotagmin-1 specifically interact with Ca_v2.1 and Ca_v2.2 channels by binding to a synaptic protein interaction site (*synprint*) located within the intracellular II-III linker region of the channels (7-11), and disruption of Ca²⁺ channel-SNARE coupling alters neurotransmitter release (6, 12, 13). A perhaps equally important consequence of SNARE protein-Ca²⁺ channel interactions is the ability of SNARE proteins to modulate presynaptic Ca²⁺ channel activity, thus fine tuning the amount of Ca²⁺ that enters the synaptic terminal. Specifically, the binding of syntaxin-1A and SNAP-25 to Ca_v2.1 and Ca_v2.2 subunits shifts the voltage-dependence of inactivation toward more hyperpolarized membrane potentials to reduce channel availability (11, 14-18), and this effect is modulated by other members of the vesicle release complex (15, 16, 19, 20).

In contrast with HVA channels, low-voltage-activated (LVA) T-type Ca²⁺ channels represent an important source of Ca²⁺ entry near the resting membrane potential. It is established that T-type Ca²⁺ currents mediate low-threshold burst discharges that occur during physiological neuronal rhythmogenesis as well as during pathological states such as epilepsy (21), and that they regulate various cellular functions such as neuronal development, dendritic integration, sensory transmission or pain signaling (for review see (22)). Furthermore, there is an increasing body of evidence that T-type channels can trigger fast and low-threshold exocytosis (23-26). In contrast with HVA Ca²⁺ channels, all members of the T-type channel family (i.e., Ca_v3.1, Ca_v3.2 and Ca_v3.3) lack the *synprint* site, and it is unclear as to how T-type channels are coupled to the exocytosis process at the molecular level. Here, we reveal the existence of a syntaxin-1A/Ca_v3.2 T-type Ca²⁺ channel complex in central neurons and show that this interaction involves different molecular determinants from those found in HVA channels. This interaction of syntaxin-1A with the Ca_v3.2 subunit potently modulates channel gating properties and appears essential for T-type channel-triggered low-threshold exocytosis.

Results

Syntaxin-1A associates with Ca_v3.2 channels in central neurons. The existence of a relationship between T-type Ca²⁺ channels and neurotransmitter release (23-26) prompted us to examine the possible colocalization of these channels with SNARE proteins in central neurons. Isolated rat reticular thalamic neurons (nRT) that are known to express predominantly the Ca_v3.2 isoform of T-type channels (27) were immunolabeled, and T-type channel and syntaxin-1A distribution analyzed by confocal microscopy. The anti-Ca_v3.2 antibody labeling (green) revealed a somatodendritic pattern consistent with previous electrophysiological studies (28-30). Interestingly, intense syntaxin-1A labeling was also similarly observed along the somatodendritic axis (red) and co-localization of the two labels becomes evident in overlaid images and visualization of co-localized pixels (Fig. 1A). These data thus strongly suggest that a pool of syntaxin-1A and Ca_v3.2 channels are present at the same subcellular level. We then investigated by co-immunoprecipitations whether T-type calcium channels and syntaxin-1A associate with each other at the protein level. As shown in Fig. 1B, specific anti-Ca_v3.1, Ca_v3.2 and Ca_v3.3 antibodies precipitated syntaxin-1A from rat brain homogenate, thus suggesting the existence of T-type Ca²⁺ channel/syntaxin-1A complexes (Fig. 1B).

Syntaxin-1A modulates Ca_v3.2 channel activity. To investigate the impact of the Ca_v3.2/syntaxin-1A interaction on channel function, channel properties were analyzed in the absence and the presence of syntaxin 1A using whole-cell patch-clamp. The co-expression of syntaxin-1A with Ca_v3.2 channel reveals a potent syntaxin-1A regulation of the voltage-dependence of T-type channel inactivation (Fig. 2A-C, Table S1). In syntaxin-1A expressing cells, the half-inactivation potential of Ca_v3.2 channels was shifted to more hyperpolarized potentials by -16.3 ± 1.2 mV ($p < 0.001$) (to -86.9 ± 1.2 mV, $n = 28$) compared to control cells (-70.6 ± 0.5 mV, $n = 27$). The syntaxin-1A-mediated modulation of Ca_v3.2 inactivation was abolished upon cleavage of syntaxin-1A by co-expression of the botulinium neurotoxin C1 (BoNT/C1) (Fig. 2C, Table S1), indicating that the membrane insertion domain of syntaxin-1A was necessary for the observed functional effects. Consistent with this observation, co-expression of a syntaxin-1A construct lacking the transmembrane domain was unable to modulate Ca_v3.2 channel inactivation (Fig. 2C, Table S1). Similar results were obtained with

Ca_v3.1 and Ca_v3.3 channels, indicating that syntaxin-1A regulation is conserved across the entire T-type channel family (Fig. S1).

It is well established that syntaxin-1A exists in both “open” and “closed” conformations (31), and that syntaxin-1A state is an important determinant of N-type channel modulation (11). Similar to previous observations in N-type channels, co-expression of a mutant syntaxin-1A construct that is locked permanently in the “open” conformation failed to induce a hyperpolarizing shift of the steady-state in half-inactivation potential (Fig. 2C), indicating that syntaxin-1A-mediated modulation of Ca_v3.2 channel is syntaxin state-dependent.

Besides regulating the voltage-dependence of Ca_v3.2 channel inactivation, syntaxin-1A also produced moderate effects on other gating properties of the channel, including a -5.7 mV hyperpolarizing shift of the activation curve (from -38.6 ± 0.6 mV ($n = 31$) to -44.2 ± 0.8 mV ($n = 18$), $p < 0.001$) (Fig. 2D, Table S1), a 1.6-fold slowing of the time constant of inactivation kinetics (from 13.1 ± 0.7 ms ($n = 31$) to 21.0 ± 1.3 ms ($n = 18$) at -20 mV, $p < 0.001$) (Table S1), and a 1.8-fold slowing of the time constant for recovery from fast inactivation (from 489.4 ± 25.9 ms ($n = 25$) to 876.3 ± 60.7 ms ($n = 14$), $p < 0.001$) (Table S1). In contrast, the voltage-dependence and kinetics of intramembrane charge movements of Ca_v3.2 channel were found unaffected upon co-expression of syntaxin-1A (Fig. S2). Unlike syntaxin-1A, co-expression of other synaptic proteins such as SNAP-25, synaptobrevin-1 and 2, CSP and Rim-1 produced only minor effects on Ca_v3.2 channel activity (Table S1). Altogether, our data indicate that syntaxin-1A is a robust and selective modulator of T-type Ca²⁺ channel inactivation.

Syntaxin-1A interacts within the carboxy-terminal domain of the Ca_v3.2 subunit.

Previous studies have shown that functional interaction of N- and P/Q-type Ca²⁺ channels can be disrupted by a peptide containing the *synprint* site (12, 13). In order to investigate the Ca_v3.2 molecular determinants of syntaxin-1A regulation, we examined the capability of the different intracellular regions of the Ca_v3.2 subunit to prevent syntaxin-1A regulation. T-type Ca_v3.2 channels were coexpressed in tsA-201 cells along with syntaxin-1A +/- a construct in which the major intracellular regions of the channels were fused to a CD4 epitope as well as the green fluorescent protein (EGFP) (Fig. 3A). Barium currents were recorded at -20 mV from a holding potential of -85 mV (where 56% of the channels are tonically inactivated in the presence of syntaxin-1A) before and after a 5 sec hyperpolarizing prepulse to -130 mV. A

5 sec hyperpolarizing prepulse to -130 mV produced a 2.1-fold increase in current amplitude in cells expressing syntaxin-1A due to the recovery of channels from inactivation (Fig. 3B). This prepulse-induced current facilitation was found significantly decreased upon co-expression of the CD4-EGFP-Ca_v3.2^{Cter} fusion protein (from 2.1 ± 0.2-fold (*n* = 20) to 1.4 ± 0.1 (*n* = 17), *p* < 0.001), whereas expression of the CD4-EGFP-Ca_v3.2^{Cter} construct by itself did not affect Ba²⁺ currents in the absence of syntaxin-1A (Fig. 3B). In contrast, expression of the other intracellular regions of the channel failed to prevent syntaxin-1A regulation (Fig. 3B), suggesting a potential interaction of syntaxin-1A within the carboxy-terminus of the channel. Consistent with a possible specific binding of syntaxin-1A within the C-terminal domain of Ca_v3.2, co-expression of syntaxin-1A in COS cells promoted translocation of a EGFP-Ca_v3.2^{Cter} fusion protein to the plasma membrane whereas the EGFP-Ca_v3.2^{II-III linker} fusion protein remained diffusely expressed inside the cell (Fig. 3C). Finally, co-immunoprecipitation experiments from tsA-201 cells using the CD4-EGFP-Ca_v3.2^{Cter} fusion protein revealed that syntaxin-1A specifically interacts with the carboxy-terminus domain of the Ca_v3.2 subunit (Fig. 3D), which is in stark contrast with the reported syntaxin-1A interaction site on HVA channels (II-III loop). Altogether, these findings demonstrate that syntaxin-1A modulates Ca_v3.2 channel activity by interacting within the C-terminal domain of the channel and that co-expression of the putative interaction site of the channel competitively inhibits syntaxin-1A-induced channel modulation.

Like syntaxin-1A, SNAP-25 was also found to associate with the Ca_v3.2 C-terminus (Fig. S3). While SNAP-25 by itself produced only slight effects on T-type channel activity, its co-expression reversed the effects of syntaxin-1A on channel inactivation properties (Fig. S3, Table S1), in analogy with previous observations with N-type channels (15, 16).

Ca_v3.2 – SNARE complexes contribute to low-threshold exocytosis.

Besides conferring a regulation of channel availability, the interaction between syntaxin-1A and T-type channels may also serve as a means for optimizing the coupling between T-type channel-mediated Ca²⁺ entry and secretion. To test for this possibility, Ca_v3.2 channels were over-expressed in MPC 9/3L-AH cells, a chromaffin cell line already fully endowed with the vesicle release machinery, but devoid of voltage-gated Ca²⁺ channels (6). Voltage-dependent exocytosis was evaluated by monitoring membrane capacitance changes (indicative of vesicle fusion) in response to a 100 ms depolarizing step to -20 mV from a holding potential of -90 mV. Voltage-dependent activation of over-expressed Ca_v3.2 channels produced a robust

increase in exocytosis (estimated by normalizing capacitance changes by Ca^{2+} charge density) which was reduced by 96% ($p < 0.001$) when SNARE proteins were uncoupled from the channel by co-expression of the CD4-EGFP- $\text{Ca}_v3.2^{\text{Cter}}$ fusion protein (Fig. 4C-D), even though Ca^{2+} entry *per se* was not affected (1.9 ± 0.7 pC/pF, ($n = 10$) *versus* 1.8 ± 0.4 pC/pF, ($n = 15$)) (Fig. 4A-B). In contrast, co-expression of the CD4-EGFP- $\text{Ca}_v3.2^{\text{II-III linker}}$ fusion protein, which does not interact with syntaxin-1A, had no effect on $\text{Ca}_v3.2$ -induced voltage-dependent exocytosis. The observation that Ca^{2+} entry was not affected upon co-expression of the CD4-EGFP- $\text{Ca}_v3.2^{\text{Cter}}$ fusion protein is consistent with the notion that syntaxin-1A modulation is abolished when $\text{Ca}_v3.2$ channels are functionally coupled to a full SNARE complex. Altogether, these findings indicate that $\text{Ca}_v3.2$ channels have the propensity to support low-threshold exocytosis, and that this process requires a close proximity between the vesicle release machinery and the channel.

Discussion

In the present study, we provide compelling evidence for the existence of a syntaxin-1A/ $\text{Ca}_v3.2$ T-type Ca^{2+} channel signaling complex. We demonstrate that this interaction not only potently modulates $\text{Ca}_v3.2$ channel gating but also regulates T-type channel mediated exocytosis.

It was previously shown that $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$ Ca^{2+} channels colocalize with syntaxin-1A at presynaptic nerve terminals (32-34) and that these channels can be isolated as a complex with SNARE proteins (35-37). We show that similarly to $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v2.2$ channels, $\text{Ca}_v3.2$ channels also colocalize with syntaxin-1A along the somatodendritic axis of nRT neurons, and that these two proteins can be co-immunoprecipitated, thus suggesting the existence of a native syntaxin-1A/ $\text{Ca}_v3.2$ channel signaling complex. Moreover, *in vitro* binding experiments indicate that syntaxin-1A interacts within the carboxy-terminal domain of the $\text{Ca}_v3.2$ subunit, which indicates that T-type channels use different structural determinants compared with the *synprint* site utilized by members of the HVA channel family. At this point it is unclear whether distinct syntaxin-1A structural determinants are involved in the interactions with Ca_v3 and Ca_v2 channels.

Electrophysiological analyses of $\text{Ca}_v3.2$ channels in tsA-201 cells revealed that syntaxin-1A potently decreases channel availability by shifting the steady-state inactivation toward more hyperpolarized potentials. This is qualitatively similar to what has been reported for N- and P/Q-type Ca^{2+} channels. Our observation that co-expression of the carboxy-

terminal region of the Ca_v3.2 subunit prevents syntaxin-1A-mediated modulation of Ca_v3.2 channel strongly suggest that syntaxin-1A modulates channel activity by virtue of its direct binding to the carboxy-terminal of the Ca_v3.2 subunit, rather than the mere presence of a syntaxin-1A molecule in the cell. The notion that syntaxin-1A-mediated modulation of Ca_v3.2 channel inactivation is abolished by botulinium neurotoxin C1 or upon deletion of the syntaxin-1A transmembrane domain indicates that membrane anchoring of syntaxin-1A is critical for channel modulation, and is analogous with previous observations on HVA channels (38). The inability of the “open” form of syntaxin-1A to alter T-type channel gating also parallels previous observations in Ca_v2.2 (11). Given that syntaxin-1A undergoes a conformational switch from a “closed” state to an “open” during the vesicle release cycle (31, 39, 40), this suggests the possibility that syntaxin-1A may be able to dynamically regulate Ca_v3.2 channel availability during various stages of exocytosis. The observation that SNAP-25 coexpression could reverse the syntaxin-1A mediated effect on channel gating is reminiscent of findings with Ca_v2.2 (but not Ca_v2.1) channels (14-16). At this point, we do not know whether this is due to a direct competition between SNAP-25 and syntaxin-1A for the same binding site within the C-terminus region of the channel, or whether both proteins can bind to the channel simultaneously. Irrespective of these structural information, the syntaxin-1A mediated alteration in the voltage-dependence of inactivation and the ability of SNAP-25 to regulate this process may represent an important regulatory pathway for T-type Ca²⁺ channels. This is further underscored when considering that these channels are ~50% inactivated near neuronal resting membrane potentials such that even small changes in the voltage dependence of inactivation can bring about dramatic changes in Ca²⁺ entry (41).

Besides modulating T-type Ca²⁺ channel gating, the physical association between Ca_v3.2 channel and SNARE proteins may contribute significantly to optimize Ca_v3.2-mediated exocytosis. Consistent with previous studies showing that Ca_v2.1, Ca_v2.2 or Ca_v3.1 channels can trigger voltage-dependent exocytosis when heterologously expressed in MPC-9/3L cells (6, 42, 43), we show that expression of Ca_v3.2 channel in these cells induced robust voltage-dependent exocytosis that was drastically reduced when SNARE proteins were competitively uncoupled from the channel by co-expression of the carboxy-terminal domain of the Ca_v3.2 subunit. This result is consistent with previous studies showing that disruption of N- and P/Q-type Ca²⁺ channels-SNAREs interaction by a peptide containing the *synprint* site prevents neurotransmitter release (12, 13). It was proposed that uncoupling of Ca²⁺ channels from SNARE proteins may not only lead to a spatial dissociation of vesicles and

channels, but also to a loss of feedback regulation that collectively alter exocytosis efficiency (44, 45). In this context, our data fit with the idea that T-type Ca^{2+} channels support low-threshold exocytosis by virtue of their close association with the SNARE protein machinery. Such tight coupling may be particularly important for T-type channels due to their small unitary conductance and low open probability.

In conclusion, although HVA and T-type channels utilize completely different channel structural determinants for their interactions with the SNARE machinery, they are functionally regulated by syntaxin-1A in a strikingly similar manner. This may perhaps underscore the fundamental evolutionary importance for providing tight control over (and localizing the exocytosis machinery close to the source of) Ca^{2+} entry. Overall, our findings reveal unrecognized new insights into the regulation of T-type Ca^{2+} channels by SNARE proteins and provide the first molecular mechanism by which these channels contribute to low-threshold exocytosis.

Methods

Plasmid cDNA constructs.

The cDNAs constructs used in this study were human $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ and $Ca_v3.3$ (46, 47), mouse syntaxin-1A (Stx-1A) and SNAP-25 subcloned in pcDNA3 vector. The pcDNA3 construct encoding for the botulinium neurotoxin C1 (BoNT/C1) was generously provided by Dr. Robert G. Tsushima and Dr. Herbert Gaisano. The Stx-1A construct lacking the transmembrane domain (Stx1A^{ΔTM}, amino acids 1 to 265) in pCMV5 was kindly provided by Dr. Randy D. Blakely. The Stx1A^{Open} in pMT2 was generated by mutating Leu¹⁶⁵ and Glu¹⁶⁶ to Ala as previously described (11).

Electrophysiology.

Transient expression in tsA-201 cells and patch-clamp recordings. Human embryonic kidney tsA-201 cells were grown in a Dulbecco's modified Eagle's culture medium containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (all products were purchased from Invitrogen) and maintained under standard conditions at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were transiently transfected using the jetPEITM transfection reagent (Qbiogen, OH, USA) with either the $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ or $Ca_v3.3$ channel, along with a green fluorescent protein (pEGFP, Clontech, CA, USA). Ba²⁺ currents were recorded 48-72 hrs after transfection in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique at room temperature (22-24°C) in a bathing medium containing (in millimolar): 5 BaCl₂, 5 KCl, 1 MgCl₂, 128 NaCl, 10 TEA-Cl, 10 D-glucose, 10 HEPES (pH 7.2 with NaOH). Patch pipettes were filled with a solution containing (in millimolar): 110 CsCl, 3 Mg-ATP, 0.5 Na-GTP, 2.5 MgCl₂, 5 D-glucose, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.4 with CsOH), and had a resistance of 2-4 MΩ. Whole-cell patch-clamp recording were performed using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA). All traces were corrected on-line for leak currents, digitized at 10 KHz and filtered at 2 KHz.

Intramembrane charge movement measurements. Gating currents were recorded using an HEKA-10 patch clamp amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht, Germany). The extracellular solution contained (in millimolar): 105 CsCl, 10 HEPES, 10 D-glucose, 10 TEA-Cl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ (pH 7.4 with CsOH). The intracellular solution contained (in millimolar): 130 CH₃SO₃Cs, 10 EGTA, 5 MgCl₂, 10 TEA-Cl, 5 Na-ATP, 10 HEPES (pH 7.4 with CsOH). 10

mM stock solution ErCl_3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was prepared daily in deionized water and diluted in the bath solution at a concentration of 30 μM prior to the experiment. Only the cells in which series resistance was below 5 $\text{M}\Omega$ were used for measurement of gating currents. Series resistance and capacitive transients were partly compensated by built-in circuits of the EPC 10 amplifier. Data were sampled at 10 kHz and filtered at 3 kHz. The linear component of the leak current and non-compensated capacitive transient was subtracted using the P/8 procedure. Total charge transferred during each pulse was evaluated by integrating the area below gating current trace at the beginning (Q_{on}) and after the end of each depolarizing pulse (Q_{off}).

Capacitance Measurements. MPC 9/3L-AH cells were transfected using Lipofectamine Plus (Invitrogen), as previously reported (6, 42). The $\text{Ca}_v3.2$ channel was co-expressed with rat β_{2a} and rabbit $\alpha_2\delta$ subunits along with either the pEGFP, CD4-EGFP- $\text{Ca}_v3.2^{\text{II-III}}$ or CD4-EGFP- $\text{Ca}_v3.2^{\text{Cter}}$ construct, using a ratio of 1:1:1:0.6 respectively. Recordings were performed 48-72 hrs after transfection. The external solution contained (in mM): TEA-Cl 140, CaCl_2 5, HEPES 10, D-glucose 10 (pH 7.3; 300 mosmoles/l). Patch pipettes were filled with a solution containing (in millimolar): 13 CsCl, 120 $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Cs}$, 2.5 MgCl_2 , 10 HEPES, 1 EGTA, 4 Na_2ATP , 0.1 Na_3GTP (pH 7.2; 295-300 mosmoles/l) and had a resistance of 2-4 $\text{M}\Omega$. Capacitance measurements were performed using an EPC-10 patch-clamp amplifier (HEKA Electronics, Lambrecht/Pfalz, Germany) using the "sine + dc" software lock-in amplifier method implemented in PatchMaster software. MPC 9/3L-AH cells were held at -90 mV except during membrane depolarization. The sinusoid had amplitude of 25 mV and a frequency of 1 kHz. The stimulation protocol consisted in a single depolarization to -20 mV for 80 ms. Single-pulse current data were leak-subtracted by hyperpolarizing sweeps. Analysis was performed using Igor Pro software version 6.0 (Wavemetrics).

Biochemistry.

Co-immunoprecipitation experiments from brain tissue. Frozen rat brain tissue was homogenized in (10% w/v) of lysis buffer (in millimolar: 150 NaCl, 50 Tris, pH 7.5 and 1% NP-40 including a protease inhibitor cocktail (Roche)). The homogenate was centrifuged at $\sim 16\,000\text{ g}$ for 10 min at 4°C in a micro centrifuge and supernatant collected. For immunoprecipitation, 200 μL of aliquots of supernatant pre-cleared by addition of 40 μL of a 50% slurry (v/v) of rehydrated protein A-Sepharose beads (Amersham Pharmacia), followed

by rotation at 4°C for 1 hr. Pre-cleared supernatants were then separately incubated with 5 µg of either anti-Ca_v3.1, anti-Ca_v3.2 or anti-Ca_v3.3 for 16 hrs at 4°C. To collect immunoprecipitated complex, the samples were further incubated for 2 hrs with 40 µL protein A-Sepharose beads (50% slurry). The beads with immunoprecipitated complex were washed four times with ice cold lysis buffer and resuspended in 40 µL of 2X SDS PAGE sample buffer. Heated at 70°C for 15 min and the soluble proteins were then resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Affinity-purified, rabbit polyclonal antibodies recognizing Ca_v3.1, Ca_v3.2 and Ca_v3.3 were purchased from Alomone Lab and Syntaxin 1A antibody was from Chemicon International (Temecula, CA, USA).

Co-immunoprecipitation experiments from tsA-201 cells. tsA-201 cells expressing Stx1A-myc or SNAP-25 along with the CD4-EGFP-Ca_v3.2^{Cter} fusion protein were solubilized with 400 µL of 50mM Tris/HCl pH 7.5, 0.05 mM EDTA and 10 mM Chaps Buffer supplemented with proteases inhibitor (1X, Roche) and lysed by sonication. Lysates were cleared by centrifugation at ~8000 g for 10 min. All steps were carried out on ice or at 4°C. Lysates were incubated for 3 hrs with 15 µL biotinylated anti-Myc antibody (Santa Cruz) or for 16 hrs with anti-GFP antibody (1/1000, Abcam) and then for 45 min with streptavidine beads or protein G beads (Invitrogen) at 4°C and were washed twice with PBS (1X) Tween 0.1% and twice with PBS (1X). The beads were finally resuspended in PBS (1X). Samples were resolved on Tris-glycine SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes using standard methods. Membranes were blocked in 10% (w/v) milk in PBS (0.1% (v/v) Tween-20) and then incubated with either anti-GFP or anti-SNAP-25 primary antibodies for 2 hrs at room temperature. After being washing once for 5 min, membranes were incubated with horseradish peroxidase conjugated protein A (Abcam). The washed membranes were developed using enhanced chemiluminescence.

nRT culture, immunostaining and confocal imaging.

The Nucleus reticularis area was isolated from lateral thalamus of P0-P1 rat pups, cut into small pieces and then digested in containing papain (Worthington, LS003126) culture media. After digestion, the tissue was washed and triturated for neuron dissociation. nRT neurons were seeded at low density onto coverslips pretreated with poly-D-lysine (Sigma, P7280) followed by Laminin (Sigma, L2020) in 24-well plate. Culture medium consisted of BME (Invitrogen, 21010) supplemented with 1% B-27 supplement (Invitrogen, 17504-044), 2mM

L-glutamine (Invitrogen, 25030-049), 1mM sodium pyruvate (Invitrogen, 11360-070), 10 mM HEPES(Sigma, H7523), 0.6% D-glucose (Sigma, G7528), 1% pen strep (Invitrogen, 15140), and 5% fetal bovine serum (Invitrogen, 26140). The next day after plating, the existing media was replaced by fresh culture media, after that every 4-5 days half of the media was removed and replaced by fresh culture media. For immunostaining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature, washed and permeabilized in PBST (PBS containing 0.02% Triton X-100) for 3 min, and blocked with blocking buffer (3% BSA in PBS) for 30 min. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary monoclonal rabbit Ca_v3.2 (Alomon) and mouse syntaxin-1A (Sigma) antibodies diluted at 1:400 and 1:500, respectively, in blocking buffer. Cells were then washed, incubated 1h at room temperature with anti-rabbit Alexa488-conjugated and anti-mouse Alexa555-conjugated secondary antibodies, washed and mounted on glass slide. Confocal images were acquired with a Zeiss LSM510 Meta microscope and analysed using ImageJ software.

Statistics. Data values are presented as mean \pm S.E.M. for n recorded cells. Statistical significance was determined using Student's t test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, statistically not different.

Acknowledgments

We are grateful to Drs. Robert G. Tsushima (York University, Toronto, Canada) and Herbert Gaisano (University of Toronto, Toronto, Canada) for providing the BoNT/C1, and to Dr. Randy D. Blakeley (Vanderbilt University, Nashville, USA) for the Stx1A^{ΔTM} constructs. We thank Dr. Amy Harkins (Saint Louis University, Missouri, USA) for making available the MPC 9/3L-AH cell line and Dr. Cristina Plata (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain) for technical assistance with MPC cells transfection. We thank Drs. Mike Seagar and Christian Lévêque (Inserm U641, Marseille, France) for antibodies. We are grateful to Dr. Emilio Carbone (University of Torino, Torino, Italy) for critical discussions.

NW was supported by fellowships from Alberta Heritage Foundation for Medical Research and from Hotchkiss Brain Institute. JMFF was funded by Spanish Ministry of Science and Innovation, Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) Funds, and Plan E (Grant SAF2009-13182-C03-02), Fondo de Investigación Sanitaria (Red HERACLES RD06/0009) and Generalitat de Catalunya (Grant 2009SGR1369). LL was supported by VEGA 2/0195/10 grant. PL was supported by ANR-2006-Neuro35 and ANR-09-MNPS-035 grants. GWZ is funded by the Canadian Institutes of Health Research, is a Canada Research Chair and Scientist of the Alberta Heritage Foundation for Medical Research.

References

1. Llinas R, Sugimori M, & Silver RB (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256(5057):677-679.
2. Neher E & Sakaba T (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59(6):861-872.
3. Weber AM, *et al.* (2010) N-type Ca²⁺ channels carry the largest current: implications for nanodomains and transmitter release. *Nat Neurosci* 13(11):1348-1350.
4. Jarvis SE & Zamponi GW (2001) Interactions between presynaptic Ca²⁺ channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol Sci* 22(10):519-525.
5. Zamponi GW (2003) Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci* 92(2):79-83.
6. Harkins AB, Cahill AL, Powers JF, Tischler AS, & Fox AP (2004) Deletion of the synaptic protein interaction site of the N-type (CaV2.2) calcium channel inhibits secretion in mouse pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(42):15219-15224.
7. Sheng ZH, Rettig J, Takahashi M, & Catterall WA (1994) Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron* 13(6):1303-1313.
8. Rettig J, *et al.* (1996) Isoform-specific interaction of the alpha1A subunits of brain Ca²⁺ channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14):7363-7368.
9. Kim DK & Catterall WA (1997) Ca²⁺-dependent and -independent interactions of the isoforms of the alpha1A subunit of brain Ca²⁺ channels with presynaptic SNARE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26):14782-14786.
10. Sheng ZH, Yokoyama CT, & Catterall WA (1997) Interaction of the synprint site of N-type Ca²⁺ channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10):5405-5410.
11. Jarvis SE, Barr W, Feng ZP, Hamid J, & Zamponi GW (2002) Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem* 277(46):44399-44407.
12. Mochida S, Sheng ZH, Baker C, Kobayashi H, & Catterall WA (1996) Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 17(4):781-788.
13. Rettig J, *et al.* (1997) Alteration of Ca²⁺ dependence of neurotransmitter release by disruption of Ca²⁺ channel/syntaxin interaction. *J Neurosci* 17(17):6647-6656.
14. Bezprozvanny I, Scheller RH, & Tsien RW (1995) Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378(6557):623-626.
15. Wisner O, Bennett MK, & Atlas D (1996) Functional interaction of syntaxin and SNAP-25 with voltage-sensitive L- and N-type Ca²⁺ channels. *EMBO J* 15(16):4100-4110.
16. Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T, & Catterall WA (1999) Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat Neurosci* 2(11):939-941.
17. Jarvis SE, Magga JM, Beedle AM, Braun JE, & Zamponi GW (2000) G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and Gbetagamma. *J Biol Chem* 275(9):6388-6394.

18. Sutton KG, McRory JE, Guthrie H, Murphy TH, & Snutch TP (1999) P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature* 401(6755):800-804.
19. Jarvis SE & Zamponi GW (2001) Distinct molecular determinants govern syntaxin 1A-mediated inactivation and G-protein inhibition of N-type calcium channels. *J Neurosci* 21(9):2939-2948.
20. Wisner O, Tobi D, Trus M, & Atlas D (1997) Synaptotagmin restores kinetic properties of a syntaxin-associated N-type voltage sensitive calcium channel. *FEBS Lett* 404(2-3):203-207.
21. Khosravani H & Zamponi GW (2006) Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev* 86(3):941-966.
22. Cueni L, Canepari M, Adelman JP, & Luthi A (2009) Ca(2+) signaling by T-type Ca(2+) channels in neurons. *Pflugers Arch* 457(5):1161-1172.
23. Carabelli V, *et al.* (2007) Chronic hypoxia up-regulates alpha1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J Physiol* 584(Pt 1):149-165.
24. Ivanov AI & Calabrese RL (2000) Intracellular Ca²⁺ dynamics during spontaneous and evoked activity of leech heart interneurons: low-threshold Ca currents and graded synaptic transmission. *J Neurosci* 20(13):4930-4943.
25. Pan ZH, Hu HJ, Perring P, & Andrade R (2001) T-type Ca(2+) channels mediate neurotransmitter release in retinal bipolar cells. *Neuron* 32(1):89-98.
26. Egger V, Svoboda K, & Mainen ZF (2003) Mechanisms of lateral inhibition in the olfactory bulb: efficiency and modulation of spike-evoked calcium influx into granule cells. *J Neurosci* 23(20):7551-7558.
27. Huguenard JR & Prince DA (1992) A novel T-type current underlies prolonged Ca(2+)-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 12(10):3804-3817.
28. Cueni L, *et al.* (2008) T-type Ca²⁺ channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites. *Nat Neurosci* 11(6):683-692.
29. Joksovic PM, Bayliss DA, & Todorovic SM (2005) Different kinetic properties of two T-type Ca²⁺ currents of rat reticular thalamic neurones and their modulation by enflurane. *J Physiol* 566(Pt 1):125-142.
30. McKay BE, *et al.* (2006) Ca(V)₃ T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur J Neurosci* 24(9):2581-2594.
31. Dulubova I, *et al.* (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J* 18(16):4372-4382.
32. Cohen MW, Jones OT, & Angelides KJ (1991) Distribution of Ca²⁺ channels on frog motor nerve terminals revealed by fluorescent omega-conotoxin. *J Neurosci* 11(4):1032-1039.
33. Westenbroek RE, *et al.* (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9(6):1099-1115.
34. Westenbroek RE, *et al.* (1995) Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci* 15(10):6403-6418.
35. Bennett MK, Calakos N, & Scheller RH (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257(5067):255-259.

36. Leveque C, *et al.* (1994) Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 269(9):6306-6312.
37. Yoshida A, *et al.* (1992) HPC-1 is associated with synaptotagmin and omega-conotoxin receptor. *J Biol Chem* 267(35):24925-24928.
38. Bezprozvanny I, Zhong P, Scheller RH, & Tsien RW (2000) Molecular determinants of the functional interaction between syntaxin and N-type Ca²⁺ channel gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25):13943-13948.
39. Fiebig KM, Rice LM, Pollock E, & Brunger AT (1999) Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol* 6(2):117-123.
40. Richmond JE, Weimer RM, & Jorgensen EM (2001) An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* 412(6844):338-341.
41. Tscherter A, *et al.* (2011) Minimal alterations in T-type calcium channel gating markedly modify physiological firing dynamics. *J Physiol* 589(Pt 7):1707-1724.
42. Serra SA, *et al.* (2010) A mutation in the first intracellular loop of CACNA1A prevents P/Q channel modulation by SNARE proteins and lowers exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4):1672-1677.
43. Harkins AB, Cahill AL, Powers JF, Tischler AS, & Fox AP (2003) Expression of recombinant calcium channels support secretion in a mouse pheochromocytoma cell line. *J Neurophysiol* 90(4):2325-2333.
44. Mochida S, *et al.* (2003) Requirement for the synaptic protein interaction site for reconstitution of synaptic transmission by P/Q-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5):2819-2824.
45. Keith RK, Poage RE, Yokoyama CT, Catterall WA, & Meriney SD (2007) Bidirectional modulation of transmitter release by calcium channel/syntaxin interactions in vivo. *J Neurosci* 27(2):265-269.
46. Vitko I, *et al.* (2007) The I-II loop controls plasma membrane expression and gating of Ca(v)3.2 T-type Ca²⁺ channels: a paradigm for childhood absence epilepsy mutations. *J Neurosci* 27(2):322-330.
47. Baumgart JP, *et al.* (2008) I-II loop structural determinants in the gating and surface expression of low voltage-activated calcium channels. *PLoS One* 3(8):e2976.

Figures Legends

Fig. 1. Ca_v3.2 channel interacts with syntaxin-1A in central neurons. (A) Confocal images of nRT neurons permeabilized and stained for Ca_v3.2 (green) and syntaxin-1A (red). Overlaid images and colocalized pixels (in white) are shown. (B) Co-immunoprecipitation of syntaxin-1A from rat brain homogenate with specific anti-Ca_v3.1, anti-Ca_v3.2 and anti-Ca_v3.3 antibodies.

Fig. 2. Syntaxin-1A modulates Ca_v3.2 channel inactivation. (A) Representative Ba²⁺ current traces recorded from a Ca_v3.2 (top panel) and Ca_v3.2/Stx-1A-expressing cell (bottom panel) in response to 150 ms depolarizing steps to -20 mV from a holding potential varied from -120 mV to -50 mV (*a* to *f*). (B) Corresponding mean normalized steady-state inactivation curves for Ca_v3.2 (filled circles) and Ca_v3.2/Stx-1A-expressing cells (open circles). (C) Plot of the mean shift values in the half-inactivation potential of Ca_v3.2 channel coexpressed with the different protein combinations indicated in the figure. (D) Mean normalized activation curve for Ca_v3.2 (filled circles) and Ca_v3.2/Stx1A-expressing cells (open circles). Inset indicates the shift values in the half-activation potential produced upon coexpression of Stx1A or Stx1A^{ΔTM}.

Fig. 3. Syntaxin-1A interacts within the carboxy-terminal domain of Ca_v3.2. (A) Schematic representation of the different constructs of intracellular regions of Ca_v3.2 used. (B) Whole-cell Ba²⁺ currents (top panels) recorded in response to a 150 ms depolarizing step to -20 mV from a holding potential of -85 mV before (P1) and after (P2) a 5 sec hyperpolarizing pulse to -130 mV in a Ca_v3.2 (left panel), Ca_v3.2 / Stx-1A (middle panel) and Ca_v3.2 / Stx-1A / CD4-Ca_v3.2^{Cter}-expressing cell (right panel) and the corresponding mean plot of the current facilitation (I_{P2} / I_{P1}) (bottom panel). Note that the hyperpolarizing pulse produces a strong current facilitation in the presence of Stx-1A which is competitively and specifically abolished upon co-expression of the CD4-Ca_v3.2^{Cter} construct. (C) Confocal images of living COS cells showing the translocation of the EGFP-Ca_v3.2^{Cter} construct (green) to the plasma membrane mediated by Stx-1A. Plasma membrane was stained with rhodamine labeled concanavalin A (ConA-Rhod, red). Overlaid images and pixel intensity profiles of crossed sections indicated by the white line are shown. Note that Stx-1A does not translocate EGFP-Ca_v3.2^{II-III linker} fusion protein. (D) Co-immunoprecipitation of the CD4-EGFP-

Ca_v3.2^{Cter} fusion protein from tsA-201 cells co-transfected with Stx-1A-Myc.* Possible degradation of the CD4-EGFP-Ca_v3.2^{Cter} fusion protein.

Fig. 4. Ca_v3.2 channel induces voltage-dependent exocytosis. (A) Representative Ca²⁺ current traces recorded from MPC 9/3L-AH cells expressing Ca_v3.2 channel alone (top panel), and in combination with CD4-Ca_v3.2^{Cter} (middle panel) or CD4-Ca_v3.2^{II-II linker} (bottom panel) in response to a 100 ms long depolarizing step to -20 mV from a holding potential of -90 mV. These data show that T-type currents are functional in the presence of CD4-Ca_v3.2^{Cter}. (B) Corresponding mean Ca²⁺ influx normalized by the whole-cell capacitance [Q_{Ca} density (pC/pF)] elicited by the 100 ms long depolarizing step to -20 mV. (C) Capacitance traces plotted as a function of time from the same cells shown in (A). (D) Corresponding mean exocytosis [Δ Cm (fF)] normalized as a function of Ca²⁺ entry [Q_{Ca} density (pC/pF)].

Supplementary information

Supplementary Figure Legends

Fig. S1. Syntaxin-1A modulates Ca_v3.1 and Ca_v3.3 channel inactivation. (A) Representative Ba²⁺ current traces recorded from a Ca_v3.1 (left panels) and Ca_v3.1/Stx-1A-expressing cell (left panel) in response to 150 ms depolarizing steps to -20 mV from a holding potential varied from -120 mV to -50 mV (*a* to *f*). (B) Corresponding mean normalized steady-state inactivation curves for Ca_v3.1 (filled circles) and Ca_v3.1/Stx-1A-expressing cells (open circles). (C) Plot of the mean shift values in the half-inactivation potential of Ca_v3.1 channel produced by Stx-1A and the reversibility upon co-expression of the BoNT/C1. Note that co-expression of the Stx-1A construct deleted of the transmembrane domain (Stx1A^{ΔTM}) failed to hyperpolarize the voltage-dependence of inactivation of Ca_v3.1 channel. (D-E) Legend is same as in (A-C) but for cells expressing Ca_v3.3 channel.

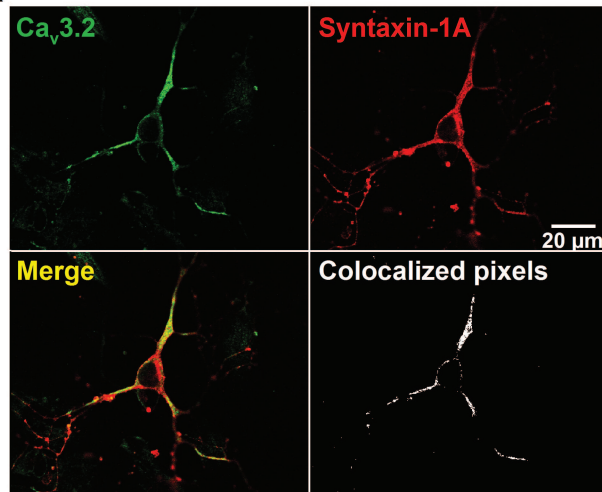
Fig. S2. Syntaxin-1A does not alter intramembrane charge movements of Ca_v3.2 channel. (A) Ca_v3.2 current traces recorded in response to a 20 ms depolarizing step from -100 mV to -30 mV before (black trace) and after (grey trace) application of 30 μM erbium (Er³⁺) demonstrate complete inhibition of the inward Ca²⁺ current by Er³⁺. Amplitude of initial upstroke (inset) was not affected indicating that Er³⁺ did not alter charge movements of the channel. (B) Representative set of gating current traces recorded from a Ca_v3.2 (left panel) and Ca_v3.2/Stx1A-expressing cell (right panel) in response to 40 ms long depolarizing steps to values ranging between -80 mV and +40 mV from a membrane potential of -120 mV. (C) Normalized *On* (top panel) and *Off* Ca_v3.2 gating transients in the absence (black traces) and presence (grey traces) of Stx1A to facilitate comparison of respective time courses. (D) Corresponding mean normalized voltage-dependence of *Q_{on}* measured in the absence (filled circles) and presence (open circles) of Stx1A. Fits of a Boltzmann function gave mean values for midpoint activation voltage (*V*_{0.5 *Q_{on}*}) of -20.6 ± 2.7 mV in Ca_v3.2 cells and -22.8 ± 5.3 mV for Ca_v3.2-Stx1A-expressing cells (*inset*). (E) Legend is same as in (D) but for *Q_{off}*. Mean values for *V*_{0.5 *Q_{off}*} were -24.7 ± 3.9 mV in Ca_v3.2 cells and -27.8 ± 2.7 mV for Ca_v3.2-Stx1A-expressing cells (*inset*).

Fig. S3. SNAP-25 modulates syntaxin-1A-mediated regulation of Ca_v3.2 channel inactivation. (A) Co-immunoprecipitation of CD4-EGFP-Ca_v3.2^{Cter} from tsA-201 cells co-transfected with SNAP-25. (B) Representative Ba²⁺ current traces recorded from Ca_v3.2/SNAP-25-expressing cells in the absence (top panel) and presence of Stx-1A (bottom panel) in response to 150 ms depolarizing steps to -20 mV from a holding potential varied from -120 mV to -50 mV (*a* to *f*). (C) Corresponding mean normalized steady-state inactivation curves for Ca_v3.2 channel in the absence (filled circles) and presence of Stx-1A (open circles). For comparison, steady-state inactivation curves of Ca_v3.2 and Ca_v3.2/Stx-1A channels are depicted in dashed lines. (D) Corresponding plot of the mean shift values in the half-inactivation potential.

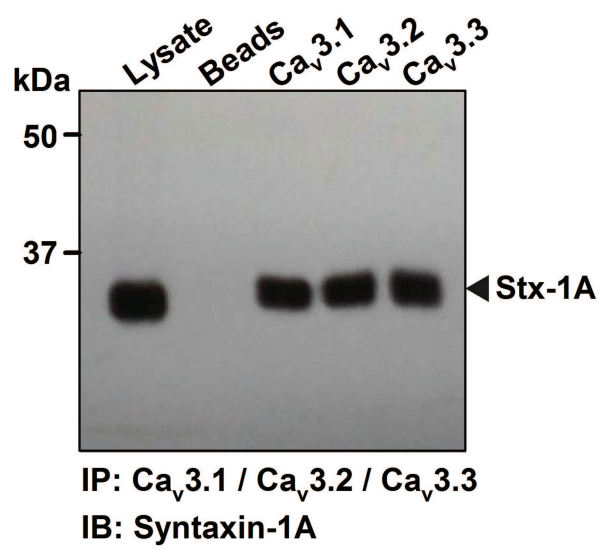
Table S1. Electrophysiological properties of Ca_v3.2 channel expressed in tsA-201 cells in combination with the different SNARE proteins. NI, not investigated.

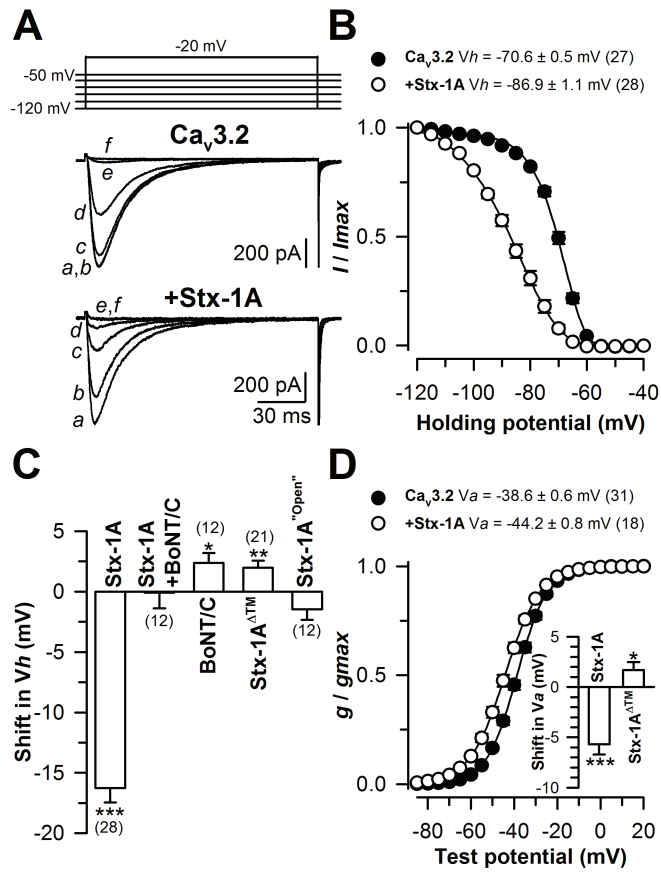
	Activation					Inactivation													
	V _{0.5} (mV)	sem	k (mV)	sem	(n)	τ _{activ} (ms)	sem	(n)	V _{0.5}	sem	k	sem	(n)	τ _{inac}	sem	(n)	τ _{recovery}	sem	(n)
Ca_v3.2	-38.6	±0.6	6.7	±0.1	(31)	2.7	±1.8	(31)	-70.6	±0.5	4.4	±0.2	(27)	13.1	±0.7	(31)	489.4	±25.9	(25)
+Stx-1A	-44.2	±0.8 ^{***}	8.0	±0.2 ^{***}	(18)	2.6	±1.5	(18)	-86.9	±1.1 ^{***}	7.0	±0.2 ^{***}	(28)	21.0	±1.3 ^{***}	(18)	876.3	±60.7 ^{***}	(14)
+SNAP25	-42.2	±0.6 ^{***}	6.3	±0.1 [*]	(30)	2.5	±0.1	(29)	-72.6	±1.0	4.1	±0.1	(25)	10.9	±0.6 [*]	(29)	NI		
+Syt1	-41.5	±1.0 [*]	5.6	±0.2 ^{***}	(14)	NI			-71.1	±0.5	3.5	±0.1 ^{**}	(11)	NI			NI		
+Syt2	-41.7	±0.7 ^{**}	6.5	±0.2	(15)	NI			-71.8	±0.8	4.1	±0.1	(11)	NI			NI		
+CSP	-39.0	±0.8	6.6	±0.2	(15)	NI			-71.8	±1.0	4.2	±0.1	(14)	NI			NI		
+Rim1	-42.2	±0.8 ^{**}	6.2	±0.2 ^{**}	(18)	NI			-71.9	±0.7	4.1	±0.1	(11)	NI			NI		

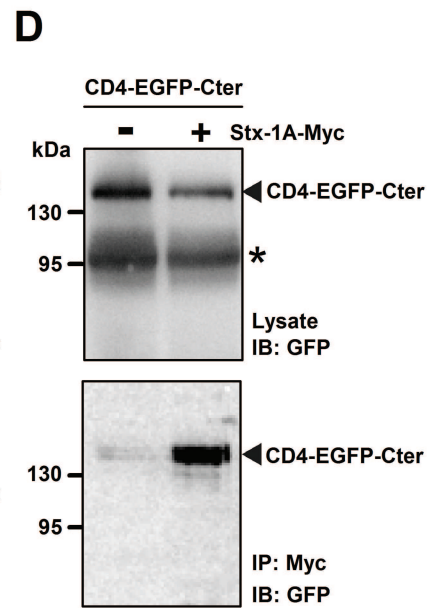
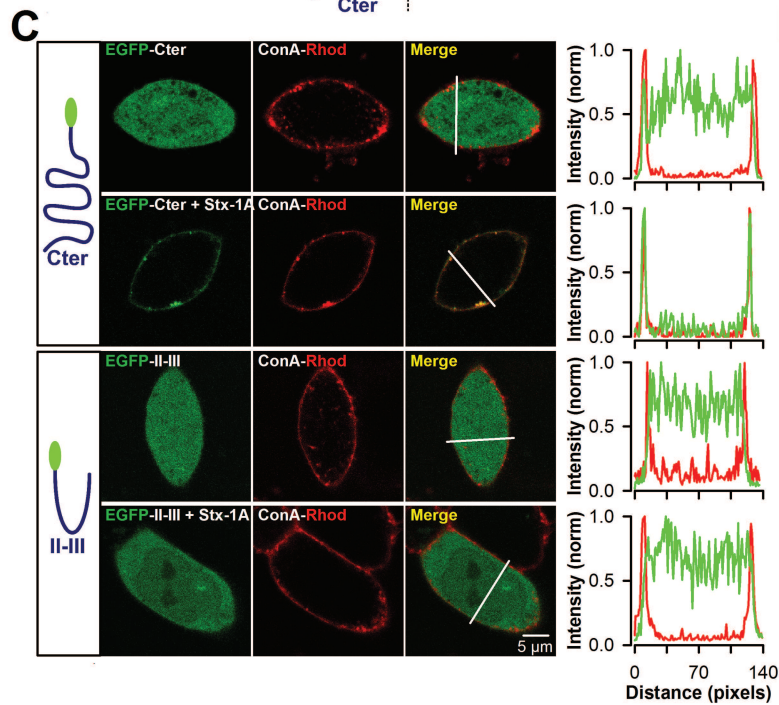
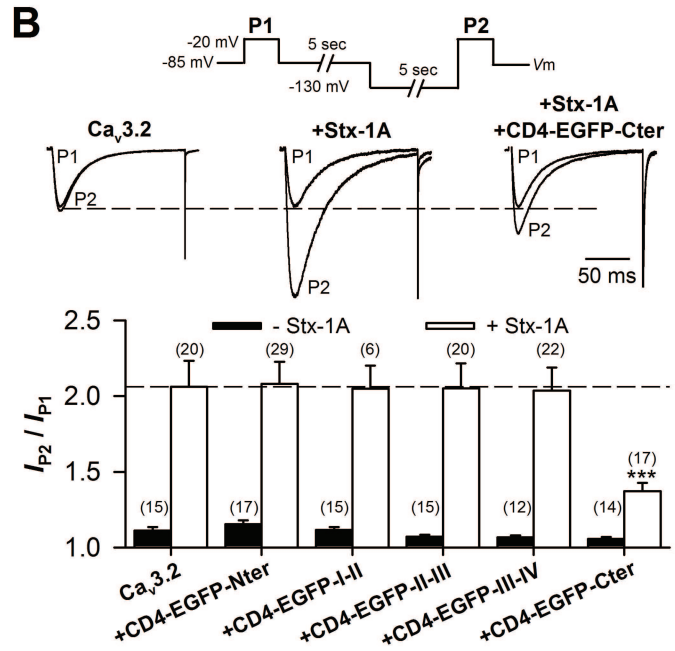
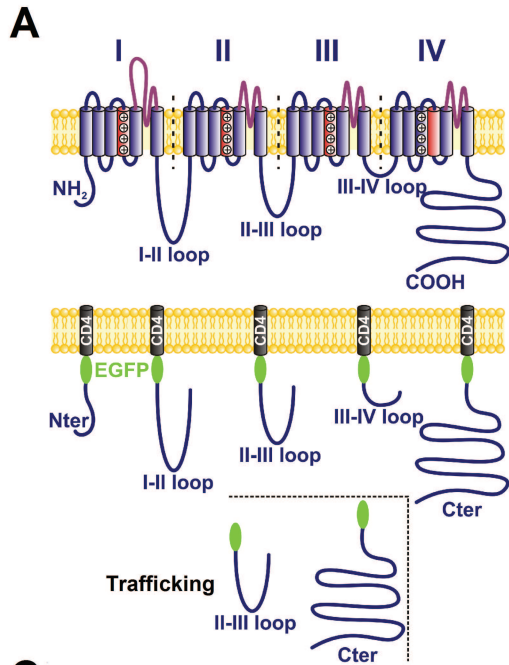
A

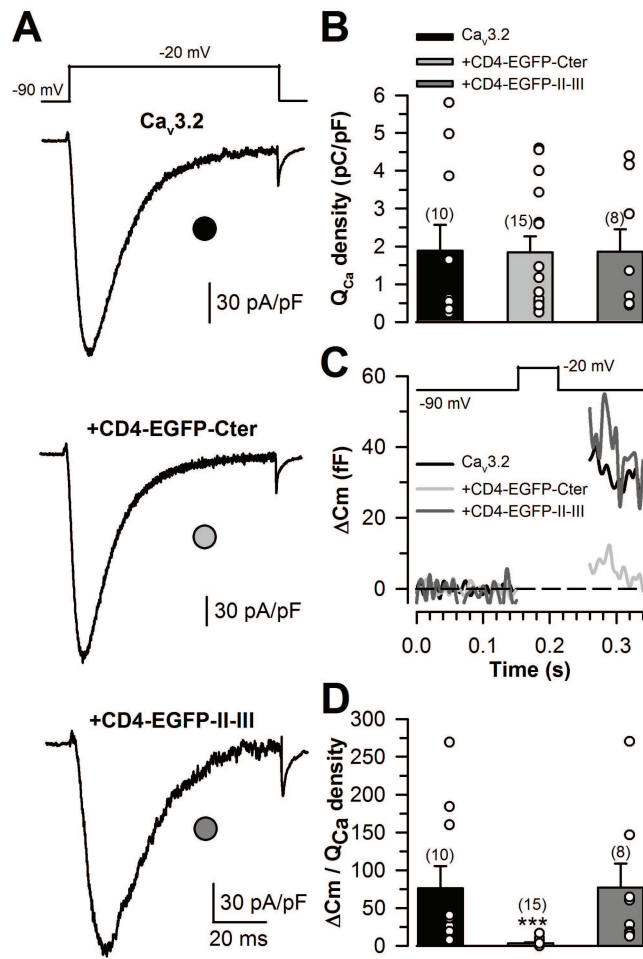


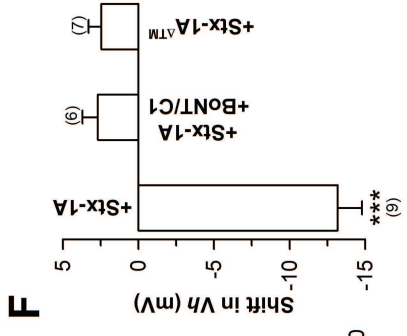
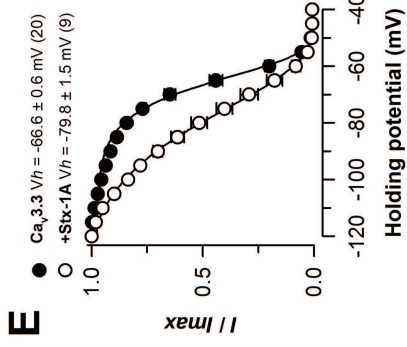
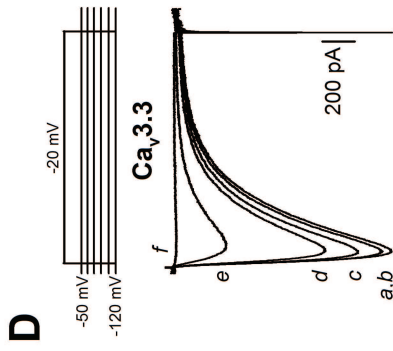
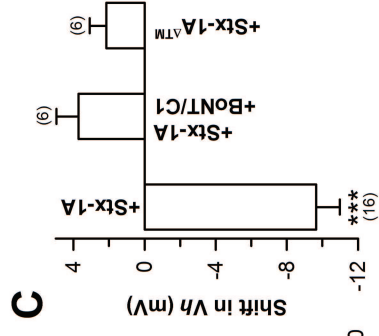
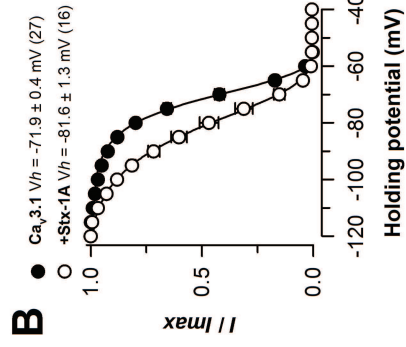
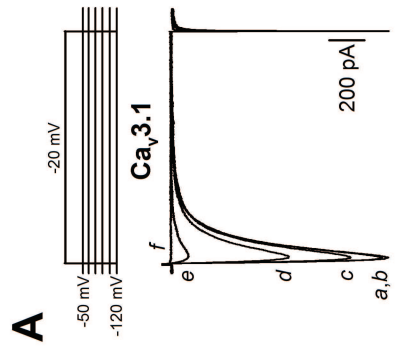
B

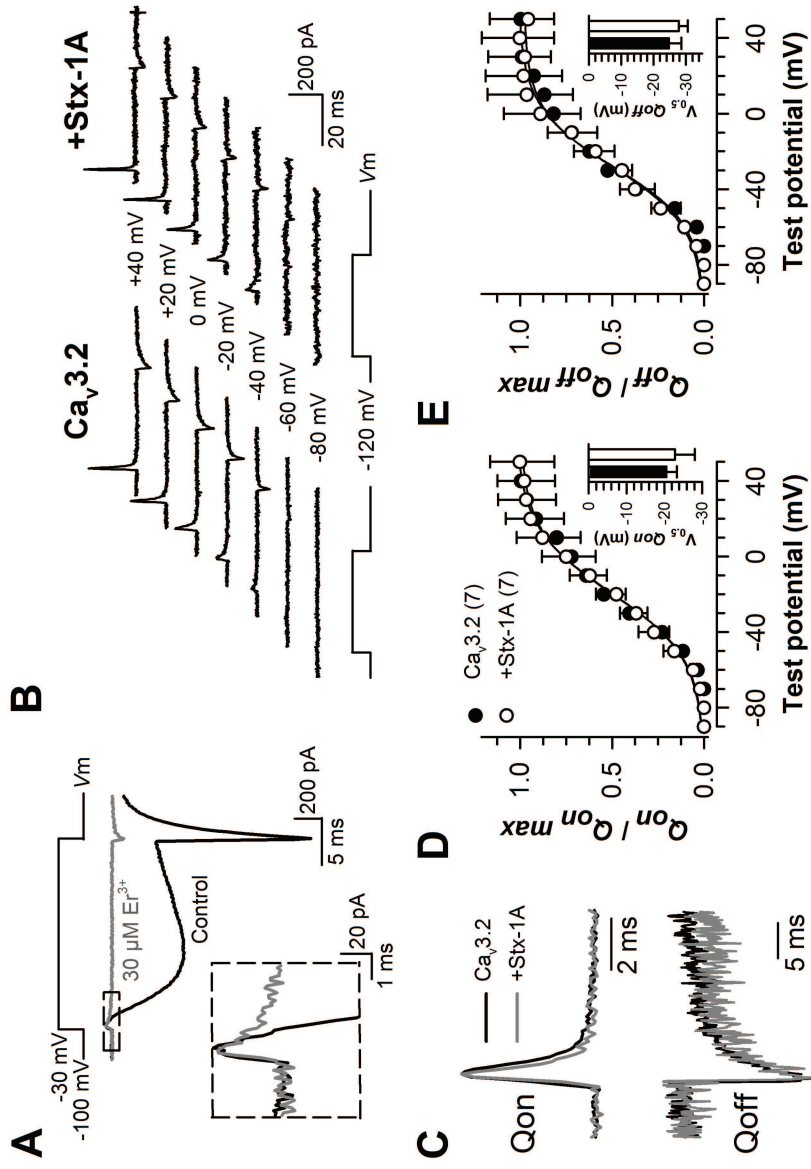


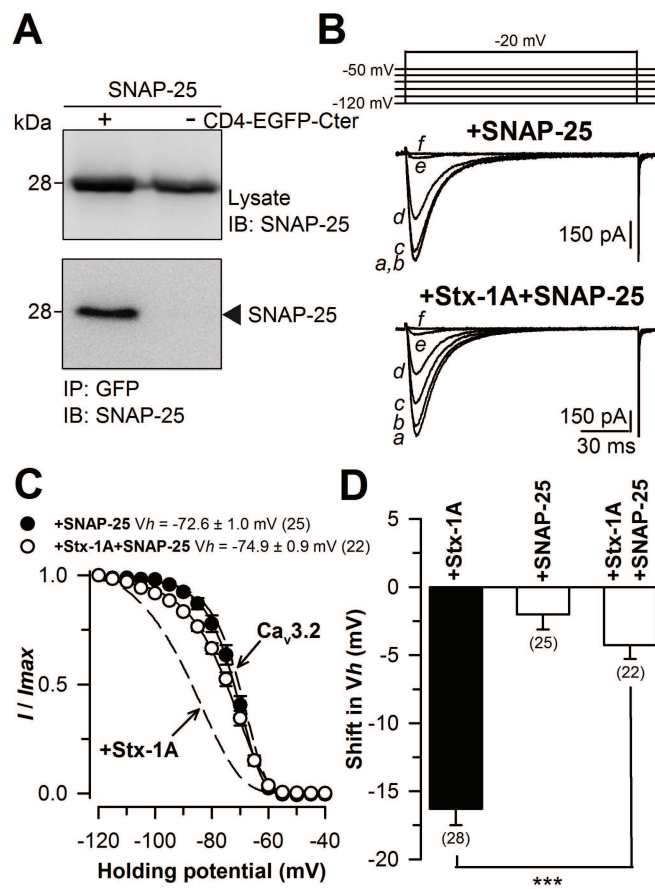












Références bibliographiques

- Abbott, L. C., K. R. Isaacs et J. A. Heckroth (1996). "Co-localization of tyrosine hydroxylase and zebrin ii immunoreactivities in purkinje cells of the mutant mice, tottering and tottering/leaner." Neuroscience **71**(2): 461-475.
- Aizawa, M., Y. Ito et H. Fukuda (1997). "Pharmacological profiles of generalized absence seizures in lethargic, stargazer and [gamma]-hydroxybutyrate-treated model mice." Neuroscience Research **29**(1): 17-25.
- Alvarez, J., J. Hamplova, A. Hohaus, I. Morano, H. Haase et G. Vassort (2004). "Calcium current in rat cardiomyocytes is modulated by the carboxyl-terminal Ahnak domain." Journal of Biological Chemistry **279**(13): 12456-12461.
- Astapova, I., L. J. Lee, C. Morales, S. Tauber, M. Bilban et A. N. Hollenberg (2008). "The nuclear corepressor, NCoR, regulates thyroid hormone action in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(49): 19544-19549.
- Ausó, E., R. Lavado-Autric, E. Cuevas, F. E. del Rey, G. Morreale de Escobar et P. Berbel (2004). "A Moderate and Transient Deficiency of Maternal Thyroid Function at the Beginning of Fetal Neocortigenesis Alters Neuronal Migration." Endocrinology **145**(9): 4037-4047.
- Austin, M. C., M. Schultzberg, L. C. Abbott, P. Montpied, J. R. Evers, S. M. Paul et J. N. Crawley (1992). "Expression of tyrosine hydroxylase in cerebellar Purkinje neurons of the mutant tottering and leaner mouse." Brain Res Mol Brain Res **15**(3-4): 227-240.
- Bading, H., D. D. Ginty et M. E. Greenberg (1993). "Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways." Science **260**(5105): 181-186.
- Baniahmad, A., A. C. Köhne et R. Renkawitz (1992). "A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor." EMBO J. **11**(3): 1015-1023.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire et T. Kouzarides (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." Nature **410**(6824): 120-124.
- Becker, N., I. Seugnet, H. Guissouma, S. M. Dupre et B. A. Demeneix (2001). "Nuclear Corepressor and Silencing Mediator of Retinoic and Thyroid Hormone Receptors Corepressor Expression Is Incompatible with T3-Dependent TRH Regulation." Endocrinology **142**(12): 5321-5331.
- Béguin, P., R. N. Mahalakshmi, K. Nagashima, D. H. K. Cher, H. Ikeda, Y. Yamada, Y. Seino et W. Hunziker (2006). "Nuclear sequestration of beta subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca²⁺ channel regulation." Journal of Molecular Biology **355**(1): 34-46.
- Béguin, P., R. N. Mahalakshmi, K. Nagashima, D. H. K. Cher, N. Kuwamura, Y. Yamada, Y. Seino et W. Hunziker (2005). "Roles of 14-3-3 and calmodulin binding in subcellular localization and function of the small G-protein Rem2." Biochem. J. **390**(1): 67-75.
- Béguin, P., K. Nagashima, T. Gonoï, T. Shibasaki, K. Takahashi, Y. Kashima, N. Ozaki, K. Geering, T. Iwanaga et S. Seino (2001). "Regulation of Ca²⁺ channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem." Nature **411**(6838): 701-706.
- Beharier, O., Y. Etzion, A. Katz, H. Friedman, N. Tenbosh, S. Zacharish, S. Bereza, U. Goshen et A. Moran (2007). "Crosstalk between L-type calcium channels and ZnT-1, a new player in rate-dependent cardiac electrical remodeling." Cell Calcium **42**(1): 71-82.
- Bernal, J. (2007). "Thyroid hormone receptors in brain development and function." Nat Clin Pract End Met **3**(3): 249-259.
- Bito, H., K. Deisseroth et R. W. Tsien (1996). "CREB Phosphorylation and Dephosphorylation: A Ca²⁺- and Stimulus Duration-Dependent Switch for Hippocampal Gene Expression." Cell **87**(7): 1203-1214.
- Bodenner, D. L., M. A. Mroczynski, B. D. Weintraub, S. Radovick et F. E. Wondisford (1991). "A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene." Journal of Biological Chemistry **266**(32): 21666-21673.

- Brice, N., N. Berrow, V. Campbell, KM Page, K Brickley, I Tedder et A. Dolphin (1997). "Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the alpha1A and alpha2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive alpha1A antibody." Eur J Neurosci **9**(4): 749-759.
- Brosenitsch, T. A. et D. M. Katz (2001). "Physiological Patterns of Electrical Stimulation Can Induce Neuronal Gene Expression by Activating N-Type Calcium Channels." The Journal of Neuroscience **21**(8): 2571-2579.
- Buraei, Z. et J. Yang (2010). "The beta Subunit of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels." Physiological Reviews **90**(4): 1461-1506.
- Burgess, D. L., G. H. Biddlecome, S. I. McDonough, M. E. Diaz, C. A. Zilinski, B. P. Bean, K. P. Campbell et J. L. Noebels (1999). "β Subunit Reshuffling Modifies N- and P/Q-Type Ca²⁺Channel Subunit Compositions in Lethargic Mouse Brain." Molecular and Cellular Neuroscience **13**(4): 293-311.
- Burgess, D. L., J. M. Jones, M. H. Meisler et J. L. Noebels (1997). "Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse." Cell **88**(3): 385-392.
- Caddick, S. J. et D. A. Hosford (1996). "GABAB-activated gK⁺ in thalamic neurons in the lethargic (lh/lh) mouse model of generalized absence seizures." Neuroscience Letters **205**(1): 29-32.
- Caddick, S. J., C. Wang, C. F. Fletcher, N. A. Jenkins, N. G. Copeland et D. A. Hosford (1999). "Excitatory But Not Inhibitory Synaptic Transmission Is Reduced in Lethargic (Cacnb4lh) and Tottering (Cacna1atg) Mouse Thalami." J Neurophysiol **81**(5): 2066-2074.
- Carrion, A. M., W. A. Link, F. Ledo, B. Mellstrom et J. R. Naranjo (1999). "DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor." Nature **398**(6722): 80-84.
- Carrion, A. M., B. Mellström et J. R. Naranjo (1998). "Protein Kinase A-Dependent Derepression of the Human Prodynorphin Gene via Differential Binding to an Intragenic Silencer Element." Mol. Cell. Biol. **18**(12): 6921-6929.
- Castellano, A., X. Wei, L. Birnbaumer et E. Perez-Reyes (1993). "Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit." Journal of Biological Chemistry **268**(17): 12359-12366.
- Chatterjee, V., J. Lee, A. Rentoumis et J. Jameson (1989). "Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(23): 9114-9118.
- Chawla, S., G. E. Hardingham, D. R. Quinn et H. Bading (1998). "CBP: A Signal-Regulated Transcriptional Coactivator Controlled by Nuclear Calcium and CaM Kinase IV." Science **281**(5382): 1505-1509.
- Chen, J. D. et R. M. Evans (1995). "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." Nature **377**(6548): 454-457.
- Chen, Y.-h., M.-h. Li, Y. Zhang, L.-l. He, Y. Yamada, A. Fitzmaurice, Y. Shen, H. Zhang, L. Tong et J. Yang (2004). "Structural basis of the [alpha]1-[beta] subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels." Nature **429**(6992): 675-680.
- Cheng, S.-Y., J. L. Leonard et P. J. Davis (2010). "Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions." Endocrine Reviews **31**(2): 139-170.
- Choi, S., J. H. Kim, E.-J. Roh, M.-J. Ko, J.-E. Jung et H.-J. Kim (2006). "Nuclear Factor-κB Activated by Capacitative Ca²⁺ Entry Enhances Muscarinic Receptor-mediated Soluble Amyloid Precursor Protein (sAPPα) Release in SH-SY5Y Cells." Journal of Biological Chemistry **281**(18): 12722-12728.
- Clipstone, N. A. et G. R. Crabtree (1992). "Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation." Nature **357**(6380): 695-697.
- Colecraft, H. M., B. Alseikhan, S. X. Takahashi, D. Chaudhuri, S. Mittman, V. Yegnasubramanian, R. S. Alvania, D. C. Johns, E. Marbán et D. T. Yue (2002). "Novel functional properties of Ca²⁺ channel β subunits revealed by their expression in adult rat heart cells." The Journal of Physiology **541**(2): 435-452.
- Colvin, R. A., N. Davis, R. W. Nipper et P. A. Carter (2000). "Zinc Transport in the Brain: Routes of Zinc Influx and Efflux in Neurons." The Journal of Nutrition **130**(5): 1484S-1487S.

- Correll, R. N., C. Pang, D. M. Niedowicz, B. S. Finlin et D. A. Andres (2008). "The RGK family of GTP-binding proteins: Regulators of voltage-dependent calcium channels and cytoskeleton remodeling." *Cellular Signalling* **20**(2): 292-300.
- Crabtree, G. R. et S. L. Schreiber (2009). "SnapShot: Ca²⁺-Calcineurin-NFAT Signaling." *Cell* **138**(1): 210-211.e211.
- Danober, L., C. Deransart, A. Depaulis, M. Vergnes et C. Marescaux (1998). "Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat." *Progress in Neurobiology* **55**(1): 27-57.
- Davila, H. M. (1999). "Molecular and Functional Diversity of Voltage-Gated Calcium Channels." *Annals of the New York Academy of Sciences* **868**(1): 102-117.
- De Luca, G., R. M. Di Giorgio, S. Macaione, P. R. Calpona, S. Costantino, E. D. Di Paola, N. Costa, D. Rotiroti, G. F. Ibbadu, E. Russo et G. De Sarro (2005). "Amino acid levels in some lethargic mouse brain areas before and after pentylenetetrazole kindling." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **81**(1): 47-53.
- De Waard, M. et K. P. Campbell (1995). "Subunit regulation of the neuronal alpha 1A Ca²⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes." *The Journal of Physiology* **485**(Pt 3): 619-634.
- Deisseroth, K., E. K. Heist et R. W. Tsien (1998). "Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons." *Nature* **392**(6672): 198-202.
- Devanagondi, R., K. Egami, M. S. LeDoux, E. J. Hess et H. A. Jinnah (2007). "Neuroanatomical substrates for paroxysmal dyskinesia in lethargic mice." *Neurobiology of Disease* **27**(3): 249-257.
- Dickie, M. (1964). "Lethargic (lh)." *Mouse News Lett* **30**: 31.
- Dolmetsch, R. E., U. Pajvani, K. Fife, J. M. Spotts et M. E. Greenberg (2001). "Signaling to the Nucleus by an L-type Calcium Channel-Calmodulin Complex Through the MAP Kinase Pathway." *Science* **294**(5541): 333-339.
- Dung, H. (1975). "Growth retardation, high mortality, and low reproductivity of neurological mutant mice." *Anat Rec* **181**: 347-348.
- Dung, H. C. et R. H. Swigart (1972). "Histo-pathologic observations of the nervous and lymphoid tissues of lethargic mutant mice." *Tex Rep Biol Med* **30**(1): 23-39.
- Ellinor, P. T., J.-F. Zhang, A. D. Randall, M. Zhou, T. L. Schwarz, R. W. Tsien et W. A. Horne (1993). "Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel." *Nature* **363**(6428): 455-458.
- Ercan-Fang, S., H. L. Schwartz et J. H. Oppenheimer (1996). "Isoform-specific 3,5,3'-triiodothyronine receptor binding capacity and messenger ribonucleic acid content in rat adenohypophysis: effect of thyroidal state and comparison with extrapituitary tissues." *Endocrinology* **137**(8): 3228-3233.
- Escayg, A., M. De Waard, D. D. Lee, D. Bichet, P. Wolf, T. Mayer, J. Johnston, R. Baloh, T. Sander et M. H. Meisler (2000). "Coding and noncoding variation of the human calcium channel β_4 subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia." *The American Journal of Human Genetics* **66**(5): 1531-1539.
- Feng, J., J. Yan, S. Michaud, N. Craddock, I. R. Jones, E. H. Cook, D. Goldman, L. L. Heston, L. Peltonen, L. E. Delisi et S. S. Sommer (2001). "Scanning of estrogen receptor α (ER α) and thyroid hormone receptor α (TR α) genes in patients with psychiatric diseases: Four missense mutations identified in ER α gene." *American Journal of Medical Genetics* **105**(4): 369-374.
- Feng, X., Y. Jiang, P. Meltzer et P. M. Yen (2000). "Thyroid Hormone Regulation of Hepatic Genes in Vivo Detected by Complementary DNA Microarray." *Mol Endocrinol* **14**(7): 947-955.
- Fletcher, C. F., C. M. Lutz, T. N. O'Sullivan, J. D. Shaughnessy, R. Hawkes, W. N. Frankel, N. G. Copeland et N. A. Jenkins (1996). "Absence Epilepsy in Tottering Mutant Mice Is Associated with Calcium Channel Defects." *Cell* **87**(4): 607-617.
- Gauthier, K., O. Chassande, M. Plateroti, J.-P. Roux, C. Legrand, B. Pain, B. Rousset, R. Weiss, J. Trouillas et J. Samarut (1999). "Different functions for the thyroid hormone receptors TR[alpha] and TR[beta] in the control of thyroid hormone production and post-natal development." *EMBO J* **18**(3): 623-631.

- Genazzani, A. A., E. Carafoli et D. Guerini (1999). "Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(10): 5797-5801.
- Ghosh A, Carnahan J et G. ME. (1994). "Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons." *Science* **18**(263): 1618-1623.
- Gilbert, M. E., L. Sui, M. J. Walker, W. Anderson, S. Thomas, S. N. Smoller, J. P. Schon, S. Phani et J. H. Goodman (2007). "Thyroid Hormone Insufficiency during Brain Development Reduces Parvalbumin Immunoreactivity and Inhibitory Function in the Hippocampus." *Endocrinology* **148**(1): 92-102.
- Glass, C. K. et M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." *Genes & Development* **14**(2): 121-141.
- Gomez-Ospina, N., F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu et R. Dolmetsch (2006). "The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel CaV1.2 Encodes a Transcription Factor." *Cell* **127**(3): 591-606.
- Gonzalez-Gutierrez, G., E. Miranda-Laferte, A. Neely et P. Hidalgo (2007). "The Src Homology 3 Domain of the β -Subunit of Voltage-gated Calcium Channels Promotes Endocytosis via Dynamin Interaction." *Journal of Biological Chemistry* **282**(4): 2156-2162.
- Göthe, S., Z. Wang, L. Ng, J. M. Kindblom, A. C. Barros, C. Ohlsson, B. Vennström et D. Forrest (1999). "Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary–thyroid axis, growth, and bone maturation." *Genes & Development* **13**(10): 1329-1341.
- Graef, I. A., P. G. Mermelstein, K. Stankunas, J. R. Neilson, K. Deisseroth, R. W. Tsien et G. R. Crabtree (1999). "L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons." *Nature* **401**(6754): 703-708.
- Greenberg, M. E., E. B. Ziff et L. A. Greene (1986). "Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription." *Science*. **3**(234): 80-83.
- Guadano-Ferraz, A., R. Benavides-Piccione, C. Venero, C. Lancha, B. Vennstrom, C. Sandi, J. DeFelipe et J. Bernal (2003). "Lack of thyroid hormone receptor [alpha]1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits." *Mol Psychiatry* **8**(1): 30-38.
- Haase, H., T. Podzuweit, G. Lutsch, A. Hohaus, S. Kostka, C. Lindschau, M. Kott, R. Kraft et I. Morano (1999). "Signaling from β -adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK." *The FASEB Journal* **13**(15): 2161-2172.
- Hadjab-Lallemend, S., K. Wallis, M. van Hogerlinden, S. Dudazy, K. Nordström, B. Vennström et A. Fisahn (2010). "A mutant thyroid hormone receptor alpha1 alters hippocampal circuitry and reduces seizure susceptibility in mice." *Neuropharmacology* **58**(7): 1130-1139.
- Hahm, S. H., Y. Chen, C. Vinson et L. E. Eiden (2003). "A Calcium-Initiated Signaling Pathway Propagated through Calcineurin and cAMP Response Element-Binding Protein Activates Proenkephalin Gene Transcription after Depolarization." *Molecular Pharmacology* **64**(6): 1503-1511.
- Hardingham, G. E., F. J. L. Arnold et H. Bading (2001). "Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity." *Nat Neurosci* **4**(3): 261-267.
- Hardingham, G. E., S. Chawla, C. M. Johnson et H. Bading (1997). "Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression." *Nature* **385**(6613): 260-265.
- Hartzell, H. C., Z. Qu, K. Yu, Q. Xiao et L.-T. Chien (2008). "Molecular Physiology of Bestrophins: Multifunctional Membrane Proteins Linked to Best Disease and Other Retinopathies." *Physiological Reviews* **88**(2): 639-672.
- Helton, T. D. et W. A. Horne (2002). "Alternative splicing of the beta 4 subunit has alpha 1 subunit subtype-specific effects on Ca²⁺ channel gating." *J. Neurosci.* **22**(5): 1573-1582.
- Hernández-Ochoa, E. O., M. Contreras, Z. Cseresnyés et M. F. Schneider (2007). "Ca²⁺ signal summation and NFATc1 nuclear translocation in sympathetic ganglion neurons during repetitive action potentials." *Cell Calcium* **41**(6): 559-571.

- Hess, E. J. et M. C. Wilson (1991). "Tottering and leaner mutations perturb transient developmental expression of tyrosine hydroxylase in embryologically distinct purkinje cells." Neuron **6**(1): 123-132.
- Hetzel, B. S. et J. T. Dunn (1989). "The Iodine Deficiency Disorders: Their Nature and Prevention." Annual Review of Nutrition **9**(1): 21-38.
- Hibino, H., R. Pironkova, O. Onwumere, M. Rousset, P. Charnet, A. J. Hudspeth et F. Lesage (2003). "Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta4 subunit." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(1): 307-312.
- Hohaus, A., V. Person, J. Behlke, J. Schaper, I. Morano et H. Haase (2002). "The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca²⁺ channels and the actin-based cytoskeleton." The FASEB Journal **16**(10): 1205-1216.
- Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzel, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass et M. G. Rosenfeld (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." Nature **377**(6548): 397-404.
- Hosford, D., S. Clark, Z. Cao, J. W. Wilson, F. Lin, R. Morrisett et A. Huin (1992). "The role of GABAB receptor activation in absence seizures of lethargic (lh/lh) mice." Science **257**(5068): 398-401
- Hosford, D., F. Lin, Y. Wang, S. Caddick, M. Rees, N. Parkinson, J. Barclay, R. Cox, R. Gardiner, D. Hosford, P. Denton, Y. Wang, M. Seldin et B. Chen (1999). "Studies of the lethargic (lh/lh) mouse model of absence seizures: regulatory mechanisms and identification of the lh gene." Adv Neurol. **79**: 239-252.
- Hosford, D. A., F. H. Lin, D. L. Kraemer, Z. Cao, Y. Wang et J. T. Wilson (1995). "Neural network of structures in which GABAB receptors regulate absence seizures in the lethargic (lh/lh) mouse model." The Journal of Neuroscience **15**(11): 7367-7376.
- Hosford, D. A., Y. Wang, C. C. Liu et O. C. Snead (1995). "Characterization of the antiabsence effects of SCH 50911, a GABA-B receptor antagonist, in the lethargic mouse, gamma-hydroxybutyrate, and pentylentetrazole models." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **274**(3): 1399-1403.
- Hu, X., Y. Li et M. A. Lazar (2001). "Determinants of CoRNR-Dependent Repression Complex Assembly on Nuclear Hormone Receptors." Mol. Cell. Biol. **21**(5): 1747-1758.
- Hudmon, A., H. Schulman, J. Kim, J. M. Maltez, R. W. Tsien et G. S. Pitt (2005). "CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation." The Journal of Cell Biology **171**(3): 537-547.
- Ishizuka, T. et M. A. Lazar (2003). "The N-CoR/Histone Deacetylase 3 Complex Is Required for Repression by Thyroid Hormone Receptor." Mol. Cell. Biol. **23**(15): 5122-5131.
- Jepsen, K. et M. G. Rosenfeld (2002). "Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes." Journal of cell science **115**(4): 689-698.
- Jeyakumar, M., X.-f. Liu, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst et M. K. Bagchi (2007). "Phosphorylation of Thyroid Hormone Receptor-associated Nuclear Receptor Corepressor Holocomplex by the DNA-dependent Protein Kinase Enhances Its Histone Deacetylase Activity." Journal of Biological Chemistry **282**(13): 9312-9322.
- Kapoor, R., M. van Hogerlinden, K. Wallis, H. Ghosh, K. Nordstrom, B. Vennstrom et V. A. Vaidya (2010). "Unliganded thyroid hormone receptor alpha 1 impairs adult hippocampal neurogenesis." FASEB J. **24** (12): 4793-4805.
- Khan, Z. et H. A. Jinnah (2002). "Paroxysmal Dyskinesias in the Lethargic Mouse Mutant." J. Neurosci. **22**(18): 8193-8200.
- Kim, S.-W., S.-C. Ho, S.-J. Hong, K. M. Kim, E. C. So, M. Christoffolete et J. W. Harney (2005). "A Novel Mechanism of Thyroid Hormone-dependent Negative Regulation by Thyroid Hormone Receptor, Nuclear Receptor Corepressor (NCoR), and GAGA-binding Factor on the Rat CD44 Promoter." Journal of Biological Chemistry **280**(15): 14545-14555.

- Kingsbury, T. J., L. L. Bambrick, C. D. Roby et B. K. Krueger (2007). "Calcineurin activity is required for depolarization-induced, CREB-dependent gene transcription in cortical neurons." Journal of Neurochemistry **103**(2): 761-770.
- Kiyonaka, S., M. Wakamori, T. Miki, Y. Uriu, M. Nonaka, H. Bito, A. M. Beedle, E. Mori, Y. Hara, M. De Waard, M. Kanagawa, M. Itakura, M. Takahashi, K. P. Campbell et Y. Mori (2007). "RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels." Nat Neurosci **10**(6): 691-701.
- Kobrinisky, E., S. Q. Duong, A. Sheydina et N. M. Soldatov (2011). "Microdomain organization and frequency-dependence of CREB-dependent transcriptional signaling in heart cells." The FASEB Journal **25**(5): 1544-1555.
- Kohl, M. M., O. Paulsen et P. B. Thomas (2010). The Roles of GABAB Receptors in Cortical Network Activity. Advances in Pharmacology, Academic Press. **Volume 58**: 205-229.
- Kordasiewicz, H. B., R. M. Thompson, H. B. Clark et C. M. Gomez (2006). "C-termini of P/Q-type Ca²⁺ channel α 1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity." Human Molecular Genetics **15**(10): 1587-1599.
- Kornhauser, J. M., C. W. Cowan, A. J. Shaywitz, R. E. Dolmetsch, E. C. Griffith, L. S. Hu, C. Haddad, Z. Xia et M. E. Greenberg (2002). "CREB Transcriptional Activity in Neurons Is Regulated by Multiple, Calcium-Specific Phosphorylation Events." Neuron **34**(2): 221-233.
- Lacerda, A. E., H. S. Kim, P. Ruth, E. Perez-Reyes, V. Flockerzi, F. Hofmann, L. Birnbaumer et A. M. Brown (1991). "Normalization of current kinetics by interaction between the [alpha]1 and [beta] subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel." Nature **352**(6335): 527-530.
- Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler et T. Jenuwein (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." Nature **410**(6824): 116-120.
- Lazar, M. A. (1993). "Thyroid Hormone Receptors: Multiple Forms, Multiple Possibilities." Endocrine Reviews **14**(2): 184-193.
- Leclerc, G. M. et F. R. Boockfor (2007). "Calcium influx and DREAM protein are required for GnRH gene expression pulse activity." Molecular and Cellular Endocrinology **267**(1-2): 70-79.
- Lee, B., G. Q. Butcher, K. R. Hoyt, S. Impey et K. Obrietan (2005). "Activity-Dependent Neuroprotection and cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): Kinase Coupling, Stimulus Intensity, and Temporal Regulation of CREB Phosphorylation at Serine 133." The Journal of Neuroscience **25**(5): 1137-1148.
- Lee, K. C. et W. Lee Kraus (2001). "Nuclear receptors, coactivators and chromatin: new approaches, new insights." Trends in Endocrinology and Metabolism **12**(5): 191-197.
- Letts, V. A., R. Felix, G. H. Biddlecome, J. Arikath, C. L. Mahaffey, A. Valenzuela, F. S. Bartlett, Y. Mori, K. P. Campbell et W. N. Frankel (1998). "The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel [gamma] subunit." Nat Genet **19**(4): 340-347.
- Levy, S., O. Beharier, Y. Etzion, M. Mor, L. Buzaglo, L. Shaltiel, L. A. Gheber, J. Kahn, A. J. Muslin, A. Katz, D. Gitler et A. Moran (2009). "Molecular Basis for Zinc Transporter 1 Action as an Endogenous Inhibitor of L-type Calcium Channels." Journal of Biological Chemistry **284**(47): 32434-32443.
- Li, J., B. W. O'Malley et J. Wong (2000). "p300 Requires Its Histone Acetyltransferase Activity and SRC-1 Interaction Domain To Facilitate Thyroid Hormone Receptor Activation in Chromatin." Mol. Cell. Biol. **20**(6): 2031-2042.
- Li, Q., L. Sachs, Y.-B. Shi et A. P. Wolffe (1999). "Modification of Chromatin Structure by the Thyroid Hormone Receptor." Trends in Endocrinology and Metabolism **10**(4): 157-164.
- Lilienbaum, A. et A. Israel (2003). "From Calcium to NF- κ B Signaling Pathways in Neurons." Mol. Cell. Biol. **23**(8): 2680-2698.
- Lin, F.-h., S. Barun, C. M. Lutz, Y. Wang et A. H. David (1999). "Decreased ⁴⁵Ca²⁺ uptake in P/Q-type calcium channels in homozygous lethargic (Cacnb4lh) mice is associated with increased [beta]3 and decreased [beta]4 calcium channel subunit mRNA expression." Molecular Brain Research **71**(1): 1-10.

- Lin, F.-H., S. Lin, Y. Wang et D. A. Hosford (1999). "Glutamate decarboxylase isoforms in thalamic nuclei in lethargic mouse model of absence seizures." Molecular Brain Research **71**(1): 127-130.
- Lin, F.-h., Y. Wang, S. Lin, Z. Cao et D. A. Hosford (1995). "GABAB Receptor-Mediated Effects in Synaptosomes of Lethargic (lh/lh) Mice." Journal of Neurochemistry **65**(5): 2087-2095.
- Liu, F.-C. et A. M. Graybiel (1996). "Spatiotemporal Dynamics of CREB Phosphorylation: Transient versus Sustained Phosphorylation in the Developing Striatum." Neuron **17**(6): 1133-1144.
- Liu, H., M. De Waard, V. E. S. Scott, C. A. Gurnett, V. A. Lennon et K. P. Campbell (1996). "Identification of Three Subunits of the High Affinity omega-Conotoxin MVIIIC-sensitive Ca²⁺ Channel." Journal of Biological Chemistry **271**(23): 13804-13810.
- Ljubojevic, S., S. Walther, M. Asgarzoei, S. Sedej, B. Pieske et J. Kockskämper (2011). "In Situ Calibration of Nucleoplasmic versus Cytoplasmic Ca²⁺ Concentration in Adult Cardiomyocytes." Biophysical Journal **100**(10): 2356-2366.
- Ludwig, A., V. Flockerzi et F. Hofmann (1997). "Regional Expression and Cellular Localization of the alpha1 and beta Subunit of High Voltage-Activated Calcium Channels in Rat Brain." The Journal of Neuroscience **17**(4): 1339-1349.
- Lusin, J. D., M. Vanarotti, C. Li, A. Valiveti et J. B. Ames (2008). "NMR Structure of DREAM: Implications for Ca²⁺-Dependent DNA Binding and Protein Dimerization." Biochemistry **47**(8): 2252-2264.
- Matza, D., A. Badou, K. S. Kobayashi, K. Goldsmith-Pestana, Y. Masuda, A. Komuro, D. McMahon-Pratt, V. T. Marchesi et R. A. Flavell (2008). "A scaffold protein, AHNK1, is required for calcium signaling during T cell activation." Immunity **28**(1): 64-74.
- McEnery, M. W., T. D. Copeland et C. L. Vance (1998). "Altered Expression and Assembly of N-type Calcium Channel alpha1B and beta Subunits in Epileptic lethargic(lh/lh) Mouse." Journal of Biological Chemistry **273**(34): 21435-21438.
- Medyouf, H. et J. Ghysdael (2008). "The calcineurin/NFAT signaling pathway: A NOVEL therapeutic target in leukemia and solid tumors." Cell cycle **7**(3): 297 - 303.
- Mellström, B., M. Savignac, R. Gomez-Villafuertes et J. R. Naranjo (2008). "Ca²⁺-Operated Transcriptional Networks: Molecular Mechanisms and In Vivo Models." Physiological Reviews **88**(2): 421-449.
- Mermelstein, P. G., K. Deisseroth, N. Dasgupta, A. L. Isaksen et R. W. Tsien (2001). "Calmodulin priming: Nuclear translocation of a calmodulin complex and the memory of prior neuronal activity." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(26): 15342-15347.
- Milenkovic, V. M., S. Krejцова, N. Reichhart, A. Wagner et O. Strauß (2011). "Interaction of Bestrophin-1 and Ca²⁺ Channel β-Subunits: Identification of New Binding Domains on the Bestrophin-1 C-Terminus." PLoS ONE **6**(4): e19364.
- Miranda-Laferte, E., G. Gonzalez-Gutierrez, S. Schmidt, A. Zeug, E. G. Ponimaskin, A. Neely et P. Hidalgo (2011). "Homodimerization of the Src Homology 3 Domain of the Calcium Channel β-Subunit Drives Dynamin-dependent Endocytosis." Journal of Biological Chemistry **286**(25): 22203-22210.
- Moeller, L. C., A. M. Dumitrescu, R. L. Walker, P. S. Meltzer et S. Refetoff (2005). "Thyroid Hormone Responsive Genes in Cultured Human Fibroblasts." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **90**(2): 936-943.
- Morgan, J. I. et T. Curran (1986). "Role of ion flux in the control of c-fos expression." Nature **322**(6079): 552-555.
- Mori, Y., M. Wakamori, S.-i. Oda, C. F. Fletcher, N. Sekiguchi, E. Mori, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, K. Matsushita, Z. Matsuyama et K. Imoto (2000). "Reduced Voltage Sensitivity of Activation of P/Q-Type Ca²⁺ Channels is Associated with the Ataxic Mouse Mutation Rolling Nagoya (tg rol)." The Journal of Neuroscience **20**(15): 5654-5662.
- Morte, B., J. Manzano, T. Scanlan, B. Vennström et J. Bernal (2002). "Deletion of the thyroid hormone receptor alpha1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(6): 3985-3989.
- Murakami, M., H. Matsui, T. Shiraiwa, T. Suzuki, H. Sasanon, E. Takahashi et M. Kashiwayanagi (2006). "Decreases in Pheromonal Responses at the Accessory Olfactory Bulb of Mice with a Deficiency

- of the $\alpha 1B$ or $\beta 3$ Subunits of Voltage-Dependent Ca^{2+} -Channels." Biological & Pharmaceutical Bulletin **29**(3437).
- Nagatsu, T., M. Levitt et S. Udenfriend (1964). "Tyrosine Hydroxylase." Journal of Biological Chemistry **239**(9): 2910-2917.
- Ohmori, I., M. Ouchida, T. Miki, N. Mimaki, S. Kiyonaka, T. Nishiki, K. Tomizawa, Y. Mori et H. Matsui (2008). "A CACNB4 mutation shows that altered Cav2.1 function may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy." Neurobiology of Disease **32**(3): 349-354.
- Olcese, R., N. Qin, T. Schneider, A. Neely, X. Wei, E. Stefani et L. Birnbaumer (1994). "The amino terminus of a calcium channel [beta] subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation." Neuron **13**(6): 1433-1438.
- Oliveria, S. F., M. L. Dell'Acqua et W. A. Sather (2007). "AKAP79/150 Anchoring of Calcineurin Controls Neuronal L-Type Ca^{2+} Channel Activity and Nuclear Signaling." Neuron **55**(2): 261-275.
- Oñate, S., S. Tsai, M. Tsai et B. O'Malley (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." Science **270**(5240): 1354-1357.
- Opatowsky, Y., C.-C. Chen, K. P. Campbell et J. A. Hirsch (2004). "Structural Analysis of the Voltage-Dependent Calcium Channel [beta] Subunit Functional Core and Its Complex with the [alpha]1 Interaction Domain." Neuron **42**(3): 387-399.
- Pagani, R., M. Song, M. McEnery, N. Qin, R. W. Tsien, L. Toro, E. Stefani et O. D. Uchitel (2004). "Differential expression of [alpha]1 and [beta] subunits of voltage dependent Ca^{2+} channel at the neuromuscular junction of normal and p/q Ca^{2+} channel knockout mouse." Neuroscience **123**(1): 75-85.
- Phu, D. T., M. Wallbach, C. Depatie, A. Fu, R. A. Srean et E. Oetjen (2011). "Regulation of the CREB coactivator TORC by the dual leucine zipper kinase at different levels." Cellular Signalling **23**(2): 344-353.
- Pilhatsch, M., C. Winter, K. Nordström, B. Vennström, M. Bauer et G. Juckel (2010). "Increased depressive behaviour in mice harboring the mutant thyroid hormone receptor alpha 1." Behavioural Brain Research **214**(2): 187-192.
- Pinato, G., S. Pegoraro, G. Iacono, M. E. Ruaro et V. Torre (2009). "Calcium control of gene regulation in rat hippocampal neuronal cultures." Journal of Cellular Physiology **220**(3): 727-747.
- Plateroti, M., K. Gauthier, C. Domon-Dell, J.-N. Freund, J. Samarut et O. Chassande (2001). "Functional Interference between Thyroid Hormone Receptor alpha and Natural Truncated TR Deltaalpha Isoforms in the Control of Intestine Development." Mol. Cell. Biol. **21**(14): 4761-4772.
- Poburko, D., D. Wheeler, R. Groth, H. Ma, C. Barrett, S. F. Owen, Y.-Q. Cao et R. Tsien (2011). "Differential effects of presynaptic calcium channel subtypes in control of synaptic transmission." IBRO(juillet 2001 Florence, Italie).
- Praefcke, G. J. K. et H. T. McMahon (2004). "The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 133-147.
- Pragnell, M., M. De Waard, Y. Mori, T. Tanabe, T. P. Snutch et K. P. Campbell (1994). "Calcium channel [beta]-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the [alpha]1-subunit." Nature **368**(6466): 67-70.
- Qian, J. et J. L. Noebels (2000). "Presynaptic Ca^{2+} Influx at a Mouse Central Synapse with Ca^{2+} Channel Subunit Mutations." The Journal of Neuroscience **20**(1): 163-170.
- Quack, M., C. Frank et C. Carlberg (2002). "Differential nuclear receptor signalling from DR4-type response elements." J Cell Biochem. **86**(3): 601-612.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z.-W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, C. D. Allis et T. Jenuwein (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." Nature **406**(6796): 593-599.
- Reichhart, N., V. M. Milenkovic, C.-A. Halsband, S. Cordeiro et O. Strauß (2010). "Effect of bestrophin-1 on L-type Ca^{2+} channel activity depends on the Ca^{2+} channel beta-subunit." Experimental Eye Research **91**(5): 630-639.
- Restituito, S., T. Cens, M. Rousset et P. Charnet (2001). " Ca^{2+} Channel Inactivation Heterogeneity Reveals Physiological Unbinding of Auxiliary [beta] Subunits." Biophysical Journal **81**(1): 89-96.

- Sachs, L. M. et Y.-B. Shi (2000). "Targeted chromatin binding and histone acetylation in vivo by thyroid hormone receptor during amphibian development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(24): 13138-13143.
- Sachs, L. M. et Y.-B. Shi (2000). "Targeted chromatin binding and histone acetylation in vivo by thyroid hormone receptor during amphibian development." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(24): 13138-13143.
- Salkoff, L., A. Butler, G. Ferreira, C. Santi et A. Wei (2006). "High-conductance potassium channels of the SLO family." Nat Rev Neurosci **7**(12): 921-931.
- Sasaki, T., H. Takemori, Y. Yagita, Y. Terasaki, T. Uebi, N. Horike, H. Takagi, T. Susumu, H. Teraoka, K.-i. Kusano, O. Hatano, N. Oyama, Y. Sugiyama, S. Sakoda et K. Kitagawa (2011). "SIK2 Is a Key Regulator for Neuronal Survival after Ischemia via TORC1-CREB." Neuron **69**(1): 106-119.
- Sawada, K. et Y. Fukui (2001). "Expression of tyrosine hydroxylase in cerebellar Purkinje cells of ataxic mutant mice: its relation to the onset and/or development of ataxia." J Med Invest. **48**(1-2): 5-10.
- Sawada, K., S. Komatsu, H. Haga, X.-Z. Sun, S. Hisano et Y. Fukui (1999). "Abnormal expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in cerebellar cortex of ataxic mutant mice." Brain Research **829**(1-2): 107-112.
- Shao, Y., K. J. Czymmek, P. A. Jones, V. P. Fomin, K. Akanbi, R. L. Duncan et M. C. Farach-Carson (2009). "Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Ca_v1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells." American Journal of Physiology - Cell Physiology **296**(5): C1067-C1078.
- Sharma, D. et J. D. Fondell (2002). "Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(12): 7934-7939.
- Sheng, Z.-H., R. E. Westenbroek et W. A. Catterall (1998). "Physical Link and Functional Coupling of Presynaptic Calcium Channels and the Synaptic Vesicle Docking/Fusion Machinery." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **30**(4): 335-345.
- Sheridan, C. M., E. K. Heist, C. R. Beals, G. R. Crabtree et P. Gardner (2002). "Protein Kinase A Negatively Modulates the Nuclear Accumulation of NF-ATc1 by Priming for Subsequent Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3." Journal of Biological Chemistry **277**(50): 48664-48676.
- Shi, Y.-B. (2009). "Dual Functions of Thyroid Hormone Receptors in Vertebrate Development: The Roles of Histone-Modifying Cofactor Complexes." Thyroid **19**(9): 987-999.
- Shirley, T. L., L. M. Rao, E. J. Hess et H. A. Jinnah (2008). "Paroxysmal dyskinesias in mice." Movement Disorders **23**(2): 259-264.
- Sidman, R. L., M. C. Green et S. H. Appel (1965). Catalog of the Neurological Mutants of the Mouse.
- Singer, D., M. Biel, I. Lotan, V. Flockerzi, F. Hofmann et N. Dascal (1991). "The roles of the subunits in the function of the calcium channel." Science **253**(5027): 1553-1557.
- Slaght, S. n. J., N. Leresche, J.-M. Deniau, V. Crunelli et S. p. Charpier (2002). "Activity of Thalamic Reticular Neurons during Spontaneous Genetically Determined Spike and Wave Discharges." The Journal of Neuroscience **22**(6): 2323-2334.
- Song, I., D. Kim, S. Choi, M. Sun, Y. Kim et H.-S. Shin (2004). "Role of the alpha1G T-Type Calcium Channel in Spontaneous Absence Seizures in Mutant Mice." The Journal of Neuroscience **24**(22): 5249-5257.
- Spafford, J. D., J. van Minnen, P. Larsen, A. B. Smit, N. I. Syed et G. W. Zamponi (2004). "Uncoupling of Calcium Channel α 1 and β Subunits in Developing Neurons." Journal of Biological Chemistry **279**(39): 41157-41167.
- Steriade, M. et D. Contreras (1995). "Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity." The Journal of Neuroscience **15**(1): 623-642.
- Subramanyam, P., G. Obermair, S. Baumgartner, M. Gebhart, J. Striessnig, W. Kaufmann, S. Geley et B. Flucher (2009). "Activity and calcium regulate nuclear targeting of the calcium channel beta4b subunit in nerve and muscle cells." Channels **3**(5).

- Sun, P., H. Enslin, P. S. Myung et R. A. Maurer (1994). "Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity." Genes & Development **8**(21): 2527-2539.
- Sutton, K. G., J. E. McRory, H. Guthrie, T. H. Murphy et T. P. Snutch (1999). "P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A." Nature **401**(6755): 800-804.
- Tagami, T., L. Madison, T. Nagaya et J. Jameson (1997). "Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone." Mol. Cell. Biol. **17**(5): 2642-2648.
- Tagami, T., Y. Park et J. L. Jameson (1999). "Mechanisms That Mediate Negative Regulation of the Thyroid-stimulating Hormone α Gene by the Thyroid Hormone Receptor." Journal of Biological Chemistry **274**(32): 22345-22353.
- Talley, E. M., G. Solórzano, A. Depaulis, E. Perez-Reyes et D. A. Bayliss (2000). "Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat." Molecular Brain Research **75**(1): 159-165.
- Terui, Y., N. Saad, S. Jia, F. McKeon et J. Yuan (2004). "Dual Role of Sumoylation in the Nuclear Localization and Transcriptional Activation of NFAT1." Journal of Biological Chemistry **279**(27): 28257-28265.
- Thanos, D. et T. Maniatis (1995). "NF- κ B: A lesson in family values." Cell **80**(4): 529-532.
- Tinnikov, A., K. Nordström, P. Thorén, Kindblom Jenny M., S. Malin, B. Rozell, M. Adams, O. Rajanayagam, S. Pettersson, C. Ohlsson, K. Chatterjee et B. and Vennström (2002). "Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor α 1." EMBO J. **21**(19): 5079-5087.
- Tsai, M. et B. W. O'Malley (1994). "Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members." Annual Review of Biochemistry **63**(1): 451-486.
- Tsakiridou, E., L. Bertollini, M. de Curtis, G. Avanzini et H. C. Pape (1995). "Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy." The Journal of Neuroscience **15**(4): 3110-3117.
- Turner, B. (1993). "Decoding the nucleosome." Cell **75**(1): 5-8.
- Van Petegem, F., K. A. Clark, F. C. Chatelain et D. L. Minor (2004). "Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel [beta]-subunit and an [alpha]-subunit domain." Nature **429**(6992): 671-675.
- Vance, C. L., C. M. Begg, W.-L. Lee, H. Haase, T. D. Copeland et M. W. McEnery (1998). "Differential Expression and Association of Calcium Channel alpha1B and beta Subunits during Rat Brain Ontogeny." Journal of Biological Chemistry **273**(23): 14495-14502.
- Vendel A.C., Rithner C.D., Lyons B.A. et H. W.A. (2006). "Solution structure of the N-terminal A domain of the human voltage-gated Ca²⁺channel beta4a subunit." Protein Sci **15**(2): 378-383.
- Vendel, A. C., M. D. Terry, A. R. Striegel, N. M. Iverson, V. Leuranguer, C. D. Rithner, B. A. Lyons, G. E. Pickard, S. A. Tobet et W. A. Horne (2006). "Alternative Splicing of the Voltage-Gated Ca²⁺ Channel beta4 Subunit Creates a Uniquely Folded N-Terminal Protein Binding Domain with Cell-Specific Expression in the Cerebellar Cortex." J. Neurosci. **26**(10): 2635-2644.
- Venero, C., A. Guadaño-Ferraz, A. I. Herrero, K. Nordström, J. Manzano, G. M. de Escobar, J. Bernal et B. Vennström (2005). "Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor α 1 can be ameliorated by T3 treatment." Genes & Development **19**(18): 2152-2163.
- Ventura-Holman, T., A. Mamoon, J. F. Maher et J. S. Subauste (2007). "Thyroid hormone responsive genes in the murine hepatocyte cell line AML 12." Gene **396**(2): 332-337.
- Vo, N. et R. H. Goodman (2001). "CREB-binding Protein and p300 in Transcriptional Regulation." Journal of Biological Chemistry **276**(17): 13505-13508.
- Volsen, S. G., N. C. Day, A. L. McCormack, W. Smith, P. J. Craig, R. E. Beattie, D. Smith, P. G. Ince, P. J. Shaw, S. B. Ellis, N. Mayne, J. P. Burnett, A. Gillespie et M. M. Harpold (1997). "The expression of voltage-dependent calcium channel beta subunits in human cerebellum." Neuroscience **80**(1): 161-174.

- Walker, D., D. Bichet, K. P. Campbell et M. De Waard (1998). "A $\beta 4$ Isoform-specific Interaction Site in the Carboxyl-terminal Region of the Voltage-dependent Ca^{2+} Channel $\alpha 1\text{A}$ Subunit." Journal of Biological Chemistry **273**(4): 2361-2367.
- Wallis, K., M. Sjögren, M. van Hogerlinden, G. Silberberg, A. Fisahn, K. Nordström, L. Larsson, H. Westerblad, G. Morreale de Escobar, O. Shupliakov et B. Vennström (2008). "Locomotor Deficiencies and Aberrant Development of Subtype-Specific GABAergic Interneurons Caused by an Unliganded Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$." The Journal of Neuroscience **28**(8): 1904-1915.
- Wang, A. H., N. R. Bertos, M. Vezmar, N. Pelletier, M. Crosato, H. H. Heng, J. Th'ng, J. Han et X.-J. Yang (1999). "HDAC4, a Human Histone Deacetylase Related to Yeast HDA1, Is a Transcriptional Corepressor." Mol. Cell. Biol. **19**(11): 7816-7827.
- Wang, D., X. Xia, Y. Liu, A. Oetting, R. L. Walker, Y. Zhu, P. Meltzer, P. A. Cole, Y.-B. Shi et P. M. Yen (2009). "Negative Regulation of TSH α Target Gene by Thyroid Hormone Involves Histone Acetylation and Corepressor Complex Dissociation." Molecular Endocrinology **23**(5): 600-609.
- Weiergräber, M., U. Stephani et R. Köhling (2010). "Voltage-gated calcium channels in the etiopathogenesis and treatment of absence epilepsy." Brain Research Reviews **62**(2): 245-271.
- Weiss, J., H. Hui et R. Burgoyne (2010). "Neuronal Calcium Sensor-1 Regulation of Calcium Channels, Secretion, and Neuronal Outgrowth." Cellular and Molecular Neurobiology **30**(8): 1283-1292.
- Weiss, R. E. et S. Refetoff (2000). "Resistance to Thyroid Hormone." Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders **1**(1): 97-108.
- Westenbroek, R. E., J. W. Hell, C. Warner, S. J. Dubel, T. P. Snutch et W. A. Catterall (1992). "Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel $\alpha 1$ subunit." Neuron **9**(6): 1099-1115.
- Wheeler, D. G., C. F. Barrett, R. D. Groth, P. Safa et R. W. Tsien (2008). "CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling." The Journal of Cell Biology **183**(5): 849-863.
- Whiteside, S. T. et A. Israël (1997). "I κ B proteins: structure, function and regulation." Seminars in Cancer Biology **8**(2): 75-82.
- Wilcoxon, J. S., G. J. Nadolski, J. Samarut, O. Chassande et E. E. Redei (2007). "Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor [alpha]." Behavioural Brain Research **177**(1): 109-116.
- Williams, G. R. (2000). "Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor beta Isoforms." Mol. Cell. Biol. **20**(22): 8329-8342.
- Wong, J., D. Patterson, A. Imhof, D. Guschin, Y. B. Shi et A. P. Wolffe (1998). "Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase." EMBO J **17**: 520-534.
- Wong, J., Y. B. Shi et A. P. Wolffe (1995). "A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR beta A gene by the thyroid hormone receptor." Genes & Development **9**(21): 2696-2711.
- Wu, X., Y. Yoo, N. N. Okuhama, P. W. Tucker, G. Liu et J.-L. Guan (2006). "Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners." Nat Cell Biol **8**(7): 756-763.
- Xu, H., K. S. Ginsburg, D. D. Hall, M. Zimmermann, I. S. Stein, M. Zhang, S. Tandan, J. A. Hill, M. C. Horne, D. Bers et J. W. Hell (2010). "Targeting of Protein Phosphatases PP2A and PP2B to the C-Terminus of the L-Type Calcium Channel Cav1.2." Biochemistry **49**(48): 10298-10307.
- Xu, X., Y. J. Lee, J. B. Holm, M. D. Terry, R. E. Oswald et W. A. Horne (2011). "The Ca^{2+} Channel beta4c Subunit Interacts with Heterochromatin Protein 1 via a PXVXL Binding Motif." Journal of Biological Chemistry **286**(11): 9677-9687.
- Yang, Z., S.-H. Hong et M. L. Privalsky (1999). "Transcriptional Anti-repression." Journal of Biological Chemistry **274**(52): 37131-37138.
- Yoh, S. M. et M. Privalsky (2002). "Molecular analysis of human resistance to thyroid hormone syndrome." Methods Mol Biol **202**(129-52).

- Yokokura, H., O. Terada, Y. Naito et H. Hidaka (1997). "Isolation and comparison of rat cDNAs encoding Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I isoforms." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology **1338**(1): 8-12.
- Youn, H.-D., T. A. Chatila et J. O. Liu (2000). "Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis." EMBO J **19**(16): 4323-4331.
- Yu, K., Q. Xiao, G. Cui, A. Lee et H. C. Hartzell (2008). "The Best Disease-Linked Cl⁻ Channel hBest1 Regulates CaV1 (L-type) Ca²⁺ Channels via src-Homology-Binding Domains." The Journal of Neuroscience **28**(22): 5660-5670.
- Zhang, S.-J., M. Zou, L. Lu, D. Lau, D. s. e. A. W. Ditzel, C. Delucinge-Vivier, Y. Aso, P. Descombes et H. Bading (2009). "Nuclear Calcium Signaling Controls Expression of a Large Gene Pool: Identification of a Gene Program for Acquired Neuroprotection Induced by Synaptic Activity." PLoS Genet **5**(8): e1000604.
- Zhang, X.-k. et M. Kahl (1993). "Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors." Trends in Endocrinology & Metabolism **4**(5): 156-162.
- Zhang, Y., M. Mori, D. L. Burgess et J. L. Noebels (2002). "Mutations in High-Voltage-Activated Calcium Channel Genes Stimulate Low-Voltage-Activated Currents in Mouse Thalamic Relay Neurons." J. Neurosci. **22**(15): 6362-6371.
- Zhang, Y., Y. Yamada, M. Fan, S. D. Bangaru, B. Lin et J. Yang (2010). "The β Subunit of Voltage-gated Ca²⁺ Channels Interacts with and Regulates the Activity of a Novel Isoform of Pax6." Journal of Biological Chemistry **285**(4): 2527-2536.
- Zhao, R., L. Liu et A. R. Rittenhouse (2007). "Ca²⁺ influx through both L- and N-type Ca²⁺ channels increases c-fos expression by electrical stimulation of sympathetic neurons." European Journal of Neuroscience **25**(4): 1127-1135.
- Zheng, C.-Y., G. K. Seabold, M. Horak et R. S. Petralia (2011). "MAGUKs, Synaptic Development, and Synaptic Plasticity." The Neuroscientist.
- Zou, S., S. Jha, E. Y. Kim et S. E. Dryer (2008). "The β 1 subunit of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels independently binds to and inhibits the gating of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels." Molecular Pharmacology **73**(2): 369-378.