

50376
1994
179

50376
1994
179



THESE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques de
Lille-Flandres-Artois pour obtenir le titre de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE EN SCIENCES DE
LA VIE ET DE LA SANTE**

Mention Physiologie Cellulaire

par

Thibault Collin

*Clonage moléculaire et expression fonctionnelle de
sous-unité β de canaux calciques humains.*

Soutenue le 28 Février 1994 devant le jury composé de :

Mr le Pr. Pierre Guilbault : président

Mr le Pr. Joël Nargeot : rapporteur

Mr le Pr. Michel Lazdunski : rapporteur

Mr le Pr. Dominique Stéhelin : examinateur

Mr le Pr. Bernard Dupuis : examinateur



D 030 060430 7

Sommaire

Introduction

Données bibliographiques

A) Canaux ioniques dépendant du potentiel

- 1) Pore et sélectivité
- 2) Dépendance vis à vis du potentiel
- 3) Mécanismes d'activation et d'inactivation

B) Les canaux calciques dépendant du potentiel

- 1) Classification des canaux calciques dépendant du potentiel
 - a) Classification biophysique
 - b) Classification pharmacologique
 - c) Le point sur la classification
- 2) Elements de régulation de l'activité des canaux calciques
 - a) Régulation par phosphorylation
 - b) Couplage direct avec les protéines G
 - c) Le point sur les régulations de l'activité des canaux calciques

C) Diversité moléculaire des canaux calciques

- 1) Etude biochimique du canal calcique
- 2) Biologie moléculaire des canaux calciques
- 3) Génétique des canaux calciques

Chapitre 2 : la sous-unité β du canal calcique

A) Les différents gènes, structure de leurs produits

- 1) Le gène $\beta 1$
- 2) Le gène $\beta 2$
- 3) Le gène $\beta 3$
- 4) Le gène $\beta 4$
- 5) Le gène MysB

B) Clonage d'ADN complémentaires codant pour des sous-unités β ; quelles applications?

- 1) Répartition tissulaire de l'expression des sous-unités β
- 2) Les aspects fonctionnels
- 3) La génétique des sous-unités β

Conclusion/modélisation de la sous-unité β

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Chapitre 4 : Résultats
Bibliographie

Introduction

Des gradients de concentration ionique de part et d'autre de structures membranaires sont utilisés par la cellule pour effectuer de multiples tâches. Par exemple, le gradient de proton engendré au travers de la membrane mitochondriale est utilisé pour la synthèse d'ATP (Mitchell, 1967). De même, le transport de glucose et des acides aminés dans les cellules est conditionné par le gradient électrochimique des ions Na^+ et H^+ au travers de la membrane plasmique. Dans tous les cas, le gradient électrochimique est une forme intermédiaire de stockage d'énergie.

Le potentiel membranaire est également impliqué dans la régulation de fonctions cellulaires telles que la contraction et la sécrétion. Le contrôle de ces activités a suggéré l'existence de mécanismes sensibles au potentiel au niveau de la membrane. La conception moderne de la signalisation ionique dérive largement de la théorie formulée en 1949 par Hodgkin, Huxley et Katz. Elle permet de comprendre l'origine de la différence de potentiel existant de part et d'autre de la membrane axonale et comment le transport de charges est contrôlé au cours du potentiel d'action (Hodgkin, 1964). En effet, selon la théorie ionique, la capacité signalétique des cellules nerveuses découle de deux familles de protéines membranaires : les canaux ioniques, les échangeurs et les pompes permettent aux ions de passer d'un côté à l'autre de la membrane.

Les pompes transportent activement et spécifiquement les ions contre leur gradient électrochimique et par conséquent, requièrent de l'énergie métabolique, quant aux échangeurs, ils utilisent l'énergie potentielle des gradients ioniques engendrée par l'activité des pompes.

Les canaux ioniques se classent principalement en deux familles :

i) les canaux dont l'ouverture est conditionnée par le potentiel de membrane. Cependant, l'ouverture de certains de ces canaux n'est que relativement dépendante du potentiel et ceux-ci sont ouverts au potentiel de repos de la cellule. Ces canaux, dits "de fuite", contribuent au maintien du potentiel de repos. D'autres types de canaux, n'étant pas ouverts au potentiel de repos peuvent être considérés comme réellement dépendant du potentiel de membrane.

ii) les canaux ioniques dont l'ouverture est conditionnée par la fixation d'un ligand agoniste. Ils reconnaissent un transmetteur chimique et s'ouvrent quand il y a liaison des deux entités.

L'avènement de nouvelles techniques telles que le "patch clamp" et le clonage moléculaire a permis d'effectuer d'importants progrès dans la compréhension de la perméabilité membranaire. En effet, le clonage et le séquençage de gènes codant pour des protéines membranaires ont conduit à déterminer les séquences primaires de plusieurs superfamilles de macromolécules et d'avoir une idée sur leur agencement spatial dans la

membrane. Les canaux ioniques sont ainsi classés suivant différents critères définis par leurs paramètres biophysiques dont les deux plus importants sont :

1) la sélectivité ionique : celle-ci se définit comme la capacité à laisser passer préférentiellement un ion donné au travers de la membrane.

2) la dépendance vis à vis du potentiel : elle peut être plus ou moins marquée selon le type de canal et représente la probabilité qu'a un canal d'être ouvert à un potentiel donné.

De plus, cette classification peut être d'une part affinée par des propriétés électrophysiologiques telles que la conductance unitaire, le temps d'ouverture (etc...) et d'autre part par des spécificités pharmacologiques telles que l'existence d'agonistes et d'antagonistes pouvant moduler leur fonctionnement.

Chapitre 1 : données bibliographiques

Ce chapitre se propose de résumer les aspects mécanistiques des canaux ioniques et de présenter sommairement leurs principales propriétés. Il présente une classification des canaux calciques activés par le potentiel basés sur des aspects électrophysiologiques, pharmacologiques et moléculaires. L'essentiel des données présentées ici permet de comprendre les effets occasionnés par la coexpression des sous-unités $\alpha 1$ et β , et d'en déduire le rôle spécifique de β .

A) Canaux ioniques dépendant du potentiel

Originellement, le potentiel d'action a été décrit comme une succession d'évènements. C'est ainsi qu'au niveau de la fibre de calmar, après une faible dépolarisation le canal sodium s'ouvre, l'entrée d'ions sodium génère une ample dépolarisation qui occasionne :

- i) l'inactivation du canal sodium par fermeture de la "porte d'inactivation";
- ii) l'ouverture simultanée du canal potassique permettant aux ions K^+ de sortir et de repolariser ainsi la membrane.

Ces données permettent de bien intégrer les concepts suivants :

1) Pore et sélectivité

i) La protéine "canal ionique" possède en elle une entité capable de faire circuler passivement des ions de part et d'autre de la membrane plasmique : le pore.

ii) Le pore gère la sélectivité de l'espèce ionique circulant en son sein.

2) Dépendance vis à vis du potentiel

L'ouverture de la structure protéique constituant le pore est conditionnée par l'activité d'un autre domaine du canal qui est lui capable d'apprécier la différence de potentiel existant de part et d'autre de la membrane plasmique : le "voltage-sensor".

3) Activation et inactivation

L'intégration temporelle des deux concepts précédent permet de gérer le phénomène d'activation du canal. En effet, la séquence suivante est généralement admise :

1. le "voltage-sensor" mesure la différence de potentiel transmembranaire;
2. au niveau d'une certaine valeur appelée "seuil d'activation" il commande l'ouverture du pore;

3. le pore gère la sélectivité ionique et ne laisse passer qu'une espèce dans le sens de son gradient électrochimique.

Le phénomène d'inactivation n'est pas généralisable à tous les canaux ioniques, en effet, certains ne le présentent pas. Pour ce qui est du canal sodique, l'inactivation est attribuée à un domaine particulier de la protéine canal appelé "balle d'inactivation". Celle-ci a la propriété de diffuser jusqu'à son "récepteur" et de bloquer le pore causant ainsi l'inactivation du canal.

L'ensemble des conductances ioniques impliquées lors du potentiel d'action de l'axone géant de calmar a été décrit en 1952 dans le cadre de la théorie ionique d'Hodgkin et Huxley. Ces

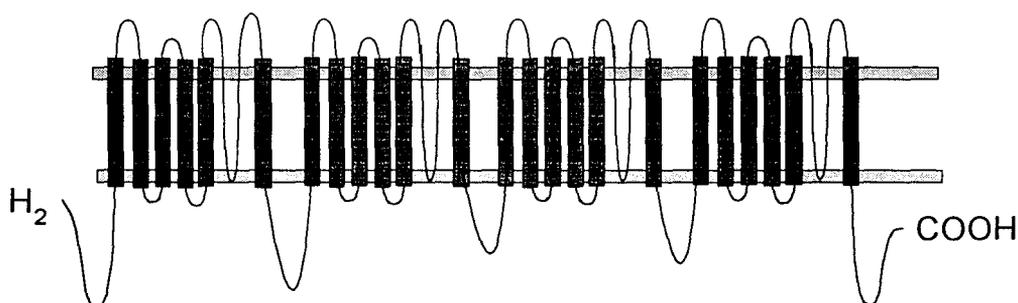
auteurs ont proposé un ensemble d'équations mathématiques rendant compte de l'activité "canaulaire" dépendante du potentiel et de sa résolution temporelle.

Ainsi était né le concept de canal ionique : d'un modèle mathématique, il constitue aujourd'hui en une entité moléculaire au fonctionnement intégré. Il est d'ailleurs intéressant de constater que chacun des paramètres mathématiques de la théorie ionique rend compte de l'activité d'un domaine distinct de la structure protéique; chacun de ces domaines fonctionnant bien sûr de manière concertée avec les autres engendrant ainsi une activité biologique intégrative.

1) Pore et sélectivité

Les principales caractéristiques du pore ionique sont sa sélectivité aux ions et sa capacité à les laisser diffuser à travers la membrane plasmique. Le clonage moléculaire du premier canal ionique dépendant du potentiel a été réalisé en 1985 par Noda et coll. : il s'agit du canal sodium d'*Electrophorus electricus*. Ce travail a permis de connaître la structure primaire de la protéine et par conséquent d'en définir l'organisation en différents domaines. Globalement, les canaux Na⁺ (comme Ca²⁺) possèdent 4 domaines (I, II, III et IV) constitués de six segments transmembranaires (S1 à S6 ; Fig.1).

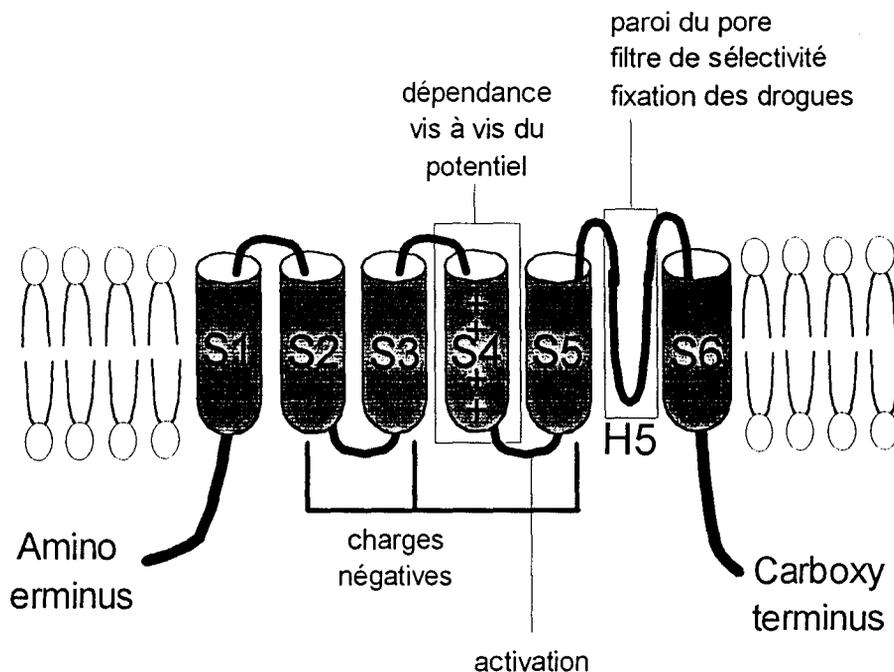
Figure 1



Par la suite, le clonage de plusieurs types de canaux potassiques a révélé une structure équivalente à un seul domaine constitué de six segments transmembranaires. De plus, on a observé une structure fortement conservée en feuillet β (modélisation de Conti et coll., 1986) appelée H5 pour les canaux potassiques et SS1-SS2 pour les canaux sodiques et calciques. Des études cristallographiques sur des protéines bactériennes telles que la porine (Kleffer et coll., 1985) ont montré que des feuilletts β antiparallèles peuvent traverser la membrane. Le segment intermédiaire entre S5 et S6 de par sa structure en feuillet β antiparallèle transmembranaire est maintenant considéré comme une composante du mécanisme de la conduction ionique.

L'essentiel des résultats sur la sélectivité des canaux ioniques a été obtenu pour des canaux potassiques. Ce sont en effet des canaux ioniques structurellement les plus simples (une seule sous-unité) et ils peuvent facilement être exprimés dans un modèle de reconstitution tel que l'ovocyte de Xénope. Des expériences d'expression fonctionnelle ont permis de démontrer que le segment situé entre les régions S5 et S6 (H5 ou SS1-SS2) représente le site de sélectivité aux ions. Un modèle d'organisation plus fin du canal potassique (Fig. 2) propose que 17 à 21 acides aminés situés après les sites de fixation du tétraéthylammonium (TEA) et de la charybdotoxine (CTX), correspondant à la région H5, forment une boucle constituant la paroi du pore (Guy et Conti, 1990). La mutation des acides aminés 431 à 449, compris dans cette région, affecte à la fois la **conductance**, la **sélectivité ionique** et la **pharmacologie** du pore (Yool et coll., 1991). Des mutations ponctuelles dans cette région H5 altèrent la sensibilité du canal vis à vis d'inhibiteurs connus telles que la CTX et le TEA qui est lui un bloqueur intracellulaire d'où l'intérêt de son utilisation.

Figure 2



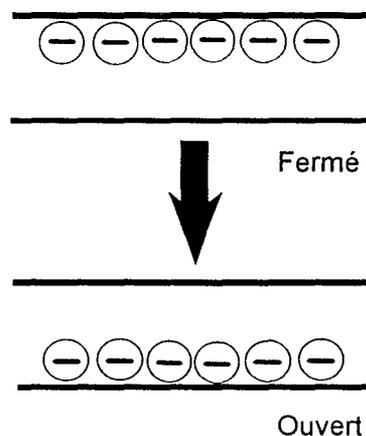
De plus, structurellement, le segment H5 est un peptide d'environ 18 acides aminés qui forme le quart de la paroi du pore ionique. Un modèle identique est proposé pour les canaux Na^+ et Ca^{2+} dans lesquels la région SS1-SS2 est relativement conservée pour les quatre domaines et comparable à H5.

Dans le cas du canal sodique, cette région détermine la sélectivité cationique, la sensibilité aux toxines telles que la tétrodotoxine (TTX; Backx et coll., 1992) voire au Cd^{2+} . En effet, les mutations ponctuelles K1422E et A1714E confèrent au canal sodium une sélectivité calcique (Heinemann et coll., 1991). De nouvelles données concernant cette fois le canal calcique tendent à confirmer les hypothèses présentées lors de l'étude du canal sodique (Tang et coll., 1993).

2) Dépendance vis à vis du potentiel

Le modèle d'Hodgkin et Huxley (1952) postulait que des "particules de porte" chargées pouvaient se déplacer dans la membrane pour ouvrir ou fermer le canal.

Figure.3



Ainsi, les canaux dépendants du potentiel détecteraient les variations de potentiel de la membrane grâce à des charges ou dipôles présents dans une région intramembranaire de la molécule. Ces résidus pourraient être déplacés par les forces électrostatiques créées par la dépolarisation. Un mouvement net de charges au travers de la molécule (gating current) a été observé et enregistré pendant l'activation du canal (Bean et coll., 1989). Ce mécanisme provoque la translocation de 4 à 8 charges positives (Hille, 1992).

Structurellement, le "zipper" serait une hélice α chargée positivement, dans laquelle chaque charge est appariée à un résidu négatif d'une autre hélice. Une augmentation des charges positives à l'intérieur de la cellule provoquerait un mouvement relatif des deux hélices résultant en une translocation vers l'intérieur du segment négatif par rapport au positif. Ce mouvement tenu des hélices correspond à la translocation d'une charge : une charge négative exposée à l'extérieur quand le canal est désactivé serait neutralisée par les charges positives (gating currents).

L'identification du segment S4 en tant que séquence sensible au potentiel confirma une partie de l'hypothèse du zipper (Voir Fig. 2). Cette séquence, commune aux canaux K⁺, Na⁺ et Ca²⁺ est caractérisée par des acides aminés basiques (Arg et Lys) disposés tous les 3 à 4 résidus et séparés par des acides aminés hydrophobes (Stühmer, 1992). Les analyses structurales semblent confirmer ceci. En effet, Mulvey et coll. (1989) ont montré que la séquence IS4 (segment S4 du premier domaine transmembranaire des canaux sodium) contient l'information essentielle à la formation d'une hélice α . Le segment S4 des canaux potassiques est impliqué également dans les processus dépendant du potentiel (Lopez et coll., 1991; Simon et coll., 1991).

L'expression fonctionnelle dans l'ovocyte de Xénope, d'ARNm synthétisés *in vitro* (ARNc) correspondant aux séquences (extrêmement homologues) de canaux potassiques rck 1,2,3 et 4 de cortex de rat (Stühmer et coll., 1989) conduit à des cinétiques d'activation et d'inactivation de ces canaux soit très rapides soit très lentes selon le type étudié. Dans ces cas, les séquences des différents segments S4 sont cependant identiques à 100% (à l'exception d'un échange Ile/Val pour une des molécules). De même Lopez et coll. (1991) montrent que la substitution d'un résidu hydrophobe entraîne une altération de l'ouverture voltage dépendante du canal K⁺ de type *Shaker*. Par ailleurs, le remplacement de la leucine 860 par une phénylalanine dans le segment IIS4 du canal NaIIA entraîne un déplacement de 20 à 25 mV de la sensibilité vis à vis du potentiel (Lopez et coll., 1991).

Il semble donc clair, à la lumière de ces données expérimentales, que la séquence S4 joue un rôle déterminant dans la sensibilité vis à vis du potentiel des canaux. Cependant, elle seule ne peut pas rendre compte de tous ces phénomènes. Il est probable que les domaines S2, S3 et H5, qui contiennent des charges négatives interviennent par appariement de charge. Cette hypothèse serait le complément indispensable à la vérification du modèle "zipper". Il est donc évident que d'autres facteurs que le nombre de charges positives dans le segment S4 participent à la dépendance des canaux ioniques vis à vis du potentiel. Dans l'état actuel des travaux, il est impossible d'établir l'implication de chaque résidu dans la réponse à la dépolarisation membranaire. Les domaines responsables de la transition entre l'état ouvert et l'état fermé ne sont pas non plus identifiés. Il pourrait en effet exister une certaine coopérativité entre les différents domaines pendant les états transitoires.

Des modélisations informatiques permettent de représenter la participation des hélices chargées négativement. Cependant, il existe d'autres modèles :

i) un modèle d'insertion dépendante du potentiel des résidus 425 à 460 de la colicine E1 dans la membrane provoquant la formation d'un canal (Meuril et Cramer, 1990);

ii) le modèle de l'hélice coulissante dans lequel l'hélice α formée par le peptide S4 se déplacerait en réponse à la dépolarisation membranaire induisant des modifications de conformation conduisant à l'ouverture du canal.

3) Mécanismes d'activation et d'inactivation

Les particules d'activation formée par le peptide S4 se déplaceraient en réponse à la dépolarisation membranaire induisant des modifications de conformation occasionnant l'ouverture du canal.

Les cinétiques d'activation et d'inactivation sont des éléments pour conduire à la discrimination des canaux entre eux. Les représentations du passé (portes d'activation et d'inactivation) permettent d'imaginer les mécanismes de contrôle de l'ouverture et de la fermeture des canaux ioniques dépendant du potentiel. Dès 1977, un modèle d'inactivation des canaux sodium était proposé par Benazilla et Armstrong. Ces auteurs montrent que l'injection de protéase (trypsine) dans l'axoplasme de calmar résulte en une perte de l'inactivation du canal sodium.

Ce travail a donné naissance au concept de balle d'inactivation. Il s'agirait d'un domaine possédant un "récepteur" au niveau de la face interne du pore et qui aurait la propriété de diffuser vers celui-ci occasionnant ainsi l'inactivation du canal. Ce domaine "balle" pourrait être séparé de la protéine-canal par clivage protéolytique engendrant ainsi la perte de l'inactivation. Les études de biologie moléculaire portant sur les canaux potassiques de type ShakerB de drosophile, canaux qui s'inactivent rapidement, permettent d'apporter un bon élément en faveur du modèle. Aldrich et coll., (1990) montrent avec des mutants par délétion que la "porte d'inactivation" se situe du côté amino terminal de la séquence peptidique. Ils ont déterminé que les 20 premiers amino-acides constituent la "balle" appelée peptide ShB. La "chaîne" est constituée des 60 amino-acides suivant le peptide ShB. De plus, le fait de "raccourcir la chaîne" par des méthodes de biologie moléculaire a pour conséquence d'accélérer l'inactivation. Les mêmes auteurs ont montré qu'il existe d'autres mécanismes d'inactivation qui ne sont pas aussi rapide que celui-ci. Le second type d'inactivation peut être affecté par des mutations dans l'extrémité carboxy-terminale. Les structures peptidiques invoquées n'ont pas encore été précisément localisées. Pour ce qui concerne le canal sodium, Stühmer et coll. (1989) ont montré qu'une coupure entre les domaines III et IV provoque un ralentissement important de l'inactivation. Compte tenu des résultats antérieurs de Benazilla et Armstrong (1977), il semble raisonnable de penser que les protéases affectent le canal sodium dans cette région.

En général, dans le cadre des canaux à quatre domaines, les parties cytoplasmiques sont considérées comme responsables de l'inactivation. C'est ainsi que des expériences similaires d'utilisation de protéases sur le fonctionnement des canaux ioniques ont été récemment réalisées sur le canal calcique (Lory et coll., 1992). Ces auteurs observent également un ralentissement du phénomène d'inactivation lors de la perfusion intracellulaire de trypsine qui semble indiquer une dissociation fonctionnelle de la sous-unité β du complexe "canaulaire". En revanche, en ce qui concerne la porte d'activation, aucune donnée expérimentale ne permet de la situer. Le groupe de Jan suggère que le segment peptidique situé entre les régions S4 et S5 des canaux potassiques, site de fixation de la "balle d'inactivation" serait en lui même la porte d'inactivation.

B) Les canaux calciques dépendant du potentiel

Au delà de leur contribution à l'excitabilité cellulaire, les canaux calciques activés par le potentiel constituent la principale voie d'entrée du calcium dans la plupart des cellules. En effet, le signal calcique joue un rôle de second messager régulant un grand nombre de fonctions physiologiques. Ainsi la contraction musculaire, la sécrétion d'hormone et de neuromédiateurs voire l'activation de gènes sont sous le contrôle étroit de la concentration en ion calcium intracellulaire libre. De par leur multiples implications dans la physiologie, il n'est pas surprenant de constater que ces canaux représentent en fait une famille hétérogène de protéines. Les travaux de ces dernières années combinant plusieurs techniques comme l'électrophysiologie, la biochimie et la biologie moléculaire permettent de révéler cette diversité tant sur le plan fonctionnel que structural. Les canaux calciques dépendant du potentiel sont également la cible de plusieurs familles de drogues d'intérêt clinique. Ils sont donc globalement classés en fonction de leur propriétés biophysiques, pharmacologiques et structurales.

1) Classification des canaux calciques dépendant du potentiel

a) Classification biophysique

La coexistence de différents types de canaux calciques sur une même cellule a été décrite pour la première fois chez l'étoile de mer en utilisant la technique de "voltage-clamp" (Hagiwara et coll., 1988). Consécutivement différentes conductances calciques ont été trouvées dans les neurones de vertébrés (Pour revue voir Catterall, 1992).

Il est aujourd'hui clairement démontré que plusieurs types de canaux calciques peuvent cohabiter au sein d'une même structure cellulaire. Brièvement, il existe deux classes de courants calciques :

Les courants activés par de faibles dépolarisations (courant bas seuil : LVA pour Low Threshold Activated);

Les courants activés par de fortes dépolarisations (courant haut seuil : HVA pour High Voltage Activated).

Dans chacun des systèmes étudiés, les canaux LVA ne sont visibles qu'à des potentiels imposés très négatifs. De plus, le courant LVA diminue rapidement après l'activation, c'est un courant dit rapide ou transitoire (type "T").

Des études de courant unitaire sur les neurones de la racine dorsale des ganglions de poussin (DRG) ont permis de distinguer trois types de canaux T, N et L grâce à leurs propriétés biophysiques (Nowycky et coll., 1985).

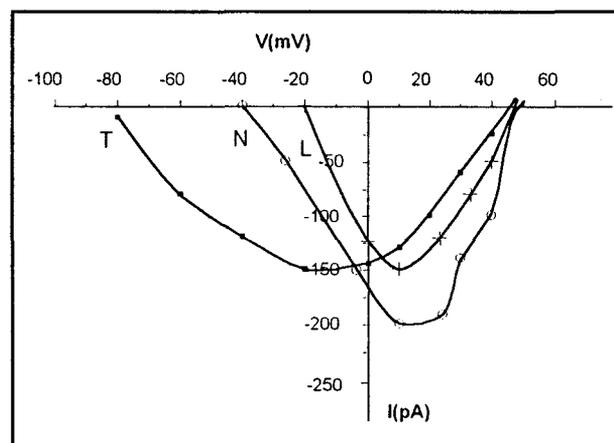


Fig. 3 : Représentation I/V des canaux calciques de type T, N et L.

Cette représentation est historiquement la première description de ces trois types de canaux :

Les canaux L (HVA; Long lasting) ont une grande conductance unitaire et contribuent au courant "long lasting" après de fortes dépolarisations;

Les canaux T (LVA; Transient) ont une conductance faible et s'activent pour de faibles dépolarisations;

Les canaux N (HVA; Neither T nor L) ont des conductances intermédiaires.

L'inactivation des différents types de canaux calciques (T, N et L) est caractéristique. En utilisant la technique de "patch clamp" en configuration cellule entière, l'inactivation se fait avec une dépendance vis à vis du temps et du voltage. Pour les canaux calciques, les mécanismes d'inactivation sont complexes :

le type T s'inactive de manière dépendante du potentiel;

pour les types N et L, le problème est plus complexe. Des mécanismes d'inactivation dépendant des ions calcium et du potentiel ont été décrits (Gutwik et coll., 1989; Tiaho et coll., 1991).

Le rôle physiologique attribué à chacun des types de canaux peut être en quelque sorte éclairé par leurs propriétés d'activation et d'inactivation vis à vis du potentiel de membrane. Le type T par exemple, peut être invoqué pour la génération de dépolarisations spontanées et d'excitations redondantes faisant suite à une forte hyperpolarisation. L'activité du canal de type T n'est rapidement diminuée qu'à partir d'un potentiel de l'ordre de -20 mV. Il peut donc engendrer un courant durable lors de petites dépolarisations et pourrait être impliqué dans une activité de type pacemaker (Hagiwara et coll., 1988).

A contrario, les canaux de type L et N nécessitent une forte dépolarisation pour s'ouvrir. Leur activité est à la base des fonctions sécrétrices des neurones et contractiles des cellules musculaires.

b) Classification pharmacologique

L'analyse pharmacologique est un outil puissant dans la discrimination de protéines d'une même famille. La classification de sites récepteur aux drogues a permis d'avancer dans la connaissance du fonctionnement des canaux calciques. Une telle étude a abouti à la discrimination de quatre familles de canaux calciques : T, N et L analysés ci-dessus ainsi qu'à la détermination du type P.

α) Les sites récepteurs des canaux de type L

D'importantes études sur le concept d'antagonistes calciques défini par Fleckenstein et Godfraind ont décrit des familles de drogues à action sélective sur les canaux de type L (Fosset et coll., 1983; Fleckenstein, 1985). L'intérêt pour de tels effecteurs est important du fait de leur potentiel thérapeutique dans le traitement d'affections cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'angine de poitrine et l'arythmie.

La classe 1a

Les 1-4 dihydropyridines (DHP) sont considérées depuis longtemps comme les ligands spécifiques des canaux de type L. Des dérivés radiomarqués (H3 Nitrendipine, Fosset et coll., 1983) ont permis de définir le site de fixation et de déterminer l'affinité du récepteur pour chacun des membres de cette famille : constante de dissociation à l'équilibre ou K_d , de l'ordre de 10 nM.

Parmi les DHP il existe :

i) des molécules à effet antagoniste ou bloqueurs calciques :

- la Nifédipine
- la Nitrendipine
- le PN 200-110
- le(+)BayK 8644
- le S(-) 202 791 ...

ii) des molécules à effet agoniste :

- le (-)BayK 8644
- le S(+) 202-791

La haute affinité du récepteur aux DHP pour des molécules telles que la Nifédipine ou le BayK 8644 est un des critères définissant les canaux L (Bean, 1985). L'étude des bloqueurs calciques par des techniques d'électrophysiologie en potentiel imposé montre clairement l'effet inhibiteur de ces drogues sur le courant calcique avec une efficacité relative en fonction de l'état conformationnel du canal (activé/inactivé/disponible).

Ces molécules présentent donc deux propriétés essentielles :

i) le blocage dépendant de la fréquence :

La puissance des inhibiteurs calciques de classe 1a est plus ou moins associée à l'ouverture répétée du canal. Le blocage du courant calcique par ces molécules est donc dépendant de la fréquence (Lee et Tsien, 1983).

ii) le blocage dépend également du potentiel transmembranaire :

Les DHP s'associent préférentiellement à l'état inactivé du canal (Lee et Tsien, 1983).

La classe 1b

Les benzothiazépines dont le chef de file est le dilthiazem possèdent un site de fixation distinct des DHP. Ce sont également des bloqueurs du courant calcique.

La classe 1c

Les phénylalkilamines dont les plus connues sont le vérapamil et le bépridil, ont un site distinct des DHP et des benzothiazépines. Différents auteurs ont montré l'existence de sites à haute et à basse affinité pour ce type de molécules dans les membranes de muscle et de système nerveux central.

La classe 2

Plus récemment, plusieurs composés spécifiques des canaux L avec des sites différents des effecteurs de la classe 1 ont été décrits :

- le SR 33557 (Pelzer et coll., 1990)
- le pinavérium (Hille, 1992)

β) Les sites récepteurs des canaux de type N

L' ω -conotoxine GVIA (ω -Cgtx GVIA : toxine purifiée du gastéropode marin *Conus geographus*) est le ligand spécifique des canaux N. Elle est rattachée à la classe 3b selon la classification de Spedding et Paoletti. La fixation spécifique de l' ω -Cgtx GVIA a été démontrée la première fois sur des membranes de cerveau de grenouille et de poussin par Cruz et Oliveira (1986). L' ω -Cgtx GVIA possédant une stoechiométrie différente des DHP sur les membranes de cerveau, elle a permis d'identifier un autre type de canaux calciques : le type N. Sur le plan fonctionnel, elle bloque irréversiblement le courant calcique de type N et constitue une caractéristique de ces canaux.

γ) Les sites récepteurs des canaux de type T

Les études pharmacologiques sur les canaux calciques LVA n'ont pas décrit de ligand très sélectif. Ces canaux sont considérés comme insensibles à l' ω -Cgtx GVIA et peu sensibles au DHP. Cependant quelques drogues appartenant à la classe 3a ont été décrites pour inhiber les canaux de type T :

La tétramétrine (Hagiwara et coll., 1988);

L'amiloride (Tytgat et coll., 1990);

Le chlordiazépoxyde (Reuvery et coll., 1993).

δ) Les sites récepteurs des canaux de type P

Le canal de type P a été défini sur des bases d'études pharmacologiques (Llinas et coll., 1989). Le venin de l'araignée *Agelenopsis aperta* contient différentes molécules à action spécifique sur un canal calcique insensible à l' ω -Cgtx GVIA et aux DHP. Parmi ces molécules, une polyamine nommée FTX bloque sélectivement un canal localisé principalement dans les cellules de Purkinje du cervelet : le type P (Llinas et coll., 1989). Une toxine peptidique également extraite de ce venin bloque spécifiquement le type P : il s'agit de l' ω -AgaIVA (Mintz et coll., 1992). Ce peptide présente une très forte efficacité sur le canal de type P car la concentration entraînant 50% de blocage du canal (IC50) est de 2 nM.

c) Le point sur la classification

canal	L	N	T	P
conductance	25 pS	12 à 20 pS	8 pS	10 à 12 pS
activation	haut potentiel	haut potentiel	bas potentiel	potentiel moyen

inactivation	lente	modérée	rapide	très lente
localisation	ubiquitaire	neuronale	ubiquitaire	neuronale
fonction	contraction	neuro-	activité de	neuro-
	sécrétion	transmission	pacemaker	transmission
bloqueurs	DHP	conotoxines	?	ω -AgaIVA

2) Eléments de régulation de l'activité des canaux calciques

Ce chapitre ne s'attachera qu'à la régulation à "court terme" des canaux calciques, c'est à dire à la régulation jouant sur l'activité des canaux déjà présents dans la membrane. Nous ne parlerons pas de la régulation pouvant exister aux niveaux pré- et post-transcriptionnels ainsi que des régulations co- et post- translationnelles.

Les neurotransmetteurs et les hormones constituent les stimuli essentiels pouvant entraîner une modification de l'activité du canal calcique. La fixation de ces derniers sur un récepteur active une cascade d'évènements pouvant entraîner une modification de l'activité de la protéine-canal. L'exemple le plus décrit de ces mécanismes est sans conteste la régulation sympathique de l'inotropisme et du chronotropisme cardiaques. La noradrénaline libérée par les terminaisons sympathiques cardiaques se fixe par son récepteur à la membrane des myocytes. Il s'ensuit une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase qui résulte en une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire. Ceci entraîne une augmentation de l'activité de la protéine kinase A (PKA) qui est alors supposée phosphoryler directement le canal calcique engendrant ainsi une augmentation de l'activité de ce dernier. Le muscle cardiaque se contracte alors plus fortement et avec une élévation du rythme de la contraction.

a) Régulation par phosphorylation

Les canaux calciques sont donc l'objet de phosphorylations. Les différentes protéines kinases peuvent en effet phosphoryler certains amino-acides de la séquence des complexes "canaux". Par exemple, la sous-unité de 165 kDa du canal calcique de muscle squelettique est le substrat de plusieurs protéines kinases (Chang et coll., 1988). Cependant, les autres sous-unités de ce canal peuvent également être phosphorylées par ces diverses protéines kinases. Ainsi, pour obtenir la reconstitution fonctionnelle en bicouche lipidique du canal calcique de type L de muscle squelettique, il est nécessaire d'ajouter dans le milieu de la protéine kinase A active (Chang et coll., 1991). En effet, l'exemple le mieux connu de régulation par phosphorylation des

canaux calciques est la phosphorylation par la protéine kinase A dépendante de l'AMP cyclique. Cette modulation semble être clairement établie au niveau cardiaque, celle ci ayant pour conséquence :

- i) une augmentation de l'amplitude du courant;
- ii) une modulation de sa cinétique d'activation (Ochi et Kawashina, 1990);
- iii) une modification de sa dépendance vis à vis du potentiel (Tiaho et coll., 1991);
- iv) une altération de sa sensibilité aux DHP (Tiaho et coll., 1990). Pour revue de ces aspects, voir Pelzer et coll., 1990.

L'activité "canaux" de type L dans d'autres tissus est aussi modulée par la phosphorylation dépendante de la PKA (type L de muscle squelettique : Arreola et coll., 1987; type L neuronal : Armstrong et Eckert, 1987). Cependant, dans les myocytes vasculaires, les canaux de type L présentent des sensibilités variables vis à vis de la phosphorylation par la PKA : ils peuvent y apparaître sensibles ou insensibles (Neveu et coll., *J. Physiol. Lond.* sous presse).

Le canal de type T n'est quant à lui pas sensible à la phosphorylation (Bean, 1985; Charnet et coll., 1991). Quant aux effets de la phosphorylation par la PKA des canaux calciques neuronaux des types N et P, les données bibliographiques sont très restreintes.

Contrairement à la situation rencontrée avec la PKA, la phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) semble induire des effets variés incluant dans la plupart des cas des stimulations mais parfois des inhibitions des influx calciques. Ces effets ne concernent néanmoins que les courants HVA, les courants LVA ne semblent pas ainsi affectés par cette kinase (Bean 1989).

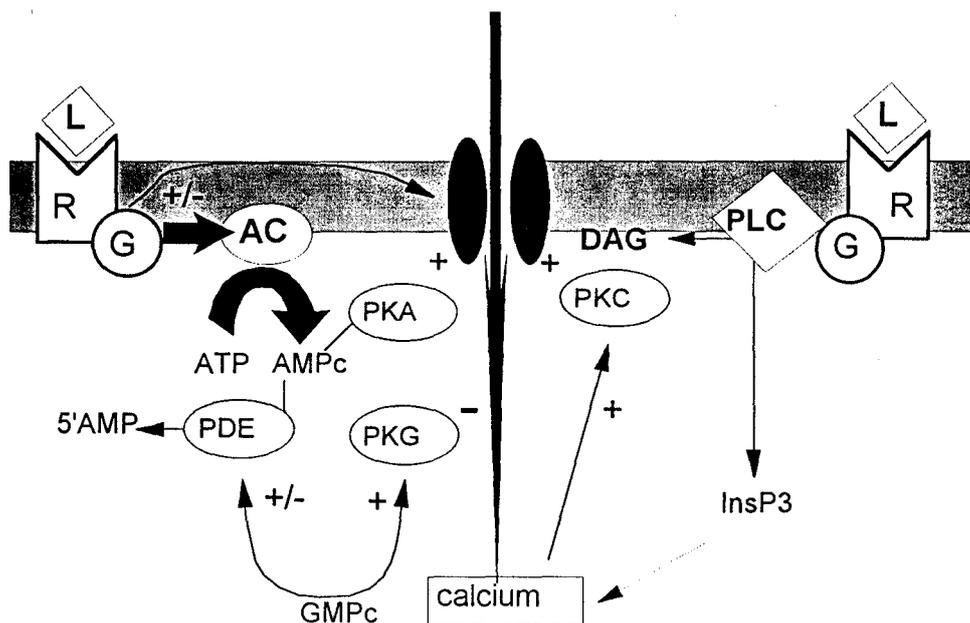
Le GMP cyclique, structurellement proche de l'AMP cyclique est également impliqué dans la régulation fonctionnelle des canaux calciques. Le GMPC est tout d'abord connu pour activer ou inhiber des phosphodiesterases cytosoliques qui régulent la concentration intracellulaire en AMPc en l'hydrolysant. Cet effet de modulation du taux d'AMPc a été montré se répercuter sur la modulation dépendante de l'AMPc du courant calcique du myocyte ventriculaire de grenouille (Fishmeister et Hartzell, 1990). La seconde action du GMPC est d'activer des kinases spécifiques : les PKG. Une phosphorylation du canal calcique par ces kinases semble inhiber les courants calciques cardiaques de type L (Méry et coll., 1991).

b) Couplage direct avec les protéines G

Une autre voie de modulation de l'activité du canal calcique est son couplage direct avec les différentes protéines G activées par les récepteurs membranaires. Les différents types de protéines G peuvent soit activer soit inhiber l'activité des canaux. Globalement, les effets "protéine G" sont beaucoup plus rapides que les effets de phosphorylation par les kinases. Les divers types de canaux calciques peuvent être régulés par les différentes protéines G. Le canal de

type T voit son activité diminuer par des protéines G inhibitrices (Fraser et Mc Vicar, 1991). De plus, il est maintenant bien établi que le type N est inhibé par un couplage direct suite à l'activation de divers récepteurs (Swartz et coll., 1993). Le type P semble partager avec le type N cette capacité de voir son activité réduite de manière dépendante du potentiel par les protéines G (Mintz et Bean, 1993). Un effet de stimulation de l'activité des canaux calciques de type L cardiaques et squelettiques par les protéines G a été reporté (Yatani et coll., 1987; 1988). L'existence de ce mécanisme au niveau du myocarde en réponse à l'isoprénaline fait l'objet d'une polémique entre plusieurs auteurs. Certains soutiennent son existence (Yatani et Brown, 1989) alors que d'autres l'excluent (Hartzell et coll., 1988).

c) Point schématique sur les régulations de l'activité des canaux calciques



C) Diversité moléculaire des canaux calciques

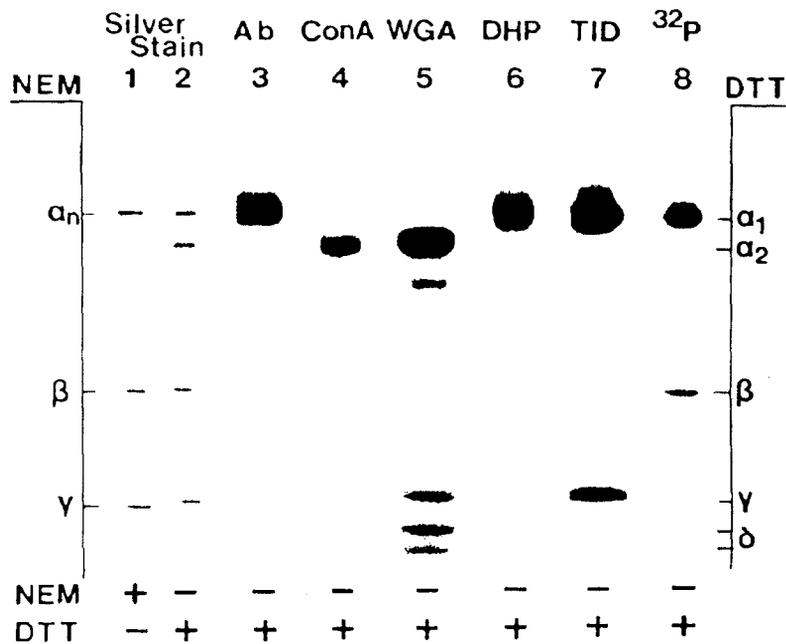
Les études pharmacologiques ont révélé l'existence de ligands à haute affinité pour les canaux calciques. Le récepteur aux DHP de muscle squelettique a donc pu être purifié à partir de membranes de tubules transverses en utilisant des antagonistes calciques radiomarqués et modifié par la présence d'un groupement photoactivable.

1) Etude biochimique du canal calcique

a) Le récepteur aux DHP de muscle squelettique

En 1983, Fosset et coll. ont montré en utilisant la ³H Nitrendipine que la membrane du tubule T présente des sites aux DHP ayant une très haute affinité. Elle présente de plus une très grande

densité de ces sites. Ces constatations ont rendu possible la purification du canal calcique et l'analyse de sa structure protéique.



En l'absence d'agent réducteur, l'électrophorèse des polypeptides purifiés fait apparaître trois bandes de tailles distinctes :

- une sous-unité α de 175 kDa;
- une sous-unité β de 54 kDa;
- une sous-unité γ de 32 kDa.

La même analyse après réduction des ponts disulfure permet d'identifier deux fractions de haut poids moléculaire :

- Une sous unité de 175 kDa nommée α_1 ;
- Une sous-unité de 143 kDa nommée α_2 ;

ces deux fractions n'étaient pas "séparables" en l'absence d'agents réducteurs.

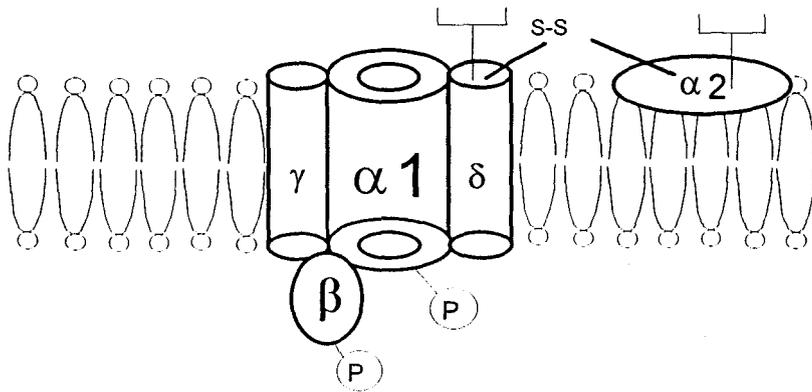
La sous-unité α_2 est liée par un pont disulfure à des sous unités δ de 24 et 27 kDa pouvant être visualisées par un marquage ¹²⁵I-WGA. En effet, chacune des sous-unités du complexe canalaire présente des propriétés de marquage lectinique différentes :

- la ConA marque α_2 ;
- la WGA marque α_2 et δ .

Le site récepteur des DHP est situé sur la sous-unité α_1 , ce qui a pu être montré par un marquage à l'Azidopine tritiée. Des expériences similaires ont montré que α_1 portait également des sites pour les benzothiazépines et les phénylalkylamines. Les parties transmembranaires des sous unités peuvent être marquées par une molécule liant les domaines hydrophobes : le TID (3-(trifluorométhyl)-3-n iodophényl diazirine). Le TID est fortement incorporé dans les sous-unités

$\alpha 1$ et γ . La ligne 8 montre que les sous-unités $\alpha 1$ et β ont des sites phosphorylés in vitro par la PKA. Ces deux sous-unités sont de la même façon phosphorylées par la PKC, la PKG, la caséine kinase et la calmoduline kinase II.

L'ensemble de ces données a permis d'imaginer un modèle de l'agencement des diverses sous-unités dans la membrane plasmique.



La sous-unité $\alpha 1$ est la protéine principale portant les sites récepteurs aux antagonistes calciques, elle peut de plus être phosphorylée. La sous-unité β est une protéine cytosolique pouvant également être phosphorylée. Les sous-unités $\alpha 2$ et δ sont glycosylées (glycosylation de type N-acétyl lactosaminique). La sous-unité γ est une sous-unité transmembranaire. Une reconstitution du canal en bicouche lipidique à partir des diverses sous-unités purifiées montre un canal réellement fonctionnel. La sous-unité $\alpha 1$ constitue le canal ionique proprement dit à travers lequel transigent les ions calcium.

b) Le récepteur à l' ω -Cgtx GVIA

Un complexe canalaire de type N a été récemment purifié à partir de membranes de cerveau de rat (Witcher et coll., 1993). Ce canal est composé :

d'une sous-unité $\alpha 1$ de 230 kDa, site de liaison pour ω -Cgtx GVIA;

d'une sous-unité $\alpha 2$ - δ de 160 kDa pouvant être séparée par réduction en $\alpha 2$ (140 kDa) et δ (20 kDa);

d'une sous-unité β de 57 kDa;

d'une autre sous-unité glycosylée de 95 kDa.

La réinsertion de ces sous-unités en bicouche lipidique montre que ce complexe protéique forme un canal de type N tout à fait fonctionnel et présentant des propriétés identiques au canal natif de cerveau.

2) Biologie moléculaire des canaux calciques

L'identification biochimique du récepteur aux DHP de muscle squelettique a rendu possible l'accès aux séquences nucléotidiques codant pour les différentes sous-unités des canaux calciques. Globalement, la contribution des études de biologie moléculaire, via les techniques de clonage et d'investigation de la distribution tissulaire a grandement contribué à établir la notion de diversité moléculaire des canaux calciques.

a) Clonage moléculaire de la sous unité $\alpha 1$ des canaux calciques

Le groupe de S. Numa, au Japon, fait partie de ceux qui ont participé à la détermination des séquences primaires des canaux ioniques. Dès 1985, ce groupe a publié la séquence nucléotidique du canal Na^+ d'*Electrophorus electricus* (Noda et coll., 1985) et par la suite, de plusieurs sous-unités équivalentes dans le cerveau de rat.

Dans le cas du canal calcique, des sondes oligonucléotidiques dégénérées ont été obtenues par micro-séquençage des fragments tryptiques du récepteur aux DHP de muscle squelettique. En 1987, Tanabe et coll. ont cloné et séquencé l'ADN complémentaire codant pour la sous-unité $\alpha 1$ du muscle squelettique de lapin.

Une telle stratégie de clonage, dépendant de la purification de la protéine, n'a pas été poursuivie par la suite dans le domaine des canaux calciques. Depuis, en effet, de nombreux ADN complémentaires ont été clonés par homologie de séquence dans différents tissus et différentes espèces. Cependant, un très bon exemple de clonage par expression a été montré en 1988 par Ellis et coll. et celui-ci a conduit au reclonage de la sous-unité $\alpha 1$ de muscle squelettique et au premier clonage de la sous-unité $\alpha 2$. Les séquences des diverses sous-unités $\alpha 1$ publiées à ce jour sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

classe	nom	type	tissus	espece	nb. isof.	référence	
skm	Cach1	L-DHP sens	m. squelet.	lapin	2	Tanabe et coll. (1987) Malouf et coll. (1992)	
A	Cach4	P- ω AgaIV-sens	cerveau	lapin	2	Mori et coll. (1991)	
	RbA			rat	4	Starr et coll. (1991)	
B	Cach5	N- ω Cgtx-sens	neuroblastome	homme	1	Williams et coll. (1992)	
	RbB			cerveau	rat	2	Dubel et coll. (1992)
				neuroblastome	souris	2	Coppola et coll. (1994)

C	Cach2	L-DHP sens	aorte	rat	1	Koch et coll.(1990)
			RbC	poumon	lapin	1
		coeur	lapin	1	Mikami et coll. (1989)	
			homme	2	Schultz et coll. (1993)	
			cerveau	rat	2	Snutch et coll. (1991)
			fibroblaste	homme	1	Soldatov et coll. (1992)
D	Cach3	L-DHP sens	insulinome	homme	2	Seino et coll. (1992)
			RbD	cerveau	rat	2
		cerveau	rat	3	Hui et coll. (1991)	
		HIT	hamster	2	Yaney et coll. (1992)	
E	Cach6	LVA	cerveau	rat	1	Soong et coll. (1993)
	RbE		cerveau	lapin	1	Niidome et coll. (1992)

L'analyse de l'homologie des différentes séquences clonées entre elles montre que les domaines transmembranaires sont les plus conservés. Globalement, l'architecture moléculaire est conservée et l'on ne sait pas encore attribuer un rôle fonctionnel aux variations de séquence primaire. Les résultats de Northern blot, Southern blot avec de l'ADN génomique ainsi que le pourcentage d'homologie donnent les arguments nécessaires à la discrimination des gènes qui codent pour les canaux calciques.

Il existe deux système de classification de ces gènes :

i) Snutch et coll. (1991) ont répertorié quatre classes de gènes exprimés dans le cerveau de rat, ayant pu être révélés par hybridation à faible stringence avec une sonde d'ADN complémentaire de muscle squelettique. La nomenclature est Rat brain (Rb) suivi de la classe (de A à E). Le gène du canal calcique de muscle squelettique n'étant pas exprimé dans le cerveau, il n'appartient donc pas à la classification.

ii) Perez-Reyes et coll. (1990), avec une stratégie équivalente proposent l'existence de cinq gènes codant pour la sous-unité $\alpha 1$ des canaux calciques. L'amplification par PCR de segments d'ADN permet de répertorier par leur divergence de séquence, les produits de gènes différents. Les différents ADN complémentaires sont classés en fonction de l'ordre chronologique du clonage et du nombre d'isoformes de la région IV-S3.

b) clonage moléculaire de la sous-unité $\alpha 2$ - δ

La sous-unité $\alpha 2$ est beaucoup plus conservée que la sous-unité $\alpha 1$ et son messenger se retrouve dans tous les tissus étudiés (Biel et coll., 1991). Jusqu'alors, un seul gène codant pour cette sous-unité a pu être caractérisé. Cependant, celui-ci est sujet à l'épissage alternatif qui génère deux isoformes distinctes. L'une d'entre elle a été décrite dans le muscle squelettique de

lapin (Ellis et coll., 1988); l'autre a été isolée dans le cerveau de rat et le cerveau humain (Kim et coll., 1992; Williams et coll., 1992). Il est important de signaler qu'un seul messenger code pour les deux sous-unités $\alpha 2$ et δ . Les chaînes peptidiques de celles-ci sont ensuite séparées par clivage protéolytique et les sous-unité restent unies par un pont dissulfure.

c) clonage moléculaire de la sous-unité β

Le tableau ci-dessous regroupe l'ensemble des gènes et des isoformes de sous-unité β clonées :

gène	isoforme	tissus	espèce	référence
$\beta 1$	a	m. squelettique.	lapin	Ruth et coll. (1989)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
	b	cerveau	rat	Pragnell et coll. (1991)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
	c	cerveau	homme	Williams et coll. (1992)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
gène $\beta 1$	a, b, c		homme	Powers et coll. (1992)
$\beta 2$	A	cerveau	rat	Peres-Reycz et coll. (1992)
	a, b	coeur, m. lisse	lapin	Hullin et coll. (1992)
$\beta 3$		cerveau, m. lisse	lapin	Hullin et coll. (1992)
		cerveau	rat	Castellano et coll. (1993a)
		cerveau, ovaire, m. lisse	homme	Collin et coll. (1993)
$\beta 4$		cervelet	rat	Castellano et coll. (1993b)
MysB		foetus humain		Rosenfeld et coll. (1993)

La démarche qui a conduit à ces clonages est décrite dans le chapitre relatif à la sous-unité β .

d) clonage moléculaire de la sous-unité γ

La sous-unité γ n'a jusqu'alors été décrite que dans le muscle squelettique (Jay et coll., 1990). En 1993 cependant, le gène humain codant pour cette sous-unité a été cloné et caractérisé (Powers et coll., 1993).

3) Génétique des canaux calciques

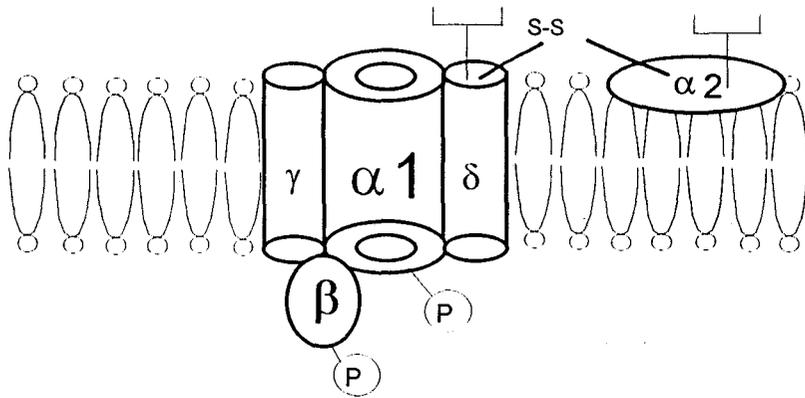
Peu de travaux concernant la génétique des canaux calciques ont été entrepris à ce jour, seule la localisation chromosomique de certaines sous-unités $\alpha 1$ et de la sous-unité $\alpha 2$ ont été effectuées. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

classe	espèce	localisation	référence
SKM	homme	1q31-q32	Drouet et coll., 1993
	souris	1FG	Drouet et coll., 1993
C	homme	12p12pter	Powers et coll., 1991
	homme	12p13	Schultz et coll., 1993
D	homme	3p14.3	Seino et coll., 1991
$\alpha 2$	souris	5p	Chin et coll., 1992

Ces travaux de localisation chromosomique peuvent présenter un intérêt dans la recherche de maladies génétiques localisées à un endroit précis sur le génôme. Dans le cas de la localisation sur les chromosomes de souris, l'intérêt est à terme de pouvoir réaliser des animaux transgéniques.

Chapitre 2 : la sous-unité β du canal calcique

Ce chapitre développe principalement les aspects structuraux des différentes sous-unités β clonées à ce jour. Il englobe la description des séquences peptidiques ainsi que leur analyse en termes de structure secondaire potentielle et d'hydrophobicité. Il est à noter qu'il n'existe dans la bibliographie aucune revue englobant les aspects structuraux et fonctionnels de la sous-unité β . Ce document constitue en fait la première revue de ce type. L'ensemble des données de structure activité ne permet pas encore de développer un modèle moléculaire fonctionnel de cette sous-unité. Cependant, une étude approfondie nous a conduit à cerner quelques domaines hautement conservés pouvant jouer un rôle important dans l'activité modulatrice de la sous-unité β sur le courant calcique.



La sous-unité β : un régulateur endogène de l'activité canal calcique portée par $\alpha 1$?

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la sous-unité β est une protéine cytosolique soluble dont on suppose qu'elle fonctionne en interaction avec la sous-unité $\alpha 1$. Cette dernière porte l'activité essentielle de canal ionique et l'activités de liaison des drogues modulant le courant calcique. De part sa position cytoplasmique, la sous-unité β occupe une position stratégique dans le contrôle de l'activité canalaire :

- elle peut être la cible de diverses protéines kinases et de ce fait participer à la régulation des canaux calciques par phosphorylation;
- enfin, elle présente une importante diversité moléculaire puisque d'ores et déjà, l'on sait que quatre gènes au moins codent pour ces sous unités.

Ce chapitre se propose d'aborder la diversité moléculaire de la sous-unité β en détaillant les éléments structuraux à la base des différences inter-isoformes. Nous examinerons les conséquences fonctionnelles que peut engendrer cette variété structurale et ce au regard des divers travaux mettant en jeu les relations structure-activité. Enfin, nous tenterons de faire le point sur la répartition des isoformes de β dans les tissus excitables au niveau des tissus entiers tout d'abord, puis au niveau des sous-populations cellulaires constituant ces tissus.

A) Les différents gènes, structure de leur produits

1) Le gène $\beta 1$

a) La sous-unité β de muscle squelettique de lapin : $\beta 1a$

Les ADN complémentaires codant pour la sous unité β du canal calcique sensible aux DHP de muscle squelettique ont été isolés sur la base des séquences peptidiques dérivées de la protéine purifiée (Ruth et coll., 1989). Huit peptides au total dont six étaient uniques ont été

isolés de deux digestions protéolytiques de sous-unité β purifiée. Dans un cas, le canal purifié contenant la sous-unité β avait été phosphorylé in vitro par la PKA avant la dissociation subunitaire (l'un des peptides contenait d'ailleurs 74% de la radioactivité retrouvée sur la sous-unité entière). Après microséquençage de ces fragments tryptiques, 64 oligonucléotides (14-mer) ont été obtenus. Un mélange de ces oligonucléotides a été utilisé pour cribler 2×10^5 clones d'une banque de muscle squelettique de lapin. Des clones partiels, dont la séquence correspondait aux peptides ont ensuite servi de sonde pour cribler à nouveau la banque. Un clone de 1835 nucléotides a été finalement isolé et codait pour 524 amino-acides :

MVQKTSMSRGPYPSPQEIFMVEVDFPSPQGGKYSKRRGRFKRSDGSTS SDTT SNSFVRQGS A ESYTSRPSDSVVSLEEDREALRKAERQALAQLEKAKTKP	100
VAFVAVRINVGYNPSPGDEVFVEGVAITTEPKDFLHIKEKYNNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSLRLLEQKLRQSALSSSKSGDNSSSSSLGDDVVTG	200
TRRPTTPASGNEMNLAFLEFLDLEDEAEELGEQSGSAKT SVS SVTTPPHGTRIPFVKTEHVPPYDVVPSMRPITLVGPSLKGVEVTDMQKALDFD	300
LKGRFDGRISITRVTADISLAKRSVLNPNPKHIIERSNTRSSLAEVQSEIERIFELARTLQVALDADT INHPAQLSKTSLAPITVYIKITSPKVLQRL	400
IKSRGKSGSKHINVOIAASEKLAQCPEMFDIILDENQLEDACEHLAEVLEAYNKATHPPSSTPPNPLINRTMATAALAAASPAVVENLQVQVLTSLRRNL	500
SFWGGLET SQRGGAVPQQQEHAM	524

Fig 1 : Séquence peptidique de la sous unité β de muscle squelettique de lapin

Le poids moléculaire calculé de 57,868 kDa est similaire au poids moléculaire apparent observé en gel de polyacrilamide-SDS qui est de 55 kDa. Cet ADN complémentaire contient la séquence de tous les peptides qui avaient été isolés par digestion tryptique. La première méthionine "en phase" a été choisie comme initiatrice puisqu'elle apparaît 50 bp après un codon stop. Une analyse de la séquence peptidique en termes d'hydropathie selon Kyte et Doolittle (1982; fig. 2) confirme l'absence de domaines typiquement transmembranaires (segment d'au moins 19 amino-acides avec un index moyen d'hydropathie supérieur à 1,6). De plus, la partie amino-terminale ne ressemble pas à une séquence signal hydrophobe. La protéine est globalement hydrophile bien qu'elle contienne de petits domaines hydrophobes répartis tout au long de sa séquence.

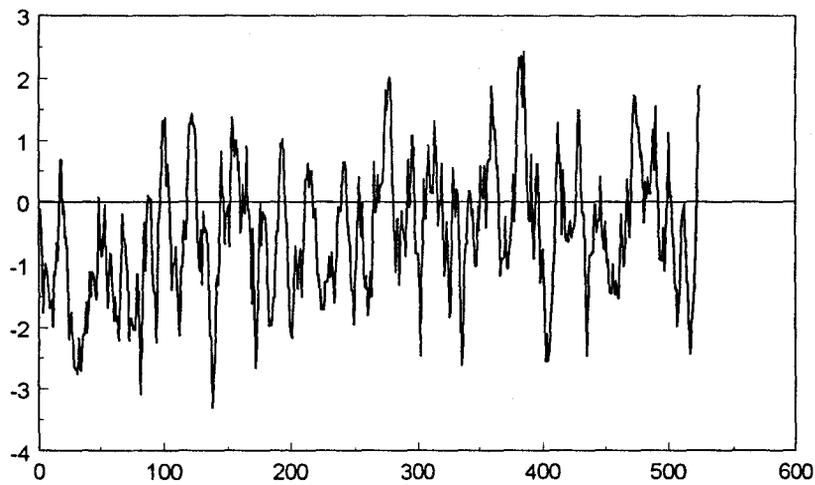


Fig.2 : diagramme d'hydropathie de la sous-unité β de muscle squelettique de lapin

Ces propriétés correspondent aux données biochimiques qui suggéraient que la sous-unité β n'avait pas d'interaction avec la membrane plasmique, mais semblait liée à un domaine intracellulaire de la sous-unité $\alpha 1$. Une analyse utilisant la méthode probabiliste de Chou et Fasman montre que la sous-unité β contient quatre grands domaines en hélice α (voir diagramme d'hydropathie) désignés I, II, III et IV et la disposition des séquences hydrophobes suggère une interaction avec les protéines du cytosquelette (Ruth et coll., 1989). Chacun des domaines en hélice α contient un motif de huit amino-acides bien conservés. Il débute par un résidu leucine ou isoleucine et est interdispersé par des amino-acides chargés négativement. Cet arrangement de résidus acides pourrait fonctionner dans un mécanisme de liaison des cations divalents.

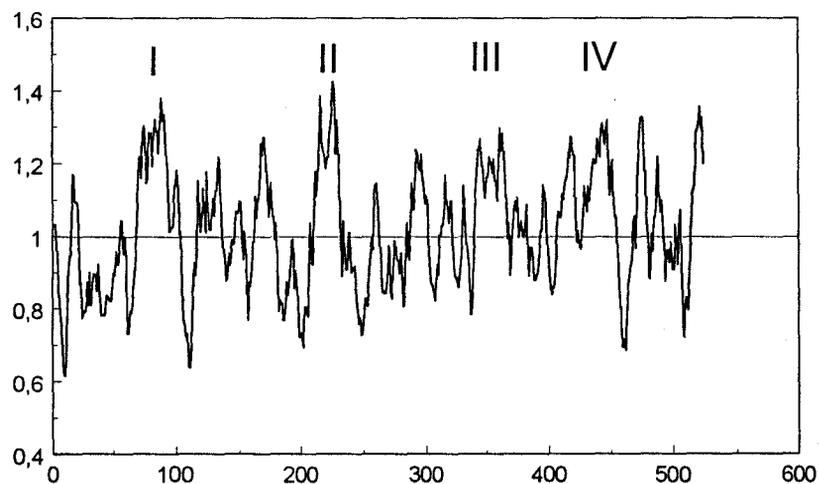


Fig.3 : analyse de la composition en hélice α de la sous-unité β de muscle squelettique de lapin; l'axe des abscisses désigne les amino acides entrant dans la composition de la protéine; l'axe des ordonnées correspond à l'index d'hélicité moyenné sur six amino acides consécutifs.

cerveau de rat. La phase de lecture ouverte code pour une protéine de 597 amino acides avec un poids moléculaire calculé de 65,679 kDa.

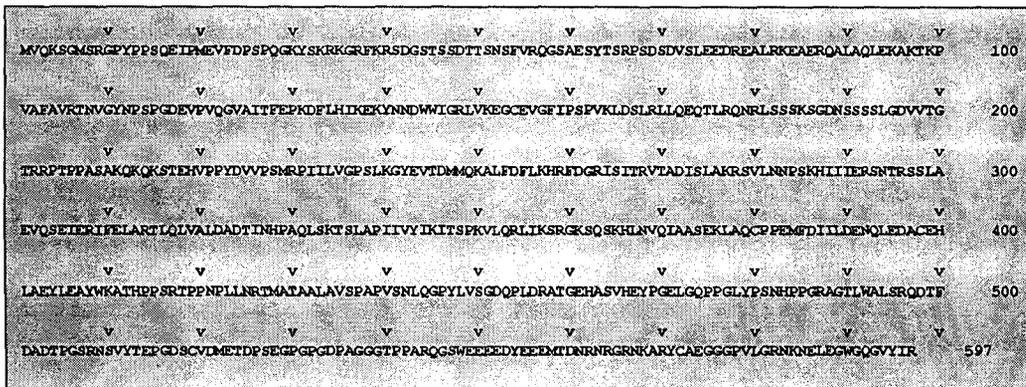


Fig. 4 : Séquence peptidique de la sous-unité β de cerveau de rat

Comme le montre la fig 5, elle présente une homologie de 82% avec la sous-unité β de muscle squelettique précédemment décrite. La protéine comporte un carboxy terminus spécifique de 153 amino acides et une délétion de 50 amino acides dans la partie médiane

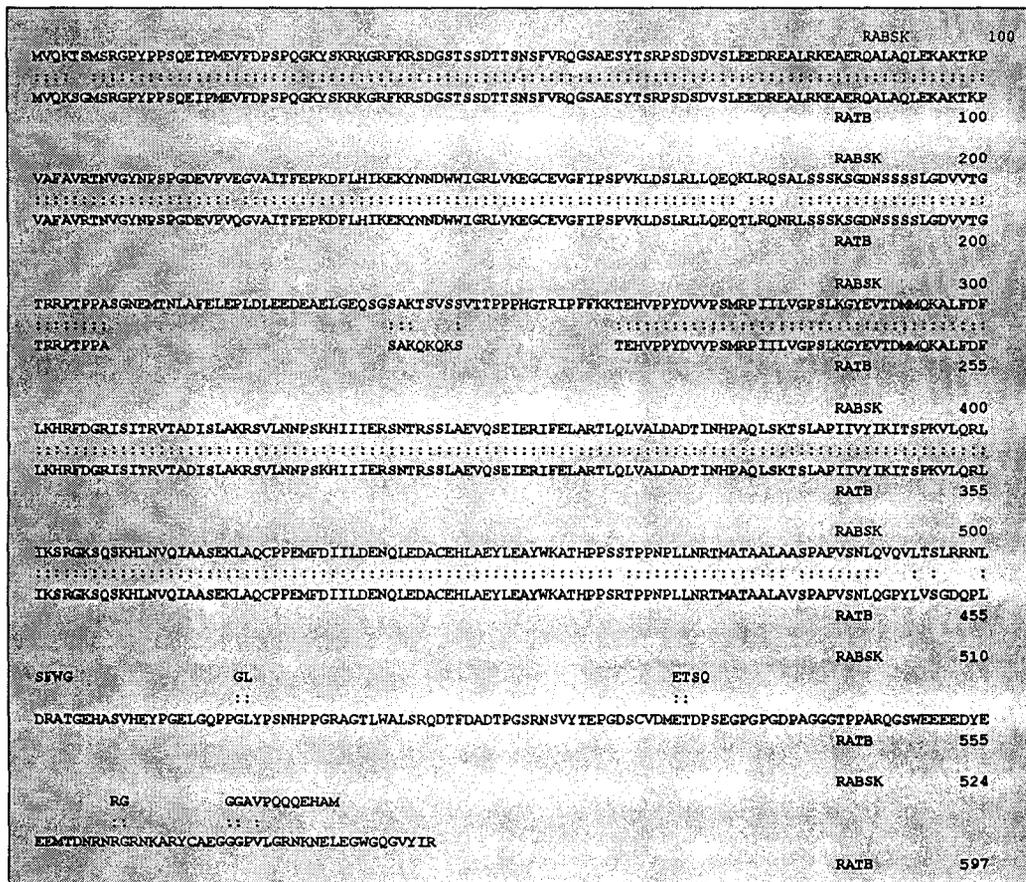


Fig. 5 : comparaison entre les séquences peptidiques de β 1a (RABSK) et β 1b (RATB).

Les propriétés physico-chimiques de la protéine ne sont pas tout à fait conservées au regard de la sous-unité β de muscle squelettique de lapin.

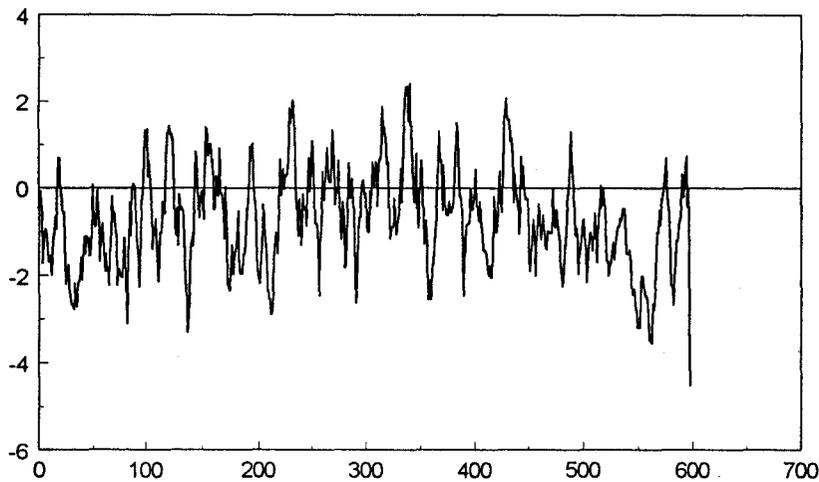


Fig. 6 : diagramme d'hydropathie de la sous-unité b1b de cerveau de rat

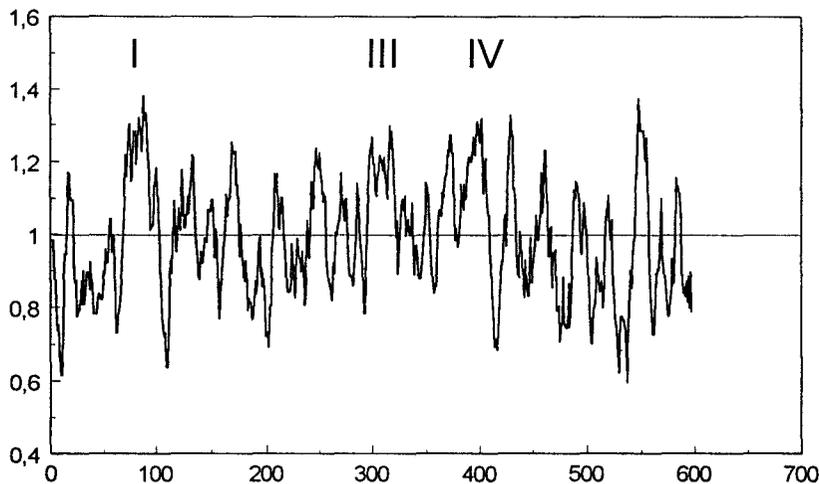


Fig.7 : analyse de la composition en hélice α de la sous-unité β de cerveau de rat; l'axe des abscisses désigne les amino acides entrant dans la composition de la protéine; l'axe des ordonnées correspond à l'index d'hélicité moyenné sur six amino acides consécutifs.

L'un des domaines en hélice α n'est pas conservé sur β 1b par rapport à β 1. Ceci est dû à la délétion de 50 acides-aminés dans la région médiane. Parallèlement à la perte de ce domaine, un motif octapeptidique correspondant à la structure II n'est pas présent dans la séquence de β 1b.

c) la sous-unité β de cerveau humain : β 1c

La même technique de clonage par homologie de séquence a permis au groupe de M. Harpold d'isoler un ADN complémentaire codant pour une nouvelle sous-unité β à partir

de cerveau humain (Williams et coll., 1992). Cet ADN complémentaire code pour 478 acides aminés et le poids moléculaire calculé est de 52.934 kDa. La séquence en amino acides présente 96.9% d'homologie avec la sous-unité β de muscle squelettique (fig. 8).

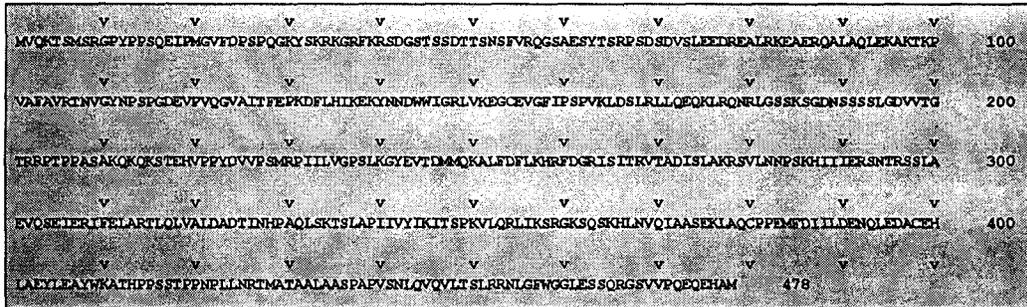


Fig. 8 : séquence peptidique de la sous unité β de cerveau humain

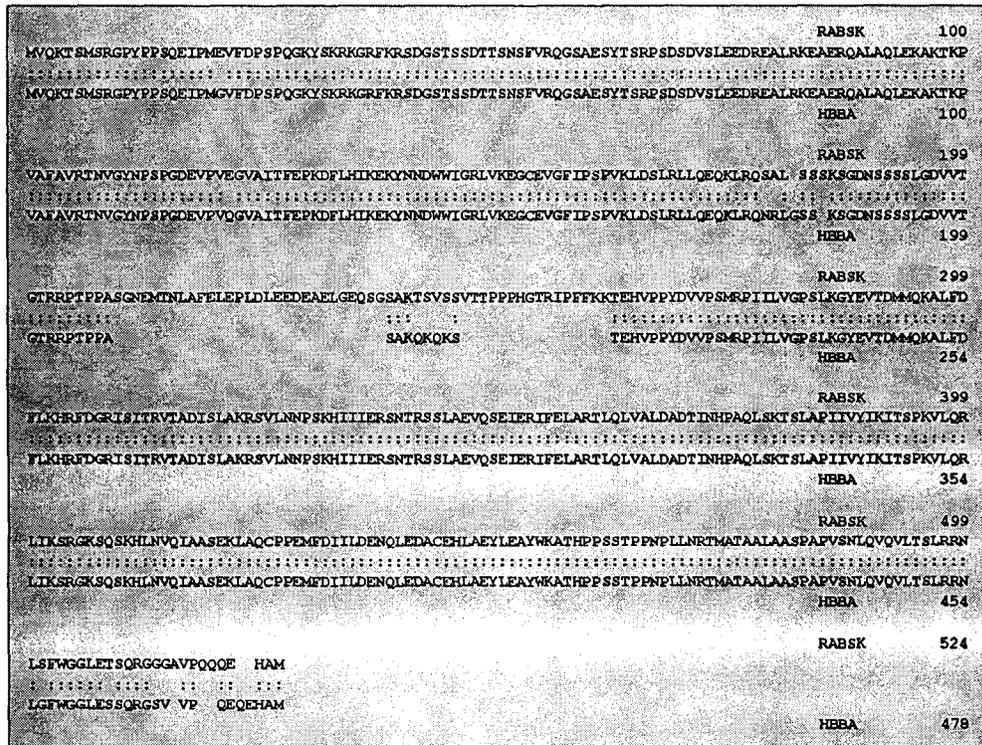


Fig. 9 : comparaison entre les séquences peptidiques de β 1a (RABSK) et β 1c (HBBA).

Comme le montre la fig. 9, la structure primaire de β 1c est quasi-identique à β 1a. Simplement, une délétion de 50 amino acides dans la région médiane est également observée comme dans le cas de β 1b, l'extrémité C-terminale étant cette fois identique à β 1a.



	RATB	100
MVQKSGMSRGFYPPSQEIPMEVFDPSPOGKYSKRKGRFKRSDGSTSSDTTNSNFVRQGSAESYTSRPSDSDVSLIEDREALRKEAERQALAEKAKTKP		
.....		
MVQKTSMSRGFYPPSQEIPMGVFDPSPOGKYSKRKGRFKRSDGSTSSDTTNSNFVRQGSAESYTSRPSDSDVSLIEDREALRKEAERQALAEKAKTKP	HBBA	100
	RATB	199
VAFVAVRTNVGYNPSPGDEVFVQGVAITFEPKDFLHIKEKYNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSLRLLOEQTLRQRLSSSKSGDNSSSLGDVVT		
.....		
VAFVAVRTNVGYNPSPGDEVFVQGVAITFEPKDFLHIKEKYNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSLRLLOEQTLRQRLSSSKSGDNSSSLGDVVT	HBBA	199
	RATB	299
GTTRRPTPPASAKQKQKSTEHVPPYDVVPSMRPITILVGPSTLKGVEVTDMMQKALDFLKHFRFDGRISITRVTDI SLAKRSVLNPNPKHIIERSNTRSSL		
.....		
GTTRRPTPPASAKQKQKSTEHVPPYDVVPSMRPITILVGPSTLKGVEVTDMMQKALDFLKHFRFDGRISITRVTDI SLAKRSVLNPNPKHIIERSNTRSSL	HBBA	299
	RATB	399
AEVQSEIERIFELARTLQVALDADTINHPAQLSKTSLAPITIVYIKITSPKVLQRLIKSRGKSQSKHLNVQIAASEKLAQCPPEMFDIILDENQLEDACE		
.....		
AEVQSEIERIFELARTLQVALDADTINHPAQLSKTSLAPITIVYIKITSPKVLQRLIKSRGKSQSKHLNVQIAASEKLAQCPPEMFDIILDENQLEDACE	HBBA	399
	RATB	499
HLAEYLEAYWKATHPPSRTPPNPLNRTMATAALAVSPAPVSNLQSPYLVSGDQPLDRATGEHASVHEYPGELGQPPGLYPSNHPPGRAGTLWALSRODT		
.....		
HLAEYLEAYWKATHPPSRTPPNPLNRTMATAALAVSPAPVSNLQSPYLVSGDQPLDRATGEHASVHEYPGELGQPPGLYPSNHPPGRAGTLWALSRODT	HBBA	466
	RATB	597
FDADTSGSRNSVYTEPGDSCVDMETDPSEGGPFGDPAGGGTTPPARQGSWEEDYEEEMTDNRNRGRNKARYCAEGGGPVLGRNKNELEGWQGVYIR		
.....		
GSVVVPEQEHAM	HBBA	478

Fig. 10 : comparaison entre les séquences peptidiques de $\beta 1b$ (RATB) et $\beta 1c$ (HBBA).

Le N-terminal et la partie médiane de la séquence sont identiques, seul le C-terminal diffère.

La structure secondaire prédite pour $\beta 1c$ est presque totalement identique à celle de $\beta 1b$ si ce n'est que l'extrémité carboxy-terminale est celle de $\beta 1a$. De même l'analyse des sites potentiels de phosphorylation est identique à celle définie pour $\beta 1a$.

Le point sur le gène $\beta 1$

L'homologie de séquence existant entre ces trois sous-unités β permettait de penser qu'elles dérivait d'un seul et unique gène. Cependant, comme toutes provenaient d'espèces différentes, il n'était pas possible de le prouver.

C'est vers la fin de l'année 1992 que l'organisation génomique a été totalement éclaircie chez l'homme (Powers et coll., 1992). Simultanément, nos travaux montraient que les trois isoformes de $\beta 1$ étaient présentes au niveau du coeur humain (Collin et coll., 1993). Il a donc été possible dès ce moment d'établir que les trois isoformes décrites ci-dessus résultaient de l'expression d'un seul et même gène : le gène $\beta 1$. L'expression de ce gène étant bien sûr soumise à l'épissage alternatif conduisant au trois isoformes. La nomenclature, basée sur l'historique de leur identification est devenue la suivante :

$\beta 1a$: muscle squelettique (Ruth et coll., 1989);

$\beta 1b$: cerveau de rat (Pragnell et coll., 1991);

$\beta 1c$: cerveau humain (Williams et coll., 1992)

Comme il sera discuté plus tard dans le paragraphe concernant la répartition tissulaire, les sous-unités β ne présentent pas une distribution tissulaire aussi claire que dans le cas de la sous-unité $\alpha 1$. En effet, toutes les isoformes $\beta 1$ sont exprimées au niveau du cardiaque chez l'homme alors que chacune d'entre elle semblait se trouver dans un tissu bien précis. Les travaux de Powers et coll. (1992) ont permis de justifier la classification en termes d'arrangement des exons (fig. 11) :

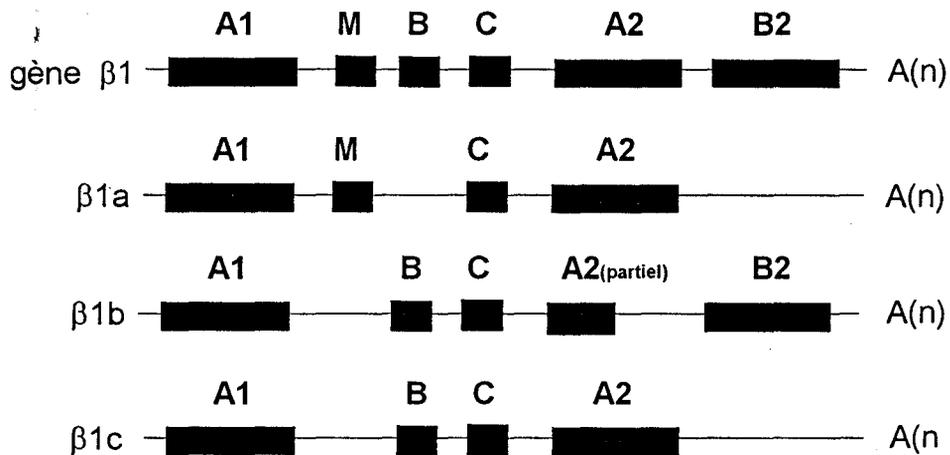


Fig. 11 : Organisation schématique de l'épissage alternatif aboutissant à l'expression des sous-unités $\beta 1a$, $\beta 1b$ et $\beta 1c$

2) Le gène $\beta 2$

Lors d'un criblage de banque avec une sonde de muscle squelettique de lapin, les clones correspondants aux produits du gène $\beta 1$ donnent un très fort signal en autoradiographie. Cependant, l'on peut trouver un certain nombre de clones qui sont manifestement positifs en dépit du faible signal qu'ils donnent. C'est en s'intéressant à ceux-ci lors du criblage d'une banque de cerveau de rat que Peres-Reyez et coll. (1992) isolèrent un produit d'un gène différent de $\beta 1$. Appelé $\beta 2$, cet ADN complémentaire code pour une protéine de 604 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 68,191 kDa (fig. 12).

```

M Q C C G L V H R R R V R V S Y G S A D S Y T S R P S D S D V S L E E D R E A V R R E A E R Q A Q A L E K A K T K P V A F A V R T N V R Y S A A Q E D D V P V P G M A I S F E A K D F L H V K E K F N
100
N D W I G R L V K E G C E I G F I P S P V K L E N M R L Q H E Q R A K Q K F Y S S K S G G N S S S L G D I V P S R R K S T P P S A I D I D A T G L D A E E N D I P A N H R S P K P S A N S V T S
200
P H S K E K R M P F F K T E H T P P Y D V V P S M R P V L V G P S L K G Y E V T D M A Q K A L F D F L K H R F E G R I S I T R V T A D I S L A K R S V L N N P S K H A I T T E R S N T R S S L A E V Q
300
S E I E R I F E L A R T L Q L V L D A D T I N H P A Q L S K T S L A P I I V Y K I S S P K V L Q R L I K S R G K S Q A K H L N V Q M V A A D K L A Q C P P O E S F D V I L D E N Q L E D A C E H L A
400
D Y L E A Y W K A T H P P S S N L P N L L S R T L A T S T L P L S P T L A S N S Q G S Q G D Q R T D R S A P R S A S Q A E E P C L E P V K K S Q H R S S A T H Q N H R S G T G R G L S R Q E T F D
500
S E T Q E S R D S A Y V E P K E D Y S H E H V D R Y V P H R E H N H R E E S H S S N G H R H R E P R H R T R D M G R D Q H N E C S K Q R S R H K S K D R Y C D K E G E V I S K R R S E A G E W N R D V
600
Y I R Q 604

```

Fig. 12 : séquence peptidique de la sous-unité $\beta 2$ de cerveau de rat

La plus grande homologie entre $\beta 1a$ et $\beta 2$ se situe dans la partie centrale (76%; résidus 17 à 443; voir fig. 13). Les parties amino et carboxy terminales sont globalement assez éloignées.

```

M V Q K T S M S R G P Y P P S Q E I P M E V F D P S P Q G K Y S K R K G R F K R S D G S T S S D T T S N S F V R Q G S A E S Y T S R P S D S D V S L E E D R E A L R K E A E R Q A L A Q L E K A K T R A B S K 98
M Q C C G L V H R R R V R V S Y G S A D S Y T S R P S D S D V S L E E D R E A V R R E A E R Q A Q A L E K A K T
B2 57
K P V A F A V R T N V G Y N P S P G D E V P V E S V A I T F E P K D F L H I K E K Y N N D W I G R L V K E G C E V G F I P S P V K L D S L R L L Q E Q K I R Q S A L S S S K S G D W S S S L G D V R A B S K 197
K P V A F A V R T N V R Y S A A Q E D D V P V P G M A I S F E A K D F L H V K E K F N N D W I G R L V K E G C E I G F I P S P V K L E N M R L Q H E Q R A K Q K F Y S S K S G G N S S S L G D I
B2 156
V T G T R R P T P P A S G N E M T N L A F E L P L D L E E D A E L G E Q S G S A K T S V S S V I T P P P H G I R I F F F K K T E H V P P Y D V V P S M R P I I L V G S S L K G Y E R A B S K 288
V P S R R K S T P P S A I D I D A T G L D A E E N D I P A N H R S P K P S A N S V T S P H S K E K R M P F F K T E H T P P Y D V V P S M R P V L V G P S L K G Y E
B2 240
V T D M A Q K A L F D F L K H R F D G R I S I T R V T A D I S L A K R S V L N N P S K H I I E R S N T R S S L A E V Q S E I E R I F E L A R T L Q L V A L D A D T I N H P A Q L S K T S L A P I I V R A B S K 387
V T D M A Q K A L F D F L K H R F E G R I S I T R V T A D I S L A K R S V L N N P S K H A I I E R S N T R S S L A E V Q S E I E R I F E L A R T L Q L V L D A D T I N H P A Q L S K T S L A P I I V
B2 339
Y I K I T S P K V L Q R L I K S R G K S Q S K H L N V Q I A A S E K L A Q C P P E M F D I I L D E N Q L E D A C E H L A E Y L E A Y W K A T H P P S S T P P N P L N R M A T A A L A R A B S K 479
Y V K I S S P K V L Q R L I K S R G K S Q A K H L N V Q M V A A D K L A Q C P P O E S F D V I L D E N Q L E D A C E H L A D Y L E A Y W K A T H P P S S N L P N L L S R T L A T S T L P L S P T L A
B2 438
A S P A P V S N L Q V V L T S L R N L S F W G G L E T S Q R G G A V P Q O O E H A M R A B S K 524
S N S Q G S Q G D Q R T D R S A P R S A S Q A E E P C L E P V K K S Q H R S S A T H Q N H R S G T G R G L S R Q E T F D S E T Q E S R B2 507
D S A Y V E P K E D Y S H E H V D R Y V P H R E H N H R E E S H S S N G H R H R E P R H R T R D M G R D Q H N E C S K Q R S R H K S K D R Y C D K E G E V I S K R R S E A G E W N R D V Y I R Q R A B S K 524
B2 604

```

Fig. 13 : Comparaison entre les séquences peptidiques de $\beta 1a$ (RABSK) et $\beta 2$ (B2)

Comme dans le cas des $\beta 1$, l'analyse d'hydropathie (voir fig. 14) ne montre ni la présence de domaines typiquement transmembranaires ni de séquence signal au niveau amino terminal. Par contre, le carboxy terminus de $\beta 2$ est beaucoup plus hydrophile que celui des $\beta 1$.

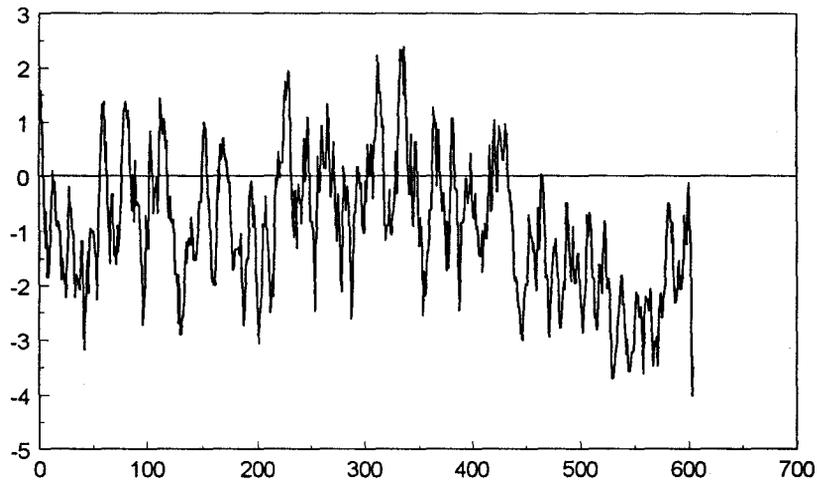


Fig. 14 : diagramme d'hydropathie de la sous-unité $\beta 2$ de cerveau de rat

L'analyse prédictive de la structure secondaire par la méthode de Chou et Fasman montre environ 50% de contenu en hélice α . Trois des quatre domaines en hélice α notés par Ruth et coll. (1989) sont relativement bien conservés dans $\beta 2$ (nommés I, III et IV, le II n'étant plus présent; fig. 12) ainsi que les motifs répétés de huit acides aminés.

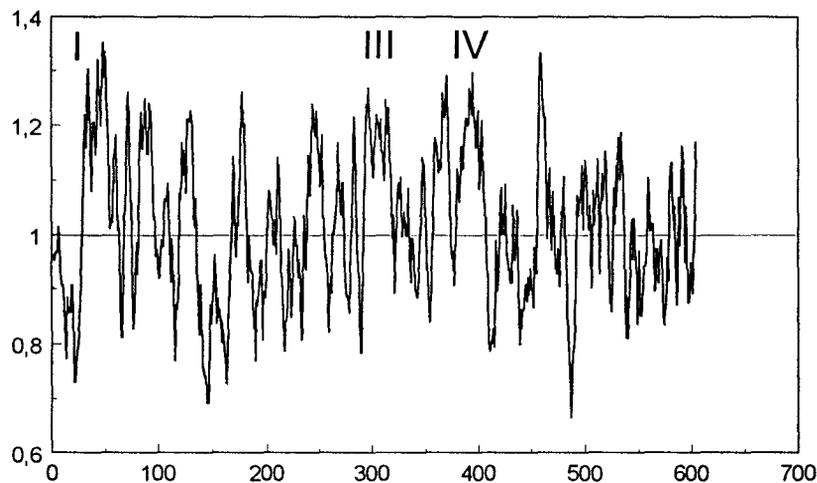


Fig. 15 : analyse de la composition en hélice α de la sous-unité $\beta 2$ de cerveau de rat; l'axe des abscisse désigne les amino-acides entrant dans la composition de la protéine; l'axe des ordonnées correspond à l'index d'hélicité moyenné sur six résidus consécutifs.

Du point de vue des sites potentiels de phosphorylation par la PKA, seule la thréonine 205 de la sous-unité β de muscle squelettique de lapin est conservée sur $\beta 2$. Le site non consensus mais phosphorylé in vitro (Ser182) n'est pas conservé. On notera cependant la présence d'un

nouveau site au niveau C-terminal (fig. 16). Par ailleurs, $\beta 2$ possède dix sites consensus pour la PKC et dix autres sites potentiels pour la caseine kinase II.

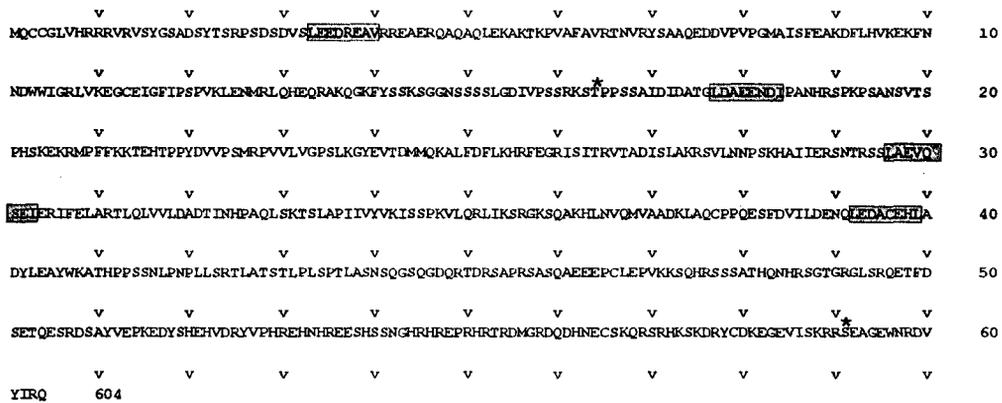


Fig. 16 : Sites de phosphorylation par la PKA et motifs conservés de la sous-unité $\beta 2$ de cerveau de rat; les sites potentiels de phosphorylation de la sous-unité $\beta 2$ sont représentés par (*); les boites représentent les motifs de huit acides aminés conservés entre $\beta 1$ et $\beta 2$

Simultanément aux travaux de Perez-Reyes et coll. (1992), le groupe de F. Hofmann a isolé deux clones (CaB2a et CaB2b) d'une banque de coeur de lapin. Ces deux clones sont presque totalement identiques à l'isoforme $\beta 2$ de cerveau de rat. Les différences consistent en deux amino-termini distinct entre eux et distinct également de $\beta 2$ (fig. 17 et 18). Ces différences sont toutefois très faibles comme le montre la comparaison ci-dessous entre $\beta 2$ et $\beta 2a$:

MQCC	GLVHRRRVVSYGSADSYTSRPSDSVLSLEEDREAVRREAERQAQAQLEKAKTKPVAVRNTVRY	B2	92
MDRHLAAPHHTQGLVLE	GSADSYTSRPSDSVLSLEEDREAVRREAERQAQAQLEKAKTKPVAVRNTVRY	B2A	93
LHVKEKFNNDWVIGRLVKEGCEIGFIPSEVKLENMRLQHEQRAKQKIFYSSKSGGNSSSSLGDIVPSSRKSTPPSSAIDIDATGLDAEENDIPANHRSPK		B2	192
LHVKEKFNNDWVIGRLVKEGCEIGFIPSEVKLENMRLQHEQRAKQKIFYSSKSGGNSSSSLGDIVPSSRKSTPPSSAIDIDATGLDAEENDIPANHRSPK		B2A	193
PSANSVTSPHSKEKRMPPFFKTEHTPPYDVVPSMRPVVLVGPVSLKGYEVTDMQKALFDLKHREGRISITRVTADISLAKRSVLANPDKHAIERSMT		B2	292
PSANSVTSPHSKEKRMPPFFKTEHTPPYDVVPSMRPVVLVGPVSLKGYEVTDMQKALFDLKHREGRISITRVTADISLAKRSVLANPDKHAIERSMT		B2A	293
RSLSLAEVQSEIERIFELARTLQLVLDADTINHFAQLSRTSLAPIIVYVKISSPKVLQRLIKSRGKSQAKHLNVQMVAAADKLAQCPPELFDVILDENQ		B2	391
RSLSLAEVQSEIERIFELARTLQLVLDADTINHFAQLSRTSLAPIVVYVKISSPKVLQRLIKSRGKSQAKHLNVQMVAAADKLAQCPPELFDVILDENQ		B2A	391
LEDACEHLADYLEAYWKATHPPSSNLFNPLLSRTLATSTLPLSPTLASNSQSGDQRTDRSAPRSASQAEPPCLEPVKKSQHRSSSATHQNHRSMT		B2	489
LEDACEHLADYLEAYWKATHPPSSNLFNPLLSRTLATLALVPSPTLASNSQSGDQRTDRSAPARSASQAEPPCLEPVKKSQHRSSSATHQNHRSMT		B2A	491
GRGLSRQETFDSETQESRD SAIVEPKEDYSHEHVDVRYVPHREHNHREESHSSNGHRHREPRHRTDMGRDQDHNECSKQSRHSKDRYCDKQGEVLSK		B2	588
GRGLSRQETFDSETQESRD SAIVEPKEDYSHEHVDHYAPHRDHNRDETHRSSDHRHRETRHRSRDMOREQDHNECNQSRHSKDRYCDKQGEVLSK		B2A	590
RRSEAGEWNRDVYIRQ		B2	604
KRNEAGEWNRDVYIRQ		B2A	606

Fig. 17 : comparaison entre les séquences peptidiques de $\beta 2$ et de CaB2a (B2A)

La comparaison des séquences de CaB2a et CaB2b montre une totale homologie à l'exception d'une trentaine d'amino-acides situés au niveau N-terminal (fig. 18A).

A	M	LDRHLAAPHHT	QGLVLEGSADSYTSRPSDSVLSLEEDREAVRREAERQAQAQLEKAKTKPVAVRNTVRY	B2A	69	
	MNQASGLDLLKI	SYGKARRKRNPKGSDGTSSTDTTNSFVRQ	SADSYTSRPSDSVLSLEEDREAVRREAERQAQAQLEKAKTKPVAVRNTVRY	B2B	95	
B	MOCC	GLVHRRRVVSY	GS	ADSYTSRPSDSVLSLEEDREAVRREAERQAQAQLEKAKTKPVAVRNTVRY	B2	70
	MNQASGLDLLKI	SYGKARRKRNPKGSDGTSSTDTTNSFVRQ	GSADSYTSRPSDSVLSLEEDREAVRREAERQAQAQLEKAKTKPVAVRNTVRY	B2B	97	

Fig. 18 : comparaison des divers amino-termini : A : CaB2a versus CaB2b; B : $\beta 2$ versus CaB2b.

Le point sur le gène $\beta 2$

A ce jour, rien n'est connu sur l'arrangement introns/exons du gène $\beta 2$. Des mécanismes d'épissage différentiels sont supposés chez le lapin mais ils ne sont pas clairement démontrés. De plus, il est important de noter que chez l'homme, il n'a pas été relevé de sous unités $\beta 2$. Cependant ce manuscrit est le premier à rapporter une importante homologie entre $\beta 2$ et un autre type de sous-unité β (MysB) dont nous traiterons un peu plus tard (voir le gène MysB).

3) Le gène $\beta 3$

En même temps que CaB2, le groupe de F. Hofmann a rapporté l'existence d'un troisième gène codant pour une sous-unité β : le gène $\beta 3$ (Hullin et coll., 1992). Un ADN complémentaire nommé CaB3 a été isolé à partir d'une banque de coeur de lapin. Cet ADN complémentaire code pour 477 acides aminés donnant naissance à une protéine dont le poids moléculaire calculé est de 53,854 kDa.

MYKDSYVFGFKDSEAGSADSYTSRPSLSDSVSLAEDRESARREVESQAQQQLERAKHKVAFVAVRTNVSYCGVLDEECFVQSGSINFEAKDFLHIKEKYS	100
NDWWTGRVKEGGDLAFIPSPORLESIRLKEQKARRSGNPSLSDIGNRRSPPFSLAKQKQAEHVPPYDVVPSMRPVVIVGFSIKGYEVTIMAKAL	200
FDLKHFRDGRISITRVTADLSLAKRSVLANPGRKRTIISRSARSSIAEVQSEIERIFELAKSLQLVVLADDTINHPAQLAKTSLAPITVYVKVSSPKVL	300
ORLIRSRGKSQMKHLTVQMMAYDKLVQCPPEFDVILDENQLEDACEHLAEYLEVYWRATHHPAPGPGLLGPPSAIPGLQSQOLLGERGEEHSPLERDSL	400
MPRDEAWTGSQRSSRHLEEDYADAYQDLYQPHRQHTSGLPSANGHDPQDRLLAQDSKHNENDRNWQRNRPWPKDSY	477

Fig. 19 : séquence peptidique de la sous-unité $\beta 3$ de coeur de lapin

Comme nous l'avons vu pour la sous-unité $\beta 2$, il existe une forte homologie entre $\beta 3$ et $\beta 1a$ dans le domaine central qui apparaît de plus en plus comme l'élément déterminant l'appartenance d'une molécule à la famille des sous-unités β .

MYKDSYVFGFKDSEAGSADSYTSRPSLSDSVSLAEDRESARREVESQAQQQLERAKHKVAFVAVRTNVSYCGVLDEECFVQSGSINFEAKDFLHIKEKYS	RABSK	99
NDWWTGRVKEGGDLAFIPSPORLESIRLKEQKARRSGNPSLSDIGNRRSPPFSLAKQKQAEHVPPYDVVPSMRPVVIVGFSIKGYEVTIMAKAL
FDLKHFRDGRISITRVTADLSLAKRSVLANPGRKRTIISRSARSSIAEVQSEIERIFELAKSLQLVVLADDTINHPAQLAKTSLAPITVYVKVSSPKVL
ORLIRSRGKSQMKHLTVQMMAYDKLVQCPPEFDVILDENQLEDACEHLAEYLEVYWRATHHPAPGPGLLGPPSAIPGLQSQOLLGERGEEHSPLERDSL
MPRDEAWTGSQRSSRHLEEDYADAYQDLYQPHRQHTSGLPSANGHDPQDRLLAQDSKHNENDRNWQRNRPWPKDSY
MYEDSYVPGFEDSEA	GSADSYTSRPSLSDSVSLAEDRESARREVESQAQQQLERAKHK	RABB3 58
FVAFVAVRTNVSYCGVLDEECFVQSGSINFEAKDFLHIKEKYSNDWWTGRVKEGGDLAFIPSPQ	RLESTRLKQEQKARRSGNPSLSL	RABSK 193
LQDVVTGTRRPTTPASQNMENLAFLEPLDLEDEAEELGEQSGSAKTSVSVITPPPHGTRIPPFKTEHVPPYDVVPSMRPITIVGFSIKGYEVTIMAK
DIGNRRSPPFSLAKQKQQA	EHVPPYDVVPSMRPVVIVGFSIKGYEVTIMAK	RABB3 196
OKALFDLKHFRDGRISITRVTADLSLAKRSVLANPGRKRTIISRSARSSIAEVQSEIERIFELAKSLQLVVLADDTINHPAQLAKTSLAPITVYVKVSSPKVL
OKALFDLKHFRDGRISITRVTADLSLAKRSVLANPGRKRTIISRSARSSIAEVQSEIERIFELAKSLQLVVLADDTINHPAQLAKTSLAPITVYVKVSSPKVL
SPKVLORLIRSRGKSQMKHLTVQMMAYDKLVQCPPEFDVILDENQLEDACEHLAEYLEVYWRATHHPAPGPGLLGPPSAIPGLQSQOLLGERGEEH
SPKVLORLIRSRGKSQMKHLTVQMMAYDKLVQCPPEFDVILDENQLEDACEHLAEYLEVYWRATHHPAPGPGLLGPPSAIPGLQSQOLLGERGEEH
ASPAPVSNLQVQVLTSLRRNLSFVGGLLET	SQRGGGAV	RABSK 524
SP	LERDSLMPDEAWTGSQRSSRHLEEDYADAYQDLYQPHRQHTSGLPSANGHDPQDRLLAQDSKHNENDRNWQRNRPWPKDSY	RABB3 468
		RABSK 524
		RABB3 477

Fig. 20 : comparaison entre les séquences peptidiques des sous-unités β 1a (RATSK) et β 3 (RABB3)

Juste avant le domaine conservé dans toutes les sous-unités β , se situe un domaine uniquement présent sur β 1a et qui est soit remplacé par un autre domaine comme dans le cas de β 2, soit absent comme dans les cas de β 1b, β 1c et maintenant β 3. La figure 21 montre la comparaison entre β 1b et β 3 au niveau amino-terminal et médian : l'on s'aperçoit de l'importante conservation qui existe chez ces protéines et notamment en ce qui concerne les exons B et C du gène β 1.



Fig. 21 : comparaison entre les extrémités amino-terminales des sous-unité b1b (RATB1B) et b3 (RABB3)

Une analyse de la séquence en amino-acides pour l'hydropathie locale montre l'absence de domaines transmembranaires comme dans le cas des autres sous-unités β (fig. 22). Deux sur quatre des domaines en hélice α et deux des motifs de 8 amino acides mis en évidence par Ruth et coll. (1989) sont conservés (fig. 23).

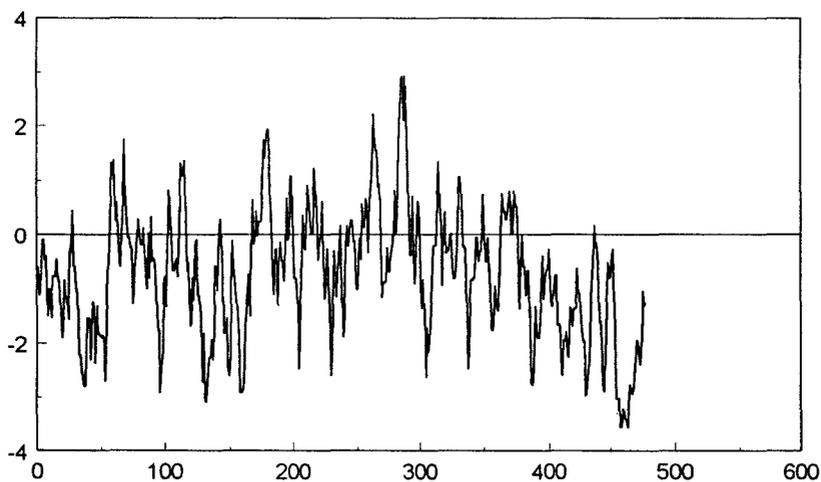


Fig. 22 : diagramme d'hydropathie de la sous-unité β 3 de coeur de lapin

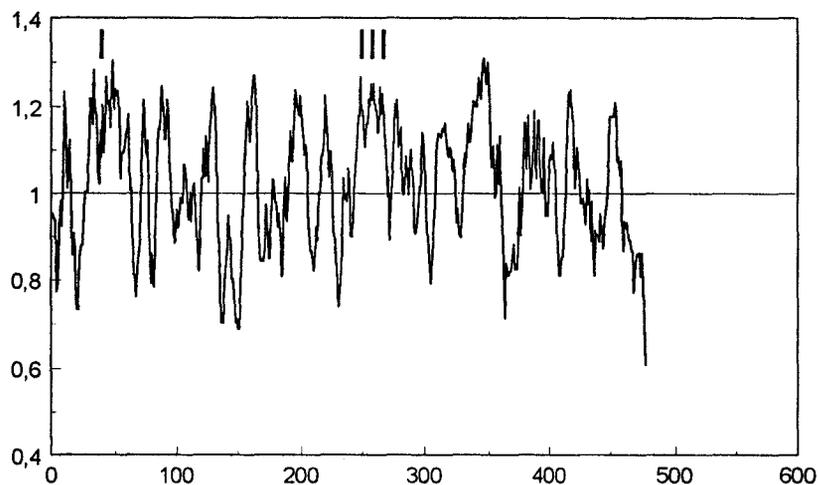


Fig. 23 : analyse de la composition en hélice α de la sous-unité $\beta 3$ de coeur de lapin; l'axe des abscisse désigne les amino-acides entrant dans la composition de la protéine; l'axe des ordonnées correspond à l'index d'hélicité moyenné sur six résidus consécutifs.

Il est important également de noter que cette sous-unité β ne possède pas de sites de phosphorylation potentiels par la PKA. Cependant de nombreux sites consensus pour la PKC et la caséine kinase II sont présents.

Des ADN complémentaires codant pour des protéines identiques appartenant à la famille des sous-unités $\beta 3$ ont été retrouvés dans le cerveau de rat (Castellano et coll., 1993) et chez l'humain (Collin et coll., 1994).

Le point sur le gène $\beta 3$

Les protéines $\beta 3$ de lapin, de rat et humaines sont strictement identiques (homologie supérieure à 96%). Aucun variant pouvant dériver de phénomènes d'épissage alternatif n'a été isolé à ce jour. Par ailleurs aucun élément concernant la structure génique de $\beta 3$ n'est disponible.

4) Le gène $\beta 4$

Après amplification par PCR en utilisant des oligonucléotides dégénérés correspondant aux parties conservées des sous-unité β , Castellano et coll. (1993b) ont pu isoler un nouveau type de sous-unité β neuronale appelée $\beta 4$. Cet ADN complémentaire code pour une protéine de 519 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 57,972 kDa (fig. 24).

MSSSYAKNGAADGPHSPSSQVARGTTTRRSLKRS	SDGSTTSTSFILRQGSADSYTSRPS	SDVLEEDREAIRQEREQQAIIQLERAKSKPVAFVKTIV	100
SYCGALDEDVFPVPTAISFDKDFLHIKEKYNNDWIGRLVKEGCEIGFIPSPLRLENIRIQEQKRGPFHGKSSQNSSSSLGEMVSGTFRATPTTTAK			200
QKQKVTZHIPFDVVPBMRPVVLVGPSPKGYEVDMMQKALFDLKHFRDGRISITRVTDISLAKRSVLNPNPSKRAIIERENTRSSLGEVQSEIERIFE			300
LARSLQVLVDADTINHFAQLIKTSLAPIIVHVKVS	SPKVLORLIKSRGKSQSKHLNVQLVAADKLAQCPPEMFDVILDENQLEDACEHLGEYLEAVWRA		400
ZHTSSPTMTPLLGRNVGSTATSPYPTAISGLQSQMRHSHNSTENSPIERRSLMTSDENYHNERARKSRNRLSSSQHSRDHYLVEEDYDPSYQDTYK			500
PHNRGSPGGCSDSRHRL			519

Fig. 24 : séquence peptidique de la sous-unité β_4 de cerveau de rat

Cette protéine présente une très haute homologie avec les autres isoformes et ce tout particulièrement au niveau de son domaine central, comme le montre la comparaison avec β_1a (fig. 25). Cependant, la comparaison des séquences nucléiques disponibles chez le rat établit clairement que β_4 est le produit d'un gène nouveau et inconnu à ce jour.

MVQKTSMSR	GPYFPQEIPEMEVDFPSPQSKYSKRKGRFKRSDGSTSSDITTSNSFV	ROGSAESYTSRPS	SDVLEEDREAIRKKEAERQAL	RABSK	90
MSSSYAKNGAADGPHSPSSQVARGTTTRRSL	KR	SDGS	TTSTFILRQGSADSYTSRPS	SDVLEEDREAI	ROER
				B4AA	76
A	OLEKAKTKPVAFVAVRTNVGYNPSPGDE	VPVEGVAITFEPKDFLHIKEKYNNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSLRLL	QEQLRQS	RABSK	179
EQQAIIQLERAKSKPVAFVKTIVSYCGAL	DEDVFPVPTAISFDKDFLHIKEKYNNDWIGRLVKEGCEIGFIPSP	LRLENIRIQEQKRGF		B4AA	170
ALSSSKSGNSSSSSSLGVDVTGTRRPTFPASGNEMTNLAFELDLEDEAEI	SEQ	SGS	AKTSVSSVTIPFPFGRIPIFYKKTENVYVDV	RABSK	270
HGT	KSSGNSSSSL		GEMVSGTFRATPTTTAKQKQK	VT	EHIPPYDV
				B4AA	214
VPSMRPFIILVGPSPKGYEVDMMQKALFDLKHFRDGRISITRVTDISLAKRSVLNPNPSKH	IIERSNTRSS	LAEVQSEIERIFELARTLQVVALDAD		RABSK	369
VPSMRPVVLVGPSPKGYEVDMMQKALFDLKHFRDGRISITRVTDISLAKRSVLNPNPSKRAII	ERSNTRSS	LAEVQSEIERIFELARSLQVVLVDAD		B4AA	313
TINHFAQLIKTSLAPIIVYIKITSPKVLORLIKSRGKSQSKHLNVQI	AASEKLAQCPPEMFDIILDENQLEDACEHLAEYLEAVKATHPPSS	TPPNE		RABSK	467
TINHFAQLIKTSLAPIIVHVKVS	SPKVLORLIKSRGKSQSKHLNVQLVAAD	KLAQCPPEMFDVILDENQLEDACEHLGEYLEAVWRATH	SSSTMTMP	B4AA	411
LINRTMA	TAALAASPAPVSN	LQVQVLTSL	RRN	LSFWGGLET	SO
LLGRNVGSTAT	SPYPTAISGLQSQMRHSHNSTENSPIERRSLMTSDENYHNERARKSRNRLSS	SQHSRDHYLVEEDYDPSYQDTYKPHR		RABSK	510
				B4AA	503
RGCGAVPQQQEHAM				RABSK	524
NRGSPGGCSDSRHRL				B4AA	519

Fig. 25 : comparaison des séquences protéiques de β_1a (RABSK) et β_4 (B4AA)

La fig. 25 montre l'absence d'un motif octapeptidique au sein de la structure de β_4 . Ceci permet donc de rattacher β_4 à la famille des sous-unités β possédant une délétion d'une cinquantaine d'acides-amino dans le domaine conservé (cf. β_1b/c et β_3 ; voir fig. 26 et 27). Les

trois motifs octapeptidiques conservés le sont presque totalement à l'exception de changements d'acides aminés tout à fait conservatifs tels L/I ou A/G.

			RATBB	90
MVKKQMSR	GYYPFSQEIPEVTFDPSQGGKYSKRKGRFRSDGTSDDTTNSFV	RQGSAESYTSRPSDSDVSL	LEEDREALRKEALRQAL	
..
MSSSYAKNGAADGPHSPSSQVARGTTTRRSRL	KR	SDGS	TTSTSEILRQGSADSYSRPSDSDVSL	LEEDREALRQER
			B4AA	76
			RATBB	179
A	OLEKAKTKPVAVAVRTNVGYNPSPGDE	VPVQGVAITFEPKDFLHIKEKYNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSLRL	OEQTIRQN	
..
EQQAATQLERAKSKPVAVAVKTNVSYCGAL	DEDVVPSTAI	SFDAKDFLHIKEKYNDWIGRLVKEGCEIGFIPSP	LRLENTRIQEQRGRF	
			B4AA	170
			RATBB	279
RLSSSKSGDNSSSLGDVVVTGTRRTPPASAKQKQKSTEHVPPYDVVPSMRPIILVGP	SLKGYEVTMMQKALDFL	KGRFDGRISITRV	TADISLAKRS	
..
HGG	KSSGNSSSSLGDMVGGTFRATPTTAKQKQKVT	HEIPPYDVVPSMRPVVLVGP	SLKGYEVTMMQKALDFL	KGRFDGRISITRV
			B4AA	269
			RATBB	377
VLNPSKH	ILERSNTRSSLAEVQSE	ERIFELARTLQVALDADTINH	PAQLSKTSLAPITVYIKITSPKVLQRLIKSRGKSQSKHLNVQI	AASEKL
..
VLNPSKRAII	ERSNTRSSLGEVQSE	ERIFELARSLQVLWLDADTINH	PAQLIKTSLAPIIVHVKVSSPKVLQRLIKSRGKSQSKHLNVQI	VAADKL
			B4AA	366
			RATBB	476
AQCPPEMFDIILDENQLEDACEHLAEY	LEAYWKATHPPSRTPPENLNR	TMA	TAALAVSPAPVSNLQGGPYLVSGDQPLDRAT	GEHASVHEYPGELGQFP
..
AQCPPEMFDVILDENQLEDACEHLAEY	LEAYWRATHSSSTPMTPLCRNVG	TAL	SP	YPTAIS
			B4AA	430
			RATBB	552
GLYP	SNHPPG	RAGTLWALS	RQDTFADTFGSRNSVYTEPGD	SCVDMETDPSEGGPGDPAAGGTPPARQGSWEEEEE
..
GLQSRMRHSNHSTENSPIERRSLMTSDENYHNERAK	SRNRLSSSSQHSRDHYPLV			EE
			B4AA	489
			RATBB	597
DYEEMTDN	RNRGRNKARYCADGGGPFVLCRNKNELEGWQGVYIR			
..
DYEDSYQDTYKPHRNRGSP	GGCHDSRHRL			
			B4AA	519

Fig. 26 : comparaison des séquences peptidiques entre $\beta 1b$ (RATBB) et $\beta 4$ (B4AA)

La figure 26 démontre clairement que les deux premiers tiers de $\beta 1b$ et $\beta 4$ présentent des structures analogues. Du fait de l'existence de la délétion d'une partie de la région conservée, seul l'extrémité carboxy-terminale est réellement différente.

BU
FILE

MYDDSYVPGFEDSEA	GS	ADSYTSRPSLSDVSL	LEEDRESAR	REVESQAQQ	QLERAKHKPVA	B3AA	61
MSS SYAKNGAADGPHSPSSQVARGTTTTRRSIKRSDGTTSTSEFILRQCSADSYTSRPS		DSIDVSL	LEEDREAI	ROQRE	QQAATQLERAKSKPVA	B4AA	93
FAVKTINVSYCGVLDEDCPVQSGVNF	FEAKDFLHIKERY	SNDWII	GRLVKEGGDI	AFIPSPQRL	ESIRLKEQKARR	B3AA	155
FAVKTINVSYCGALDEIVVPSTAIS	FDAKDFLHIKERY	NNDWII	GRLVKEGCEI	GFIPSPRL	ENIRIQEQKRGRFHGKSSGN	B4AA	192
SL AKOKKQAEHVPYDVVPSMRPVV	LVGPSL	KGVEYV	DMOKALE	DFLKH	RFDGRISITRVTADISLAKRSV	B3AA	251
ATPTTAKQKQVTEHIPPYDVVPSMRPVV	LVGPSL	KGVEYV	DMOKALE	DFLKH	RFDGRISITRVTADISLAKRSV	B4AA	292
SEIERIFELAKSLQVVLADDT	INHPAQLAKTSLAP	IIVFKVSSPKVL	QRLIRSRGK	SQMKHLTVQ	MAYDKLVQCPPE	B3AA	351
SEIERIFELARSLQVVLADDT	INHPAQLIKTSLAP	IIVFKVSSPKVL	QRLIKSRGK	SQSKHLVQ	LVAAQKLAQCPPE	B4AA	392
YLEVYWRATHHPAPQGM	LGPPS	AIPGLQ	QQLGERGEEH	SPL	ERDSLMP	B3AA	425
YLEAVWRATHSSSTMTPLLGRNVG	STALSPYPTAISGL	QSQMR	HSNHSTENS	PIERRSLMTSDENY	HNERARKSRNRL	B4AA	484
EEDYADAYQDLYQPHRQHTS	GLFSANGHD	PQDRLLAQD	SEHDH	NDRNWQRN	RWPKDSY	B3AA	484
PLVEEDYPDSYQDTYKPH				RNRGSPGC	SHDSRHL	B4AA	519

Fig. 27 : comparaison des séquences peptidiques de $\beta 3$ (B3AA) et $\beta 4$ (B4AA)

La sous-unité $\beta 3$ comprend un carboxy-terminus plus court que celui de $\beta 1b$ et cela se traduit sur la fig. 27 par une plus grande homologie avec $\beta 4$. Ces deux sous-unités dont la répartition tissulaire est voisine (système nerveux central) sont donc vraiment très homologues.

La séquence de la sous-unité $\beta 4$ ne présente aucun site consensus pour la phosphorylation par la PKA. Par contre, elle possède 11 sites PKC et 8 sites caséine kinase II. Par ailleurs, toutes les propriétés de $\beta 4$ concernant son hydrophathie et sa structure secondaire sont globalement conservées comme l'attestent les diagrammes suivants (fig. 28 et 29).

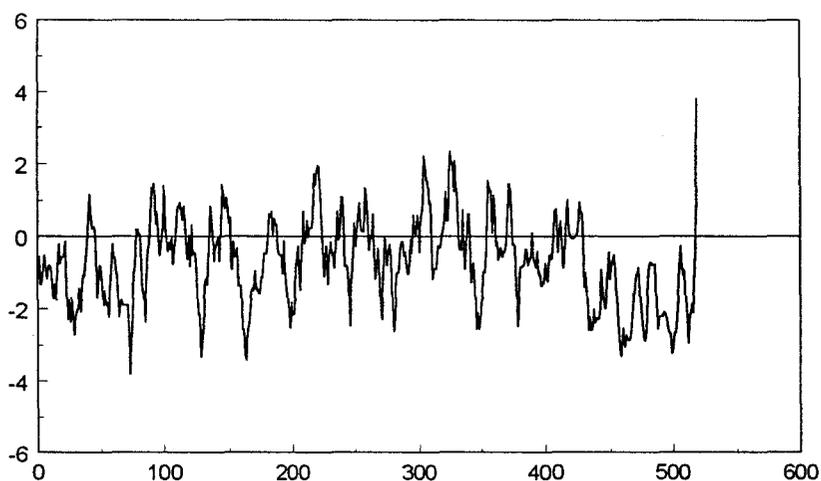


Fig. 28 : diagramme d'hydrophathie de la sous-unité $\beta 4$ de cerveau de rat

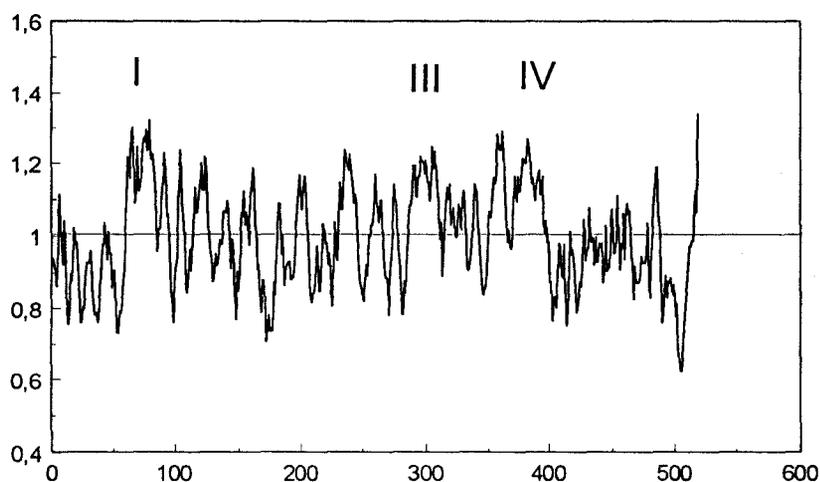


Fig. 26 : analyse de la composition en hélice α de la sous-unité β 4 de cerveau de rat par la méthode de Chou et Fasman; l'axe des abscisse désigne les amino-acides entrant dans la composition de la protéine; l'axe des ordonnées correspond à l'index d'hélicité moyenné sur six résidus consécutifs.

Le point sur le gène β 4

Comme dans le cas de β 3, aucun variant de β 4 n'a été mis en évidence à ce jour, il n'est donc pas possible de conclure sur d'éventuels épissages alternatifs pouvant s'opérer sur β 4. De plus cette sous-unité n'a été identifiée que dans une seule espèce animale : le rat; rien n'est connu quant à son expression chez d'autres espèces. Enfin, la structure du gène demeure également inconnue.

5) Le gène MysB

En utilisant des sera de patients atteints du syndrome de Lambert-Eaton, Rosenfeld et coll. (1993) ont criblé une banque de cerveau foetal humain. Ces auteurs ont ainsi isolé un ADN complémentaire codant pour une protéine très proche de la sous-unité β appelée MysB. L'ADN complémentaire de 3.5 kb présente une phase de lecture ouverte codant pour 567 acides aminés. A priori, cette protéine ne correspond à aucun produit des gènes précédemment décrits et semble donc provenir de l'expression d'un nouveau gène. La comparaison avec la séquence protéique de β 1a (fig. 30) montre clairement qu'il s'agit d'une sous-unité β : comme dans tous les cas, le domaine central est conservé à l'exception ici d'une insertion se rapprochant fortement de β 2 (fig. 31).

MVQKTSMSRGPYPFS	OEIPMEVDFPSQ	GKYSKRKRFRSDGTSDDTTSNSFVRQGSAEYSYTSRPSDSVLEED	RABSK	78
WVQRD MSKS	PPTAAAVAQEIOMELLENVAPAGALGAAQSTGKGARRKRIKSDGTSDDTTSNSFVRQGSADSTTSRPSDSVLEEDRLAVRR		MYSBAA	97
EALRKEAERQALAQ	LEKAKTKFAFAVAVRINVGYNPSPGDEVFVEGVAITFEPKDFLHIKEKYNNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSRLLEEQ		RABSK	174
EAL	AQAQAQLERARTKFAFAVAVRINVSAAHEDDVVPGMAISFEAKDFLMVKEKFNNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLENMRLQHEQ		MYSBAA	188
KLRQSAI	SSSKGDNSSSLGDVVTGTRRTPPASGNEMNLAFELEPLDLEFEAEI	GEQSG	SAKTSVSSVTTPPPHGTRI	PFFKKEH
RAKQCKTSS	KSGGNSSSSLGOIVPSSRKSTPPSSAIDIDATG	LD	AEENDIPANHRSPKPSAN	SVTS
			PHSKKRMPPFFKKEH	
			MYSBAA	271
VFPYDVVPSMRP	IILVGPSIKGYEVTIMMKALEDFLKHREDFGRISITRVTADISLAKRSVLNNSPKH	IIERSNTRSS	LAEVQSEIERIFELARTLQL	
TPPYDVVPSMRP	VVLVGPSIKGTIVTMMKALDFLKHREDFGRISITRVTADISLAKRSVLNNSPKH	IIERSNTRSS	LAEVQSLIERIFELARTLQL	
			MYSBAA	370
VALDADI	INHPAQLSKTSLAP	IIVYIKITSPKVLQRLIKSRGKSQSKHLNVQI	AASEKLAQCPPEMFDIILDEN	LEDACEHIAEYLEAYWKATHPSS
VVLDA	DIINHPAQLSKTSLAP	IIVTVRISSPKVLQRLIKSRGKSQAKHLNVQMVAA	KLAQLPPELFDVILDEN	LEDACEHIAEYLEAYWKATHPSS
				MYSBAA
				469
TPPNPLNRTMATA		AL	AASPAPVSNLQVQLTSL	RRNL
SLPNPLLSRTLAT	SSCPLSPTLASNSQGSQGDQRTDRSAPIRSASKLKGVLVWQSRNPSTALPPPHITTAVGQVAASPGKRH			LTRKPRV
				MYSBAA
				562
SFWGGLET	SQRGGGAVPQQQEHAM			RABSK
				524
	ETLEPT			MYSBAA
				567

Fig. 30 : comparaison des séquences peptidiques de β 1a (RABSK) et MysB (MYSBAA)

Bien que des différences subsistent, la comparaison ci-dessous (fig. 31) tend à démontrer que MysB est plus ou moins liée à la famille des β 2 :

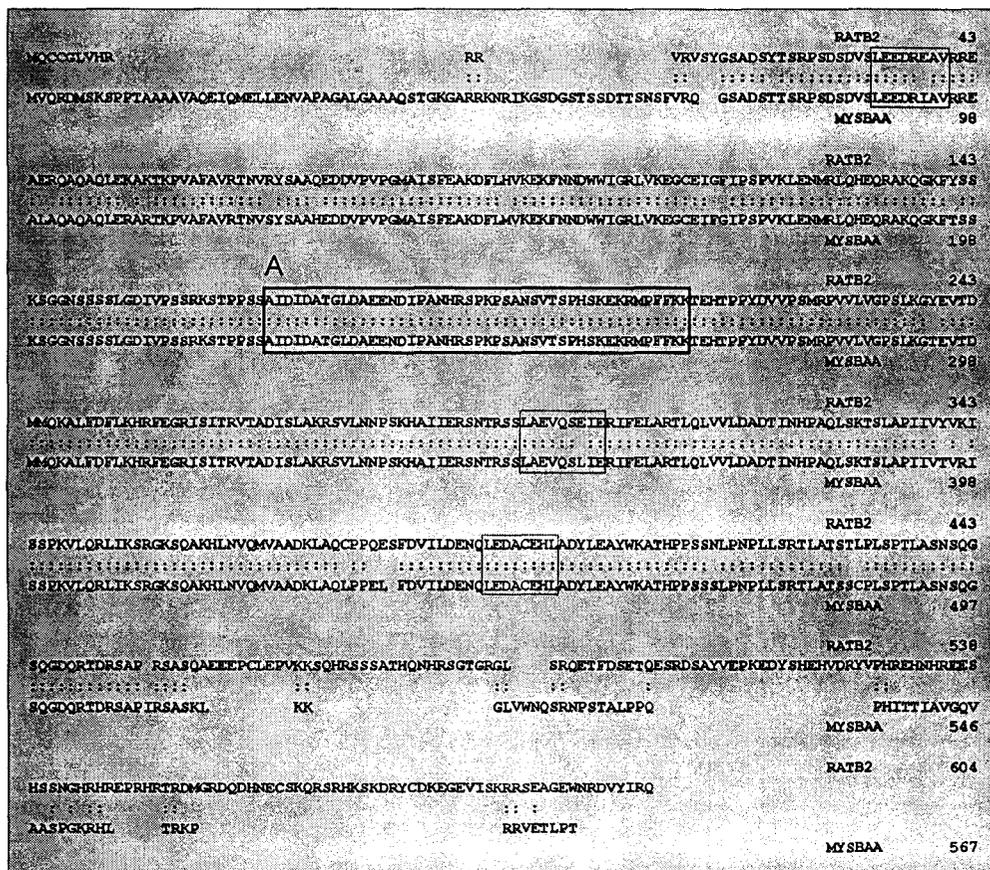


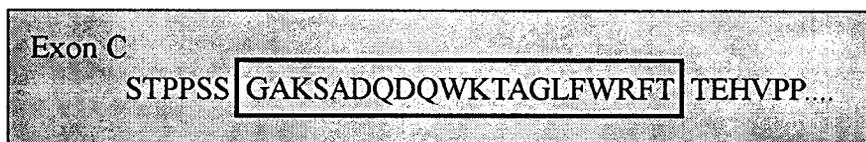
Fig. 31 : comparaison des séquences peptidiques de $\beta 2$ (RATB2) et MysB (MYSBAA)

Cependant les extrémités amino- et carboxy- terminales sont différentes et de plus, il existe deux variants de MysB qui semblent provenir de mécanismes d'épissage différentiel. Ces épissages ont tous lieu au même endroit de la molécule, c'est à dire au niveau du domaine central (boite A, fig. 31), là où précisément on trouve les variations entre les différents produits du gène $\beta 1$ (Différence entre $\beta 1a$ et $\beta 1c$). Trois exons putatifs (car pouvant résulter de la fusion de plusieurs petits exons comme dans le cas de $\beta 1$) sont donc mentionnés :

- l'exon A qui est présenté sur la figure 31 et se rapproche beaucoup de $\beta 2$ (voir fig. 31, encart marqué A);
- l'exon B qui lui correspond à l'insertion commune à $\beta 1b/c$, $\beta 3$ et $\beta 4$ (voir tableau ci-dessous) :

MysB	STPPSS	AKQKQKS	TEHVPP...
$\beta 1b/1c$	RTPPAS	AKQKQKS	TEHVPP...
$\beta 3$	RPPPSL	AKQKQKS	AEHVPP...
$\beta 4$	ATPTTT	AKQKQKV	TEHIPP...

- l'exon C qui n'a été retrouvé nulle part ailleurs.



La sous-unité MysB ne comprend aucun site consensus pour la phosphorylation par la PKA dans sa séquence. Par contre, on peut dénombrer 10 sites pour la PKC et 9 pour la caséine kinase II.

Pour ce qui concerne maintenant les propriétés biophysiques de MysB, aucun grand changement ne peut être observé par rapport aux autres sous-unités déjà décrites comment le montrent les deux diagrammes suivants : (fig. 32 et 33).

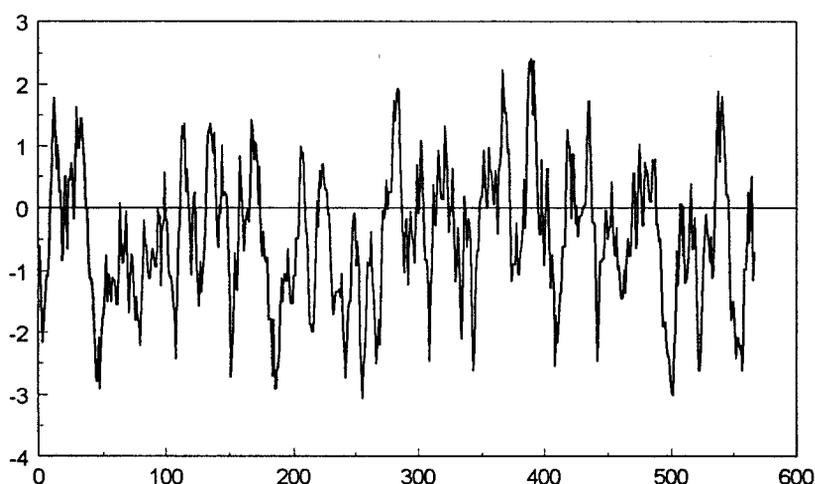


fig. 32 : diagramme d'hydrophobicité de la sous unité β MysB

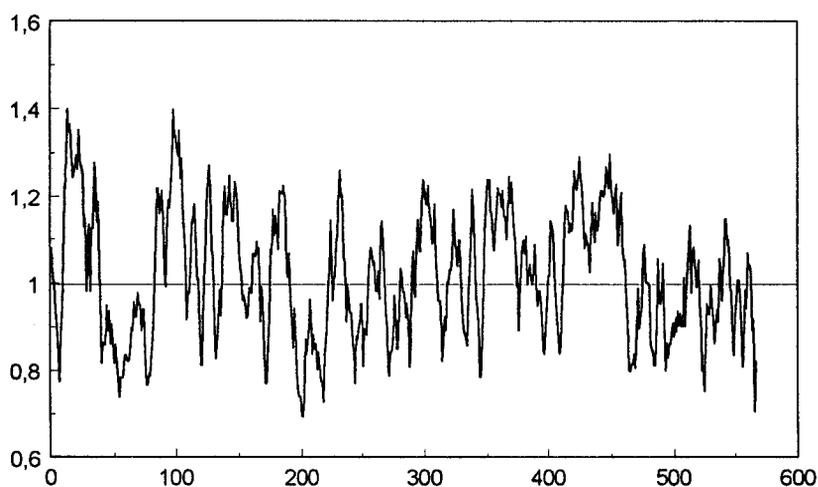


Fig. 33 : analyse de la composition en hélice α de la sous-unité MysB de cerveau foetal humain par la méthode de Chou et Fasman; l'axe des abscisse désigne les amino-acides entrant dans la composition de la protéine; l'axe des ordonnées correspond à l'index d'hélicité moyenné sur six résidus consécutifs.

Le point sur le gène MysB

Concernant le gène MysB, les hypothèses suivantes peuvent être posées :

i) MysB est la forme humaine de $\beta 2$. En effet, il existe chez le lapin des variants de $\beta 2$ (CaB2a et b; Hullin et coll., 1992), et les épissages ont lieu au niveau amino-terminal. Cependant, aucun de ses amino-termini ne correspond à MysB. La ressemblance entre MysB et $\beta 2$ est évidente mais aucune des $\beta 2$ ne comprend le carboxy terminus de MysB. Il serait donc possible d'imaginer pour le gène MysB une structure voisine de celle du gène $\beta 1$ qui pourrait générer des épissages différentiels à trois endroits différents : au niveaux amino- et carboxy terminaux ainsi que dans la région centrale. Les produits du gène MysB ont été cloné chez le fœtus humain. Aucune expérience visant à rechercher l'expression de ces produits à d'autres stades n'a été réalisée jusqu'alors.

ii) MysB est bel et bien le produit d'un gène différent de $\beta 2$. Aucune trace de $\beta 2$ n'a jusqu'alors été retrouvée chez l'homme, il est donc fort possible que les formes "rat" ou "lapin" de $\beta 2$ ne soient pas présentes. Ce gène pourrait donc être le correspondant humain de $\beta 2$ en présentant tout de même ses propres particularités.

B) Clonage d'ADN complémentaire codant pour des sous-unités β ; quelles applications?

L'obtention de sondes nucléiques par le biais du clonage moléculaire permet de déterminer l'origine tissulaire du produit cloné et ce, de différentes manières :

a) Une banque d'ADN complémentaire est toujours construite à partir d'un tissu ou d'un organisme précis pris à un stade de développement bien déterminé. La seule présence d'un clone dans la banque justifiera donc de l'expression de ce dernier dans le tissu et au stade considérés.

b) Des expériences de Northern blot peuvent être réalisées à partir de clones même partiels extraits de la banque. Ces expériences donneront des renseignements sur la présence d'un messager dans des populations diverses d'ARNm.

C'est principalement sur les données de Northern blot que sont basées les conclusions visant à attribuer tel ou tel type de sous-unité β à tel ou tel tissu.

c) Lorsque la séquence nucléotidique est connue, il est toujours possible de réaliser des amplifications par la méthode de PCR. Ces amplifications sont effectuées directement sur le premier brin d'ADN complémentaire obtenu par transcription inverse de la population d'ARNm. Cette technique permet parfois d'affiner le diagnostic obtenu en Northern blot dans le cas par exemple où l'on recherche des messagers de tailles voisines.

d) Enfin, si l'on dispose d'anticorps, la technique de Western blot reste la mieux adaptée à ce genre de problématiques car elle offre la possibilité d'observer la présence de la protéine et non de son messager.

1) Répartition tissulaire de l'expression des sous-unités β

Tableau récapitulatif :

gène	isoforme	tissus	espèce	référence
$\beta 1$	a	m. squelettique.	lapin	Ruth et coll. (1989)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
	b	cerveau	rat	Pragnell et coll. (1991)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
	c	cerveau	homme	Williams et coll. (1992)
		coeur	homme	Collin et coll. (1993)
gène $\beta 1$	a, b, c		homme	Powers et coll. (1992)
$\beta 2$	A	cerveau	rat	Peres-Reyez et coll. (1992)
	a, b	coeur, m. lisse	lapin	Hullin et coll. (1992)
$\beta 3$		cerveau, m. lisse	lapin	Hullin et coll. (1992)
		cerveau	rat	Castellano et coll. (1993a)
		cerveau, ovaire, m. lisse	homme	Collin et coll. (1993)
$\beta 4$		cervelet	rat	Castellano et coll. (1993b)
MysB	A	foetus humain		Rosenfeld et coll. (1993)
	B	foetus humain		Rosenfeld et coll. (1993)
	C	foetus humain		Rosenfeld et coll. (1993)

Le tableau ci-dessus résume la distribution tissulaire des messagers de toutes les isoformes de la sous-unité β clonées à ce jour. On notera cependant, que dans le cas de MysB, aucune expérience visant à rechercher son expression tissulaire n'a été effectuée.

2) Les aspects fonctionnels

L'expression fonctionnelle de l'activité "canal-calcique" passe tout d'abord par l'expression de la sous-unité $\alpha 1$, les autres sous-unité interviennent alors comme modulateurs de cette activité "canaulaire".

a) Expression hétérologue des canaux calciques

Les canaux calciques peuvent être étudiés hors de leur environnement cellulaire (expression hétérologue). C'est grâce à l'utilisation de modèles d'expression divers et complémentaires qu'ont pu débiter les études structure-fonction. L'ovocyte de Xénope a tout d'abord permis d'exprimer de façon transitoire les sous-unités clonées après transcription *in*

vitro et obtention de l'ARNm spécifique. Un autre modèle d'expression, complémentaire du précédent, est la lignée cellulaire fibroblastique L murine dans laquelle il est possible de réaliser des transfections stables. Elle présente l'avantage de n'exprimer constitutivement aucune des sous-unités du canal de type L. D'autres types de cellules fibroblastiques (HEK293, CHO...) ont été également utilisées pour l'expression de canaux calciques. Enfin la cellule musculaire murine *muscular dysgenesis (mdg)*, qui est très spécifiquement dépourvue de la sous unité α_1 constitue un modèle de choix pour les études concernant la sous-unité α_1 .

b) Mise en évidence du rôle prépondérant de la sous-unité α_1 : la "sous-unité canal"

L'injection dans l'ovocyte d'ARNm codant pour les sous-unités α_1 cardiaque et vasculaire conduit à l'expression de canaux calciques sensibles aux DHP (Mikami et coll., 1989; Biel et coll., 1990; Singer et coll., 1991; Wei et coll., 1991). Aucune expression de canaux calciques n'a été détectée dans l'ovocyte de Xénope suite à l'injection d'ARNm codant pour la sous-unité α_1 de muscle squelettique, cette isoforme s'exprime toutefois comme canal calcique dans la cellule L (Perez-Reyes et coll., 1990; Varadi et coll., 1991). De même, une activité canalaire a pu être également mesurée dans la cellule L après transfection de la sous-unité α_1 cardiaque (Lory et coll. 1992). Enfin, l'expression de la sous unité α_1 squelettique dans la cellule *mdg* permet la restauration du couplage excitation-contraction (Tanabe et coll., 1990). Il ressort de ces premières études structure-fonction que la sous-unité α_1 supporte à elle seule l'activité canalaire et la sensibilité aux agents pharmacologiques. De plus, l'expression de chimères d' α_1 a permis d'identifier des régions impliquées dans le couplage excitation-contraction de type squelettique : la boucle intracellulaire entre les motifs II et III (Tanabe et coll., 1990; 1991) et dans les propriétés de binding de DHP : la partie S5-S6 du motif IV (Tang et coll., 1993a). Des études moléculaires visant à modifier le pore du canal en changeant certains amino acides commencent à apparaître (Tang et coll., 1993b) et démontrent l'implication de la sous unité α_1 dans le rôle de "sous-unité canal".

c) Influence des autres sous-unités; mise en évidence du rôle régulateur de β

Les données bibliographiques montrent que les sous unités auxiliaires jouent un rôle important dans le fonctionnement global du canal. Varadi et coll. (1991) ont démontré que la sous unité β jouait un rôle important dans l'expression fonctionnelle de la sous-unité α_1 squelettique. De même, la coexpression d'une sous-unité β avec l'isoforme α_1 cardiaque dans les cellules L résulte en une augmentation de 20 à 50 fois de l'amplitude des courants calciques (Lory et al., 1993). Les études précitées ont également révélé que la sous-unité β module les propriétés pharmacologiques, la dépendance vis à vis du voltage de l'activation, les cinétiques d'activation et d'inactivation des courants L squelettique et cardiaque (Varadi et Coll., 1991; Lory et coll., 1992; Lory et coll., 1993). La sous unité β serait impliquée dans :

- i) l'augmentation de l'expression fonctionnelle de α_1 ;
- ii) la modification de l'amplitude des courants enregistrés;
- iii) la modulation des caractéristiques cinétiques des courants.

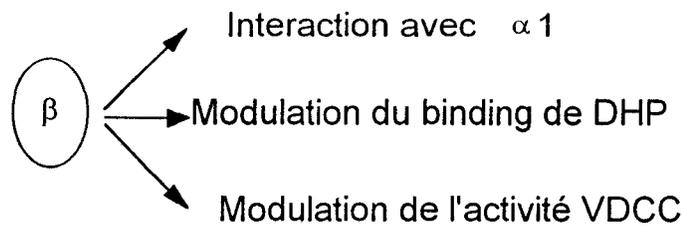
Par ailleurs, Mikami et coll. (1989) ont montré que la sous-unité α_2 stabilise α_1 en augmentant l'activité des canaux calciques sur les ovocytes injectés avec les deux populations d'ARN messagers. Cette propriété d' α_2 a été retrouvée pour le canal calcique de muscle squelettique (Varadi et coll., 1991).

Il ressort de ces études structure-fonction que la sous unité β joue un rôle tout à fait déterminant dans la régulation de l'activité du canal calcique de type L.

3) La génétique des sous-unités β

La localisation du gène β_1 a été réalisée par Gregg et coll. (1993). Il en résulte que ce gène est localisé en 17q 11.2-q22. Des études réalisées par hybridation *in situ* avec une sonde fluorescente, en collaboration avec le Dr. S. Taviaux du CRBM, nous ont permis de localiser le gène de l'isoforme humaine β_3 en 12q13. Ces deux gènes sont les seuls à avoir été localisés chez l'homme et sont situés sur des chromosomes différents.

Conclusion : modélisation de la sous-unité β



Caractéristiques principales :

- *Hydrophilie :*

L'étude de l'hydrophobicité des sous-unité β sur leur structure primaire montre clairement qu'il s'agit de protéines cytosolique ne possédant donc aucun domaine transmembranaire. La figure ci-dessous compare les diagrammes d'hydrophobicité obtenus par la méthode de Kyte et Doolittle de la sous-unité $\beta 4$ et du premier motif de la sous-unité $\alpha 1$.

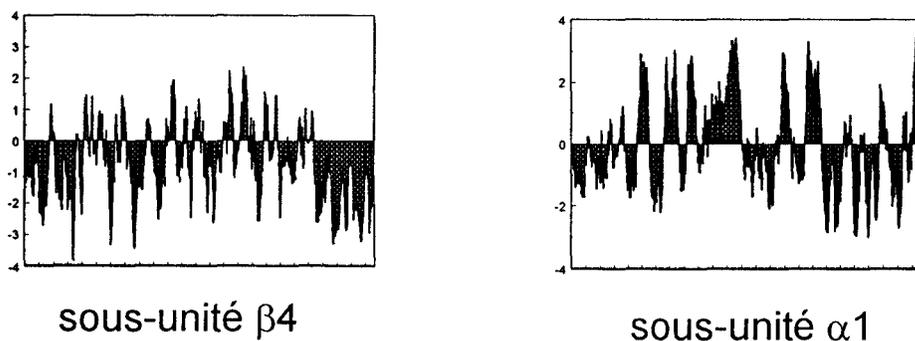


Fig. 31 comparaison des diagramme d'hydrophobicité de la sous-unité β et du premier motif de la sous-unité $\alpha 1$

L'on remarque aisément que la majorité des pics de la sous-unité β sont situés dans la partie négative donc hydrophile du diagramme. On observe le phénomène inverse dans le cas d' $\alpha 1$: chacun des grands pics dans les valeurs positives du diagramme représente les segments transmembranaires qui sont au nombre de six dans ce premier domaine.

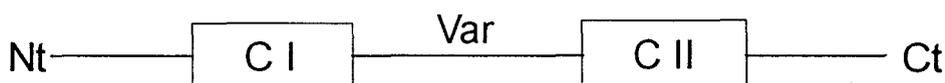
- *Sites de phosphorylation*

La sous-unité β a souvent été impliquée dans le cadre des mécanismes de phosphorylation des canaux calciques par la PKA. Cependant, toutes les isoformes de β ne possèdent pas de sites de phosphorylation consensus pour la PKA. L'on sait par des études structurales (Witcher et coll., 1993) que la sous-unité $\beta 3$ entre dans la composition du canal calcique de type N. La sous-unité $\beta 3$ ne possède aucun site consensus de phosphorylation par

la PKA. Il est néanmoins possible que β intervienne dans ce mécanisme de régulation soit sans être elle-même phosphorylée par la PKA ou en étant phosphorylée en un site non consensus (la serine 182 de $\beta 1a$ qui est phosphorylable *in vitro* n'est pas un site consensus pour la PKA). Des études biochimiques complémentaires sont donc nécessaires pour apporter une réponse à ces questions.

- Structure résumée :

La sous-unité β comporte deux domaines nommés CI et CII qui sont tout à fait conservés dans l'ensemble des isoformes. Entre ces deux domaines se trouve un segment variable correspondant à l'expression de un ou plusieurs exons suivant les isoformes. Enfin, les extrémités amino- et carboxy-terminales sont variables et ce même au sein d'une même famille de sous-unités β . Le modèle ci-dessous résume ces différents éléments :



**Fig. 35 : modèle d'organisation schématique de la sous-unité β
appliqué aux études structure-fonction**

Les deux domaines CI et CII étant les seuls à être constants, l'on peut logiquement penser qu'ils sont impliqués dans l'interaction de la sous-unité β avec la sous-unité $\alpha 1$.

Des données récentes du groupe de K. Campbell ont permis de localiser précisément sur la sous-unité $\alpha 1$ le domaine d'interaction avec la sous-unité β . Lorsque ce motif de 18 acides aminés est produit seul en tant que peptide, il est presque totalement insoluble. Ceci laisse à penser que l'interaction entre $\alpha 1$ et β est du type hydrophobe. Il faudrait donc rechercher une région hydrophobe des domaines conservés CI et CII comme impliquée dans la liaison de β sur $\alpha 1$.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

A) Construction d'une banque d'ADN complémentaire

1) Extraction et purification des ARN messagers

Le protocole que nous avons utilisé est adapté de celui publié par Chomczynski et Sacchi (1987).

a) Choix du tissu

Ce choix était entièrement guidé par nos perspectives de clonage et non du tissu pouvant générer la plus grande quantité d'ARN messagers.

b) Conditions de travail :

L'extraction d'ARN est rendue difficile principalement à cause de la très grande sensibilité des ARN aux ribonucléases. Deux conditions sont indispensables :

Stérilité : tout le matériel n'étant pas à usage unique est autoclavé ainsi que l'eau et les solutions mère. Le port des gants stériles est indispensable afin d'éviter toute contamination par les ribonucléases présentes en grande quantité sur la peau.

Rapidité : Lors des différentes phases du protocole, le délai le plus court est nécessaire pour éviter toute dégradation des ARN par les ribonucléases endogènes.

c) L'extraction d'ARN

L'extraction d'ARN totaux de tissus comportent deux étapes :

- l'étape d'extraction qui consiste à séparer les acides ribonucléiques des autres macromolécules cellulaires : protéines, lipides, ADN.

- l'étape de précipitation qui permet de précipiter sélectivement l'ARN du milieu réactionnel c'est à dire de l'ensemble des produits utilisés pour l'extraction et de quelques protéines étroitement associées à l'ARN.

α) Description physico-chimique de l'extraction

- la solution dénaturante : elle comporte :

- 4M isothiocyanate de guanidinium
- 25mM citrate de sodium
- 0,5% lauryl sarcosinate

Avant l'extraction, on ajoute le β -mercapto-éthanol à la concentration finale de 0,1M. La forte concentration en isothiocyanate de guanidinium offre deux avantages : une lyse rapide des cellules et la dénaturation immédiate des protéines libérées. Ceci permet une protection totale contre les ribonucléases endogènes. Le β -mercapto-éthanol réduit les ponts dissulfures des protéines et participe à la dégradation de celles-ci. Le lauryl sarcosinate est un détergent qui lui s'attaque à la structure phospholipidique des membranes.

- *le phénol* : il est saturé en eau par chauffage à 65°C en présence d'un volume suffisant d'eau. Le phénol est un puissant agent organique non miscible à l'eau. Son utilisation permet une

extraction par séparation de phase en jouant sur la capacité des macromolécules à s'incorporer préférentiellement à la phase organique ou à la phase aqueuse.

- *l'acétate de sodium* : une solution 2M à pH4 d'acétate de sodium (tamponnée avec de l'acide acétique glacial) permet d'ajuster le pH de la phase aqueuse entre 5 et 6. L'acidité de la phase aqueuse est très importante pour obtenir une séparation correcte entre l'ADN et l'ARN en utilisant le phénol.

- *le "sevag" ou mélange chloroforme-alcool isoamylique* : il est utilisé en proportion 24:1 pour améliorer la séparation entre les phases aqueuse et organique grâce à la forte densité des deux composés. En outre, le chloroforme permet une dissolution des lipides et l'alcool isoamylique empêche la formation de mousse due à l'utilisation de détergents.

- *l'isopropanol et l'éthanol* : ces deux alcools sont utilisés lors des étapes de précipitation. Pour obtenir la précipitation des ARN on utilise une concentration finale de 0,3M d'acétate de sodium et soit un volume d'isopropanol soit deux volumes d'éthanol. Cette précipitation se fait à une température inférieure ou égale à -20°C.

β) Les différentes étapes du protocole d'extraction

L'exemple traité concerne 500mg de tissu.

Extraction :

Homogénéiser le tissu dans 5ml de solution dénaturante puis ajouter séquentiellement :

- 500µl d'acétate de sodium 2M pH4
- 5ml de phénol
- 1ml de sevag

laisser reposer sur glace pendant 15 min.

centrifuger à 10000g pendant 20 min

reprenre la phase aqueuse et ajouter :

- 0,5 vol. de phénol
- 0,5 vol. de sevag

agiter et laisser reposer pendant 15 min.

réitérer la centrifugation et le prélèvement de la phase aqueuse

ajouter à la phase aqueuse 1 vol. de sevag afin de s'affranchir des traces de phénol

réitérer la centrifugation et le prélèvement de la phase aqueuse

Précipitation

- ajouter 1 vol. d'isopropanol à la phase aqueuse et laisser précipiter 2 h. à -20°C

- centrifuger 20 min. à 10000g, évacuer le surnageant et dissoudre le culot dans 1,5ml de solution dénaturante

- ajouter 2 vol. d'éthanol et laisser précipiter 1 h. à -20°C

- centrifuger, évacuer le surnageant, rincer le culot à l'éthanol 75% pour se débarrasser de l'excès de sels

- dissoudre le culot dans l'eau stérile, ajouter 0,1 vol. d'acétate de sodium et 2 vol. d'éthanol. Laisser précipiter toute la nuit à -20°C.
 - centrifuger et rincer le culot comme précédemment, puis le dissoudre dans de l'eau stérile.
- A cette étape, un dosage est réalisé par absorption 260nm (1u DO260 : 40µg d'ARN). Un spectre peut être réalisé entre 220 et 300nm permettant d'obtenir : le minimum d'absorption à 230 et l'A280 pour déterminer le rapport A260/A280. Ce rapport doit se rapprocher de 2 si il ne reste que peu de protéines dans la solution.

d) Purification des messagers

L'extraction précédemment décrite permet l'obtention des différents ARN de la cellule : ARN messagers, de transfert et ribosomiaux. Seule la fraction d'ARN messagers code pour des protéines et est donc intéressante pour réaliser des banques d'ADN complémentaire. Cette fraction qui ne représente qu'entre 2 et 5% des ARN totaux, doit être purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'oligo-dT cellulose.

Préparation de la colonne : 50mg d'oligo-dT cellulose sont mis en suspension dans un tampon TE (TrisHCl 10mM pH 7,4; EDTA 1mM). Une fois hydratée l'oligo-dT cellulose est déposée dans une colonne puis rincée et équilibrée dans plusieurs volumes de tampon de fixation TNS (TE + 0,1% SDS, 0,5M NaCl).

Fixation : L'échantillon d'ARN total est dilué par un volume de TNS deux fois concentré puis chauffé à 65°C. Cette fraction est déposée sur la colonne et l'éluat, récupéré, est repassé une fois à travers la colonne. Les ARN polyA(-) sont élués par le passage de deux volumes de TNS puis le SDS est éliminé en rinçant la colonne avec 4 volume de TN (TNS sans SDS).

Elution : la fraction polyA(+) est éluee en abaissant la force ionique : 4 volumes de TE sont passés sur la colonne, l'éluat étant récupéré directement dans 2 volumes d'éthanol. 10% d'acétate de sodium sont ajoutés et le tout est placé à -20°C pendant 1 à 2 h. Après centrifugation, le culot de messagers est repris dans l'eau stérile et stocké à -80°C.

2) Construction d'une banque d'ADN complémentaire dans le vecteur λ-ZAP II

La procédure de construction d'une banque d'ADN complémentaire commence par la purification d'au moins 5µg d'ARN polyA+.

a) Synthèse du premier brin d'ADN complémentaire

Les précautions nécessaires à la manipulation de l'ARN sont encore à prendre à ce stade. Dans un tube, on mélange dans l'ordre :

- 5µl de tampon de transcriptase inverse (MMLV)
- 3µl de mélange de nucléotides méthylés à 10mM
- 2µl d'amorce oligo-dT-XhoI, 1,4µg/µl
- 1µl de RNase blockII
- 37µl de solution d'ARN contenant 5µg de polyA+

Laisser incuber à température ambiante pendant 10 min. pour avoir l'hybridation amorce-matrice.

Puis ajouter 2,5µl de M-MuLV-Reverse transcriptase à 18u/µl

Le volume final est maintenant de 50µl.

Incuber 1 h. à 37°C.

b) Synthèse du second brin

Au milieu réactionnel précédent on ajoute dans l'ordre :

- 40µl de tampon d'ADN polymérase I
- 6µl de mélange de dNTP à 10mM
- 300µl d'eau stérile
- 0,8µl de RNase H (4u/µl)
- 6,5µl d'ADN polymérase I (10u/µl)

Incuber 2h30 à 16°C

Après incubation, faire une extraction phénol/chloroforme suivie d'une extraction au chloroforme seul.

Précipiter en ajoutant 1/10° de volume d'acétate de sodium 3M, pH5,3 et 2 volumes d'éthanol.

Laisser précipiter à -20°C toute la nuit.

Récupérer le culot par centrifugation à 10000g pendant 1h.

Rincer le culot à l'éthanol 70% et le lyophiliser au "speed vac"

Le culot est ensuite resuspendu dans 40µl d'eau stérile.

c) Transformer les extrémités de l'ADN complémentaire en bouts francs

Aux 40µl de l'étape précédente on ajoute :

- 5µl de tampon de T4 ADN polymérase
- 2,5µl de mélange de dNTP à 2,5mM
- 3,5µl de T4 ADN polymérase à 2,9u/µl

Incuber à 37°C pendant 30 min.

Augmenter le volume jusqu'à 100µl et extraire :

- une fois au phénol/chloroforme
- une fois au chloroforme seul

Précipiter la phase aqueuse en ajoutant :

- 1/10° d'acétate de sodium
- 2 vol. d'éthanol

précipiter à -20°C pendant 1h.

Centrifuter 1h, laver le culot avec de l'éthanol à 70% et le lyophiliser au "speed-vac".

d) Ligation des adaptateurs EcoRI

Resuspendre le culot précédent dans 7µl de solution d'adaptateurs EcoRI, puis ajouter,

- 1µl de tampon de T4 ADN ligase
- 1µl de 10mM rATP
- 1µl de T4 ADN ligase

Incuber toute la nuit à 4°C

Le matin, inactiver la ligase par un chauffage à 70°C pendant 30 min.

e) Phosphorylation des extrémités EcoRI

Ajouter au mélange réactionnel précédent :

- 1µl de tampon de T4 ligase
- 2µl d'ATP à 10mM
- 6µl d'eau stérile
- 1µl de T4 polynucléotide kinase (10u/µl)

Incuber à 37°C pendant 30 min.

f) Digestion par XhoI

Ajouter au mélange précédant :

- 3µl de tampon réactionnel de XhoI
- 2µl de XhoI (45u/µl)

Incuber 1h30 à 37°C

puis ajouter 5µl de STE 10X

L'échantillon doit être ensuite passé au travers d'une colonne de gel-filtration Sephacryl S-400

- équilibrer la colonne avec 3 vol. de STE
- charger l'échantillon

Il est possible à ce point d'effectuer une sélection des populations d'ADN complémentaire suivant leur taille : les premières fractions correspondent aux poids moléculaires les plus élevés.

- Faire une extraction phénol/chloroforme puis une extraction chloroforme sur chacune des fractions

g) Précipitation de l'ADN complémentaire

Le 1X STE contient suffisamment de chlorure de sodium pour permettre la précipitation de l'ADN. On ajoutera donc simplement 2 vol. d'éthanol. La précipitation a lieu toute la nuit à -20°C.

Récupérer le culot par centrifugation à 10000g pendant 1h, laver à l'éthanol 70% et sécher.

h) Ligation dans les bras du phage λ

Resuspendre le culot précédent dans 10µl

puis prendre :

- 2,5µl d'ADN complémentaire
- 0,5µl de tampon de T4 ADN ligase
- 0,5µl de rATP à 10mM
- 1µl de Uni-Zap-XR (1µg/µl)

puis ajouter 0,5µl de T4 ADN ligase (4u/µl)

Incuber pendant 48h à 4°C

i) Packaging

A cette étape, il faut ajouter 1µl d'ADN complémentaire à l'extrait de packaging. L'extrait de packaging est un extrait commercial vendu sous la référence Gigapack Gold II (Stratagene).

- ajouter 1µl d'ADN à l'extrait freeze/thaw
- ajouter 15µl d'extrait soniqué

Incuber à température ambiante pendant 2h, puis :

- ajouter 500µl de SM
- ajouter 20µl de chloroforme

centrifuger pour éliminer quelques débris, le surnageant est maintenant prêt à être titré.

3) Vérification de la banque

a) Titration

- prendre 2µl de la réaction de packaging
- diluer au 1/10° avec 18µl de SM
- étaler 1µl de la banque diluée et 1µl de la banque non diluée en utilisant 200µl de

bactéries PLK-F' à $DO_{600} = 0.5$

Préincuber les bactéries et les phages 15 min. à 37°C avant d'ajouter le "top agar". Ceci permet aux phages de s'attacher aux bactéries.

- ajouter 2 à 3 ml de top agar (48°C) et étaler sur des boîtes NZY

Incuber toute une nuit à 37°C

Normalement, on doit obtenir 10^6 à $1,5 \cdot 10^7$ pfu/µg de bras de phage.

b) Amplification

Il faut normalement amplifier les banques en phage λ pour en faire un stock à haut titre. Cependant, il peut s'avérer gênant d'effectuer plus d'un cycle d'amplification car certains clones poussant lentement peuvent devenir nettement sous-représentés.

L'on procède comme suit :

1. Préparer des PLK-F'

$DO_{600} = 0.5$

600µl par boîte de 150mm

2. Aliquoter les clones I à raison de 5 10⁴pfu dans 600µl de cellules hôte
 3. Incuber les tubes contenant les phages et les cellules hôte 15 min. à 37°C
 4. Mélanger 6,5ml de top agar avec chaque aliquot, étaler sur boîte NZY
 5. Incuber les boîtes à 37°C pendant 5 à 8 h, ne pas laisser les plages de lyse devenir trop larges.
 6. Ajouter 10ml de SM sur chaque boîte puis les incuber à 4°C toute la nuit avec une légère agitation.
 7. Récupérer la suspension de bactériophage de chaque boîte dans un tube polypropylène stérile. Rincer les boîtes avec 2ml de SM et ajouter aux fractions précédentes
 - ajouter 5% de chloroforme, agiter 15 min. à température ambiantecentrifuger 5 min. à 4000g
- transférer le surnageant dans un tube stérile et ajouter du chloroforme jusqu'à 0,3%.

Après amplification, la banque doit être titrée une fois de plus. On peut espérer jusqu'à 10¹²pfu/ml.

On peut également déterminer le taux de recombinant en utilisant des boîtes contenant X-Gal et IPTG. En effet, le vecteur λZAP permet le test de détermination du taux de recombinant par la couleur des plages de lyse.

B) Criblage des banques d'ADN complémentaire

1) Préparation de la sonde

Les sondes sont réalisées par la méthode d'amorçage aléatoire ou "random priming". Un mélange d'hexanucléotides aléatoires est utilisé pour amorcer une réaction de polymérisation in vitro à partir d'une matrice linéaire double brin. Avec cette méthode, il est possible d'obtenir des sondes ayant une très haute activité spécifique. Généralement, le pourcentage d'incorporation du radionucléotide est de l'ordre de 60%. De plus, la longueur des sondes est en général autour de 50% de la longueur de la matrice initiale, ce qui est supérieur à ce que l'on obtient avec la méthode de "nick-translation".

Le prérequis au marquage d'une sonde est de préparer et de purifier un fragment d'ADN. Ce fragment peut provenir :

- d'un ADN complémentaire extrait de son vecteur par digestion enzymatique
- d'un fragment résultant d'une amplification par PCR

Dans le premier cas, le fragment est préparé comme suit :

1. Digestion d'environ 5µg d'ADN plasmidique par une ou deux enzymes de restriction (la quantité d'ADN à digérer dépend du rapport entre la taille de l'insert et la taille du vecteur).

Exemple :

- ADN plasmidique : 5µl (correspondant à 5µg)

- tampon 10X : 4 μ l (on choisi dans ce cas un tampon pouvant convenir pour la coupure avec les deux enzymes; si ce n'est pas possible, les deux digestions sont réalisées à la suite l'une de l'autre et l'ADN est précipité après la première coupure).

- eau : 27 μ l

- Enzyme 1 : 2 μ l correspondant environ à 40 unités

- Enzyme 2 : 2 μ l

soit un volume total de 40 μ l.

Incubation 2h à 37°C

2) Purification du fragment

L'ADN digéré est ensuite chargé sur un gel d'agarose au pourcentage judicieusement choisi afin d'obtenir une bonne séparation entre l'insert et le vecteur. Un fragment d'ADN produit par PCR est également traité de la même façon. Après la migration électrophorétique, la bande d'intérêt est coupée du gel. Ici se situe un problème relatif au choix de la méthode utilisée pour purifier un ADN contenu dans un fragment de gel. Plusieurs méthodes sont en effet utilisables :

1. avec un gel "low melting"

- la méthode au papier de DE cellulose n'est pratiquement plus utilisé.

- la méthode au phénol chaud :

L'on chauffe le morceau de gel à 70°C jusqu'à sa fusion et l'on chauffe parallèlement un tube contenant du phénol. On réalise ensuite deux extractions au phénol, une au phénol chloroforme et enfin une au chloroforme seul. La phase aqueuse contenant l'ADN est alors précipitée à -20°C par adjonction d'1/10^e de volume d'acétate de sodium 3M et de 2,5 volumes d'éthanol. Cette méthode offre des résultats acceptables mais le rendement de purification ne dépasse que rarement les 50%.

2. avec un gel d'agarose normal

a) la méthode de filtration sur laine de verre ou fritté commercial (colonne Costar) .

La bande est insérée dans la colonne contenant le filtre et congelée à -80°C pendant 20 min. Ensuite, on centrifuge l'ensemble pendant 20 min. à température ambiante. On récupère l'éluat qui contient l'ADN en solution dans le tampon de migration électrophorétique. On effectue ensuite une extraction au phénol/chloroforme pour se débarrasser des résidus éventuels d'agarose suivie d'une extraction au butanol permettant de s'affranchir de toute trace de bromure d'éthidium. Enfin, la précipitation s'opère comme précédemment. Cette méthode donne un rendement d'environ 60% pour des fragments d'ADN de petite taille. Au delà de 2kb, le rendement peut chuter de manière importante et même être nul dans le cas de grands inserts.

b) l'utilisation des résines type "Glass milk"

Ces résines ont la propriété de pouvoir lier l'ADN et ce, même dans des tampons très oxydants. On utilise donc des solutions de perchlorate ou de periodate de sodium pour dégrader

l'agarose, l'ADN étant lui prisonnier de la résine. De tels produits sont vendus sous forme de kits comme "GeneClean" ou "Prep-A-Gene" de Bio-Rad.

La bande de gel contenant l'ADN est incubée à 55°C en présence de 2 volumes de solution 6M de perchlorate de sodium (avec 50mM TrisHCl, pH8 et 10mM EDTA). Après dissolution totale de l'agarose, on ajoute 5µl de résine (cette quantité permet de lier environ 1µg d'ADN). On laisse à 55°C pendant 10 min. puis l'on centrifuge : la matrice ayant emprisonné l'ADN se retrouve sous forme de culot. On rince ce culot 4 fois avec 200µl de solution à 50% d'éthanol, 20mM TrisHCl, pH7,5 et 2mM EDTA. Après ces lavages, l'ADN est élué de la résine avec 50µl de TE, pH8. Le fragment est ensuite précipité.

A ce stade, l'ADN est prêt à être marqué par "random priming". Pour cela on opère comme suit :

1. chauffer l'ADN à 95°C pendant 5 min. et le refroidir brusquement dans la glace
2. ajouter ensuite :
 - 5µl de tampon pour l'ADN polymérase I
 - 1,7µl de dATP, dGTP et dTTP qui sont en solution stock à 1,5mM
 - 5µl d' α [³²P]dCTP (3000Ci/mmol; 50µCi)
 - 1µl de Klenow fragment (10u/µl)

Incuber la réaction à 37°C pendant 30 min.

Ajouter ensuite 5µl d'EDTA 0,5M pour stopper la réaction.

La sonde est maintenant prête à être purifiée. En effet, pour se débarrasser du radionucléotide non incorporé, il est souhaitable d'effectuer une chromatographie de gel-filtration sur l'ensemble de la réaction. La résine Sephadex G-50 est particulièrement bien adaptée à ce genre de procédures. Procéder comme suit :

1. Equilibrer un peu de Sephadex G-50 dans un tampon TES (TrisHCl 10mM, EDTA 1mM et NaCl 100mM).
2. En utilisant une seringue de 1ml comme colonne, il est possible de construire une "spun-column" que l'on peut centrifuger. On place donc un petit tampon de laine de verre au fond du corps de la seringue et on remplit l'ensemble de G-50 correctement équilibrée. Centrifuger l'ensemble à 600g pendant 1 min. et rajouter de la résine jusqu'à un volume final de 0,8ml. Rééquilibrer ensuite cette "spun column" en faisant passer 200µl de TES. L'échantillon, dont le volume a été augmenté jusqu'à 100µl est maintenant chargé dans la colonne. On centrifuge 2 min. à 600g et l'on récupère directement la sonde marquée débarrassée des nucléotides libres (et donc du radioisotope non incorporé) dans le premier effluent. L'ensemble de cette procédure peut être contrôlée en mesurant la radioactivité résiduelle de la colonne à l'aide d'un compteur Geiger de pailleasse.

La sonde est maintenant prête à l'emploi.

2) Préparation des répliques

Pour un criblage moyen, il est bon d'étaler environ 10^6 clones, ce qui représente à peu près 20 boîtes de 150mm. Après une incubation d'une nuit à 37°C, on refroidit les boîtes à 4°C pendant 2h. Ceci empêche que le top agar ne se colle aux filtres de nitrocellulose. Les plages de lyse sont transférées pendant 1 min. sur filtre de nitrocellulose. Pour faire la seconde réplique, on transfère les mêmes plages pendant 3 min. Les filtres sont ensuite traités comme suit :

- dénaturation 2 min. dans 1,5M NaCl, 0,5M NaOH
- neutralisation 5 min. dans 1,5M NaCl, 0,5M TrisHCl pH8
- rinçage 30 sec. dans 0,2M TrisHCl pH7,5; 2X SSC

Les filtres sont ensuite séchés sur du papier Whatman 3MM et cuits à 80°C pendant 2h.

3) Préhybridation, hybridation

a) Préhybridation

On utilise la solution suivante :

- 6X SSC
- 5X Denhardt's
- 20mM NaH₂PO₄
- 500µg/ml d'ADN de sperme de saumon

Les répliques baignant dans cette solution sont placées dans un sac plastique à 42°C pendant 1 à 2 h.

b) Hybridation

On extrait la solution de préhybridation du sac plastique et l'on incube l'ensemble à 42°C pendant une nuit dans la solution suivante :

- 0,4% SDS
- 6X SSC
- 20mM NaH₂PO₄
- 500µg/ml d'ADN de sperme de saumon

On ajoute la sonde radiomarquée à une concentration d'au moins 0,5 10^6 cpm/ml.

c) Lavages

Il est utile de disposer d'un compteur Geiger afin de déterminer quels lavages doivent être effectués.

1er lavage : en 6X SSC, 0,1% SDS à température ambiante

2ième lavage : 2X SSC, 0,1% SDS à température ambiante

Ensuite, suivant le signal que l'on obtient avec le compteur, on pourra faire un ou plusieurs lavages supplémentaires en 1X SSC, 0,1% SDS à 65°C.

Les filtres sont ensuite exposés à température ambiante toute la nuit. Normalement, le bruit de fond est encore important mais cette première exposition permet en général de déterminer les meilleures conditions pour les lavages ultérieurs visant à ne conserver que les clones vraiment positif. Tout dépend également de la spécificité que l'on recherche avec la sonde. On peut donc laver en 0,5X SSC, 0,1% SDS à 65°C et même descendre à 0.2X SSC si besoin est. Les filtres seront alors exposés pour 48 h à -70°C.

4) Sélection des clones

A l'issue d'un premier criblage, on est d'ores et déjà capable d'isoler partiellement un certain nombre de clones positifs. Afin de les purifier, il est parfois nécessaire de procéder à un second voire à un troisième criblage. Lorsque les clones sont purs, on doit passer à l'étape d'analyse de ceux-ci.

5) L'excision *in vivo*

Le vecteur λ ZAP a été conçu de manière à pouvoir exciser *in vivo* et recirculariser tous les inserts contenus dans le bactériophage sous forme de phagemide. La séquence de λ ZAP contient des protéines dérivées du bactériophage f1. Ces protéines reconnaissent une région de l'ADN qui sert normalement d'origine de répllication au phage f1 pour la synthèse du brin (+). De plus, cette origine peut être divisée en deux parties : 1) le site d'initiation et 2) le site de terminaison de la synthèse d'ADN. Ces deux régions du brin (+) ont été sous-clonées séparément dans le vecteur λ ZAP. Le phage λ est donc ainsi accessible aux protéines dérivées de f1 en infectant simultanément une souche de bactérie avec λ et f1. Au sein d'E. Coli, les protéines "helper" (protéines de f1 et M13) reconnaissent l'ADN initiateur qui est contenu dans le phage λ . Ces protéines, réalisent un "nick" sur l'un des deux brins de l'ADN de λ . Au site de ce nick, une nouvelle synthèse d'ADN commence et duplique tout ce qui existe entre les deux sites et ce, jusqu'au terminateur. La molécule simple brin est ensuite circularisée par un produit du gène II du phage f1 donnant une molécule circulaire contenue entre l'initiateur et le terminateur. Dans le cas du vecteur λ ZAP, ceci comprendra toute la séquence du phagemide pBluescript SK(-) et l'insert contenu s'il en existe un.

Ce système permet de remplacer l'étape de sous-clonage des inserts du bactériophage λ (comme dans le cas de λ GT11) vers un vecteur plasmidique plus facile à manipuler pour l'analyse de restriction et le séquençage.

Pratiquement, on procède ainsi :

1. prélever une plage de lyse et la transférer dans 500 μ l de SM avec quelques gouttes de chloroforme

2. combiner dans un tube de 50ml :

- a) 200 μ l de bactéries XL-1 blue ($DO_{600} = 1$)
- b) 200 μ l de stock de bactériophage réalisé en 1.

c) 1 µl de phage helper R408 (plus de 10^6 pfu/ml)

Incuber l'ensemble à 37°C pendant 15 min.

3. ajouter 5ml de milieu 2XYT et incuber 3 h à 37°C avec agitation

4. chauffer le tube à 70°C pendant 20 min. et centrifuger

5. prélever le surnageant dans un tube stérile. Ce stock contient le phagemide pBluescript empaqueté sous forme de particule de phage filamenteux.

6. pour étaler le phagemide, on mélange :

- 20 µl de stock de phage filamenteux

- 200 µl de cellules XL-1 blue ($DO_{600} = 1$)

Incuber à 37°C pendant 15 min.

7. étaler de 1 à 100 µl du mélange sur des boites LB ampiciline et incuber toute une nuit à 37°C.

Les colonies qui apparaissent contiennent le phagemide pBluescript avec l'insert d'ADN complémentaire. Les ADN complémentaires isolés à l'issue du criblage de la banque sont maintenant disponibles pour les manipulations suivantes :

- Analyse de restriction : même pratiquée avec les enzymes les plus communes, l'analyse de restriction permet toujours d'identifier des clones comme étant identiques ou différents. Elle est donc précieuse en tant que première étape d'étude des ADN complémentaires clonés.

- Southern blot : avec les fragments de restriction, il est possible de faire une analyse en Southern blot afin de vérifier i) la conformité des produits clonés et ii) la position de la sonde au sein de ces produits.

L'étape qui, logiquement, suit ces deux analyse est l'étape de séquençage.

C) Séquençage

La grande majorité des séquences réalisées dans le cadre de ce manuscrit l'ont été en utilisant directement l'ADN double brin. Seuls certains fragments complexes ont été sous-clonés et séquencés dans M13. La méthode employée est celle décrite par Sanger et coll. (1977) utilisant les didésoxynucléotides et l'enzyme est la Sequenase ou T7 ADN polymérase décrite par Tabor et Richardson (1987).

Les réaction de séquence sont effectuées ainsi :

1. Dénaturation de la matrice double brin

- solution de dénaturation 10X : 2M NaOH, 2mM EDTA

- procédure de dénaturation : on utilise avec cette méthode une quantité importante d'ADN. En effet, si l'on utilise plus de 5 µg d'ADN, on peut parvenir à lire plus de 600 paires de bases avec un gel long.

on utilise donc :

- ADN double brin : 8 μ l (correspondant au moins à 5 μ g)
- solution de dénaturation 10X : 2 μ l

soit un total de 10 μ l. On laisse à température ambiante pendant 20 min et l'on ajoute ensuite :

- 3 μ l d'acétate de sodium 3M (pH 5,2)
- 7 μ l d'eau
- 60 μ l d'éthanol

On précipite l'ADN dans la carboglace pendant 10 min., puis on centrifuge, on rince le culot à l'éthanol 70% et on le sèche.

2. Hybridation matrice-amorce

Le culot est resuspendu dans 6 μ l d'eau et l'on ajoute 2 μ l d'une solution d'amorce à 1 μ mol/ μ l et 2 μ l de tampon de réaction.

On incube l'ensemble :

- 10 min. à 65°C
- 20 min. à 37°C
- 10 min à température ambiante

3. Réactions de séquence

a) on aliquote 2,5 μ l de chaque mélange de terminaison (chacun contenant un didésoxynucléotide)

b) dilution de l'enzyme

- 0,5 μ l de Sequenase version 2.0
- 1.5 μ l de tampon de dilution de l'enzyme

c) dilution du mélange de marquage

La dilution utilisée (1 : 5) est la plus "passe partout", elle peut bien entendu être modifiée en fonction de certains cas précis.

- mélange de marquage : 2 μ l
- eau : 8 μ l

d) réactions de séquence

Aux 10 μ l du mélange matrice-amorce l'on ajoute séquentiellement :

- DTT 0,1M : 1 μ l
- Mélange de marquage dilué : 2 μ l
- a[35S]ATP : 1 μ l
- Sequenase diluée : 2 μ l

mélanger et incuber à température ambiante pendant 5 min. En même temps, on préchauffe les quatre tubes contenant les mélanges de terminaison à 37°C.

On transfère ensuite 3,5 μ l de la réaction précédente dans chacun des tubes de terminaison. On poursuit l'incubation pendant 5 min.

Après ce temps, on ajoute 4µl de solution stop à chacun des tubes. Ils sont maintenant prêt à être chargés dans un gel de séquence.

Solutions utilisées dans ce protocole

- tampon de réaction 5X :
 - 200mM TrisHCl pH 7,5
 - 100mM MgCl₂
 - 250mM NaCl
- mélange de marquage 5X : 7,5 µM dGTP, dCTP, dTTP
- mélange de terminaison :
 - 80µM (dGTP, dATP, dCTP, dTTP)
 - 50mM NaCl
 - 8µM ddXTP
- tampon de dilution de l'enzyme :
 - 10mM TrisHCl pH 7,5
 - 5mM DTT
 - 0,5mg/ml BSA
- solution stop :
 - 95% formamide
 - 20mM EDTA
 - 0,05% xylène cyanol
 - 0,05% bleu de bromophénol
- Sequenase version 2.0
 - T7 ADN polymérase 13u/µl dans :
 - 20mM KPO₄ (pH 7,4)
 - 1mM DTT
 - 0,1 EDTA
 - 50% glycerol

4) Gel de séquence

a) Tampon de migration

On utilise le TBE et il est préparé en tant que solution 5X

b) Solution d'acrylamide

On utilise une solution à 40% acrylamide/bis-acrylamide

c) Gel à 6% acrylamide/urée (7M)

Pour 500ml de solution prête à l'emploi :

- 40% acrylamide/bis : 75ml
- 5X TBE : 50ml

urée : 230g

chauffer puis ajuster le volume à 500ml et filtrer

Une telle solution prête à l'emploi peut être conservée pendant deux semaines à 4°C.

Avant de couler le gel :

prélever 50ml de la solution ci-dessous

ajouter : 400µl de persulfate d'ammonium et 20µl de TEMED

couler le gel

d) Migration du gel

α) Pré-run

Le gel est d'abord lancé à vide afin d'atteindre une température propice au chargement soit supérieure à 50°C; et également de se débarrasser du persulfate d'ammonium.

β) Migration

Elle est réalisée à 2000 volts et à voltage constant pendant un temps dépendant de la longueur de séquence que l'on veut lire.

Dans certains cas, une méthode de séquençage par PCR a été utilisée. Elle correspond scrupuleusement à la méthode "Circum Vent DNA Sequencing" de New England Biolabs en utilisant la Vent (exo-) DNA polymerase.

D) Northern blot

Le Northern blot est la suite logique de toute démarche de clonage. En effet, après avoir cloné un ADN complémentaire, il est nécessaire de prouver son existence au sein d'un tissu donné et de rechercher dans quels tissus il peut être exprimé. Une analyse en Northern blot peut tout à fait convenir pour répondre à de telles questions

1) Gel dénaturant avec formaldéhyde

a) Tampon MOPS

0,2M MOPS

0,05M acétate de sodium

0,01M EDTA

b) Tampon de chargement

720µl formamide

160µl tampon MOPS

260µl formaldéhyde

100µl eau

80µl glycérol

80µl de solution saturée en bleu de bromophénol

si le gel n'est pas totalement utilisé pour être transféré on peut obtenir une bonne visualisation des bandes en ajoutant 100µl de solution de bromure d'éthidium (10mg/ml).

Dans la plupart des cas, un gel à 1% est tout à fait convenable.

On procède donc comme suit :

On fait chauffer 1g d'agarose dans 10ml de tampon MOPS 10X et 85ml d'eau stérile. On laisse la solution refroidir jusqu'à une température d'environ 50°C, puis on ajoute : 5,4ml de formaldéhyde à 37%. Mélanger et couler le gel dans le système de "casting".

2) Migration

- Diluer une quantité suffisante de tampon 10X à 1X.
- Reprendre les échantillons d'ARN (2µl) dans 10 µl de tampon de chargement
- Chauffer les échantillons à 95°C pendant 2 min. et charger dans le gel.

La migration est toujours effectuée à un voltage d'environ 10volts/cm.

3) Transfert

Le transfert est effectué par capillarité en 20X SSC et sur une membrane de Hybond N (Amersham). Une fois le transfert terminé (entre 12 et 24h), la membrane est cuite à 80°C pendant 2h. Après ceci, elle est prête pour l'utilisation.

4) Préhybridation et hybridation

Nous utilisons une solution proche du "Denhardt's reagent" donnant cependant de meilleurs résultats : le 5X PE

250mM TrisHCl, pH 7,5

0,5% w/v pyrophosphate de sodium

5% SDS

1% polyvinylpyrrolidone

1% ficoll

5% BSA

25mM EDTA

On utilise la solution suivant pour la préhybridation et l'hybridation :

50% formamide désionisée

5X SSC

1X PE

150µg/ml ADN de sperme de saumon

Préhybridation de la membrane dans un sac plastique à 42°C pendant 1 à 2h.

Ensuite, on ajoute directement la sonde à 10⁶cpm/ml dans la solution de préhybridation. On hybride ainsi toute la nuit et on procède aux lavages de la membrane.

1er lavage : à 65°C en 2X SSC, 0,1% SDS pendant 15 min. et à renouveler une fois

2nd lavage : à 65°C en 0,1X SSC, 0,1% SDS pendant 15 min

En jugeant de la radioactivité résiduelle avec un compteur Geiger, il est possible savoir si l'on doit continuer à rincer ou non.

Enfin, la membrane est exposée entre deux écrans amplificateurs à -80°C pendant 24 à 48h.

E) Préparation et microinjection des ovocytes de Xénope

Cette technique de microinjection dans les ovocytes de Xénope est utilisée dans le travail concernant le clonage de la sous-unité b3 humaine. Elle est également au centre de mon travail au sein de l'équipe du Pr. P. Guilbault concernant l'expression et la caractérisation de récepteurs purinergiques dans le cerveau embryonnaire de cobaye.

1) Prélèvement des ovocytes

Les femelles *Xenopus Laevis* sont importées d'Afrique du Sud et acclimatées quelques mois avant leur utilisation. Elles sont élevées dans une eau déchlorée à 20°C sous une photopériode 12/12 et nourries deux fois par semaine avec du coeur de boeuf. Les femelles atteignent l'âge adulte vers 3-4 ans, néanmoins seule leur taille offre un critère extérieur de maturité.

Il est possible d'injecter quelque temps avant l'opération des hormones gonadotrophiques. Cette injection sous-cutanée permet de stimuler la production d'ovocytes par les ovaires. Cependant, l'influence d'une telle injection sur le nombre et le stade des ovocytes n'est pas toujours clairement visible.

Les femelles sont anesthésiées par immersion dans une solution à 0.2% de tricaine méthane sulfonate tamponnée à pH 7. Une incision des plans cutanés et musculaires est pratiquée au niveau iliaque et les sacs ovariens sont déposés dans un milieu physiologique.

Il est possible d'utiliser plusieurs fois la même femelle, cependant nous avons préféré utiliser des animaux dont la dernière opération remontait à six mois.

2) Solutions physiologiques

Le ND 96 dont la composition suit est la solution utilisée pour toute les opérations concernant la dissection et le maintien en survie des ovocytes.

ND 96 :

NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1.8 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	5 mM, pH 7,4 avec NaOH

Pour la survie des ovocytes, 100UI/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine sont ajoutés. Les milieux sont filtrés et maintenus en condition stériles.

3) Isolement des ovocytes

L'isolement des ovocytes consiste à extraire les cellules ovocytaires des différentes enveloppes membranaires qui les entourent, seule la membrane vitelline, structure acellulaire, reste intègre. Le protocole de dissociation mécanique, bien que demandant un "tour de main"

s'est avéré le plus fiable *versus* le protocole de dissociation enzymatique. En effet, ce dernier faisant appel à l'utilisation de la collagénase à une concentration de 1mg/ml en milieu ND privé de calcium s'est avéré très dépendant du lot de collagénase utilisé.

4) Microinjection des ARN messagers ou ADN plasmidiques.

L'injection d'ARN messagers ou d'ARN complémentaire (abus de langage désignant des ARN messagers transcrits *in vitro* à partir d'un ADN complémentaire) s'effectue dans le cytoplasme de l'ovocyte. Par contre, l'injection d'ADN s'effectue dans le noyau de ovocyte. Différents types d'injecteurs ont été utilisés. Tous fonctionnaient de manière pneumatique, du plus simple : une seringue de 50ml munie d'un tuyau et d'un porte-micropipette; au plus complexe faisant appel à deux électrovannes et une bouteille d'azote en tant que véhicule gazeux. Tous ces dispositifs permettent d'obtenir un volume d'injection relativement contrôlé et fiable. Le volume d'injection requis est de l'ordre de 50nl pour l'ARN et de 10nl pour l'ADN.

5) Dispositif électrophysiologique et expérimental

a) Potentiel imposé par la technique de double microélectrode

Toutes les données électrophysiologiques présentées dans ce manuscrit ont été réalisées par la technique de potentiel imposé en double microélectrode. Cette technique est la plus utilisée sur l'ovocyte de Xénope.

Brièvement, l'intérêt de cette technique est basée sur les caractéristiques d'application du voltage de commande (V_c).

L'électrode de voltage (ME1) lit la différence de potentiel existant entre la face intérieure et extérieure de la membrane de l'ovocyte par comparaison avec une électrode de référence placée dans le bain.

L'électrode de courant (ME2) injecte une quantité de charge suffisante pour amener le potentiel de membrane (PM) à la valeur fixée par V_c . Tout mouvement d'ion transitant à travers la membrane va tendre à faire varier le PM, ME2, en réponse, injecte un courant égal en intensité à celui porté par les ions. C'est ce courant qui est enregistré.

L'installation électronique doit répondre à certaines caractéristiques afin de permettre une imposition stricte du potentiel et donc une injection rapide du courant.

- le gain de l'amplificateur doit être élevé afin que le PM lu par ME1 soit le plus proche possible de celui fixé par V_c .

- une réponse impulsionnelle rapide est nécessaire afin de contrôler le PM pendant le décours des courants capacitifs et ioniques transitoires.

L'amplificateur que nous avons utilisé pour les enregistrements présentés ici est un amplificateur DAGAN de type TEV-200. Il possède un voltage de sortie de 130volts dans les deux sens ce qui permet de "clamper" des courants d'amplitude importante.

Les microélectrodes sont obtenues par étirement vertical d'un verre dur. Leur résistance varie entre 0.1 et 2M Ω et elles sont remplies de KCl 3M. L'électrode de référence est constitué par un pont agar-KCl de résistance quasi nulle.

L'amplificateur est interfacé par le biais d'une carte stimulation-acquisition (TECMAR-TM40) à un ordinateur de type IBM PC-AT. Cette carte est gérée par le logiciel pClamp (Axon instruments Inc. CA) qui permet de fixer les paramètres de stimulation et d'acquisition ainsi que d'analyse.

La cuve expérimentale est constituée par deux chambres de 300 μ l. La première chambre dans laquelle est placé l'ovocyte est reliée à deux arrivées de perfusion par gravité. La solution physiologique utilisée est le ND96 précédemment décrit. Pour l'enregistrement des courants de baryum, la solution suivante est utilisée : BAMS :

Ba(OH) ₂	40 mM
NaOH	50 mM
KOH	1 mM
HEPES	5 mM

Les drogues sont appliquées soit à l'aide du système de perfusion soit directement dans le bain. Toutes les précautions d'usage sont prises lors de la préparation des drogues, et les solutions mères sont stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Chapitre 4 : Résultats

Article 1 : Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage dependent calcium channel β subunit from normal human heart

Introduction supplémentaire

La biologie moléculaire de la sous-unité β a débuté en 1989 avec le clonage de la sous-unité β de muscle squelettique de lapin (Ruth et coll., 1989). A partir de cet ADN complémentaire, il semblait donc possible de cribler des banques de tissu cardiaque afin d'isoler l'isoforme cardiaque de β ou de montrer son identité avec la forme du muscle squelettique. Des tentatives effectuées dans cette optique se sont toutes soldées par un échec (A. Schwartz, communication personnelle; Perez-Reyes et coll., 1992). La stratégie de l'époque pour cloner les " β cardiaques " était la suivante : recloner tout d'abord avec une sonde de $\beta 1a$, la sous-unité β de cerveau de rat (Pragnell et coll., 1991; $\beta 1b$) et utiliser celle-ci comme sonde pour cribler une banque de coeur. A mon arrivée dans le laboratoire du Pr. A. Schwartz, j'ai effectué le reclonage de $\beta 1b$ à partir d'une banque de cerveau de rat. A cette période, est paru l'article de Perez-Reyes et coll. (1992) montrant l'existence de la sous-unité $\beta 2$ dans le coeur de rat. Du fait de la parution de cet article et pour éviter toute forme de *bis repetita*, nous avons décidé de nous intéresser aux isoformes cardiaques de β dans l'espèce humaine. C'est ainsi qu'en utilisant des banques d'ADN complémentaire de coeur humain, nous avons cloné trois isoformes de la sous-unité β dont une était l'homologue humain exact de la sous-unité β de muscle squelettique de lapin. La présence d'une telle isoforme au niveau cardiaque semble donc être une particularité de l'espèce humaine puisque elle n'a pas été depuis retrouvée à ce même niveau dans les espèces animales étudiées. Les deux autres isoformes sont, quand à elles, caractéristiques du système nerveux central. En effet, nous avons cloné l'homologue humain de $\beta 1b$ ainsi qu'une isoforme très proche des deux précédentes qui elle avait été caractérisée dans le cerveau humain (Williams et coll., 1992). Enfin, la sous-unité $\beta 2$, considérée comme spécifique du tissu cardiaque chez le rat et le lapin, n'est pas présente dans le coeur humain.

L'ensemble des données constituant cet article, tout en renforçant l'idée du "gène $\beta 1$ ", montre que la répartition tissulaire des sous-unités β n'est pas superposable à celle de la sous-unité $\alpha 1$.

Brief Definitive Communication

Molecular Cloning of Three Isoforms of the L-Type Voltage-Dependent Calcium Channel β Subunit From Normal Human Heart

Thibault Collin, Jing-Jing Wang, Joël Nargeot, and Arnold Schwartz

We have cloned and sequenced cDNAs for three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel β subunit isolated from a normal human heart cDNA library. One of these subunits, designated β_a , hybridized with a 3.4-kb message, and the other two, designated β_b and β_c , hybridized with a message of approximately 1.9 kb. The presence of both of these latter two messages in human heart was confirmed by polymerase chain reaction methodology. Considering the differences between β_a and β_b/β_c , we find it likely that these messages may be encoded by two different gene sequences, β_a and β_b/β_c , and that the β_b/β_c sequence can be alternatively spliced in the 209–260 region. The data suggest that the human heart presents a different pattern of β subunit expression from that found in the rat and rabbit heart. (*Circulation Research* 1993;72:1337–1344)

KEY WORDS • β subunits • calcium channels • cDNA cloning • human heart

L-type voltage-dependent calcium channels exist in a wide variety of cell types. Intracellular calcium contributes to a wide range of physiological functions, including muscle contraction and secretion of neurotransmitters and hormones. Among the L-type voltage-dependent calcium channels, the most extensively studied in terms of structure is the skeletal muscle isoform. This isoform consists of four subunits (α_1 , α_2 - δ , β , and γ), which have been biochemically characterized¹ and cloned.² The α_1 subunit bears the pore and the drug-binding sites²; the other subunits, particularly the β subunit, appear to regulate α_1 subunit activity.^{3–7} The first β subunit was isolated by Ruth et al.⁸ from rabbit skeletal muscle. Several isoforms of the skeletal muscle type- β subunit have been identified to date in various tissues, including rat brain,^{9,10} rat and rabbit heart,^{10,11} and human brain and skeletal muscle.^{12,13} In the case of rabbit heart, three distinct isoforms (designated CaB_{2a}, CaB_{2b}, and CaB₃) have been identified. A so-called β_2 subunit¹⁰ expressed in rat heart and brain is identical to CaB_{2a} of Hullin et al.¹¹ These isoforms have been described in terms of tissue specificity. In the present study, we report the cloning of three distinct isoforms from human heart (designated β_a , β_b , and β_c), and we present evidence that the β subunits expressed in human heart are different from

the putative “cardiac-type” isoforms stated above. However, β_a is highly similar to the rat brain subtype,⁹ β_b is identical to the human brain β ,^{12,13} and β_c is identical to the skeletal muscle isoform.^{8,13} Furthermore, by the criterion of Northern blot analysis at least two distinct transcripts for 1) β_a and 2) β_b and β_c were detected in human heart mRNA. Finally, a distinction at the mRNA level between β_b and β_c was carried out using polymerase chain reaction (PCR) experiments. Taken together, our data indicate that the human heart exhibits a pattern of β subunit expression different from that found in the rat and rabbit heart. Our data and analysis also suggest that all of the β subunit isoforms described, to date, are not tissue specific, as is the case for the α_1 subunit.²

Materials and Methods

Isolation of cDNA Clones and DNA Sequencing

An amplified human heart oligo dT and random-primed λ ZAPII cDNA library (Stratagene Inc., La Jolla, Calif.) was screened using a 0.9-kb rat brain β subunit probe corresponding to a brain β subunit isoform.⁹ The strategy of using a rat brain β subunit to obtain a β subunit from human heart derives from the studies of Ruth et al.,⁸ in which no hybridization signal was obtained when using a skeletal β probe and mRNA from heart or smooth muscle. This probe, obtained by screening a rat brain cDNA library with a skeletal muscle probe (kindly supplied by Dr. K.P. Campbell, University of Iowa College of Medicine, Iowa City), was labeled by random hexamer priming with [³²P]dCTP to a specific activity of 2×10^9 dpm/ μ g DNA. Filters were prehybridized for 5 hours in a solution composed of 50% formamide, 5 \times SSPE buffer, 5 \times Denhardt's solution, 0.5% sodium dodecyl sulfate, and 100 μ g/ml sonicated salmon sperm DNA at 42°C. The probe was added to a final concentration of 4×10^7 dpm/ml. Hy-

From the Department of Pharmacology and Cell Biophysics (J.-J.W., A.S.), University of Cincinnati College of Medicine (Ohio).

T.C. and J.-J.W. are to be considered as joint first authors.

Supported in part by National Institutes of Health grants T32 HL-07382-16, PO1 HL-22619-15, and 5R37 HL-43231-03. T.C. is supported by an M.R.T. Grant (France).

Address for correspondence: Dr. Arnold Schwartz, Department of Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati College of Medicine, 231 Bethesda Avenue, Cincinnati, OH 45267-0575.

Received August 17, 1992; accepted March 3, 1993.

bridization was carried out for 24 hours. Filters were washed at a final stringency of $0.1\times$ SSPE and 0.1% sodium dodecyl sulfate at 65°C for 1 hour. cDNA clones were obtained in pBluescript SK(-) by in vivo excision of the cDNA containing plasmid from the λ phage with helper phage R408. After restriction endonuclease mapping, the cDNA clones were sequenced using either single- or double-stranded templates by the dideoxy chain termination method using [32 S]dATP and Sequenase version 2.0 (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). Nucleotide sequences were verified by bidirectional sequencing reactions.

Northern Blot Analysis

Total RNA was isolated from human heart by the method described by Chomczynski and Sacchi.¹⁴ PolyA⁺ mRNAs were purified by oligo dT-cellulose chromatography (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, N.J.). Five micrograms polyA⁺ RNA from human heart was denatured and size-fractionated on 1% denaturing formaldehyde agarose gels. The RNA samples were transferred to Hybond C membrane (Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.) and fixed by baking for 2 hours at 80°C under vacuum. The transfers were prehybridized for 2 hours in a solution of $5\times$ SSPE, $5\times$ Denhardt's solution, 0.5% sodium dodecyl sulfate, and 100 μ g/ml sonicated salmon sperm at 65°C. The probe was added to a final concentration of 4×10^7 dpm/ml, and hybridization was carried out for 24 hours. The blots were sequentially washed to a final stringency of $0.1\times$ SSPE and 0.1% sodium dodecyl sulfate at 65°C for 1 hour. Hybridizing bands were visualized by autoradiography at -70°C with intensifying screens.

PCR Analysis

Analysis was performed using primers with sequences homologous to both β_b and β_c human cDNA. The 5' primer was 5'-GATGTGGTACTGGCACC-3', homologous to β_b and β_c nucleotides 583-600. The 3' primer was 5'-CCTGAGCGAGGTGAGCACC-3', homologous to β_b nucleotides 1,335-1,353 and β_c nucleotides 1,467-1,485. Reverse transcription was carried out using 1 μ g human heart polyA⁺ RNA and 1 unit AMV reverse transcriptase (Pharmacia LKB) in the buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, and 5 mM MgCl₂. The resulting first strand of cDNA was subjected to PCR analysis. The reaction mixture (100 μ l) contained 10 μ l of the reverse transcription mixture, 10 μ l of $10\times$ polymerase buffer (Amersham), 100 pmol of each primer, 200 μ M dNTPs, and 1 unit Hot Tub polymerase (Amersham). PCR was performed for 30 cycles with a 2-minute denaturation at 94°C, 2-minute annealing at 65°C, and 2-minute extension at 72°C. To rule out genomic DNA contamination in the RNA-PCR experiments, parallel PCR experiments were carried out using the same conditions but in the absence of reverse transcriptase. The reaction mixture was then electrophoresed on 3% sieving agarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) gels. Bands were isolated and sequenced.

Results

Five distinct recombinant clones were isolated from a λ ZAPII cDNA library after screening with a radiolabeled rat brain β subunit probe consisting of a 900-

nucleotide fragment of the β subunit reported by Pragnell et al.⁹ HH2 and HH16 presented an overlap of 313 nucleotides (Figure 1A). HH2 encompasses a region from nucleotide -47 to nucleotide +333, and HH16 encompasses a region from nucleotide +20 to nucleotide +2,294. A full-length cDNA, which we have designated β_a , coding for a 597-amino acid protein with a calculated molecular mass of 65,505 D, was generated using the 277 *Xho* I site (Figure 1A). The β_a cDNA shares 97% homology with the rat brain β subunit reported by Pragnell et al.⁹ However, there may be other differences in the 5' end of β_a , since the HH2 sequence was chosen to be the 5' end of β_a solely on the basis of the homology in the overlap region. The clones HH12 and HH28 displayed an overlapping region of 499 nucleotides. HH12 starts 15 nucleotides upstream from the ATG and ends at nucleotide +532. HH28 begins at nucleotide +33 and terminates at nucleotide +1,543. Merged together using the 512 *Pst* I site (Figure 1B), the two clones cover the complete open reading frame from nucleotide 1 to nucleotide 1,432 of a recently described human brain β subunit isoform.^{12,13} This constructed full-length message, designated β_b , encodes a 477-amino acid protein with a calculated molecular mass of 52,917 D. Clones HH9 and HH28 are identical except for a region of 21 bp encoding seven amino acids in HH28 (residues 209-215), which is not present in HH9. In the corresponding region and downstream (residues 209-260), clone HH9 has 156 bp encoding 52 amino acids that are different from those present in clone HH28. Clones HH12 and HH9 were merged using the 512 *Pst* I site, resulting in a full-length cDNA, designated β_c (Figure 1C). This cDNA encodes a 522-amino acid protein with a calculated molecular mass of 57,840 D. The cDNA is 92.3% homologous to the rabbit skeletal muscle β subunit.⁸ However, we have to consider that there might be other differences in the 5' end region of both β_b and β_c , since HH12 was chosen to be the 5' end only because of the homology in the overlap region. Nevertheless, the full-length clones β_b and β_c we constructed are identical to recently reported human brain and skeletal clones.¹³

Figure 2 shows the amino acid sequence of the human heart β subunit isoforms β_a , β_b , and β_c together with the rabbit skeletal muscle β subunit (β_{sk}). Compared with β_{sk} , β_a contains a different and longer carboxyl terminus as well as a region in which the 52 amino acids in β_{sk} (residues 210-261) have been substituted by seven different amino acids. The same replacement is also observed in β_b ; other regions of the molecule remain basically unchanged. The β_c subunit, which does not have the replacement, is highly similar to the rabbit skeletal muscle β isoform and completely identical to the human skeletal muscle β isoform recently described by Powers et al.¹³

The comparison between β_b and β_c cDNA at the nucleotide and amino acid levels is depicted in Figure 3. These clones are identical except for a region consisting of 52 amino acids in β_c (residues 209-260) and seven different amino acids in β_b (residues 209-215). In comparing both nucleotide and amino acid sequences of β_b and β_a , it is apparent that, although the amino acid sequence of the two isoforms is highly conserved, the differences in the nucleotide sequences are consistent with a two-gene concept (Figure 4).

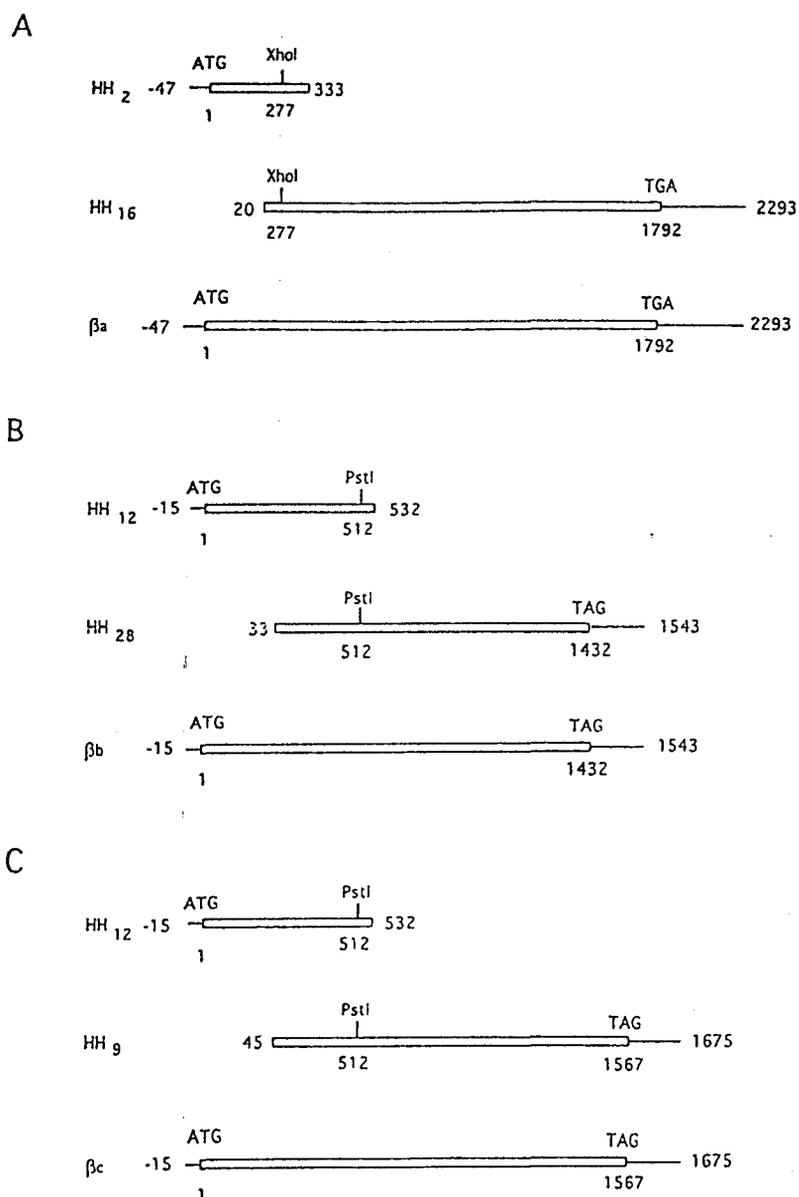


FIGURE 1. Schematic representation of the L-type voltage-dependent calcium channel β clones. The insert length and relative position of the open reading frame (open box) of five independent λ ZAP cDNA clones encoding β_a , β_b , and β_c are illustrated in panels A, B, and C, respectively.

We observed some interesting differences concerning the putative phosphorylation sites. The *in vitro* phosphorylated Ser¹⁸² of β_{sk} , which is thought to be of importance in the cAMP-dependent regulation of L-type voltage-dependent calcium channels,⁸ is not present in β_b and β_c . However, the putative cAMP phosphorylation site Thr²⁰⁵ is conserved among all of our clones. The potential protein kinase C phosphorylation site Ser²³⁸ that is not present in β_a and β_b is conserved in β_c . The β_a and β_b sequences do contain a protein kinase C site, but it is located at Ser²⁰⁹ (Figure 2).

The β subunit isoforms in human heart were probed by Northern blot analysis. Two specific probes were constructed to discriminate between β_a and the two closely related isoforms β_b and β_c . Using a fragment containing the unique 3' end of β_a , we detected a 3.4-kb message in human heart polyA⁺ RNA (Figure 5A, lane 2), indicating that the transcript size of the human is similar to its rat counterpart.⁹ A message of approximately 1.9 kb was revealed with a 249-nucleotide probe, which contained the 135 nucleotides missing from β_b

and 114 nucleotides that are common between the β_b and β_c clones (Figure 5A, lane 1).

To investigate the presence of distinct messengers encoding β_b and β_c , PCR experiments using human heart mRNA were conducted. Specific oligonucleotides surrounding the different region were designed (see "Materials and Methods") to generate PCR products of different sizes for the amplification of either the β_b or β_c message. The locations of these oligonucleotides in the clones are also indicated in Figure 3 to show that no β_a -derived product could be generated by using these primers. Figure 5B shows that both expected bands for β_b and β_c are present, displaying sizes of 771 and 903 bp, respectively. No amplification was found in the PCR in the absence of reverse transcriptase, which proves that there is no genomic DNA contamination in the RNA-PCR experiments. The PCR products were totally sequenced to verify their homology to the corresponding cDNAs. These results confirm the presence of these two isoforms in human heart mRNA.

β_{Sk}	MVQKTSMSRGPYPSPQEIPEMEVFDPSQPKYSKRKGRFKRSDGTSDDTTSNSFVRQGSAESYTSRPSDS	70
β_cR.....	69
β_bR.....	69
β_aSG.....QR.....	70
β_{Sk}	DVSLIEDREALRKEAERQALALEKAKTKPVAFVRTNVGYNPSGDEVPEYGVAITFEPKDFLHIKEY	140
β_cQ.....	139
β_bQ.....	139
β_aQ.....D.....	140
β_{Sk}	NNDWVIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSLRLLEQKLRQSLSSKSGDNSSSLGDVVYTGTRRPTPPASG	210
β_cN..G.....	209
β_bN..G.....	209
β_aTV..N.....A.....	210
β_{Sk}	NEMTHLAFELEPLDLEEDAELGEQSGSAKTSVSSVYTPPHGTRIPFFKKEHVPPYDVPVSMRPIILV	280
β_cD..E..E.....K.....	279
β_b	KOKQKS-----	234
β_a	KOKQKS-----S.....	235
β_{Sk}	GPSLKGVEYTDMMQKALFDLKHFRDGRISITRVYADISLAKRSVLNHPKSHIIERSNTRSSLAEVQSE	350
β_c	349
β_b	304
β_aLQHT.....	305
β_{Sk}	IERIFELARTLQLVALDADTINHQAQSLKTSLAPIIVYIKITSPKVLQRLIKSRGKSQSKHLNVQIAASE	420
β_c	419
β_b	374
β_aL.....	375
β_{Sk}	KLAQCPEMFDIILDENQLEDACEHLAEYLEAYWKATHPPSSTPPNLLNRTHATAALAASPAPVSNLQV	490
β_c	522
β_b	444
β_aI.....G.....	445
β_{Sk}	QVLTSLRRNLSFWGGLETSQRGGGAVPQQQEHAM	524
β_cG.....S.....SV...E.....	522
β_bG.....S.....SV...E.....	477
β_a	PY·A·GDQP·DRAT·EHA·VHEYPGELGQPPGLYPSNHPPGRAGTLWALSQRDTFDADTPGSRNSAYTEP	515
β_a	GDSCVDMETDPSGEGPDPAGGGTTPARQGSWEEDYEEEMTDNRRNRGRNKARYCAEGGPPVLGRNKN	585
β_a	ELEGWGGVYIR	597

FIGURE 2. The amino acid sequence of the human heart subunits β_a , β_b , and β_c (as predicted from the cloned cDNAs; the nucleotide sequences for these three β isoforms have been submitted to the Genbank with accession numbers L06110, L06111, and L06112, respectively) compared with the rabbit skeletal muscle β subunit (β_{Sk}). Regions of sequence identity are represented by dots, and gaps in the sequences are indicated by dashes. The putative sites for phosphorylation are indicated above the sequences with the following symbols: #, Ser¹⁸² and Thr²⁰⁵ cAMP-dependent protein kinase consensus sites; *, Ser²⁰⁹ Ser²³⁸ protein kinase C consensus sites.

Discussion

The present report describes the molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel β subunit from normal human heart. These isoforms have interesting tissue expression characteristics. In particular, β_a is identical to the previously described β subunit from rat brain,⁹ β_b has been found in human brain,^{12,13} and β_c is homologous to β_{Sk} ⁸ and identical to the human skeletal muscle β isoform.¹³

The serine (Ser¹⁸²) of β_{Sk} , which is phosphorylated in vitro by cAMP-dependent protein kinase, is thought to be of importance in calcium channel regulation.⁸ It is of interest that this putative phosphorylation site is not found in β_b and β_c . Thr²⁰⁵ is present, however, in all of our isoforms. Nonetheless, experiments on human cardiac myocytes clearly demonstrate that the L-type voltage-dependent calcium channel is sensitive to cAMP-dependent phosphorylation.¹⁵ However, protein kinase C site Ser²³⁸, found in β_{Sk} and β_c , is not present in our β_a and β_b isoforms. The observation that some phosphorylation sites are conserved in all of the human heart β isoforms and others are exclusive to one or two of them may imply specific functional correlates. The absence of 45 amino acids in both β_a and β_b removes the second putative α -helical domain proposed for the rabbit skeletal muscle β subunit.⁸ It remains to be determined if this causes a change in the secondary structure.

As depicted in Figure 3, the sequences of β_b and β_c are identical, with the exception of a region of 52 amino acids in β_c (Figure 3, sequence C) that is replaced by seven different amino acids in β_b (Figure 3, sequence B). Genomic sequence analysis of the corresponding portion reported recently by Powers et al¹³ demonstrates that this difference arises from alternative splicing of a primary transcript, which is a common mechanism for the generation of multiple isoforms of a protein from a single transcript.¹⁶

Whereas β_a is highly homologous to β_b at the amino acid level (Figure 4), there are numerous differences at the nucleotide level in the conserved region as well as completely different carboxyl termini compared with β_b , which suggests that the calcium channel β subunits in human cardiac muscle are derived from two different genes, one encoding β_a and another encoding β_b and β_c . Recently, Powers et al¹³ claimed that human β subunits isolated from brain and skeletal muscle are derived from a single gene that is alternatively spliced. In our opinion, more gene-counting experiments such as Southern blots, S1 nuclease mapping, and PCR using genomic DNA are required to establish the genomic pattern of human β subunits.

The subunits described in human heart were investigated by 1) Northern blot and 2) PCR experiments on first-strand cDNA. Northern blot analysis allowed us to distinguish between the β_a and the two closely related β_b

	H V Q K T S M S R G P Y P P S Q E I P H E V F D P S P R K Y S K R	33
β_b	ATGGTCAGAGACCAAGATGTCGGGGGCGCTTACCCACCCCTCCAGGAGATCCCATGGAGGTTCTGACCCCAAGCCCG CGAAATACAGCAAGA	97
	
β_a	ATGGTCAGAGAGCGGGATGTCGGGGGCGCTTACCCACCCCTCCCAAGAGATCCCATGGAGGTTCTGACCCCAAGCCCAAGCGAAATACAGCAAGA	100
	H V Q K S Q M S R G P Y P P S Q E I P H E V F D P S P Q R K Y S K R	34
	K G R F K R S D G S T S S D T T S N S F V R Q G S A E S Y T S R P	66
β_b	GGAAAGGGCGATTCAAAAGGTCAGATGGGAGCAGCTCTCGGATACCCACATCAACAGCTTTGTCGGCCAGGGCTCAGCGGAGTCTACACAGCCGCTCC	197
	
β_a	GGAAAGGGCGATTCAAAAGGTCAGATGGGAGCAGCTCTCGGATACCCACATCAACAGCTTTGTCGGCCAGGGCTCAGCGGAGTCTACACAGCCGCTCC	200
	K G R F K R S D G S T S S D T T S N S F V R Q G S A E S Y T S R P	67
	S D S D V S L E E D R E A L R K E A E R Q A L A Q L E K A K T K P	99
β_b	ATCAGACTCTGATGTATCTCTGGAGGAGGACCGGAAAGCTTAAGGAAGGAGCAGAGCCGAGCATTAGCCAGCTCGAGAAAGCCCAAGCCAAAGCCA	297
	
β_a	GTCCAGACTCTGAGCTGTCTGGAGGAGGACCGGAAAGCTTAAGGAAGGAGCAGAGCCGAGCATTAGCCAGCTCGAGAAAGCCCAAGCCAAAGCCA	300
	S D S D V S L E E D R E A L R K E A E R Q A L A Q L E K A K T K P	100
	V A F A V R T N V G Y N P S P G D E V P V Q G V A I T F E P K D F L	133
β_b	GTGGCATTGCTGTGGGACCAATGTTGGCTACAATGCTCTCCAGGGGATGAGGTGCTGTGACGGGATGGCCATCACTCTGGAGCCCAAGACTTCC	397
	
β_a	GTGGCATTGCTGTGGGACCAATGTTGGCTACAATGCTCTCCAGGAGATGAGGTGCTGTGACGGGATGGCCATCACTCTGGAGCCCAAGACTTCC	400
	V A F A V R T N V G Y N P S P G D E V P V Q G V A I T F E P K D F L	134
	H I K E K Y N N D W H I G R L V K E G C E V G F I P S P V K L D S	166
β_b	TGCACATCAAGGAGAAATACAATAAGTCTGGTGGATCGGGGCGCTGTGAAGGAGGCTGTGAGGTTGGCTTCATCCAGCCCGCTCAAACTGGACAG	497
	
β_a	TGCACATCAAGGAGAAATACAATAAGTCTGGTGGATCGGGGCGCTGTGAAGGAGGCTGTGAGGTTGGCTTCATCCAGCCCGCTCAAACTGGACAG	500
	D I K E K Y N N D W H I G R L V K E G C E V G F I P S P V K L D S	167
	L R L L Q E Q K L R Q N R L G S S K S G D N S S S S L G D V V T G	199
β_b	CCTTCGCTGCTGACGAAACAGAGCTGCGCCAGAACCCGCTCGCTCCAGCAAAATCAGCCGATCACTCCAGTCTGGGAGATGGTGACTGGC	597
	
β_a	CCTTCGCTGCTGACGAAACAGAGCTGCGCCAGAACCCGCTCGCTCCAGCAAAATCAGCCGATCACTCCAGTCTGGGAGATGGTGACTGGC	600
	L R L L Q E Q V R Q N R L S S K S G D N S S S S L G D V V T G	200
	T R R P T P P A S A K Q K Q K S T E H V P P Y D V V P S H R P I I L	233
β_b	ACCCGCGCCCAACCCCTGCCAGTGCACAAACAGAGGAGAGTGCACAGAGCATGTGCCCCCTGACGTGGTGCCTTCCATGAGCCCATCATCC	697
	
β_a	ACCCGCGCCCAACCCCTGCCAGTGCACAAACAGAGGAGAGTGCACAGAGCATGTGCCCCCTGACGTGGTGCCTTCCATGAGCCCATCATCC	700
	T R R P T P P A S A K Q K Q K S E H V P P Y D V V P S H R P I I L	234
	V G P S L K G Y E V T D M H Q K A L F D F L K H R F D G R I S I T	266
β_b	TGTTGGAGCCGCTGCTCAAGGCTACAGGTTACAGACATGATGAGAAAGCTTATTTGACTTCTGAAGCATCGTTTATGAGGAGATCTCCATCAC	797
	
β_a	TGTTGGAGCCGCTGCTCAAGGCTACAGGTTACAGACATGATGAGAAAGCTTATTTGACTTCTGAAGCATCGTTTATGAGGAGATCTCCATCAC	800
	V G P S L K G Y E V T D M H Q K A L F D F L K H R F D G R I S I T	267
	R V T A D I S L A K R S V L N N P S K H I I E R S N T R S S L A	299
β_b	TCGTTGACGGCAGATATTCCTGCTAAGCCGCTCAGTTCTCAACAACCCAGCAACACATCATCATTGAGCG CTCCAACACAGCTCCAGCTGGC	896
	
β_a	TCGTTGACGGCAGATATTCCTGCTAAGCCGCTCAGTTCTCAACAACCCAGCAACACATCATCATTGAGCGACTCCAACACAGC TCCAGCCTGGC	899
	R V T A D I S L A K R S V L N N P S K H I I E R S N T R S S L A	300
	E V Q S E I E R I F E L A R T L Q L V A L D A D T I N H P A Q L S	332
β_b	TGAGTGCAGAGTGAATTCAGCGAATCTTCAGGCTGGCCGAGCCCTTCAGTTGGTGCCTTGGATGCTGACACCATCAATACCCAGCCAGCTGTCC	996
	
β_a	TGAGTGCAGAGTGAATTCAGCGAATCTTCAGGCTGGCCGAGCCCTTCAGTTGGTGCCTTGGATGCTGACACCATCAATACCCAGCCAGCTGTCT	999
	E V Q S E I E R I F E L A R T L Q L V A L D A D T I N H P A Q L S	333
	K T S L A P I I V Y I K I T S P K V L Q R L I K S R G K S Q S K H L	366
β_b	AAGCCTCGCTGGCCCAATCATGTTTACATCAAGATCACTCTCCCAAGGACTTCAAAAGGCTCATCAAGTCCGAGGAAAGTCTCAGTCCAAACACC	1096
	
β_a	AAAACCTCGCTGGCCCAATCATGTTTACATCAAGATCACTCTCCCAAGGACTTCAAAAGGCTCATCAAGTCCGAGGAAAGTCTCAGTCCAAACACC	1099
	K T S L A P I I V Y K I T S P K V L Q R L I K S R G K S Q S K H L	367
	N V Q I A A S E K L A Q C P P E M F D I I L D E N Q L E D A C E H	399
β_b	TCATGTCCAAATAGCGGCTGGAAAGCTGGCAGTGGCCCTGAAATGTTGACATCATCTGGATGAGAACCAATGGAGGATGCTCCGAGCA	1196
	
β_a	TCATGTCCAAATAGCGGCTGGAAAGCTGGCAGTGGCCCTGAAATGTTGACATCATCTGGATGAGAACCAATGGAGGATGCTCCGAGCA	1199
	N V Q I A A S E K L A Q C P P E M F D I I L D E N Q L E D A C E H	400
	L A E Y L E A Y W K A T H P P S S T P P N P L L N R T M A T A A L	432
β_b	TCTGGCGAGTACTTGGAAAGCTATTGGAAAGCCACACCCGCGCAGCAGCCACCAATCCGCTGCTGAACCGACCATACCCAGCCGCTG	1296
	
β_a	TCTGGCGAGTACTTGGAAAGCTATTGGAAAGCCACACCCGCGCAGCAGCCACCAATCCGCTGCTGAACCGACCATACCCAGCCGCTG	1299
	L A E Y L E A Y W K A T H P P S S T P P N P L L N R T M A T A A L	433
	A A S P A P V S N L Q V Q V L T S L R R N L G F W G G L E S S Q R G	466
β_b	GCTGCCAGCCCTGCCCTGTCTCCAACTCCAGGTACAGGTGCTACCTCGCTCAGGAGAAACCTCGGCTTCTGGGGGGGCTGGAGTCTCACAGCGGG	1396
	
β_a	GCTGCCAGCCCTGCCCTGTCTCCAACTCCAGGTACAGGTGCTACCTCGCTCAGGAGAAACCTCGGCTTCTGGGGGGGCTGGAGTCTCACAGCGGG	1399
	A A S P A P V S N L Q G P Y L A S G D Q P L D R A T G E H A S N E	467
	S V V P Q E Q E H A H <	477
β_b	GCAAGTGTGGTCCCCAGGAGCAGGAACATGCCATGTAG	1437
	
β_a	AGTACCCCGGGAGCTGGCCAGCCCGAGCCCTTTACCCAGCAACCCACCCCTGGCCGGGAGCCGCTGTGGCCGCTATCCCGCAAGACACCTT	1499
	<u>Y P O E L G Q P P G L Y P S H K P P G R A G T L W A L S R Q D T F</u>	500
	TGATGCTACACCCCGGAGCCGAAACTGCTACACGGAGCCAGGACTGCTGTGGACATGGAGACAGACCCCTCAGAGCCCGCCAGCCGCTGGA	1599
	<u>D A D T P G R N S A Y T P E R G D S C V D M E T D P E E G F G F G</u>	533
	GACCCCTCAGGGGAGTACACACACAGCTCGGCAAGGCTCTGGAAAGAGGAGAAATGATGAGGAGGATGACCCGACACAGGAAACCCCGGCGGA	1699
	<u>D P A G G G T P P A R Q S W E E E D Y E E M E T D E R R R G R M</u>	567
	ATAAGCCCGCTACTGTGGGAGGCTGGGCGGCTTCTGGGGCCAAATAAGATGAGCTGGAGGGCTGGGGCAAGGCTGTACATCCGCTGA	1793
	<u>K A R Y C A E G G G P V L G R N K K E L E G W S Q Q V Y I R <</u>	597

FIGURE 4. Nucleotide and amino acid comparison between human heart subunits β_a and β_b . Nucleotide similarities are indicated by colons between the identical bases. Amino acid differences are underlined in the β_a sequence. The differences at the nucleotide level indicate that these subunits are encoded by two different gene sequences.

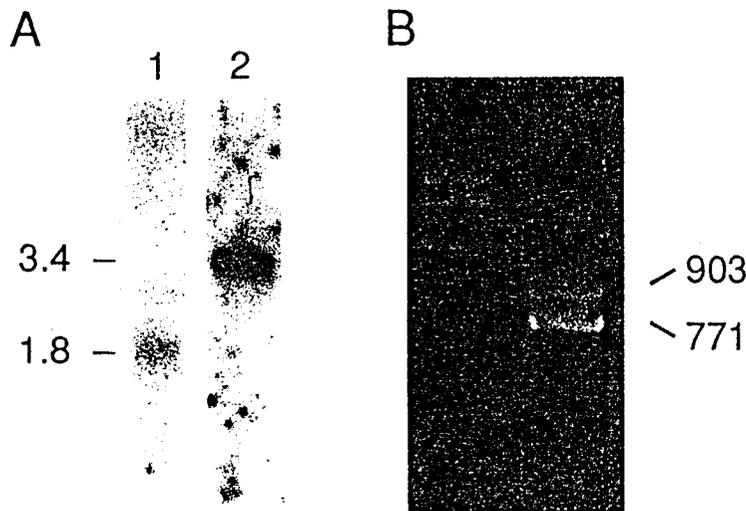


FIGURE 5. Panel A: Northern blot analysis of human heart mRNA using the following probes: lane 1, an Nsp I (575)–BstXI (824) β_c -derived fragment that includes 135 bp of the exon unique to β_c ; lane 2, an Apa I (1,564)–EcoRI (EcoRI site of pBluescript SK(+)) β_a -derived fragment that includes the 3' end sequence unique to β_a . Panel B: Electrophoresis of the polymerase chain reaction products obtained using primers surrounding the deletion area of β_b , showing two distinct bands of 771 bp and 903 bp for β_b and β_c , respectively.

are very similar at the amino acid level, but considering the obvious differences at the nucleotide level, Hullin et al claimed that at least three genes encode the β subunits: one for the skeletal muscle-derived subtypes, another for the CaB₂-related subunits, and the last for the CaB₃ subtype. Interestingly, using a rat brain cDNA library and a skeletal muscle probe, we cloned a CaB₃ subtype (unpublished data). Subsequently, we screened the human heart library with this CaB₃ clone and performed Northern blot analysis (data not shown), yet we did not get any CaB₃-related message. The reason we were unable to detect either CaB₂- or CaB₃-related subtypes in human heart may be due to 1) the low abundance of these messages in the tissue or 2) their absence. The number of β subunit isoforms we found in human heart to date, although interesting, may still not constitute the entire population.

Our results demonstrate that at least three β isoforms are present in human cardiac tissue. β_a and β_b also have been found in rat and human brain.^{9,12,13} It is of considerable interest that a skeletal muscle isoform is present in human heart.

It would be interesting to investigate whether each type of isoform represents a cell-type specificity, since it is well-known that cardiac muscle is comprised of numerous different cell types. It is intriguing to suggest, for example, that some message could be solely expressed in ventricular myocytes, others in atria, and still others, such as the "brain isoform," in the specialized conducting tissue. The use of the total heart to generate a cDNA library is probably responsible for the multitude of isoforms. Each of the isoforms described here, and possibly others, may give rise to a different function in the diverse cell subpopulation of the heart.

Overall, the array of β subunits that have emerged from cloning strategies from a number of laboratories presents a complex picture of structural variants and a nomenclature that begs for simplification. Unfortunately, the picture at present is so incomplete that any

attempt in this direction might be counterproductive. At this time, we can state that at least three isoforms (β_a , β_b , and β_c) of the L-type voltage-dependent calcium channel β subunit exist in the human heart and that these subunits are probably derived from two different genes, one encoding β_a and another one encoding β_b and β_c . The latter two can be alternatively spliced in the 209–260 region. These isoforms do not appear to be tissue specific, since all of them have been found in brain and skeletal muscle.

Acknowledgments

We are thankful to Dr. P. Lory for critical review of the manuscript. We thank D. Schultz for providing the human heart polyA⁺ RNA. We also wish to thank Dr. G. Mikala and Dr. Y. Mori for their helpful comments during the accomplishment of this work and Dr. K.P. Campbell for the generous supply of a skeletal muscle β subunit clone. We also thank Liz Wendelmoot for typing the manuscript.

References

- Hosey MM, Lazdunski M: Calcium channels: Molecular pharmacology, structure and regulation. *J Membr Biol* 1988;104:81–105
- Miller RJ: Voltage sensitive Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 1992;267:1403–1407
- Varadi G, Lory P, Schultz D, Varadi M, Schwartz A: Acceleration of activation and inactivation by the β subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 1991;352:159–162
- Lory P, Varadi G, Schwartz A: The β subunit controls the gating and dihydropyridine sensitivity of the skeletal muscle Ca²⁺ channel. *Biophys J* 1992;63:1421–1424
- Klößner U, Itagaki K, Bodi I, Schwartz A: β subunit expression is required for cAMP-dependent increase of cloned cardiac and vascular calcium channel currents. *Pflügers Arch* 1992;420:413–415
- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N: The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 1991;253:1553–1557
- Wei X, Perez-Reyes E, Lacerda AE, Schuster G, Brown AM, Birnbaumer L: Heterologous regulation of the cardiac Ca²⁺ channel α_1 subunit by skeletal muscle β and γ subunits. *J Biol Chem* 1991;266:21943–21947
- Ruth P, Rohrkasten A, Biel M, Bosse E, Regulla S, Meyer HE, Flockerzi V, Hofmann, F: Primary structure of the β subunit of

- the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 1989;245:1115-1118
9. Pragnell M, Sakamoto J, Jay SD, Campbell KP: Cloning and tissue specific expression of the brain calcium channel β subunit. *FEBS Lett* 1991;291:253-258
 10. Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Baggstrom E, Lacerda AE, Wei X, Birnbaumer L: Cloning and expression of a cardiac/brain β subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* 1992;267:1792-1797
 11. Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V: Calcium channel β subunit heterogeneity: Functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J* 1992;11:885-890
 12. Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM: Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunit of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 1992;8:71-84
 13. Powers PA, Liu S, Hogan K, Gregg RG: Skeletal muscle and brain isoforms of a β -subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J Biol Chem* 1992;267:22967-22972
 14. Chomczynski P, Sacchi X: Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
 15. Ouadid H, Seguin J, Chaptal PA, Richard S, Nargeot J: Properties of Ca channels in adult human atrial cells. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:41-54
 16. Smith CWJ, Patton JG, Nadal-Ginard B: Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu Rev Genet* 1989; 23:527-577

Discussion complémentaire

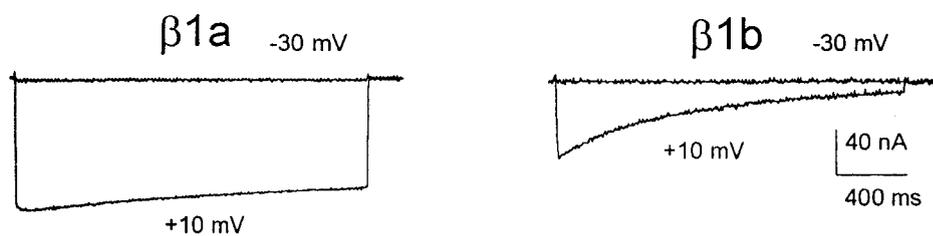
Différents points énoncés dans cet article réclament une discussion complémentaire.

Avant son acceptation finale dans *Circulation Research*, est paru l'article de Powers et coll., (1992) décrivant l'appartenance des trois sous-unités que nous avons clonées à la famille du gène $\beta 1$. Notre article est resté plus prudent quand à la provenance des trois messagers. Ceci était justifié par l'existence de certaines différences dans les parties conservées entre βa (appelée maintenant $\beta 1b$) et les deux autres ADN complémentaires. Ce problème subsiste puisqu'il n'a pas été réglé par l'article de Powers et coll. (1992). De même, un certain nombre d'erreurs de séquence ainsi que d'iconographie perturbent la compréhension de la figure de comparaison de séquences de leur article. Par ailleurs, ni la totalité des séquences introniques, ni les jonctions introns-exons ne sont détaillés. Afin de résoudre ces points de litige, un certain nombre d'expériences devraient être réalisées. Tout d'abord, il serait nécessaire de séquencer précisément la totalité du gène $\beta 1$. Ensuite, un mapping à la nucléase S1 serait indispensable à la connaissance des véritables jonctions introns-exons. Des travaux complémentaires concernant le promoteur du gène $\beta 1$ serait aussi requis afin de savoir comment est régulée sa transcription.

Le second problème soulevé par cet article concerne la répartition tissulaire des produits du gène $\beta 1$. Nous avons montré en utilisant les techniques de Northern blot et de RT-PCR que les trois produits connus du gène $\beta 1$ étaient exprimés au niveau du coeur humain. De même, Powers et coll. (1992) ont montré que $\beta 1a$ est également présente dans le muscle squelettique humain. Par ailleurs, l'expression de $\beta 1c$ dans le cerveau humain a été montrée par Williams et coll. (1992). Cependant, aucune preuve de l'expression de $\beta 1b$ dans le cerveau humain n'est disponible : Powers et coll. (1992) ont effectué leur analyse en Northern blot avec des ARN messagers de souris; Williams et coll. (1992) rapportent qu'ils ont isolé un fragment d'une autre sous-unité β , mais aucune donnée concernant celle-ci n'est parue à ce jour.

Enfin, notre article ne présente aucune donnée relative à l'expression fonctionnelle de ces sous-unités. Lorsque j'ai quitté le laboratoire du Pr. A. Schwartz, je n'ai pas été autorisé à emporter les ADN complémentaires que j'avais clonés. Nous avons projeté de réaliser l'expression fonctionnelle de celles-ci mais cela n'a pu se réaliser. Cependant, un certain nombre d'articles provenant du laboratoire d'A. Schwartz montrent l'expression de sous-unité $\alpha 1$ associées à des sous-unité $\beta 1$ humaines (Schultz et coll., 1993; Mikala

et coll., 1993; Tang et coll., 1993; Wakamori et coll., 1993 et Tang et coll., 1994). A mon retour en France, dans le laboratoire du Pr. J. Nargeot, j'ai entrepris le clonage de sous-unités β à partir d'une banque d'embryon humain (voir article suivant). Ceci m'a permis de recloner rapidement $\beta 1a$ et $\beta 1b$. Disposant alors de ces ADN complémentaires, nous avons pu en étudier l'expression fonctionnelle dans l'ovocyte de Xénope. Comme il avait été précédemment rapporté (Williams et coll., 1992), ces sous-unités sont apte à modifier le courant de baryum circulant au travers du canal calcique endogène de l'ovocyte de Xénope comme le montre la figure ci-dessous.



Les tracés de cette figure, enregistrés en condition de potentiel imposé montrent clairement l'effet amplificateur de la sous-unité β sur les canaux calciques endogènes de l'ovocyte de Xénope. Nous pouvons également remarquer que β est capable de modifier la cinétique d'inactivation du courant endogène de l'ovocyte, et ce d'une manière propre à chaque isoforme.

Article 2 : Cloning, chromosomal location and functional expression of the human voltage dependent calcium channel $\beta 3$ subunit

Introduction supplémentaire

Ce travail a débuté grâce à une collaboration avec le Dr. P. Berta qui travaille sur le gène SRY au CRBM. P. Berta avait en effet pour projet de construire des banques d'ADN complémentaire d'embryon humain, ceci seulement après avoir obtenu l'accord du Comité National d'Ethique. Ayant déjà travaillé sur des banques d'ADN complémentaire humain, je fus tout de suite intéressé par un criblage de ces banques avec une sonde de sous-unité β . Ce criblage, comme je l'ai mentionné précédemment, nous a donné les ADN complémentaires de $\beta 1a$ et $\beta 1b$. De plus, il nous a été possible de cloner l'homologue humain de $\beta 3$. Cet article montre que la protéine codée par cet ADN complémentaire est très proche de celle caractérisée chez le rat. Nous avons réalisé une étude de sa répartition tissulaire par Northern blot sur de l'ARN messager humain adulte. Le signal le plus important a été obtenu avec de l'ARN de cerveau. Pourtant, des auteurs ayant travaillé sur le cerveau humain (Williams et coll., 1992) n'avaient pas isolé $\beta 3$ mais $\beta 1c$. Nous avons également remarqué que ce messager était fortement exprimé dans l'ovaire, tissu dans lequel les canaux calciques sont peu étudié. Enfin l'expression importante de $\beta 3$ dans les tissus d'origine musculaire lisse est un point qui a tout particulièrement retenu notre attention. En effet cette isoforme peut être impliquée de façon importante dans la régulation des courant calciques d'aorte qui sont étudiés au laboratoire par le Dr. S. Richard.

L'expression fonctionnelle de $\beta 3$ a été réalisée dans un modèle désormais classique au laboratoire : l'ovocyte de Xénope. Comme les autres sous-unité β , $\beta 3$ engendre une augmentation de l'amplitude du courant de baryum endogène de l'ovocyte de Xénope. Celle-ci entraîne de plus, une accélération notable de sa cinétique d'inactivation.

En collaboration avec le Dr. S. Taviaux, du CRBM, nous avons réalisé la localisation chromosomique de $\beta 3$. En utilisant la technique de marquage fluorescent sur des chromosomes métaphasiques humains, $\beta 3$ a été localisée sur le chromosome 12 en position q13.

Cloning, chromosomal location and functional expression of the human voltage-dependent calcium-channel β_3 subunit

Thibault COLLIN¹, Philippe LORY¹, Sylvie TAVIAUX¹, Christophe COURTIEU², Pierre GUILBAULT³, Philippe BERTA¹ and Joël NARGEOT¹

¹ Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, CNRS UPR9008, INSERM U249, Montpellier cedex, France

² Service de gynécologie-obstétrique, Hôpital Carremeau, Nîmes, France

³ Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université des Sciences et Techniques de Lille, Villeneuve d'Ascq cedex, France

(Received September 17, 1993) – EJB 93 1427/2

A novel human-voltage-dependent-calcium-channel (VDCC) β subunit was isolated from a 9-week-old human total-embryo cDNA library. Of the four genes encoding β -subunit isoforms that have been identified in animal species, this isoform shares strong similarity with the rat and rabbit β_3 -related gene product and is referred to here as $H\beta_3$ subunit. The $H\beta_3$ isoform is the second β subunit identified in human. Its open reading frame encodes a 482-amino-acid protein with a predicted molecular mass of 54.571 kDa. The $H\beta_3$ mRNA is expressed mostly in brain, smooth muscle and ovary. The gene for the human $H\beta_3$ was specifically localized on chromosome 12q13. The cloned $H\beta_3$ subunit was further expressed in *Xenopus* oocytes to demonstrate its ability to modulate VDCC activity.

Voltage-dependent calcium channels (VDCC) are heteromultimers composed of at least three distinct subunits α_1 , α_2/δ and β (Catterall et al., 1988; Snutch and Reiner, 1992). To date, six α_1 genes (Perez-Reyes et al., 1990; Snutch et al., 1992; Niidome et al., 1992) and four β genes (Powers et al., 1992; Perez-Reyes et al., 1992; Hullin et al., 1992; Castellano et al., 1993a, b) have been characterized and show distinct patterns of tissue-specific expression. Molecular cloning of human VDCC subunits has only recently started. Four subtypes of the α_1 subunit have been isolated, one N-type VDCC (Williams et al., 1992a) and three L-type VDCC (Seino et al., 1992; Soldatov, 1992; Schultz et al., 1993).

From several functional expression studies, it has become clear that the VDCC activity is directed by the α_1 subunit, the function of which is regulated by the β subunit (Varadi et al., 1991; Singer et al., 1991; Perez-Reyes et al., 1992; Hullin et al., 1992). Thus, the molecular identification of these latter subunits has become a key issue in the structure-function studies of the VDCC. In humans, several β -subunit subtypes have been cloned from brain (β_{1c} ; Williams et al., 1992b) and heart ($\beta_{1s}/\beta_{1i}/\beta_{1c}$; Collin et al., 1993) and in all cases appear to derive exclusively from the β_1 gene. The complete human β_1 gene structure was recently elucidated (Powers et al., 1992) and assigned to chromosome 17q11.2-q22 (Gregg et al., 1992).

We recently investigated the molecular properties of the β subunits expressed in human heart (Collin et al., 1993) which in contrast to observations in other species (Hullin et

al., 1992; Perez-Reyes et al., 1992) are exclusively derived from the β_1 gene. We now report the molecular cloning of a new type of human VDCC β subunit which has been characterized in other species as β_3 . We also show its tissue-specific expression and its chromosomal location. We further demonstrate its ability to modulate VDCC activity in *Xenopus* oocytes.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of a $H\beta_3$ cDNA

An oligo(dT)-primed cDNA library (HE9W) was constructed in λ ZapII phage arms (Stratagene) using size-selected mRNA (FastTrack kit, Invitrogen) from 9-week-old human total embryo obtained according to french ethical rules. Plaques (5×10^3) were screened with a skeletal-muscle β -subunit probe (generously provided by Dr K. P. Campbell). Replica filters were prehybridized for 4 h at 65°C in the following solution: 6X NaCl/Cit (NaCl/Cit, NaCl, 150 mM, sodium-citrate 15 mM, pH 7.0), 5X Denhardt's solution, 0.1% SDS and 0.1 mg/ml sonicated salmon sperm DNA. The filters were then hybridized for 16 h in the same solution supplemented with 5×10^5 cpm/ml of 32 P-labeled, randomly primed probe. The filters were then washed twice in 2X NaCl/Cit, 0.1% SDS at room temperature and afterwards in 0.2X NaCl/Cit, 0.1% SDS at 65°C. The cDNA was excized from the λ Zap vector with the use of a helper phage according to manufacturer's instructions. Sequencing was determined by dideoxynucleotide chain-termination method (Sequenase™, USB). Sequence analysis was performed with the help of the GCG software package (Wisconsin).

Northern blot analysis

Two commercial blots containing poly(A)-rich RNA of various human tissues (MTM blot and MTM blot II, Clon-

L2758

Correspondence to J. Nargeot CRBM, CNRS, route de Mende – BP 5051, F-34033 Montpellier cedex, France

Abbreviations. VDCC, voltage-dependent calcium channel; SV40 promoter, simian-virus-40 promoter; BaMeSO, barium methanesulfonate solution; $I_{Na, B}$, endogenous barium current.

Note. The novel nucleotide sequence data published here have been submitted to the \square sequence data bank and are available under accession number \square .

Lab. Inc.) were probed with H β_3 . Membranes were pre-hybridized under the following conditions: 50% formamide, 75 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 5X Denhardt's solution, 0.1% SDS and 0.1 mg/ml sonicated salmon perm DNA at 42°C for 4 h. A ³²P-labeled randomly primed cDNA insert from clone HE9W23 (nucleotides 907–713) was then added to the prehybridization solution to a final concentration of 2×10⁶ cpm/ml. Hybridization was carried out for 12 h. Membranes were then washed twice in 2X NaCl/Cit, 0.1% SDS at room temperature and in NaCl/Cit, 0.1% SDS at 65°C. The integrity of the mRNA was controlled by probing the membranes with a S26 ribosomal protein-derived probe (Vincent et al., 1993). Autoradiography was then performed for 24 h at –70°C.

Chromosomal location

The human β_3 subunit gene was localized by *in situ* hybridization on human metaphase chromosomes. Metaphases were obtained from phytohemagglutinin-stimulated blood lymphocytes of a healthy donor after thymidine synchronization and bromodeoxyuridine incorporation. Full-length cDNA probe H β_3 (1.7 kb) was labeled with biotinyl-11-dUTP by nick translation. *In situ* hybridization was performed according to Pinkel et al. (1985). After one signal amplification, R bands were obtained as described by Cherif et al. (1990). Slides were screened with an Axiophot Zeiss photomicroscope. Ektachrome ASA 400 color slide films were used for all photographs.

Functional expression of H β_3 in *Xenopus* oocytes

A full-length cDNA encoding the human β_3 subunit was subcloned into the pSVK₃ expression plasmid (Pharmacia) containing a simian-virus-40 (SV40) promoter. The construct was named pSVK₃H β_3 . Similarly, an antisense construct was produced by cloning the H β_3 cDNA in the reverse orientation compared to the SV40 promoter (named pSVK₃ASH β_3). The constructs were directly injected within 1–2 nl into the nucleus of the oocytes at a concentration of 1 mg/ml using a home-made microinjector. Oocytes were maintained in a saline solution of the following composition: 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 2.5 mM sodium-pyruvate, 5 mM Hepes, pH 7.4 with NaOH, supplemented with 50 μ g/ml gentamicin at 19°C on a rotating platform for 1–3 days prior to testing. Electrophysiological measurements were performed using the standard two-microelectrode voltage-clamp technique with an Axoclamp 2A amplifier (Axon instruments, Inc.). Voltage and current electrodes were filled with 3 M CsCl, 10 mM EGTA, 5 mM Hepes. Barium currents through endogenous VDCC ($I_{Ba, E}$) were recorded in barium methane sulfonate (BaMeSO) solution of the following composition: 40 mM Ba(OH)₂, 20 mM NaOH, 20 mM tetraethylammonium hydroxide, 2 mM CsOH, 5 mM Hepes, pH 7.4 with methane sulfonic acid. The pCLAMP software package (version 5.51; Axon instruments, Inc.) was used for data acquisition and analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning of H β_3

From the screening of the HE9W library with a rabbit skeletal-muscle β -subunit probe, 10 positive clones (HE9W17–HE9W26) were recovered. The clones HE9W18,

HE9W19, HE9W22 and HE9W24 all correspond to partial or full-length cDNAs coding for the already characterized H β_{1b} (Powers et al., 1992; Collin et al., 1993). The clones HE9W20, HE9W25 and HE9W26 are other messages and have not been fully analyzed. HE9W17 is of 1.7 kb and contains a 1446-nucleotide open reading frame. Fig. 1 shows the nucleotide sequence of HE9W17 and its encoded 482 amino acids according to the largest open reading frame. The initiating ATG was chosen according to published sequences of rat and rabbit β_3 subunits (Hullin et al., 1992; Castellano et al., 1993a) and appeared to be present in a putative consensus sequence for translation initiation in eukaryotic systems (TCCCCCATGT) according to Kozak (1991). No polyadenylation consensus sequence was retrieved in these clones. The calculated molecular mass of this protein, referred to here as H β_3 , is 54.569 kDa which is smaller than the human H β_{1a} and H β_{1b} , but bigger than H β_{1c} (respectively 57.868, 65.505, 52.917 kDa, Collin et al., 1993). Hydrophathy analysis (Kyte and Doolittle, 1982) did not reveal the presence of either a typical membrane-spanning domain or a signal sequence, which is consistent with the fact that the β subunit interacts with an intracellular domain of the α_1 subunit (Catterall, 1991). The carboxy terminus appears to be highly hydrophilic which is similar to the previously described rat brain/heart β_2 (Perez-Reyes et al., 1992). Overall secondary-structure analysis predicts 50% α -helical content for the H β_3 subunit. Only three of the four α -helical domains noted by Ruth et al. (1989) are conserved in H β_3 .

Fig. 2 displays the comparison between H β_3 and the two human β subunits H β_{1a} and H β_{1b} (named β_c and β_a , respectively, in Collin et al., 1993). The central core region of each of the β subunits (corresponding to amino acids 68–361) have an average similarity of 70%. The H β_3 protein is highly similar to the rabbit and rat β_3 subunits (Hullin et al., 1992; Castellano et al., 1993a) as illustrated in Fig. 3. H β_3 is 95% similar to the rabbit CaB3 (Hullin et al., 1992) and 96% to the rat brain β_3 (Castellano et al., 1993a). At the nucleotide level however, the human message encoding H β_3 shows only 53% similarity with CaB3 and 61% with β_3 . It is of importance however to consider the human protein for a more detailed comparison. In that respect, the slight differences (two gaps, five amino acid changes) may lead to substantial changes in the function of this protein. Moreover, the H β_3 sequence contains 11 potential protein-kinase-C consensus phosphorylation sites (Ser/Thr-Xaa-Lys/Arg) and 6 potential casein-kinase phosphorylation sites (Ser/Thr-Xaa-Xaa-Asp/Glu), which correspond to an additional putative protein-kinase-C phosphorylation site and one casein-kinase-II site less, compared to the rat β_3 . No consensus sites for cAMP-dependent protein kinase were found in H β_3 .

β -subunit expression in early stages of development

Only β subunits related to the β_1 subtype have been cloned in human (Williams et al., 1992b; Powers et al., 1992; Collin et al., 1993). In particular, the H β_{1c} (referred to as β_2 by Williams et al., and as β_b by Collin et al.) has not been cloned in other species and may constitute a human specificity. By contrast, the β_2 isoforms (Perez-Reyes et al., 1992; Hullin et al., 1992) were not found in human (Collin et al., 1993). We report hereby the cloning of a novel human calcium-channel β subunit which is correlated to the β_3 subtype. The H β_3 cDNA was cloned from a human embryonic library which is of interest since very little is known about calcium-channel expression in early development. We there-

TCCCCCACCCACCCGGACTCCCCC 27

ATGTATGACCACTCTACCTGCCCCGTTGAGGACTCGAGCCGCTCTACACCCAGCCGCGCATCTCTGACGTCAGAGCTCTCGGAGG 127
M Y D D S Y T D F G E D S E A G G S A D S Y T S R P S L D S D V L E 34

AGCACCCGAGACTGCCCGGCTAAAGTAGAGAGCCAGCCTCAGCAGCAGCTCGAAAGGCCAAGCACAACCTGAGGCATTTCCGCTGAGGACCAATGT 227
D R E S A R R E V E S Q A Q Q Q L E R A K H K P E A F A V R T N V 67

CAGCTACTGTGCGCTACTGATGAGAGTCCCAAGTCCAGGCTCTGAGCTCACTTTGAGCCAAAGATTCTCCACATTAAGAGAGTACAGCAAT 327
E T C G C V L D E E C P V Q G S G V N F E A K D F L H I K E K Y S N 100

GACTGGTGGATCGCCGCTACTGAAAGCAGGCGCGGACATCCCTTCATCCCAAGCCGCGCCGCTGAGAGCATCCGCTCAAACAGGAACAAGG 427
D W H I G R L V F K E G G D I A F I P F S P Q R L E S I R L K Q E Q K A 134

CCAGGAGATCGCGAACCTTCCAGCCTGAATGACATTGGCAAGCCGCTTCCCTCTCCATCTCTAGCCAAAGCAGAAAGCAGGCGGAGCATGT 527
R R S G M F S S L S D I G M R R S P P P S L A K Q K O K Q A E H V 167

TCCCCCTATGACCTGCTGCCCTCAATGCGCCGCTGGTCTGGTGGGACCTCTCTCAAGGTTATGAGGTACAGACATGATGAGAGGCTCTCTTC 627
P P Y D V V L F E N R P F V V L V G P S L A K G Y E V T D X K G K A L F 200

GACTTCTCAAACACAGATTGATGCCAGCATCTCCATCACCCGACTCAGACCCGACTCTCCCTGCCAAAGCATCTCTGCTCAACAATCCGGCAAGA 727
D F L K H R F D G R I S I T R V T A D L B L A K R S V L M N P G K R 234

GGACATCATGAGCCTCTCTCCGCTCCAGCATTGCGGAAAGTCCAGAGTCCAGCCGATATTTGAGCTGCCAAATCCCTGAGTGTAGTAT 827
T I I E R S S A R S S I A E V Q S E E I E R I F E L A K S L O L L V 267

CTTGGAGCTCACACCTCAACAGCCAGCAGCTGGCCAAAGCCTCCCTGCCCAATCATGCTCTTGTCAAAGTCTCCTCAGCAAAGTACTCCAG 927
L D A D L T I N H P A Q L A K T S L A P I I V F V K V E S P K V L Q 300

CGCTCATCTCCCTCCCGGGGAAGTACACATGAAGCAGCTGACCTACAGATGCGCATATGATAGCTGCTCACTGCTGAGTCCCAAGTCAATTTGATGTG 1027
R L I R S R G K S O N K K L T V Q N A Y D K L V Q C P P E S F D V I 334

TTCTGGATGAGAACAGCTGAGGATGCTCTGTGAGCTCTGCTGAGTCTGGAGGTTACTGCGCGCCAGCCAGCCAGCCCTGCGCCGAGT 1127
L D E N Q L E A L L E V L E V Y W R A T H H P A P Q F G L 367

TCGGCTCTCCAGCTGCCATCCCGGACTTCAAGACCCAGCAGCTCTGGGGAGCCTGGCGAGGAGCCTCCCGCTTGAAGCAGGACAGCTTGAATGCC 1227
L G P P S A I P F G L Q N Q D L L G E R C E E H S P L E R D S L M P 400

TCGATCAGCCGAGCAGAGCTCTCCGCAAGCCTGAGCAGCTTCCAGCAGTACCTCCCGCCAGCTGAGGAGGACTACCCAGATGCTGACAGGACC 1327
S D E A S E S S R A Q W T G S S Q R T S R H L E E D Y A D A Y Q D L 434

TCTACAGCTCACGCCAACACCTCGGAGTGCCTAGTCTAACGGCAGTACCCCAAGAGCCGCTCTAGCCCAAGCAGCTCAGAAACACACACAG 1427
Q P F H X H T S C L P S A N G H D P Q D R L L A O D E E K N H S 467

TCACCGAAGCTCCGACCCCAAGCCCTTGGCCAGGATAGCTACTCAGACGCTCTCTGCTCCCTACCCCTGCCAGCCAGCCGAGCTGCTGCTGGGG 1527
D R N W O R R M R P F K D S Y - 482

CCCACTCAGGACGCTGCCCTTAGACTGACATCAGGCTGGCAGTACGCTCAGCCCCCAAAACCCCTGCCAGCCCAAGCTTCAAGGCTGCTGTGCTGCC 1627

AAGTTCTCGGAGAAACAGGACCCCTCACCCTCTGGCAGTACCCTACTAGCCTCCCATCCAGCTACTAGCTGCTGCTTCTCCGAG 1717

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of H β_3 clone HE9W17. The sequence of H β_3 was determined by sequencing both strands of HE9W17. The deduced amino acid sequence is given in single letters below the corresponding codons. The numbering of nucleotides starts at the beginning of the sequence, the A residue of the initial methionine is located at position 28.

H β_3 MYDSSYLPGFEDSEA.....GSADSYTSRPSLSDV LZEEDRESARREVE/SQAQQLEPAXHX 57
H β_{1b} MVQKTSMSRGPYPSPQEIPEHVFDPSPQGYKSRKGRFKRSDGSSDTSNSFVRQSAESYTSRPS DSDVSLZEEDREALRKEERQALAQLEKAKTK 99
H β_{1a} MVQKTSMSRGPYPSPQEIPEHVFDPSPQGYKSRKGRFKRSDGSSDTSNSFVRQSAESYTSRPS DSDVSLZEEDREALRKEERQALAQLEKAKTK 99

H β_3 PEAFVAVRTNVSYCGVL DZEECPVQSGVNF EAKDFLHIKEKYSMDWIGRLVKEGGDIAPFIPSPQ.....RLESIRLKEQEQKARR.....SGNPSSLS 144
H β_{1b} PVAFVAVRTNVSYPSPGZV PVQGVAITFEPKDFLHIKEKYNNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSLRL.....QEQKLRNRLGSSKSGDNSSS 193
H β_{1a} PVAFVAVRTNVSYPSPGZV PVQGVAITFEPKDFLHIKEKYNNDWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDSLRL.....QEQKLRNRLGSSKSGDNSSS 193

H β_3 DIGN.....RRS-PPP.....SLAKQKQKQ.....AEHVPPYDVVPSKRPVVLVGPVSLKGYEVTDQK 195
H β_{1b} LQDVVTCGTRRPTPPA.....S-AKQKQS.....TEHVPPYDVVPSKRPVVLVGPVSLKGYEVTDQK 248
H β_{1a} LQDVVTCGTRRPTPPASGNEMNTLAFELDPLEEFAELGQSCS-ARTSSVSTTTPPHGKRIPFKTEHVPPYDVVPSKRPVVLVGPVSLKGYEVTDQK 292

H β_3 OKALYDFLKHFRFDGRISITRVTDLSLAKRSVLNHPKRTII-ERSSARSSIAEVQSEIERIPELASLQLVVLADDTINHPAQLAKTSLAPITVIVKYS 292
H β_{1b} OKALYDFLKHFRFDGRISITRVTDLSLAKRSVLNHPKRTII-ERSNTRSSIAEVQSEIERIPELARTLQVVALDADTINHPAQLAKTSLAPITVIVKIT 345
H β_{1a} OKALYDFLKHFRFDGRISITRVTDLSLAKRSVLNHPKRTII-ERSNTRSSIAEVQSEIERIPELARTLQVVALDADTINHPAQLAKTSLAPITVIVKIT 389

H β_3 SPKVLQRLIRSRGKSQMKHLTVQMAVD-KLVQCPPEFSDVILDEHQLEDACELLAKYLEVYWRATHHPAPGGLGPPSAIPGLNQQLGECGEHHSPL 391
H β_{1b} SPKVLQRLIRSRGKSQMKHLNVAIAASEKLAQCPPEMFDIILDEHQLEDACELLALEYLAWKAT-EPPSSSTPPNPLNRTATHAALRRSPAPVSNLQGP 444
H β_{1a} SPKVLQRLIRSRGKSQMKHLNVAIAASEKLAQCPPEMFDIILDEHQLEDACELLALEYLAWKAT-EPPSSSTPPNPLNRTATHAALRRSPAPVSNLQVQ 488

H β_3 ERDSLMPDSEASERSQAWGTSQRTSRHLEEDYADAYQDLYOPHROHTSGLPSANGHDPQDRLLAQDSEHNHSDRNWQRNRPWPKDSY..... 482
H β_{1b} YLASGDQPLERATGESHSMHEYPQELGQPFGLYPSHHPGRAGTLRALSRQDTFDADTPGSRNSAYTELGDSVDMETDPSEGPCLDGPAGGAPARQGSW 547
H β_{1a} VLTSLRRNLGFGGLESSQRGSVVFQEQEIAM..... 522

H β_{1b} EDEEDYEEELTDNRNCRNKARYVPEQCAPVLGRNKNELEGWGRGVYIR..... 596

Fig. 2. Alignment of deduced amino acid sequences of three human β subunits. Shown is the alignment of deduced amino acid sequences of H β_3 , H β_{1b} , and H β_{1a} . H β_{1a} and H β_{1b} sequences are from Collin et al., (1993; Genbank accession numbers are L06112 and L06110, respectively). Regions of sequence identity are in bold letters. (⊕), Gaps in the sequence.

for demonstrate the presence of both H β_{1b} and H β_3 subunits at an early stage of development. We are currently investigating the expression profile of the $\alpha 1$ and β subunits in respect to early stages of development.

Distribution of H β_3 mRNA

The tissue distribution of H β_3 was determined using poly(A)-rich RNA isolated from a variety of human tissues. The Northern blots were probed with the clone HE9W23 describing the unique carboxy terminus of H β_3 (amino acids

370-482) in order to avoid cross-reaction with other β subunit messages. Overall, the data demonstrate the presence of H β_3 mRNA mostly in brain, ovary and smooth-muscle tissues. More precisely, the H β_3 cDNA hybridized with a 3.5-kb message in human brain, ovary, thymus, prostate, lung colon and small intestine (Fig. 4). The weakness of the signal obtained with the thymus and the prostate RNA samples might be due to a significantly lower amount of RNA than in the other samples, as revealed by the S26 ribosomal mRNA signal. The presence of a β_3 -related message in brain was previously shown in rabbit (Hullin et al., 1992) and in

Hβ ₃	MYDDEYLPOFEDSEAGSADSTSRPFLDSDV-LLEDRESARREVESQAQQGLERAKHEPEAFVAVRTHVBYCGVLDEECFVGGSGVNYEAKDFLHKEXYS	99
β ₃S.....V.....	100
CaB ₃	..E.....S.....V.....I.....	100
Hβ ₃	NMWIGRLVKEGGDIAFIPSPQRLESIRLKEQKARRSCNPSELSIDIGNRRFPFSLAKQKQKQALHVPYDVVFMRPVVLVGPBLKGTETDMOKAL	199
β ₃	200
CaB ₃	200
Hβ ₃	FDFLKHRYDFGRISITRVTDLSLAKRSVLNPNPKRTIERSARSIAEVQSEIERIFELAKSLQLVLDADTINHPAOLAKTSLAPIIVFVKVSPKVL	299
β ₃	300
CaB ₃	300
Hβ ₃	ORLIRSRGKSKQKHLYVO-MAYDKLVQCPPEFVDVILDENOLEDACELLAXYLEVTVRATHHPAPQPGLLOPPSAIFGLONQQLQOERGEHSPLEKDSL	398
β ₃M.....D.....E.....K.....	400
CaB ₃M.....H.....S.....	400
Hβ ₃	MPSEASASRSQANTGSSQNTSRHLEEDYADAYQDLYOPHRQHTSCLPSANGHDPQDRLLAQDSEHNSDRNMQRNKRWPKDSY	482
β ₃S.....D.....M.....	484
CaB ₃S.....H.....N.....	477

Fig. 3. Comparison between Hβ₃ and its rat and rabbit counterparts. Hβ₃ is compared to the rat β₃ (Castellano et al., 1993a; Genbank accession number, M88751) and the rabbit CaB3 (Hullin et al., 1992; EMBL accession number; X64299). Dots represent identity of the deduced amino acid sequences and differences are indicated. The potential sites for phosphorylation in the Hβ₃ sequence are indicated: (☆), protein kinase; (↓), casein kinase II.

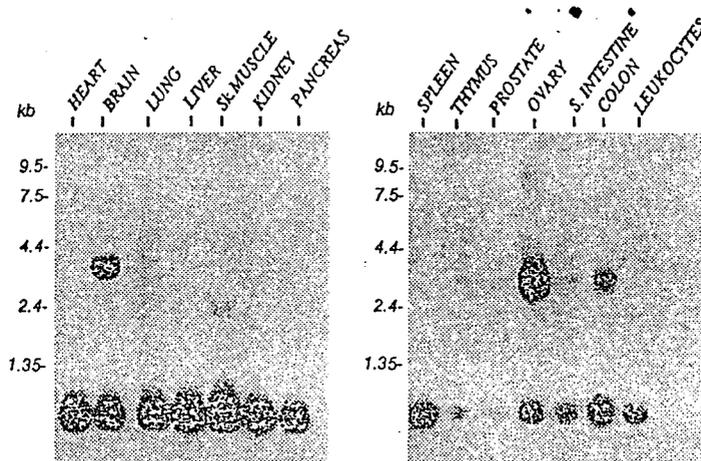


Fig. 4. Northern blot analysis of mRNA from a variety of human tissues probed with Hβ₃. Analysis was performed using 2 μg/lane poly(A)-rich RNA from several representative human tissues. The blots were hybridized for 12 h at 42°C with 2.10⁶ cpm/ml labeled randomly primed cDNA derived from HE9W23 clone (806 bp). The final wash was performed at 65°C with NaCl/Cit plus 0.1% SDS. Autoradiographs were exposed at -70°C using two intensifying screens. The integrity of the mRNA was controlled by probing the membranes with a S26 ribosomal probe according to Vincent et al., (1993). Corresponding bands appear at 0.7 kb. Note that for the lung, a diffused banding appeared in addition to the 3.5-kb band. S. intestine, small intestine.

rat (Castellano et al., 1993a). Interestingly, Hβ₃ hybridizes to a low-abundance 2.4-kb message in skeletal muscle. This has not been described in rat or rabbit and consequently may represent a human-specific message. Although more sensitive Hβ₃ mRNA detection and quantification techniques such as ribonuclease protection assays (Lee and Costlow, 1987) would be needed, an interesting finding of our Northern blot experiments is the presence of a strong Hβ₃-subunit signal in human smooth-muscle tissues. This may be correlated with the presence of a CaB3 message in rabbit aorta and trachea (Hullin et al., 1992). Another finding of our study is the high abundance of Hβ₃ message in ovary, a tissue in which the presence and the role of VDCC has still to be identified. However, a recent study revealed the presence of three α₁-related mRNA encoding the skeletal muscle, the class C and class D isoforms in this tissue (Perez-Reyes et al., 1990; Snutch and Reiner, 1992). Contractions and secretory activity

are well described in ovary and it is tempting to speculate that VDCC are involved in such physiological activities.

Chromosomal location of Hβ3

Analysis of 40 metaphase chromosome preparations shows the localization on chromosome 12 at band q13 (Fig. 5). Of the 83 fluorescent spots observed with 50 ng/ml probe, 46 were localized at 12q13. We visualized a spot on the four chromatids in one cell, on three chromatids in two cells, on two chromatids in 13 cells and on one chromatid in ten cells. In 14 cells, no spot was observed on chromosome 12. The 37 other spots were localized on other chromosomes and scattered throughout the genome. No secondary hybridization peak was detected. These results allow us to demonstrate that the Hβ₃ gene is located on chromosome 12q13. By contrast, the β₁ gene has been assigned to chromosome

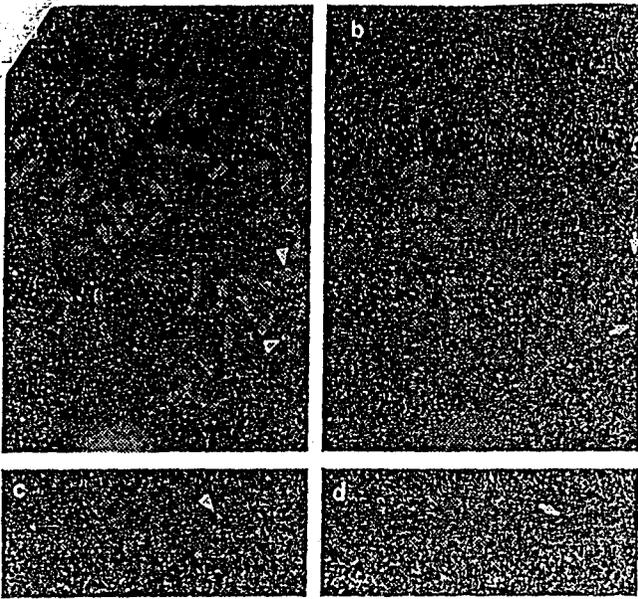


Fig. 5. Fluorescence *in situ* hybridization of probe HE9W17 to human chromosomes. (a, c) Fluorescence spots are indicated by arrowheads. (b, d) The corresponding chromosome 12 after R banding indicated by arrows. The fluorescent spots are localized at 12q13. Magnification $\times 100$.

17q11.2-q22 (Gregg et al., 1992). The cardiac VDCC α_1 subunit has been located on chromosome 12p12-pter (Powers et al., 1992; Schultz et al., 1993). The relevance that the genes encoding two distinct subunits of the VDCC are located on the same chromosome is unknown and may be fortuitous. Whether mutation in the $H\beta_3$ gene gives rise to human disease is unknown.

Functional expression of $H\beta_3$

The human β_3 subunit was tested in *Xenopus laevis* oocytes for its ability to modulate the function of endogenous VDCC (Lory et al., 1990; Bourinet et al., 1992). The $H\beta_3$ cDNA was subcloned in both orientations (i.e. sense and antisense) in an expression vector containing a SV40 promoter, the pSVK₃. Barium currents ($I_{Ba,E}$) were recorded in the presence of 40 mM Ba²⁺ in the bath (Fig. 6). Interestingly, higher Ba²⁺-current amplitude was already noticeable in pSVK₃ $H\beta_3$ -injected oocytes only 24 h after nuclear injection (data not shown). After 3 days, amplitude of $I_{Ba,E}$ was eightfold higher in pSVK₃ $H\beta_3$ -injected oocytes than in control oocytes (-132 ± 22 nA, $n = 9$ versus -17 ± 5 nA, $n = 11$). No increase, even a slight decrease, in current amplitude was observed in pSVK₃ASH β_3 -injected oocytes (-13 ± 4 nA, $n = 10$). Typical control, ASH β_3 -stimulated and $H\beta_3$ -stimulated $I_{Ba,E}$ current traces are presented in Fig. 6A. The increase in current amplitude was observed at all the potentials (Fig. 6B). No change in activation threshold (-15 mV) or peak current (at $+20$ mV) were detected following $H\beta_3$ expression. As for control current, the $H\beta_3$ -stimulated $I_{Ba,E}$ was insensitive to both agonist (1 μ M Bay K 8644) and antagonist (10 μ M PN 200-110) dihydropyridines ($n = 3$). The results presented here indicate that our cloned $H\beta_3$ subunit can be functionally expressed in a recipient cell. The electrophysiological data are in good agreement with previous observations on $I_{Ba,E}$ (Lory et al., 1990; Bourinet et al., 1992) and corroborate several recent studies indicating that

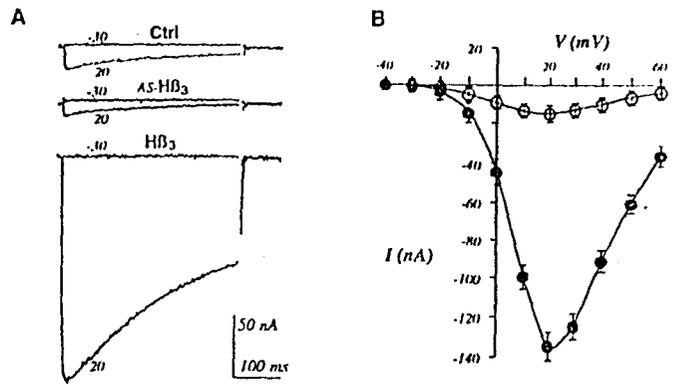


Fig. 6. Functional expression of $H\beta_3$ in *Xenopus* oocytes. Ba²⁺ currents were recorded in *X. laevis* oocytes as described in Materials and Methods. (A) Current traces obtained during 400-ms depolarising pulses to -30 mV and $+20$ mV from an uninjected oocyte (C+H), a pSVK₃ASH β_3 -injected oocyte (AS- $H\beta_3$) and a pSVK₃ $H\beta_3$ -injected oocyte ($H\beta_3$). The holding potential was -60 mV. The data were filtered at 500 Hz and digitized at 1000 Hz. Leak and linear currents were subtracted using a P/5 protocol (pCLAMP, version 5.51). (B) Mean current amplitude (\pm SD) plotted as a function of the test potential for uninjected (O; $n = 11$) and pSVK₃ $H\beta_3$ -injected (\bullet ; $n = 9$) oocytes. Data were collected from three separate experiments.

exogenous β subunits introduced in *Xenopus* oocytes can affect the activity of endogenous VDCC (Singer et al., 1991; Perez-Reyes et al., 1992; Hullin et al., 1992; Williams et al., 1992b; Castellano et al., 1993a, b). We also demonstrate that a fast and robust expression in *Xenopus* oocytes can be obtained using an expression vector driven by the SV40 promoter. This experimental procedure simplifies expression studies in *Xenopus* oocytes since no *in vitro* transcription is needed. Furthermore, a nuclear-injected-plasmid procedure seems more efficient for obtaining high levels of protein expression in *Xenopus* oocytes since we observed a twofold increase in $I_{Ba,E}$ amplitude compared to previous studies using cRNA (Castellano et al., 1993a; Hullin et al., 1992).

The present study describes the molecular properties of the human β_3 subunit and reveals that this subunit is expressed as early as the embryonic stage. Its mRNA exhibits a specific expression pattern in brain, ovary and diverse smooth-muscle-related tissues. Although the subunit composition of cardiac, smooth-muscle and neuronal dihydropyridine-sensitive VDCC has yet to be precisely determined, these latter channels are supposed to correspond to an $\alpha_1/\alpha_2/\beta$ complex (Ahlijanian et al., 1990; Snutch and Reiner, 1992). Several observations have now to be taken into account for a further interpretation of the β -subunit modulation of VDCC activity: any β isoform can modulate any type of VDCC; distinct subtypes of β subunit can be expressed in a given tissue; the N-type VDCC specifically incorporates a β_3 isoform (Whitcher et al., 1993). It is now of interest to determine whether smooth-muscle VDCC also incorporate a β_3 subunit and to investigate the expression of this isoform with regard to developmental stages.

We are grateful to Dr P. Fort for providing Northern blot filters and S26 probe. We thank Drs N. J. C. Lamb, S. Richard for their helpful comments on the manuscript. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Association Française contre les Myopathies, by a grant MRE no. 92-C-0321 to P. B. and a Ministère de la Recherche et de la Technologie fellowship to T. C.

REFERENCES

- Zijianian, M. K., Westenbroek, R. E. & Catterall, W. A. (1990) Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina, *Neuron* 4, 819–832.
- Bourinet, E., Fournier, F., Nargeot, J. & Charnet, P. (1992) Endogenous *Xenopus* oocyte calcium channels are regulated by protein kinases A and C, *FEBS Lett.* 299, 5–9.
- Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L. & Perez-Reyes, E. (1993a) Cloning and expression of a third calcium channel β subunit, *J. Biol. Chem.* 268, 3450–3455.
- Castellano, A., Wei, X., Birnbaumer, L. & Perez-Reyes, E. (1993b) Cloning and expression of a neuronal calcium channel β subunit, *J. Biol. Chem.* 268, 12359–12366.
- Catterall, W. A., Seagar, M. & Takahashi, M. (1988) Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channel in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 263, 3535–3538.
- Catterall, W. A. (1991) Functional subunit structure of voltage-gated calcium channels, *Science* 253, 1499–1500.
- Cherif, D., Julier, C., Delattre, O., Derré, J., Lathrop, G. M. & Berger, R. (1990) Simultaneous localization of cosmids and chromosome R-banding by fluorescence microscopy: Application to regional mapping of human chromosome 11, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 6639–6643.
- Collin, T., Wang, J. J., Nargeot, J. & Schwartz, A. (1993) Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage-dependent calcium channel β subunit from normal human heart, *Circ. Res.* 72, 1337–1344.
- Gregg, R. G., Powers, P. A. & Hogan, K. (1992) Assignment of the human gene for the β subunit of the voltage-dependent calcium channel to chromosome 17 using somatic cell hybrids and linkage mapping, *Genomics* 15, 185–187.
- Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F. & Flockerzi, V. (1992) Calcium channel β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain, *EMBO J.* 13, 885–890.
- Kozak, M. (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of transcription, *J. Biol. Chem.* 266, 19867–19870.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- Lee, J. J. & Costlow, N. A. (1987) A molecular titration assay to measure transcript prevalence levels, *Methods Enzymol.* 152, 633–648.
- Lory, P., Rassendren, F. A., Richard, S., Tiaho, F. & Nargeot, J. (1990) Characterization of voltage-dependent calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat heart, *J. Physiol. (Lond.)* 429, 95–112.
- Niidome, T., Kim, M. S., Friedrich, T. & Mori, Y. (1992) Molecular cloning and characterization of a novel channel from rat brain, *FEBS Lett.* 308, 7–13.
- Perez-Reyes, E., Wei, X., Castellano, A. & Birnbaumer, L. (1990) Molecular diversity of L-type calcium channels, *J. Biol. Chem.* 265, 20430–20436.
- Perez-Reyes, E., Castellano, A., Kim, H. S., Bertrand, P., Bagstrom, E., Lacerda, A. E., Wei, X. & Birnbaumer, L. (1992) Cloning and expression of a cardiac/brain β subunit of the L-type calcium channel, *J. Biol. Chem.* 267, 1792–1797.
- Pinkel, D., Staume, T. & Gray, J. W. (1985) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 2934–2938.
- Pragnell, M., Sakamoto, J., Jay, S. D. & Campbell, K. (1991) Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel β subunit, *FEBS Lett.* 291, 253–258.
- Powers, P. A., Liu, S., Hogan, K. & Gregg, R. G. (1992) Skeletal muscle and brain isoform of a β subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene, *J. Biol. Chem.* 267, 22967–22972.
- Ruth, P., Röhrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H. E., Flockerzi, V. & Hofmann, F. (1989) Primary structure of the β subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle, *Science* 245, 1115–1118.
- Schultz, D., Mikala, G., Yatani, A., Engle, D. B., Iles, D. B., Segers, B., Sinke, R. J., Olde Weghuis, D., Klöckner, U., Wakamori, M., Wang, J. J., Melvin, D., Varadi, G. & Schwartz, A. (1993) Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the $\alpha 1$ subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 6228–6232.
- Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J. H. & Bell, G. (1992) Cloning of the α_1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 584–588.
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F. & Dascal, N. (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel, *Science* 253, 1553–1557.
- Snutch, T. P. & Reiner, P. B. (1992) Ca^{2+} channels: diversity of form and function, *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 247–253.
- Soldatov, M. (1992) Molecular diversity of L-type Ca^{2+} channel transcripts in human fibroblasts, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 4626–4632.
- Varadi, G., Lory, P., Schultz, D., Varadi, M. & Schwartz, A. (1991) Acceleration of activation and inactivation by the β subunit of the skeletal muscle calcium channel, *Nature* 352, 159–162.
- Vincent, S., Marty, L. & Fort, P. (1993) S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eukaryotic cells and tissues, *Nucleic Acids Res.* 21, 1498.
- Witcher, D. R., De Waard, M., Sakamoto, J., Franzini-Armstrong, C., Pragnell, M., Kahl, S. D. & Campbell, K. P. (1993) Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca^{2+} channel complex purified from brain, *Science* 261, 486–489.
- Williams, M. E., Brust, P. F., Feldman, D. H., Pathi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A. F., Veliçelebi, G., Ellis, S. B. & Harpold, M. M. (1992a) Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel, *Science* 257, 389–395.
- Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Veliçelebi, G., Ellis, S. B. & Harpold, M. M. (1992b) Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype, *Neuron* 8, 71–84.

Discussion complémentaire

Chez le rat, la sous-unité $\beta 3$ n'est exprimée qu'au niveau du système nerveux central (Perez-Reyes et coll., 1993). Chez le lapin, par contre, elle est également exprimée dans le muscle lisse et tout particulièrement dans le tissu aortique. Ces deux expressions tissulaires semblent se retrouver chez l'humain. La diversité de l'expression tissulaire rencontrée pour $\beta 3$ permet donc de confirmer le manque de distribution stricte des sous-unités β .

Travaillant sur l'embryon humain de neuf semaines, organisme pluripotent contenant les ébauches de chaque tissu adulte. Nous avons été étonné du nombre assez faible de trois isoformes que nous avons pu cloner. Un nouveau criblage de la même banque avec d'autres sondes (plus spécifique d'autres isoformes) pourrait s'avérer tout à fait intéressant dans le but de déterminer l'ensemble de la population en sous-unités β exprimées au niveau embryonnaire. Il se pourrait alors que nous trouvions la trace de l'expression de gènes déjà caractérisés dans l'espèce humaine comme le gène MysB, proche de $\beta 2$ ou bien de gènes uniquement caractérisés chez l'animal comme le gène $\beta 4$.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail est en majorité basé sur le clonage et l'analyse structurale de différentes sous-unités β du canal calcique. On ne peut que rester vague sur le terme canal calcique. En effet, par le seul clonage de ces sous-unités on ne peut pas savoir si celle-ci appartient à un complexe canal calcique de type L, de type N ou de type P. Le canal de type L a uniquement été purifié à partir de muscle squelettique (Fosset et coll., 1983). Le complexe purifié montre une sous-unité β de type $\beta 1a$ mais aucune expérience n'a permis de prouver que celle-ci n'appartenait pas également à un autre complexe d'un type différent. Les sous-unités β clonées à partir de système nerveux central sont nombreuses : $\beta 1b$, $\beta 1c$, $\beta 2a$, $\beta 2b$, $\beta 3$ et $\beta 4$. La récente purification du complexe canalaire de type N a montré que celui-ci incorpore une sous-unité β de type $\beta 3$. Cependant, parmi les autres sous-unités β clonées à partir de cerveau, aucune n'a encore pu être attribuée à un type de complexe canalaire précis. Il est néanmoins connu que $\beta 4$ est majoritairement exprimée au niveau du cervelet, là où l'on trouve la plus grande densité de canaux de type P. Il serait possible d'en déduire que $\beta 4$ appartient au complexe de type P. Dans l'état actuel des connaissances, il n'est donc pas possible d'attribuer une appartenance précise à chacune des sous-unités β clonées. Les expériences d'expression fonctionnelle ont montré que la sous-unité β serait impliquée dans :

i) l'augmentation de l'expression fonctionnelle des sous-unités $\alpha 1$;

ii) la modification de l'amplitude des courants enregistrés;

iii) la modulation des caractéristiques cinétiques des courants, et ce de façon différente suivant l'isoforme de β coexprimée.

Au vu de ces conclusions, l'on peut se poser la question de savoir si l'appartenance d'une sous-unité β à un complexe canalaire précis est vraiment judicieuse. En effet, on peut aisément considérer qu'un seul et même type d' $\alpha 1$ peut voir son activité modifiée par la présence de diverses isoformes de la sous-unité β . Plus précisément, tous les types de sous-unité $\alpha 1$ sont modulables par n'importe quel type de sous-unité β , comme cela a été montré dans un modèle de reconstitution tel que l'ovocyte de Xénope (Singer et coll., 1991; Perez-Reyes et coll., 1991). La sous-unité $\alpha 1$ cardiaque par exemple a été coexprimée soit avec $\beta 1a$, $\beta 1b$ ou $\beta 2$. Dans chacun des cas, les cinétiques d'inactivation du courant étaient différentes. Ces résultats viennent tout juste d'être confirmés en utilisant le canal calcique endogène de l'ovocyte de Xénope avec les sous-unités $\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2a$ et $\beta 3$ (Lory et coll., *manuscript soumis pour publication*). L'hypothèse retenue est qu'une sous-unité $\alpha 1$ peut voir son activité modulée par différents types de sous-unités β et ce même au niveau d'un tissu donné. Les travaux de cette thèse étayaient cette hypothèse en montrant que plusieurs types de sous-unités β sont exprimées au niveau du cœur humain où un seul type de sous-unité $\alpha 1$ est exprimé. La suite de ce travail décrit le clonage moléculaire de la sous-unité de type $\beta 3$ chez l'homme. Comme il a été récemment démontré par purification (Witcher et coll., 1993), cette isoforme est

préférentiellement associée à la sous-unité $\alpha 1$ de type N au niveau du cerveau. Cependant, $\beta 3$ est également exprimée dans le muscle lisse où seule une $\alpha 1$ de type L n'a été détectée. $\beta 3$ aurait donc elle aussi la possibilité de moduler l'expression de différentes $\alpha 1$.

Il ressort de ces études structure-fonction que la sous unité β joue un rôle tout à fait déterminant dans la régulation de l'activité de tous les types de canaux calciques. Ce rôle, s'il commence à être caractérisé par l'électrophysiologie, n'est encore pas connu du point de vue moléculaire. Ainsi le mode d'association entre les sous-unité $\alpha 1$ et β est lui aussi encore inconnu. Sachant que l'on observe une parfaite compatibilité entre tous les types de chacune des sous-unité, il est raisonnable de penser que ces interactions ont lieu entre des domaines conservés de chacune de ces protéines. Des études récentes, ont montré que l'interaction entre $\alpha 1$ et β était localisée sur la boucle entre les domaines II et III de la sous-unité $\alpha 1$ (K. Campbell, communication personnelle).

L'objectif de ce travail était de débiter, en France, la biologie moléculaire des canaux calciques et ce, grâce à une collaboration étroite entre les laboratoires du Pr. P. Guilbault à Lille et du Pr. J. Nargeot à Montpellier. Pour ce faire, nous avons choisi une cible plus aisée à cloner que la sous-unité canal $\alpha 1$ mais présentant cependant un intérêt certain dans la régulation fonctionnelle de cette dernière : la sous-unité β . En 1991 dans ce domaine, la compétition internationale rendait quasi-impossible l'obtention de sondes de sous-unités du canal calcique, qu'il s'agisse de sondes nucléiques ou de sondes de type anticorps. C'est pour cette raison que le groupe du Pr. J. Nargeot a choisi la voie de la collaboration avec un groupe possédant une bonne expérience dans le domaine du clonage des canaux calciques. Le laboratoire du Pr. A. Schwartz à Cincinnati (OH, USA) dans lequel le Dr. P. Lory effectuait un stage post-doctoral nous a semblé un bon candidat pour développer cette collaboration. Au cours de l'année que j'ai passée dans ce laboratoire, j'ai pu m'initier aux techniques de clonage moléculaire et réaliser le clonage de quatre isoformes de sous-unité β . De retour en France, j'ai continué de développer cette thématique et cloner une nouvelle isoforme de sous-unité β . En collaboration avec le Dr. P. Lory, revenu dans le groupe du Pr. J. Nargeot, nous avons pu nous intéresser à l'expression de ces clones dans le modèle de reconstitution qu'est l'ovocyte de Xénope. Poursuivant nos investigation dans la recherche du fonctionnement de l'interaction entre les sous-unités $\alpha 1$ et β , nous avons développé la production de protéine β recombinante et l'élaboration d'anticorps à partir de celle-ci. Notre approche d'aujourd'hui semble se diriger préférentiellement dans deux directions : un approfondissement biophysique de la connaissance de la structure de β et une recherche de celle-ci au sein-même de la cellule par des techniques de biologie cellulaire. Par ailleurs, notre objectif est également de rechercher si tel ou tel type de cellule dans une structure tissulaire exprime

préférentiellement une ou plusieurs isoformes de la sous-unité β . Cette investigation visera tout particulièrement des préparations cardiaques et vasculaires.

En bref, le concept général soutendant la totalité de notre démarche est celui d'une sous-unité β agissant comme un modulateur endogène dynamique de l'activité du complexe canalaire.



BIBLIOGRAPHIE



- Ahlijanian M.K., Westenbroek R.E., Catterall W.A. (1990). Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord and retina. *Neuron* 4, 819-832.
- Armstrong D.L. & Eckert R. (1987). Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2518-2522.
- Arreola J., Calvo J., Garcia M.C., Sanchez J.A. (1987). Modulation of calcium channels of twitch skeletal muscle fibres of the frog by adrenaline and cyclic adenosine monophosphate. *J. Physiol. Lond.* 393, 307-330.
- Bean B. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 86, 1-30.
- Bean B. (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 367-384.
- Bean B. (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340, 153-156.
- Beech D.J., Bernheim L., Hille B. (1992). Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron* 8, 97-106.
- Biel M., Ruth P., Bosse E., Hullin R., Stühmer W., Flockerzi V., Hofmann F. (1990). Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Letters* 2, 409-412.
- Biel M., Hullin R., Freundner S., Singer D., Dascal N., Flockerzi V., Hofmann F. (1991). Tissue-specific expression of high-voltage-activated dihydropyridine-sensitive L-type calcium channels. *Eur. J. Biochem.* 200, 81-88.
- Castellano A., Wei X., Birnbaumer L., Perez-Reyes E. (1993). Cloning and expression of a third calcium channel β subunit. *J. Biol. Chem.* 268, 3450-3455.
- Castellano A., Wei X., Birnbaumer L., Perez-Reyes E. (1993). Cloning and expression of a fourth neuronal calcium channel beta subunit. *Biophysical J.* 64, A5.

- Catterall W.A., Seagar M., Takahashi M. (1988). Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channel in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 263, 3535-3538.
- Catterall W.A. & Striessnig (1992). Receptor sites for Ca²⁺ channel antagonists. *TIPS* 13, 256-262.
- Chang F.C. & Hosey M.M. (1988). Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J. Biol. Chem.* 263, 18929-18937.
- Charnet P., Richard S., Gurney A.M., Ouadid H., Tiaho F., Nargeot J. (1991). Modulation of Ca currents in isolated frog atrial cells studied with photosensitive probes. regulation by cAMP and Ca²⁺: a common pathway? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 23, 343-356.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., McDonald R.J., Rutter W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5284-5299.
- Collin T., Wang J.J., Nargeot J., Schwartz A. (sous presse). Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage dependent calcium channel β subunit from normal human heart. *Circ. Res.*
- Dascal N., Lotan I., Karni E., Gigi. A. (1992). Calcium channel currents in *Xenopus* oocytes injected with rat skeletal muscle RNA. *J. Physiol. Lond.* 450, 469-490.
- Dascal N., Snutch T.P., Lubbert H., Davidson N., Lester H.A. (1986). Expression and modulation of voltage-gated calcium channels after RNA injection in *Xenopus* oocytes. *Science* 231, 1147-1150.
- Dascal N. & Lotan I. (1991). Activation of protein kinase C alters voltage dependence of a Na⁺ channel. *Neuron* 6, 165-165.
- Dascal N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *Crit. Rev. in Biochem.*, 22, 317-387.
- Diebold R.J., Koch W.J., Ellinor P.T., Wang J.J., Muthuchamy M., Wieczorek D.F., Schwartz A. (1992). Mutually exclusive exon splicing of the cardiac calcium channel alpha 1 subunit gene generates developmentally regulated isoforms in the rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1497-1501.
- Dolphin A.C. & Scott R.H. (1989). Interaction between calcium channel ligands and guanine nucleotides in cultured rat sensory and sympathetic neurones. *J. Physiol. Lond.* 413, 271-288.

- Drouet B., Garcia L., Simon-Chazottes, D., Mattei M.G., Guénet J.L., Schwartz A., Varadi G. et Pinçon-Raymond M. (1993) The gene coding for the $\alpha 1$ subunit of the skeletal dihydropyridine receptor maps to mouse chromosome 1 and human 1q32.
- Dubel S.J., Starr T.V.B., Hell J., Ahljianian M.K., Enygart J.J., Catterall W.A., Snutch T.P. (1992). Molecular cloning of the $\alpha 1$ subunit of an ω -conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5058-5062.
- Fischmeister R. & Hartzel H.C. (1986). Mechanism of action of acetylcholine on calcium current in single cells from frog ventricle. *J. Physiol. Lond.* 376, 183-202.
- Fischmeister R. & Hartzel H.C. (1990). Regulation of calcium current by low-Km cyclic AMP phosphodiesterases in cardiac cells. *Mol. Pharmacol.* 38, 426-433.
- Fleckenstein A. (1985). Calcium antagonists and calcium agonists: fundamental criteria and classification. Dans *Bayer-Symposium IX: cardiovascular effects of dihydropyridine-type calcium antagonists and agonists*, ed. Fleckenstein A., Van Breemen C., Gross R., Hoffmeister F. Berlin, Heidelberg; Springer-Verlag.
- Fosset M., Jaimovich E., Delpont E., Lazdunski M. (1983). [^3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 258, 6086-6092.
- Fournier F., Honoré E., Brulé G., Mironneau J., Guilbault P. (1989). Expression of Ba currents in *Xenopus* oocytes injected with pregnant rat myometrium mRNA. *Pflügers Arch.* 413, 682-684.
- Fraser D.D. & MacVicar B.A. (1991). Low-threshold transient calcium current in rat hippocampal lacunosum-moleculare interneurons: kinetics and modulation by neurotransmitters. *J. Neurosci.* 11, 2812-2820.
- Fujita Y., Mynlieff M., Dirksen R., Kim M.S., Niidome T., Nakai J., Friedrich T., Iwabe N., Miyata T., Furuichi T., Furutama D., Mikoshiba K., Mori Y., Beam K.G. (1993). Primary structure and functional expression of the ω -conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron* 10, 585-598.
- Gregg R.G., Powers P.A. et Hogan K. (1993). Assignment of the human gene for the voltage-dependent calcium channel to chromosome 17 using somatic cell hybrids and linkage mapping. *Genomics* 15, 185-187.

- Gregg R.G., Couch F., Hogan K et Powers P.A. et. (1993). Assignment of the human gene for the alpha 1 subunit of the skeletal muscle DHP-sensitive Ca²⁺ channel to chromosome 1q31-q32. *Genomics* 15, 107-112.
- Gundersen C.B. & Umbach J.A. (1992). Suppression cloning of the cDNA for a candidate subunit of a presynaptic calcium channel. *Neuron* 9, 527-537.
- Gurdon J.B., Lan C.D., Woodland H.R., Marbaix G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177-182.
- Guy H.R. et Conti F. (1990) Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *TINS* 13, 201-206.
- Hagiwara N., Irisawa H., Kameyama M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol. Lond.* 395, 233-253.
- Hartzell H.C. (1988). Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 52, 165-247.
- Heinemann S.H., Terlau H., Stühmer W., Imoto K., Numa S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356, 441-443.
- Hess P., Lansman J.B., Tien R.W. (1984). Different modes of Ca channel gating behavior favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311, 538-544.
- Hille B. (1992). *Ionic channels in excitable membranes*, 2nd ed., Sinauer. Sunderland, MA, USA.
- Hosey M.M. & Lazdunski M. (1988). Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membr. Biol.* 104, 81-105.
- House C., Kemp B.E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 238, 1726-1728.
- Hui A., Ellinor P.T., Krizanova O., Wang J-J., Dielbold R.J., Schwartz A. (1991). Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the $\alpha 1$ subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Neuron* 7, 35-44.

- Hullin R., Singer-Lahat D., Freichel M., Biel M., Dascal N., Hofmann F., Flockerzi V. (1992). Calcium channel β subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* 13, 885-890.
- Isom L.L., De Jongh K.S., Patton D.E., Reber B.F.X., Offord J., Charbonneau H., Walsh K., Goldin A.L., Catterall W.A. (1992). Primary Structure and Functional expression of the β 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256, 839-842.
- Jan L.Y. & Jan Y.N. (1992). Tracing the roots of ion channels. *Cell* 69, 715-718.
- Jay S.D., Sharp A.H., Kahl S.D., Vedvick T.S., Harpold M.M., Campbell K.P. (1991). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel α 2-subunit and the associated δ peptides. *J. Biol. Chem.* 266, 3287-3293.
- Kim H., Kim H.L., Chin H. (1992). Differential expression of brain L-type and P-type calcium channel mRNAs in adult and developing rat brain. 22nd Neuroscience abs, 18, 479-9, 1139.
- Kim H.L., Kim H., Lee P., King R.G., Chin H. (1992). Rat brain expresses an alternatively spliced form of the dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel α 2 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3251-3255.
- Kim M.S., Mori T., Sun L.X., Imoto Y., Mori Y. (1993). Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Letters* 318, 145-148.
- Kleffel B., Garativo R.M., Baumeister, W. et Rosenbush. (1985). Secondary structure of a channel-forming protein : porin from E. Coli outer membranes. *EMBO J.* 4, 1589-1582.
- Klockner U., Itagaki K., Bodi I., Schwartz A. (1992) β -subunit expression is required for cAMP-dependent increase of cloned cardiac and vascular calcium channel currents. *Pflügers Arch.* 420, 413-415.
- Klockner U., Itagaki K., Bodi I., Schwartz A. (1992) Co-expression of Skeletal β -subunit is required for cAMP dependent increase of calcium channel current in *Xenopus* oocytes expressing cardiac or vascular α 1 subunits. *Biophys. J.* 61: A407.
- Lee K. et Tsien R.W. (1983). Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialyzed heart cells. *Nature* 302, 790-794.

- Lacerda A.E., Kim H.S., Ruth P., Perez-reyes E., Flockerzi V., Hofmann F., Birnbaumer L., Brown A.M. (1991). Normalization of current kinetics by interaction between the α -1 and the β subunits of the skeletal muscle dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channel. *Nature* 352, 527-530.
- Lacerda A.E., Rampe D., Brown A.M. (1988). Effects of protein kinase C activators on cardiac Ca^{2+} channels. *Nature* 335, 249-251.
- Leonard J.P., Nargeot J., Snutch T.P., Davidson N., Lester H.A. (1987). Ca channels induced in *Xenopus* oocytes by rat brain mRNA. *J. of Neurosci.* 7, 875-881.
- Lester H.A., Snutch T.P., Leonard J.P., Dascal N., Curtis B.M., Davidson N. (1989). Expression of mRNA encoding voltage-dependent Ca channels in *Xenopus* oocytes. *Calcium Channels: structure an function.* Ann N. Y. Acad. Sci. 560, 174-182.
- Lester H.A., Snutch T.P., Leonard J.P., Nargeot J., Davidson N. (1988). Expression of mRNA encoding rat brain Ca^{2+} channels in *Xenopus* oocytes. Dans "*the calcium channel: structure, function and implications.*" Springer Verlag, New York. 272-280.
- Lester H.A. (1988). Heterologous expression of excitability proteins: route to more specific drugs ? *Science* 241, 1057-1063.
- Llinas R., Sugimori M., Lin J.W., Cherskey B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1689-1693.
- Llinas R. & Yarom Y. (1981). Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian olivary neurones. *J. Physiol. Lond.* 315, 569-584.
- Lopez H.S. & Brown A.M. (1991). Correlation Between G Protein Activation and Reblocking Kinetics of Ca^{2+} Channel Currents in Rat Sensory Neurons. *Neuron* 7, 11061-1068
- Lory P, Nargeot J (1992) Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac calcium channels expressed in *Xenopus Laevis* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 182: 1059-1065.
- Lory P., Rassendren F.A., Richard S., Tiaho F., Nargeot J. (1990). Characterization of voltage-dependent calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat heart. *J. Physiol. Lond.* 429, 95-112.

- Lory P., Varadi G., Schwartz A. (1992). Molecular insights into regulation of L-type Ca channel function. NIPS 6, 277-281.
- Lory P., Varadi G., Slish D.F., Varadi M., Schwartz A. (1993). Characterization of β subunit modulation of a rabbit cardiac L-type Ca²⁺ channel α 1 subunit as expressed in mouse L cells. FEBS Letters 315, 167-172.
- Lotan I., Goelet P., Gigi A., Dascal N. (1989). Specific block of calcium channel expression by a fragment of dihydropyridine receptor cDNA. Science 243, 666-669.
- Lotan I. (1992). Hybrid Arrest Technique to test for Functional Roles of Cloned cDNAs and to Identify Homologies among Ion Channel Genes. Dans *Methods in ENZYMOLOGY* Vol 207 "Ion Channels", 605-612.
- Malouf N.N., McMahon D.K., Hainsworth C.N., Kay B.K. (1992). A two-motif isoform of the major calcium channel subunit in skeletal muscle. Neuron 8, 899-906.
- McDonald T., Pelzer D., Trautwein W. (1989). Dual action (stimulation, inhibition) of D600 on contractility and calcium channels in guinea-pig and cat heart cells. J. Physiol. Lond. 414, 569-586.
- Merill A.R. et Cramer W.A. (1990). Identification of a voltage-responsive segment of the potential gated colicin E1 ion channel. Biochemistry 29, 8529-8534.
- Méry P.F., Lohmann S., Walter U., Fischmeister R. (1991). Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMPc-dependent protein kinase in mammalian myocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1197-1201.
- Mikami A., Imoto K., Tanabe T., Niidome T., Mori Y., Takeshima H., Narumiya S., Numa S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. Nature 340, 230-233.
- Miledi, R. & Parker, I. 1984. Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. J; Physiol. Lond. 416, 601-621.
- Miledi R., Parker I., Woodward R.M. (1989). Membrane current elicited by divalent cations in *Xenopus* oocytes. J. Physiol. Lond. 417, 173-195.
- Miledi R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus* Laevis oocytes. Proc. R. Soc. Lond., B 215, 491-497.

- Mintz I.M., Adams M.E., Bean B.P. (1992). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9, 85-95.
- Mintz I.M., Venema V.J., Adams M.E., Bean B.P. (1991). Inhibition of N- and L-type Ca²⁺ channels by the spider venom toxin ω -Aga-IIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 6628-6631.
- Mintz I.M., Venema V.J., Swiderek K., Lee T., Bean B.P., Adams M.E. (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVa. *Nature* 355, 827-829.
- Mori M., Friedrich T., Kim M-S., Mikami A., Nakai J., Ruth P., Bosse E., Hofmann F., Flockerzi V., Furuichi T., Mikoshiba K., Imoto K., Tanabe T., Numa S. (1991). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350, 398-402.
- Mulvey O., King G.F., Cooke R.M., Doak D.G., Harvey T.S. et Campbell I.D. (1989). High resolution 1H-NMR study of the solution structure of the S4 segment of the sodium channel protein. *FEBS Lett.* 257, 113-117.
- Nakayama H., Taki M., Striessnig J., Glossmann H., Catterall W.A., Kanaoka Y. (1991). Identification of 1,4-dihydropyridine binding regions within the α 1 subunit of skeletal muscle Ca²⁺ channels by photoaffinity labeling with diazepam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 9203-9207.
- Nargeot J., Dascal N., Lester H. A. (1992). Heterologous expression of calcium channels. *J. Membrane Biol.* 126, 97-108.
- Neveux D., Nargeot J., Richard S. (sous presse). Two types of high-voltage-activated, dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ currents with distinct electrophysiological and pharmacological properties in cultured rat aortic myocytes. *Pflügers Arch.*
- Niidome T., Kim M.S., Friedrich T., Mori Y. (1992) Molecular cloning and characterization of a novel channel from rat brain. *FEBS Letters.* 308, 7-13
- Nilius B. (1988). Modal gating behavior of cardiac sodium channels in cell-free membrane patches. *Biophys. J.* 53, 8577-862.
- Noda M., Susuki H., Numa S., Stuhmer W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin sensitivity and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Letters* 259, 213-216.

- O'Rourke B., Backx P.H., Marban E. (1992). Phosphorylation-Independent Modulation of L-type Calcium Channels by Magnesium-Nucleotide Complexes. *Science* 257, 245-248
- Ono K. & Trautwein W. (1991). Potentiation by cyclic GMP of β -adrenergic effect on Ca^{2+} current in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. Lond.* 443, 387-404.
- Ouadid H., Seguin J., Dumuis A., Bockaert J. Nargeot J. (1992). Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-Hydroxytryptamine 4 receptors. *Mol. Pharmacol.* 41, 346-351.
- Parker I., & Ivorra I. (1990). A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus Laevis*. *Proc. R. Soc. Lond., B* 238, 369-381.
- Patton D.E., West J.W., Catterall W.A., Goldin A.L. (1992). Amino acid residues required for fast Na^{+} -channel inactivation: Charges neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10905-10909.
- Paupardin-Tritsch D., Hammond C., Gerschenfeld H.M., Nairn A.C., Greengard P. (1986). cGMP-dependent protein kinase enhances Ca^{2+} current and potentiates the serotonin-induced Ca^{2+} current increase in snail neurones. *Nature*, 812-814.
- Pelzer D., Pelzer S., McDonald T.F. (1990). Properties and regulation of calcium channels in muscle. *Rev. Physio. Biochem. Pharmacol.* 114, 108-206.
- Perez-Reyes E., Wei X., Castellano A., Birnbaumer L. (1990). Molecular diversity of L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 265, 20430-20436.
- Perez-Reyes E., Castellano A., Kim H.S., Bertrand P., Bagstrom E., Lacerda A.E., Wei X., Birnbaumer L. (1992). Cloning and expression of a cardiac/brain Beta subunit of the L type calcium channel. *J. Biol. Chem.* 267, 1792-1797.
- Perozo E. & Bezanilla F. (1990). Phosphorylation affects voltage gating of the delayed rectifier K^{+} channel by electrostatic interactions. *Neuron* 5, 685-690.
- Plummer M. & Hess P. (1991). Reversible uncoupling of inactivation in N-type Calcium channels. *Nature* 351, 657-659.
- Pongs O. (1992). Structural basis of voltage-gated K^{+} channel pharmacology. *TIPS* 13, 359-365.

- Powers P.A., Gregg R.G. et Hogan K. (1992). Linkage mapping of the human gene for the alpha 1 subunit of the cardiac DHP-sensitive Ca²⁺ channel to chromosome 12p13.2-pter using a dinucleotide repeat. *Genomics* 14, 206-207.
- Powers P.A., Liu S., Hogan K. et Gregg R.G. (1992). Skeletal muscle and brain isoforms of a β -subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* 267, 22967-22972.
- Powers P.A., Liu S., Hogan K. et Gregg R.G. (1993). Molecular characterization of the gene encoding the gamma subunit of the human skeletal muscle 1,4 dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel (CACNLG), cDNA sequence, gene structure, and chromosomal location. *J. Biol. Chem.* 268, 9275-9279.
- Pragnell M., Sakamoto J., Jay S.D., Campbell K.P. (1991). Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel β -Subunit. *FEBS Letters.* 291, 253-258.
- Regula S., Schneider T., Nastainczyk W., Meyer H.E., Hofmann F. (1991). Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium-channel $\alpha 1$ subunit. *EMBO J.* 10, 45-49.
- Reuvery E., Twombly D.A., Narahashi T. (1993). Chlordiazepoxide block of two types of calcium channels in neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. and Exp. Therap.* 264, 22-28.
- Richard S., Charnet P., Nerbonne J.M. (1993). Interconversion between distinct gating pathways of the high threshold calcium channel in rat ventricular myocytes. *J. Physiol. London* 462, 197-228.
- Richard S., Neveu D., Carnac G., Bodin P., Travo P., Nargeot J. (1992). Differential expression of voltage-gated Ca²⁺-currents in cultured aortic myocytes. *BBA* 1160, 95-104.
- Romey G., Garcia L., Dimitriadou V., Pincon-Raymond M., Rieger F., Lazdunski M. (1989). Ontogenesis and localization of Ca²⁺ channels in mammalian skeletal muscle in culture and role in excitation-contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2933-2937.
- Rosenfeld M.R., Wong E., Dalmau J., Manley G., Posner J.B., Sher E., Furneaux H.M. (1993). Cloning and characterisation of a Lambert-Eaton myastenic syndrome antigen. *Ann. Neurol.* 33, 113-120.
- Ruth P., Röhrkasten A., Biel M., Bosse E., Regulla S., Meyer H.E., Flockerzi V., Hofmann F. (1989). Primary structure of the β subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245, 1115-1118.

- Sakamoto J. & Campbell K.P. (1991). A monoclonal antibody to the b subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor immunoprecipitates the brain w-conotoxin GVIA receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 18914-18919.
- Sambrook E., Fritsch F., Maniatis T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sargent P.B. (1992). Electrical signaling. Dans : *An introduction to Molecular neurobiology* Ed. par Zach W. Hall, Sinauer.
- Sather W.A., Tanabe T., Mori Y., Adams M.E., Miljanich G., Numa S., Tsien R.W. (1992). Contrast between cloned BI and cardiac L-type Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. 22nd Neuroscience abs, 18, 10.11.
- Satin J., Kyle J.W., Chen M., Bell P., Cribbs L.L., Fozzard H.A., Rogart R.B. (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science* 256, 1202-1205.
- Schneider T. & Hofmann F. (1988). The bovine cardiac receptor for calcium channel blockers is a 195-kDa protein; *Eur. J. Biochem.* 174, 369-375.
- Schultz D., Mikala G., Yatani A., Engle D.B., Iles D.E., Segers B., Sinke R.J., Weghuis D.O., Klöckner U. Wakamori M., Varadi G. et Schwartz A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6228-6232.
- Seino S et coll. (1992). Assignment of the gene encoding the $\alpha 1$ subunit of the neuroendocrine/brain-type calcium channel to human chromosome 3, band p14.3. *Genomics* 13, 1375-1377.
- Seino S., Chen L., Seino M., Blondel O., Takeda J., Johnson L.H., Bell G.I. (1992). Cloning of the $\alpha 1$ subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89, 584-588.
- Singer D., Biel M., Lotan L., Flockerzi V., Hofmann F., Dascal N. (1991). Roles of the subunits of calcium channel in its expression and function. *Science* 253: 1553-1557.
- Singer D., Gershon E., Lotan I., Hullin R., Biel M., Flockerzi V., Hofmann F., Dascal N. (1992). Modulation of cardiac Ca²⁺ channels in *Xenopus* oocytes by protein kinase C. *FEBS Letters* 306, 113-118.
- Singer D., Lotan I., Itagaki K., Schwartz A., Dascal N. (1992). Evidence for the existence of RNA of Ca²⁺ channel $\alpha 2$ - δ subunit in *Xenopus* oocytes. *BBA* 1137, 39-44.

- Snutch T. P. & Mandel G. (1992). Tissue RNA as Source of Ion Channels and Receptors. Dans *Methods in ENZYMOLOGY* Vol 207 "Ion Channels", 297-309.
- Snutch T.P., Tomlinson W.J., Leonard J.P., Gilbert M.M. (1991). Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* 7, 45-57.
- Snutch T.P. & Reiner P.B. (1992). Ca²⁺ channels: diversity of form and function. *Cur. Op. in Neurobiol.* 2, 247-253.
- Soldatov M. (1992). molecular diversity of L-type Ca²⁺ channel transcripts in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4626-4632.
- Soong T.W., Stea A., Hodson C.D., Dubel S.J., Vincent S.R., Snutch T.P. (1993). Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260, 1133-1136.
- Starr T.V.B., Prystay W., Snutch T.P. (1991). Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5621-5625.
- Striessnig J., Murphy B.J., Catterall W.A. (1991). Dihydropyridine receptor of the L-type Ca²⁺ channel: identification of binding domains for [³H](+)-PN200-110 and [³H]azidopine within the α 1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10769-10773.
- Stühmer W. (1992). Electrophysiological Recording from *Xenopus* Oocytes. Dans *Methods in ENZYMOLOGY* Vol 207 "Ion Channels", 319-339.
- Susuki H., Beckh S., Kubo H., Yahagi N., Ishida H., Kayano T., Noda M., Numa S. 1988. Functional expression of cloned cDNA encoding sodium channel III. *FEBS Letters*, 228, 195-200.
- Swandula D., Carbone E., Lux H.D. (1991). Do calcium channel classifications account for neuronal calcium channel diversity? *TINS* 14, 46-51.
- Swartz K.J., Merritt A., Bean B.P., Lovinger D.M. (1993). Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca²⁺ channels and synaptic transmission. *Nature* 361, 165-168.
- Swartz K.J. (1993). Protein kinase C modulates G protein inhibition of neuronal calcium channels. *Biophysical J.* 64, A204.



- Takahashi K. & Akaike N. (1990). Calcium antagonist effect on low-threshold (T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 169-175.
- Tanabe T., Tkeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313-318
- Tanabe T., Beam K.G., Powell J.A., Numa S. (1988). Restoration of excitation contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336, 134-137.
- Tanabe T., Adams B.A., Numa S., Beam K.G. (1991). repeat I of the dihydropyridine receptor is critical in determining calcium channel activation kinetics. *Nature* 352, 800-803.
- Tang C., Presser F., Morad M. (1988). Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 240, 213-215.
- Tang S., Yatani A., Mori Y., Schwartz A. (1993). Molecular localization studies of the dihydropyridine (DHP) binding site in the cardiac L-type voltage dependent Ca²⁺ channel (L-VDCC) α 1 subunit reveal motif IV S3 to S6 as essential. *Biophysical J.* 64, A6.
- Terlau H., Heinemann S.H., Stuhmer W., Pusch M., Conti F., Imoto K., Numa S. (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium Channel II. *FEBS Letters* 293, 93-98.
- Tiaho F., Richard S., Lory P., Nerbonne J.M., Nargeot J. (1990). Cyclic-AMP-dependent phosphorylation modulates the stereospecific activation of cardiac Ca channels by Bay K 8644. *Pflügers Arch.* 417, 58-66.
- Tiaho F., Nargeot J., Richard S. (1991). Voltage-dependent regulation of L-type cardiac Ca channels by isoproterenol. *Pflügers Arch.* 419, 596-602.
- Trautwein W. & Hescheler J. (1990). Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G protein. *Ann. Rev. Physiol.* 52, 257-274.
- Trimmer, J.S. & Agnew, W.S. 1989. Molecular diversity of voltage-sensitive Na channels. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 1401-1418.
- Tsien R.W., Lipscombe D., Madison D.V., Blay K.R., Fox A.P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends in Neurosci.*, 11 431-438.

- Tsien R.W., Ellinor P.T., Horne W.A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *T.I.P.S.*, 12, 349-354.
- Tytgat J., Nilius B., Vereecke J., Carmeliet E. (1988). The T-type Ca channel in guinea pig ventricular myocytes is sensitive to isoproterenol. *Pflügers Arch.* 411, 704-706.
- Tytgat J. & Hess P. (1992). Evidence for cooperative interactions in potassium channel gating. *Nature* 359, 420-423.
- Umbach J.A. & Gunderson C.B. (1987). Expression of an ω -conotoxin-sensitive calcium channel in *Xenopus* oocyte injected with mRNA from Torpedo electric lobe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 5464-5468.
- Varaldi G., Lory P., Schultz D., Varaldi M., Schwartz A. (1991). Acceleration of activation and inactivation kinetics by the β subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 352, 159-162.
- Wei X., Perez-Reyes E., Lacerda A.E., Schuster G., Brown A.M., Birnbaumer L. (1991). Heterologous regulation of the cardiac Ca²⁺ channel α 1 subunit by skeletal muscle β and γ subunits. implications for the structure of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 266, 21943-21947.
- Westenbroek R.E., Ahljianian M.K., Catterall W.A. (1990). Clustering of L-type Ca²⁺ channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 347, 281-283.
- Westenbroek R.E., Hell J.W., Warner C., Dubel S., Snutch T.P., Catterall W.A. (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-Type calcium channel α 1. *Neuron* 9, 1099-1115.
- Williams M.E., Brust P.F., Feldman D.H., Patthi S., Simerson S., Maroufi A., McCue A.F., Velicelebi G., Ellis S.B., Harpold M.M. (1992). Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257, 389-395.
- Williams M.E., Feldman D.H., McCue A.F., Brenner R., Velicelebi G., Ellis S.B., Harpold M.M. (1992). Structure and functional expression of α -1, α -2 and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8, 71-84.
- Witcher D.R., De Waard M., Sakamoto J., Franzini-Armstrong C., Pragnell M., Kahl S.D. et Campbell K.P. (1993). Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca²⁺ channel complex purified from the brain. *Science* 261, 486-489.

Yatani A., Codina J., Imoto Y., Reeves J., Birnbaumer L., Brown A.M. (1987). A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science* 238, 1288-1290.

Yatani A., Imoto Y., Codina J., Hamilton S.L., Brown A.M., Birnbaumer L. (1988). The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, G_s, also stimulates dihydropyridines-sensitive Ca²⁺ channels. Evidence for direct regulation independent of phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase or stimulation by a dihydropyridine agonist. *J. Biol. Chem.* 263, 9887-9895.

Yatani A. & Brown A.M. (1989). Rapid β -adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway. *Science* 245, 71-74.

Annexes

Ins(1,4,5)P₃ formation and fluctuating chloride current response induced by external ATP in *Xenopus* oocytes injected with embryonic guinea pig brain mRNA

Franck Fournier, Eric Honoré, Thibault Collin and Pierre Guilbault

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, UFR de Biologie, Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Asq Cédex, France

Received 25 September 1990; revised version received 29 October 1990

In voltage-clamped *Xenopus* oocytes injected with embryonic guinea pig mRNA, effective concentrations of extracellular ATP elicited an inward fluctuating current. This current, carried by Cl⁻ ions, was mainly dependent upon liberation of Ca²⁺ ions from stores as demonstrated by experiments using intracellular EGTA loading and TMB-8 superfusion. Neomycin inhibited these fluctuating currents indicating that the transplanted purinoceptor is linked to phospholipase C activity and triggers Ins(1,4,5)P₃ formation. Ins(1,4,5)P₃ production evoked by external ATP was clearly demonstrated by directly measuring the water-soluble Ins(1,4,5)P₃ level in injected oocytes. Finally, it is suggested that the ATP effect was mediated by a Ca²⁺ release from Ins(1,4,5)P₃ sensitive pools since heparin blocked the ATP responsiveness. The acquired purinoceptor may be made apparent to a P₂ subtype since ATP and ADP were equipotent in eliciting Cl⁻ current while AMP and Adenosine were ineffective in injected oocytes.

Xenopus oocyte; Guinea pig brain mRNA; Ins(1,4,5)P₃; Internal Ca²⁺ pool; Extracellular ATP; P₂ purinoceptor

1. INTRODUCTION

The close association between neuronal activation and ATP secretion indicates that extracellular ATP can act as a cotransmitter [1] and exert a feedback modulation of the transmitter release in central and peripheral nervous systems. Thus, it was previously stated that afferent fibres may utilize ATP to excite neurons in the sensory regions of the brain, as well as in the spinal cord [2-4]. Furthermore, other findings have pointed out a release of ATP from cholinergic nerve endings in the central nervous system [5]. P₂ purinergic receptors, reported to be sensitive to ATP and ADP [6], exhibit a wide variety of transduction mechanisms (Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ mobilization, Ca²⁺ influx through receptor-operated channel). These mechanisms are not yet clearly defined but both contribute to increasing the free intracellular Ca²⁺ level. The complexity and diversity of these transduction processes led us to use the *Xenopus* oocyte translation system to express P₂ purinoceptor from embryonic guinea pig mRNA. *Xenopus* oocyte is a useful tool in the dissection of synaptic communication processes since it faithfully synthesises and assembles a variety of biologically active neurotransmitter receptors after injection of exogenous mRNA [7]. With this system, a range of studies

on receptor function is accessible when the receptors are active in controlled situations. In many cases, the agonist-induced responses were detected as changes in chloride conductance as a result of the activation of endogenous Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels in the oocyte plasma membrane [8]. In the present study, a description of an acquired P₂ purinoceptor activity is presented and evidence is provided for the participation of phosphoinositide breakdown and an Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺-release from intraoocyte stores to the purinergic response.

2. MATERIALS AND METHODS

Total RNA was extracted from embryonic guinea pig brain following the Chirgwin procedure [9] and poly(A)⁺ mRNA was selected with two runs of oligo(dT) cellulose chromatography. Oocytes were dissected away from tricaine methane sulphate (MS 222)-anesthetized adult *Xenopus laevis* and prepared as reported elsewhere [10]. Stage VI oocytes were pressure-injected with 50 ng of mRNA and incubated in a modified Barth solution (MBS) supplemented with 50 µg/ml gentamycin for 3-6 days. Uninjected oocytes served as control.

Electrophysiological measurements were performed using the two-electrode voltage-clamp technique and membrane currents were monitored on a flat-bed single-pen chart recorder. In all experiments, the holding voltage was set to -70 mV and oocytes were routinely tested in the conventional bathing medium ND96 (in mM: NaCl 96; MgCl₂ 2; CaCl₂ 1.8; Hepes 5, pH 7.4 with NaOH) unless otherwise stated. Drugs were applied either externally by addition to the superfusate or internally by pressure injection using an additional micropipette (3-8 µm in diameter). The injected volume was 0.5-0.8% of the cell volume and all injection solutions were made up

Correspondence address: P. Guilbault, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, UFR de Biologie, Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Asq Cédex, France

in 10 mM Hepes-KOH (pH 7). Experiments were conducted using batches of oocytes derived from three different donors.

To determine $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ level, 40–50 injected oocytes were incubated for 24 h at 22°C with MBS supplemented with 10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ of myo-[2- ^3H]inositol. After extensive washing, cells were preincubated for 20 min with 10 mM LiCl in MBS medium and stimulated for 2 min with 300 μM ATP or 10 μM ACh. RNA-injected oocytes with no agonist stimulation served as control. The reaction was stopped by the addition of perchloric acid to 0.5 M and immediate homogenisation. Subsequently, cell extracts were neutralized with 1.5 M KOH in 75 mM Hepes and applied to Dowex AG 1 \times 8 columns (formate form). A stepwise elution was performed using 0.1 M formic acid and increasing concentrations of ammonium formate [11]. The radioactivity of the fraction eluted between 0.4 and 1 M ammonium formate containing $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ was counted in a liquid scintillation counter.

3. RESULTS AND DISCUSSION

At the holding voltage of -70 mV, the external application of an effective concentration of ATP (300 μM) in guinea pig brain RNA-injected oocytes induced an oscillatory inward current accompanied by an increase in membrane conductance (Fig. 1A: left panel). After a latency period of 28 ± 7 s ($n = 8$), this response peaked

between 2 and 4 min after ATP application and decreased over the next 4–8 min. This current presented a reversal potential of -25 ± 4 mV ($n = 5$) and was completely inhibited by 9-anthracene carboxylic acid (9AC; final concentration = 2.5 mM; $n = 5$; data not illustrated), a blocker of chloride conductance [7]. These results demonstrate that these oscillations were generated by an inward chloride current. Native oocytes failed to respond to extracellular ATP even when perfused with concentrations up to 300 μM (Fig. 1A: right panel; $n = 10$). Intracellular injection of ATP did not cause any change in the current recording of injected oocytes. In view of these observations, it may be advanced that ATP effects, following mRNA injection, are due to newly expressed purinoceptors in oocyte membrane. To our knowledge, the ATP response we describe is the first demonstration of an expression of purinoceptors in *Xenopus* oocytes after injection of mRNA from mammalian brain. As depicted in Fig. 1B, the fluctuating current is not dependent upon extracellular Ca^{2+} since no significant modification either of the wave form or of the amplitude of this current could be recorded in a Ca^{2+} -free medium (Ca^{2+} 0, EGTA 1 mM) in the presence of 300 μM ATP (right panel; $n = 4$). By contrast, intracellular injection of EGTA (final concentration = 0.1 mM) markedly attenuated the ATP response (Fig. 1C; $n = 8$), suggesting that the ATP-sensitive chloride current was mainly connected to intracellular Ca^{2+} variations probably resulting of release from an intracellular Ca^{2+} pool.

With the purpose of providing evidence for the involvement of intracellular Ca^{2+} stores in the ATP response, oocytes were challenged using

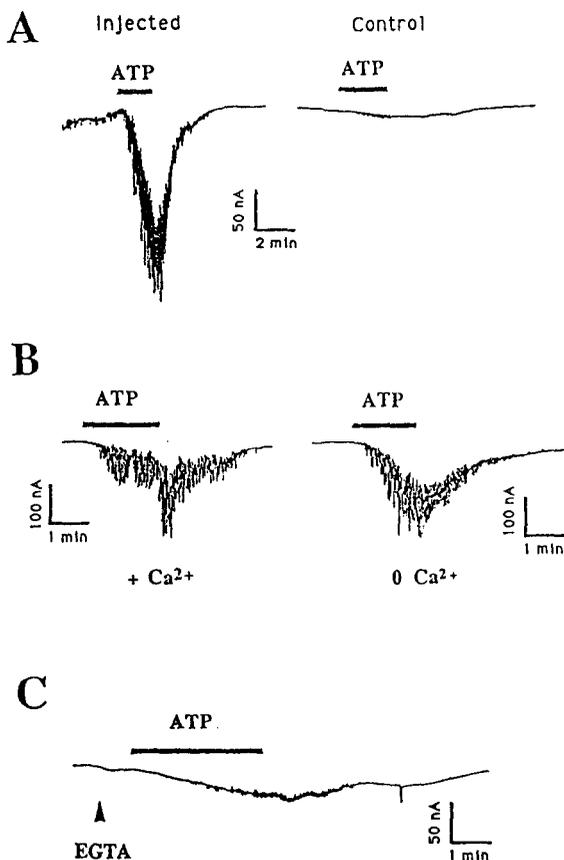


Fig. 1. ATP effects on membrane currents and Ca^{2+} dependence of the ATP response. (A) ATP-induced membrane currents compared in injected and control oocytes. (B) Dependence of ATP response upon external Ca^{2+} concentration: Ca^{2+} 1.8 mM (left panel); Ca^{2+} 0.1 mM EGTA (right panel). (C) Dependence of ATP response upon internal Ca^{2+} activity. Inhibition of ATP-evoked Cl^- -current by intraoocyte injection of EGTA (final concentration = 0.1 mM). 300 μM ATP superfusion are indicated by horizontal bars.

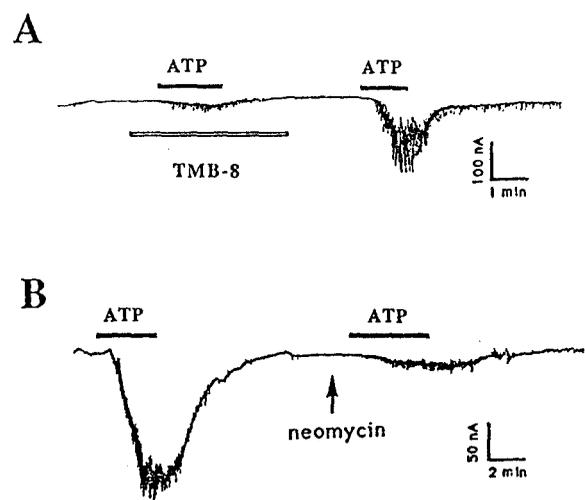


Fig. 2. Role of Ca^{2+} release from intracellular stores and mediation of ATP effects by phospholipase C. (A) Reversible inhibition by TMB-8 (external concentration of 100 μM) of the ATP-induced Cl^- -current. (B) Effect of intra-oocyte injection of 400 pmol neomycin on a Ca^{2+} -activated Cl^- current evoked during ATP superfusion. Oocytes were superfused with 300 μM ATP; TMB-8 superfusion is indicated by the empty horizontal bar.

3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester hydrochloride (TMB-8), a putative inhibitor of Ca^{2+} release from intracellular stores [12]. As shown in Fig. 2A, external application of this compound (final concentration = $100 \mu\text{M}$) reversibly inhibited the ATP response ($n = 5$). One of the metabolic transduction pathways which could account for the purinergic response in injected oocytes is phosphoinositide breakdown induced by phospholipase C. Previous intracellular loading of oocytes with neomycin (400 pmol ; Fig. 2B), an inhibitor of the enzymatic degradation of PIP_2 and PIP [13], strongly reduced the purinergic response ($n = 5$). These experiments suggest that phospholipase C activation, leading to $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ synthesis, underlies the ATP-induced oscillatory chloride current. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ production following purinoceptor activation was investigated by measuring the level of this water-soluble product in cells prelabelled with the precursor myo-[2- ^3H]inositol. As shown in Fig. 3A, a significant increase of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ could be detected 2 min after bathing oocytes with $300 \mu\text{M}$ ATP ($301 \pm 45\%$ of control; 3 experiments). This stimulation of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ production with ATP was comparable with the ACh-induced rise of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ formation in injected oocytes ($391 \pm 52\%$ of control; 3 ex-

periments). The $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ response of this Ca^{2+} mobilizing neurotransmitter may be considered as a reference positive control since the muscarinic receptor transduction pathway has been established in previous studies as a Ca^{2+} release from $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -sensitive Ca^{2+} stores in defolliculated oocytes injected with mammalian brain mRNA [14]. Moreover, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ level remained unchanged in native oocytes in the presence of ATP ($300 \mu\text{M}$; data not shown; 3 experiments). To release Ca^{2+} , $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ must bind to receptors that are somehow linked to Ca^{2+} channels connected with $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -sensitive pools. Heparin inhibits both the binding of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ to its purified receptor [15] and the mobilization of Ca^{2+} in numerous cell systems [16]. Fig 3B shows that intra-oocyte injection of heparin (final concentration = $80 \mu\text{M}$) blocked the ATP responsiveness ($n = 4$). Therefore, $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} mobilization did appear to be involved in the ATP effects. Previous pharmacological studies (see [17] for review), based on the rank order of potency of various purinergic agonists, have led to establishing a classification of purinergic receptors as either P_1 (recognizing adenosine and AMP) or P_2 (recognizing ADP and ATP). As shown in Fig. 4, ATP and ADP (final concentration = $300 \mu\text{M}$) were quipotent in eliciting the fluctuating chloride current ($n = 5$) while AMP and adenosine (same concentration) were ineffective in guinea pig brain RNA-injected oocytes ($n = 5$). Therefore, the acquired purinoceptor may be made apparent to a P_2 receptor according to Burnstock's classification.

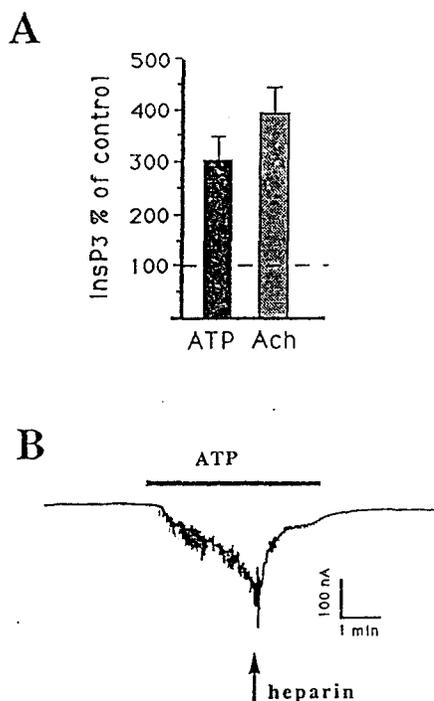


Fig. 3. Mediation of the ATP response by $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. (A) Accumulation of InsP_3 in injected oocytes followed for 2 minutes in the presence of $300 \mu\text{M}$ ATP or $10 \mu\text{M}$ ACh. Results are expressed as the percentage of basal level. (InsP_3 % of control) means \pm SE, three experiments (duplicates); 100% represents the amount of InsP_3 in the absence of external ATP. (B) Typical effect of intraoocyte injection of heparin (final concentration = $80 \mu\text{M}$) on Ca^{2+} activated fluctuating current evoked during the ATP superfusion. The oocyte was superfused with $300 \mu\text{M}$ ATP.

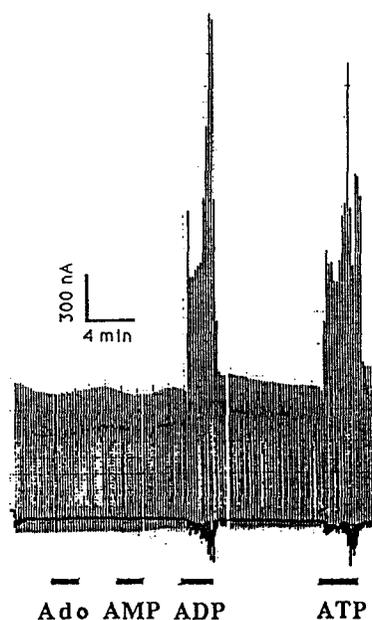


Fig. 4. Membrane currents induced by purinergic agonists in oocytes. Typical chart record of the effects of adenosine (Ado), AMP, ADP, ATP. Each compound was superfused at the concentration of $300 \mu\text{M}$. The oocyte was repeatedly depolarized to 20 mV for 4 s every 20 s to test the membrane conductance variations evoked by the different purinergic agonists.

Our results bring several lines of evidence for a stimulation by ATP of phosphoinositide breakdown evoked by activation of newly expressed purinoceptors. They are consistent with previous studies which have demonstrated that P₂ receptor occupation increases phosphatidyl inositol polyphosphate turnover with subsequent production of Ins(1,4,5)P₃ in a wide variety of cell systems including isolated hepatocytes, Ehrlich ascite tumor cells and rat ventricular cells [18-20]. Likewise, recent findings demonstrated that extracellular ATP caused a large increase in inositol phosphate accumulation in neural cells [21] and thereby initiate a chain of events, which may play a role in the induction of long-term adaptative changes (long-term potentiation; LTP) in synaptic neuronal function. The biochemical characterization of the P₂ class receptors is hardly advanced; no nucleic or immunological probes are available, thus preventing the use of classical techniques to study purinoceptors. Our results suggest an alternative way to investigate a functional and structural characterization of this type of receptor. This approach would be to use the *Xenopus* oocyte to clone the receptor gene, as was previously done with the 5-HT_{1C} or the substance K receptors [22,23].

Acknowledgements: This work received financial support from the Association Française contre les Myopathies.

REFERENCES

- [1] Holton, F.A. and Holton, P. (1954) *J. Physiol. (Lond.)* 126, 124-140.
- [2] Burnstock, G. (1981) *J. Physiol. (Lond.)* 313, 1-35.
- [3] Jahr, C.E. and Jessel, T.M. (1983) *Nature* 304, 730-733.
- [4] Fyffe, R.E.W. and Perl, E.R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6890-6893.
- [5] Richardson, P.J. and Brown, S.J. (1987) *J. Neurochem.* 48, 622-630.
- [6] Burnstock, G. and Kennedy, C. (1985) *Gen. Pharmacol.* 16, 433-440.
- [7] Dascal, N. (1987) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 317-387.
- [8] Miledi, R. (1982) *Proc. R. Soc. Lond. B* 215, 491-497.
- [9] Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- [10] Fournier, F., Honoré, E., Brulé, G., Mironneau, J. and Guilbault, P. (1989) *Plügers Arch.* 413, 682-684.
- [11] Berridge, M.J., Downes, C.P. and Hanley, H.R. (1982) *Biochem. J.* 206, 595-597.
- [12] Chiou, C.Y. and Malagodi, M.H. (1975) *Br. J. Pharmacol.* 53, 279-285.
- [13] Cockcroft, S. and Gomperts, B. (1985) *Nature* 314, 534-536.
- [14] Nomura, Y., Kaneko, S., Kato, K., Yamagishi, S. and Sugiyama, H. (1987) *Mol. Brain Res.* 2, 113-123.
- [15] Supattapone, S., Worley, P., Baraban, J. and Snyder, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1530-1534.
- [16] Worley, P.F., Baraban, J.M., Supattapone, S., Wilson, V.S. and Snyder, S.H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12132-12136.
- [17] Gordon, J.L. (1986) *Biochem. J.* 233, 309-319.
- [18] Charest, R., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15789-15794.
- [19] Dubyak, G.R. and De Young, M.B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10653-10661.
- [20] Legssyer, A., Poggioli, J., Renard, D. and Vassort, G. (1988) *J. Physiol. (Lond.)* 401, 185-199.
- [21] Ehrlich, Y.H., Snider, R.M., Kornecki, E., Garfield, M.G. and Lenox, R.H. (1988) *J. Neurochem.* 50, 295-301.
- [22] Julius, D., MacDermott, A.B., Axel, R. and Jessel, T.M. (1988) *Science* 241, 558-564.
- [23] Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M. and Nakanishi, S. (1987) *Nature* 329, 836-838.

Functional expression of P_{2Y} purinoceptor in *Xenopus* oocyte injected with brain mRNA

E. Honoré^{1*}, F. Fournier¹, T. Collin¹, J. Nargeot², and P. Guilbault¹

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire, UFR de Biologie, Université des Sciences et Techniques de Lille-Flandres-Artois, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

²Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, CNRS, route de Mende, F-34033 Montpellier, France

Received December 18, 1990/Received after revision February 6, 1991/Accepted February 20, 1991

Abstract. *Xenopus* oocytes injected with embryonic guinea-pig brain mRNA expressed functional P_{2Y} purinoceptors. Extracellular ATP stimulated in a dose-dependent manner a delayed Ca²⁺-dependent Cl⁻ current component. Analysis of the interactions of ATP with compounds that affect Ca²⁺ fluxes through the plasma membrane or Ca²⁺ release from internal stores indicates that ATP raises [Ca²⁺]_i by a mechanism that involves activation of voltage-dependent Ca²⁺ channels, which leads to influx of extracellular Ca²⁺ into the cells, as well as release of Ca²⁺ from intracellular stores. Since this phenomenon was not found in control oocytes, it is suggested that brain mRNA encoded for a newly synthesized Ca²⁺-release process stimulated by purinoceptor activation. This mechanism could be largely involved in the short-term regulation of intracellular Ca²⁺ level involved in ATP neuromodulation functions.

Key words: ATP – Purinergic receptor – *Xenopus* oocyte – Brain mRNA – Chloride channel

Introduction

In addition to the well-known role of ATP in supplying chemical energy for maintenance of cell activity, an increasing number of studies provides evidence for a variety of actions of extracellular ATP (for review see [14]). The close association between neuronal activation and ATP secretion indicates that extracellular ATP can exert in the central and peripheral nervous systems a feed-back modulation of the release of transmitters. The functional role of ATP as a contransmitter was first postulated by

Holton and Holton [16]. Evidence was found for ATP release from cholinergic nerve endings in the central nervous system [5]. Afferent fibers utilize ATP to excite neurons in the sensory regions of the brain as well as in the spinal cord [7, 17]. Clinical observations have implicated adenine nucleotides in schizophrenia and in depression [7].

ATP specifically binds to P₂ purinoceptors [6], and Burnstock and Kennedy [8] have proposed that P₂ purinoceptors may be further divided in several subtypes. The existence of at least four P₂ nucleotide receptor subtypes X, Y, Z and T has been hypothesized on the basis of functional responsiveness and the rank order of potency of structural analogues (for review see [14]).

The transduction mechanism responsible for P₂ purinoceptor activity currently leads to an increase in the free intracellular Ca²⁺ level. Different pathways have been described: (a) an increase in the amplitude of the voltage-dependent Ca²⁺ channel current [1]; (b) the association of P_{2Y} purinoceptors with voltage-activated cation channels [4]; (c) a Ca²⁺-permeable purinoceptor-operated channel [3]; (d) mobilization of inositol-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ stores [21].

The lack of specific antagonists able to discriminate among receptors subtypes, the limited number of radioligand binding studies and the lack of affinity-cross-linking studies of the putative receptor protein led us to use the *Xenopus* oocyte translation system to express P₂ purinoceptors from embryonic guinea-pig brain mRNA. The *Xenopus* oocyte is useful in the dissection of the mechanisms of synaptic communication since it faithfully synthesizes and assembles a variety of biologically active neurotransmitter receptors and voltage-gated ion channels after injection of exogenous mRNA. Furthermore, a range of studies on receptor function is accessible when the receptors are active in controlled situations (intracellular medium)

The present study provides a description of functional P_{2Y} purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes and brings evidence for the participation of a newly synthesized intracellular Ca²⁺ mobilization mechanism.

* Present address: Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, 660 route des Lucioles, Sophia Antipolis, F-06560 Valbonne, France

Offprint requests to: P. Guilbault

Materials and methods

mRNA extraction procedure. The mRNA extraction procedure has been previously described elsewhere [12]. Briefly, whole cerebral hemispheres were quickly removed from 45-day-old guinea-pig fetuses and total RNA was purified using a modified guanidium thiocyanate/CsCl method. Poly(A)-rich mRNA was purified by oligo(dT)-cellulose chromatography (redi-column; Pharmacia-LKB) according to standard procedures.

mRNA injection into *Xenopus* oocytes. *Xenopus laevis* were purchased from CRBM (Montpellier, France). Pieces of the ovary were surgically removed and individual oocytes were dissected away in a modified Barth's solution (mM): NaCl 88, KCl 1, NaHCO₃ 2.4, Ca(NO₃)₂ 0.33, CaCl₂ 0.41, MgSO₄ 0.82, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid (HEPES) 10; pH 7.4 with NaOH. To discard follicular cells, stage V and VI oocytes were treated for 2 h with collagenase (1 mg ml⁻¹, Boehringer Mannheim, FRG) in Barth's medium. Each oocyte was injected with 50 ng RNA using a pressure microinjector (Inject+Matic; Geneva, Switzerland). Control oocytes were injected with 50 nl distilled water. Then, oocytes were kept for 4–7 days in Barth's medium supplemented with pyruvate (2.5 mM), theophylline (0.5 mM) and gentamycin (50 µg ml⁻¹).

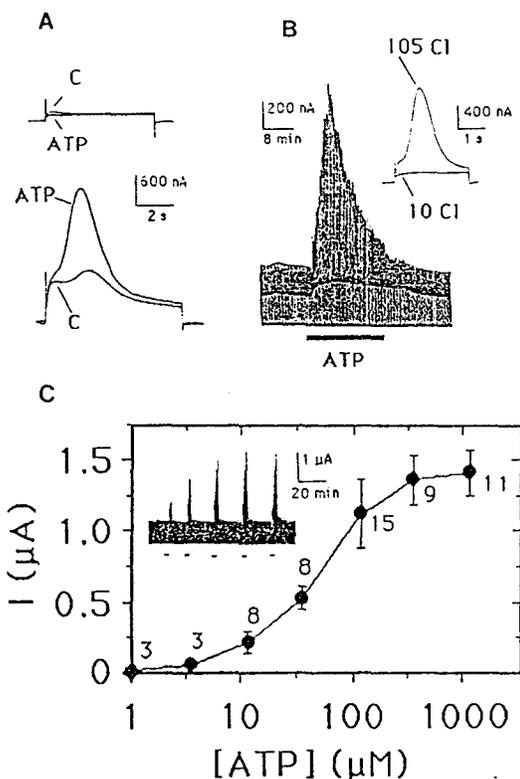


Fig. 1A–C. ATP activates a calcium-activated chloride current in oocytes injected with brain mRNA. **A** *Upper traces:* the Ca²⁺-activated Cl⁻ current in a control oocyte was not affected by 300 µM ATP superfusion. *Lower traces:* 300 µM ATP superfusion stimulated the Ca²⁺-activated Cl⁻ current in a brain-mRNA-injected oocyte. **B** *Inset:* lowering chloride concentration from 105 mM to 10 mM (substitution with methanesulphonate) reduced the ATP effects. The response to 300 µM ATP superfusion displayed a slow desensitization process. **C** *Inset:* dose/effect relationship of the ATP response. Concentrations used were 10, 30, 100, 300 and 1000 µM. The graph represents the relationship between the ATP-activated chloride current amplitude as a function of the logarithm of the ATP concentration (in µM). The number of oocytes used for each mean data point is indicated. In all experiments, the holding potential was -100 mV and the oocytes were depolarized to 20 mV every 20 s. ATP superfusion is indicated by filled bars

Electrophysiological measurements. In a 0.3-ml perfusion chamber, a single oocyte was impaled with two standard glass microelectrodes (0.5–2.0 MΩ resistance) filled with 3 M KCl and maintained under voltage clamp using a Dagan 8500 (Minneapolis, USA) amplifier. Stimulation of the preparation, data acquisition and analyses were performed using the pClamp software (Axon Instruments, Burlingame, USA). In addition, membrane currents were continuously displayed on a flat-bed single-pen recorder (Sefram, Paris, France). Drugs were applied either externally by addition to the superfusate (peristaltic pump Gilson; flow rate: 3 ml min⁻¹) or internally by pressure injection (Inject+Matic, Geneva, Switzerland) using an additional micropipette (4–6 µm in diameter). The injected volume was 0.01%–0.02% of the cell volume. To calculate the final concentration of an injected substance, it was assumed to be distributed throughout the entire cell volume (1 µl). All injection solutions were made in 10 mM HEPES/KOH/distilled water (pH = 7.0). Saline solution (ND 96) of the following composition was used in all procedures unless otherwise stated (mM): NaCl 96, KCl 2, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 2, HEPES 5 (pH 7.4 with NaOH). Barium currents were measured in a barium methanesulphonate solution containing (mM): BaOH 40, NaOH 50, KOH 2, 9-anthracic acid 5, HEPES 5 (pH 7.3 with methanesulphonic acid).

The drugs used (all purchased from Sigma unless otherwise stated) were: adenosine (A), adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP), adenosine 5'-triphosphate disodium salt (ATP), adenosine 5'-[γ-thio]triphosphate tetralithium salt (ATP[γ-s]) as purinergic agonists; adenosine 5'-[α,β-methylene]triphosphate lithium salt ([Me]ATP) as P_{2X} non-competitive antagonist; basilin blue E-3G and cibacon blue 3GA (RB2) as P_{2Y} antagonists; inosine 5'-triphosphate sodium salt (ITP), uridine 5'-triphosphate sodium salt (UTP), guanosine 5'-triphosphate sodium salt (GTP) as purine and pyrimidine nucleotide triphosphates; indomethacin as a prostaglandin synthesis inhibitor; ruthenium red, as a blocker of the Ca²⁺-induced Ca²⁺-release mechanism; 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester hydrochloride (TMB8) and caffeine as internal-pool Ca²⁺-flux inhibitors; ethyleneglycolbis-(β-aminoethyl ether)-*N,N'*-tetraacetic acid (EGTA) as a Ca²⁺ chelator; 9-anthracic acid from Fluka as a chloride channel blocker.

The variability of the results was expressed as the standard error of the mean with *n* indicating the number of cells contributing to the mean. Student's *t*-test was used for statistical analysis.

Results

ATP stimulates a calcium-activated chloride current in oocytes injected with brain mRNA

In control oocytes (Fig. 1A, upper traces), stepping the voltage from a holding potential of -100 mV to 20 mV elicited a transient outward (I₁) current (116 ± 37 nA; *n* = 18). This current peak has already been described in the native oocyte [2, 19] and has been identified as a Ca²⁺-dependent Cl⁻ current. In oocytes injected with guinea-pig brain mRNA (Fig. 1A, lower traces) the outward current amplitude was significantly (*P* < 0.01) increased (832 ± 66 nA, *n* = 22) and an additional delayed transient component (I₂) could be clearly distinguished (993 ± 123 nA, *n* = 22). I₁ appeared within 257 ± 44 ms (*n* = 22) and I₂ after a delay of 1024 ± 87 ms (*n* = 22). Superfusing the injected oocytes with ATP (Fig. 1A, lower traces) caused a marked increase in I₂ amplitude (320 ± 40%, *n* = 22), but only a slight effect on I₁ (25 ± 7%, *n* = 22). By contrast, in control oocytes (Fig. 1A, upper traces), ATP superfusion only induced a slight decrease in I₁ amplitude (-41 ± 19%; *n* = 18). Intraoocyte ATP injection (final concentration: 1 mM) failed to alter the two outward current components, suggesting that ATP acts extracellularly.

As illustrated in Fig. 1 B, the ATP response was transient, indicating a slow desensitization process. The ATP response latency was 27 ± 9 s ($n = 7$) and the time to peak current ranged from 4 min to 6 min.

In order to determine the ionic basis of the ATP-activated current, Cl^- was substituted with methanesulphonate, which has a low permeability through Cl^- channels [2]. Under these conditions, both I_{11} and I_{12} were reduced (Fig. 1 B, inset). Furthermore, addition of the chloride channel blocker 9-anthracic acid (2.5 mM final concentration) to the control bathing solution (ND 96) inhibited both current components (data not shown). Therefore, I_{11} and I_{12} were assumed to be carried by Cl^- .

The ATP response occurred in a dose-dependent manner (Fig. 1 C, inset). Increasing ATP concentrations were superfused for only 3 min with a period of 20 min. This protocol allowed us to monitor dose/effect curves without any significant desensitization. The concentration threshold was $3 \mu\text{M}$ and half-maximum effect $40 \mu\text{M}$ (Fig. 1 C).

Pharmacology of the acquired ATP response

To characterize the ATP response, the potency of different purinergic agonists was investigated. While adenosine and AMP were ineffective ($n = 6$), ADP and ATP were equipotent in eliciting large Cl^- currents (Fig. 2 A).

In various tissues [10], other purine and pyrimidine nucleotide triphosphates exhibit potent ATP-like effects. Figure 2 B demonstrates that ATP, UTP and ITP were equieffective, although GTP was ineffective. ATP appears

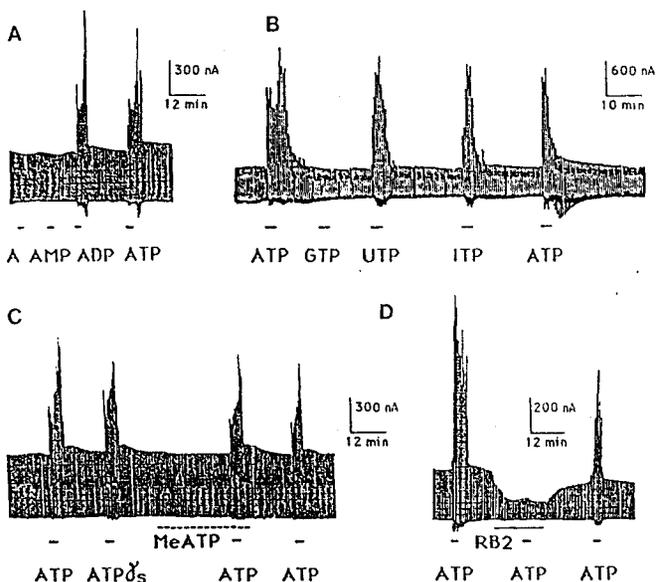


Fig. 2 A–D. Pharmacological characterization of the acquired, purinergic response. A Chart record of the effects of adenosine (A), AMP, ADP and ATP on the membrane currents. B Chart record of the effects of ATP, GTP, UTP and ITP on the membrane currents. C Chart record of the effects of ATP, $\text{ATP}\gamma\text{S}$ and $[\text{Me}]\text{ATP}$ on the membrane currents. D Inhibition of the ATP response by $30 \mu\text{M}$ reactive blue 2 (RB2). The application of RB2 is indicated by a continuous line. Every compound was superfused at a concentration of $300 \mu\text{M}$. In all experiments, the holding potential was -100 mV and the oocytes were depolarized to 20 mV for 4 s every 20 s

to act in its native form since the non-hydrolysable analogue $\text{ATP}\gamma\text{S}$ was as potent as ATP ($n = 5$; Fig. 2 C). $[\text{Me}]\text{ATP}$ was without any effect ($n = 4$) and moreover $[\text{Me}]\text{ATP}$, which is known to be a non-competitive antagonist of the $\text{P}_{2\text{X}}$ purinoceptors (for review see [14]), failed to affect the ATP response. Reactive blue 2, a putative $\text{P}_{2\text{Y}}$ receptor antagonist [9, 23] reversibly inhibited the ATP response ($n = 5$; Fig. 2 D). Nevertheless, this compound cannot be used to provide evidence of receptor subtype since it appears directly to block the chloride current in *Xenopus* oocytes.

The inward currents seen during the ATP response are chloride tail current activated after the depolarizing potential jump. They seem to correspond to the intracellular Ca^{2+} mobilization induced by purinoceptor activation. Moreover, ATP can produce an inward current in the absence of depolarizing steps (data not shown).

Finally, we investigated whether the ATP response might involve prostaglandin synthesis. In the presence of $10 \mu\text{M}$ indomethacin (15 min pretreatment), the ATP response was not significantly different from the control ($n = 5$; data not shown).

The ATP response is triggered by the voltage-dependent calcium channels

As illustrated in Fig. 3 A, the ATP response depended on the membrane voltage (current before ATP was digitally

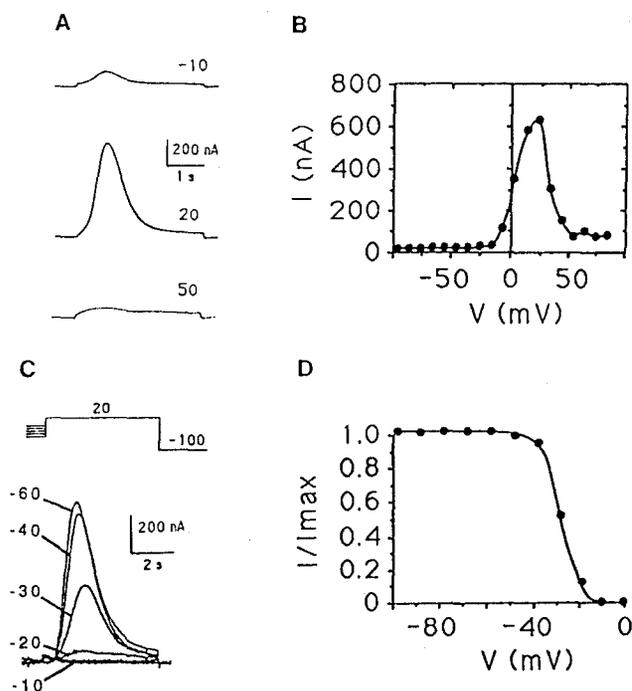


Fig. 3 A–D. Voltage dependence of the purinergic response. A ATP-sensitive chloride currents were recorded at -10 , 10 and 50 mV (the current before $300 \mu\text{M}$ ATP superfusion was digitally subtracted). The holding potential was -100 mV and the depolarizing potential is indicated on each current trace. B Current-to-voltage relationship of the ATP-evoked current. C Voltage-dependent inactivation of the ATP-activated chloride current. Upper traces: voltage protocol; lower traces: current recordings. The test-pulse potential was 20 mV and the prepulse potential (5 s duration) was increased by 10 mV every 20 s. D Inactivation curve of the ATP-sensitive chloride current

subtracted). The bell-shaped current-to-voltage relationship (I/V) of the ATP-sensitive current is depicted in Fig. 3B. The voltage threshold was -20 mV ($n = 3$), the peak current was recorded at 20 mV ($n = 3$) and current amplitude decreased when the potential was made more positive than 20 mV. The ATP-sensitive current inactivated in a voltage-dependent manner (Fig. 3C). The superimposed traces in Fig. 3C demonstrate that the ATP response was inactivated as the conditioning depolarization was made more positive than -50 mV. Half-inactivation occurred at a potential of -30 mV ($n = 3$; Fig. 3D).

Superfusing the oocytes with a Ca^{2+} -free solution (Fig. 4A) or addition of $100 \mu M$ Cd^{2+} to the bath (data not shown) reversibly inhibited the ATP response. To investigate the activity and the modulation of the Ca^{2+} channels expressed *in ovo*, oocytes were tested in a partic-

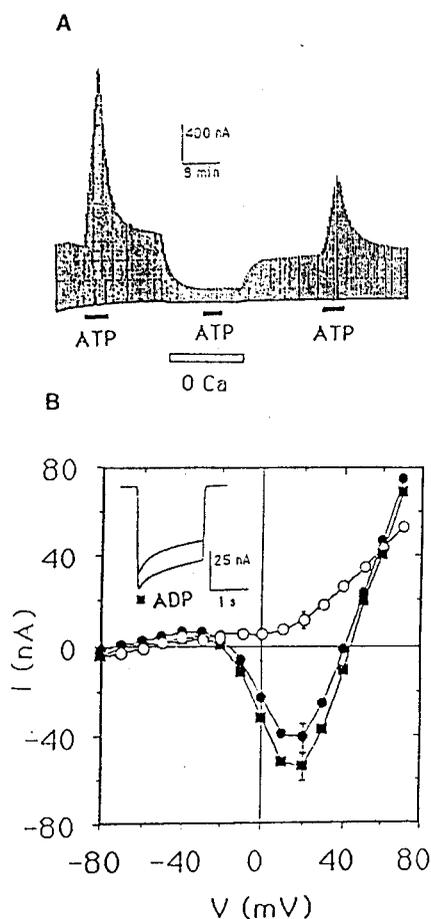


Fig. 4A,B. The purinergic response depends on external Ca^{2+} . A Ca^{2+} -free solution (0 Ca^{2+} / 1 mM EGTA) reversibly blocked the ATP ($300 \mu M$) response. The Ca^{2+} -free solution superfusion is indicated by the empty bar and ATP by filled bars. The holding potential was -100 mV and the oocyte was depolarized to 20 mV for 4 s every 20 s. B Inset: 1 mM ADP (4 min superfusion) increased the amplitude of the inward Ba^{2+} current (currents were digitally subtracted from the current recorded in the presence of $100 \mu M$ Cd^{2+}). The holding potential was -100 mV and the oocytes were depolarized to 20 mV every 20 s. Current-to-voltage relationships of (a) the control membrane current (\bullet), (b) the current in the presence of 1 mM ADP (\blacksquare), (c) the current in the presence of $100 \mu M$ Cd^{2+} (\circ). Every data point is the mean of six experiments. Standard error of the mean is indicated for the peak current recorded at 20 mV

ular medium where Ba^{2+} (40 mM) was used as charge carrier and where Cl^- currents were abolished by using a test solution without Cl^- and in the presence of the Cl^- channel blocker 9-anthracic acid [18]. As ATP led to Ba^{2+} precipitation in the Ba^{2+} medium, we investigated the effects of ADP (an equipotent agonist) on the Ba^{2+} inward current ($I_{Ba^{2+}}$). The Cd^{2+} -sensitive $I_{Ba^{2+}}$ (net $I_{Ba^{2+}}$) recorded in an injected oocyte is illustrated in Fig. 4B (inset). The mean amplitude of $I_{Ba^{2+}}$ (holding potential: -100 mV, depolarization to 20 mV) was -63 ± 6 nA ($n = 16$) versus -12 ± 3 nA ($n = 8$) in control oocytes. As shown in Fig. 4B, $I_{Ba^{2+}}$ occurred with only a single phase of inward current, which decayed in a monotonic manner. Addition of 1 mM ADP to the Ba^{2+} solution resulted in a small but significant increase in $I_{Ba^{2+}}$ amplitude ($26 \pm 5\%$, $n = 6$; $P < 0.01$) and no additional component of current was revealed; the inactivation kinetics remained monotonic. ATP did not elicit any effect on $I_{Ba^{2+}}$ in non-injected oocytes (data not shown). This could be correlated to the absence of an ATP effect on the Cl^- current (Fig. 1A).

The I/V relationship of $I_{Ba^{2+}}$ is illustrated in Fig. 4B (filled dots). The $I_{Ba^{2+}}$ activation threshold was -40 mV ($n = 6$) and the peak current was recorded at 20 mV ($n = 6$). In the presence of ADP, no significant change in the voltage dependence of $I_{Ba^{2+}}$ was found (filled squares), Cd^{2+} inhibited the Ba^{2+} current (Fig. 4B; empty dots). Voltage inactivation of $I_{Ba^{2+}}$ was tested using the classical double-pulse protocol (data not shown). The half-inactivation potential ($n = 4$) was -30 mV and remained unchanged in the presence of 1 mM ADP.

These results demonstrate that I_{I_2} is not due to a second delayed phase of Ca^{2+} entry, although it is largely dependent on extracellular Ca^{2+} . Thus, it is postulated that the occurrence of I_{I_2} results from an additional process of Cl^- channel opening, which may probably depend on intracellular Ca^{2+} level.

Involvement of internal Ca^{2+} pools in the ATP response

In order to assess the mechanisms underlying I_{I_2} and particularly the eventual involvement of internal Ca^{2+} pools, we examined the effects of various experimental conditions known to alter intracellular Ca^{2+} activity. Injection of the Ca^{2+} chelator EGTA (final concentration: $200 \mu M$) partially reduced the amplitude of I_{I_1} ($-39 \pm 6\%$, $n = 6$) and completely abolished I_{I_2} (Fig. 5A). Moreover, the effects of compounds known to interact on Ca^{2+} uptake and release from internal stores have been studied. TMB8 ($100 \mu M$) inhibited the ATP response in a reversible manner ($n = 4$; Fig. 5B). Similar results were obtained with 3 mM caffeine ($n = 3$; data not shown).

A possible mechanism producing a delayed effect of Ca^{2+} may be that of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. Ba^{2+} has been shown to block the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism [22, 13]. Injection of 250 pmol Ba^{2+} inhibited I_{I_2} ($n = 4$; Fig. 5C). Similar results were obtained with injection of ruthenium red (final concentration: $60 \mu M$; $n = 3$; Fig. 5D).

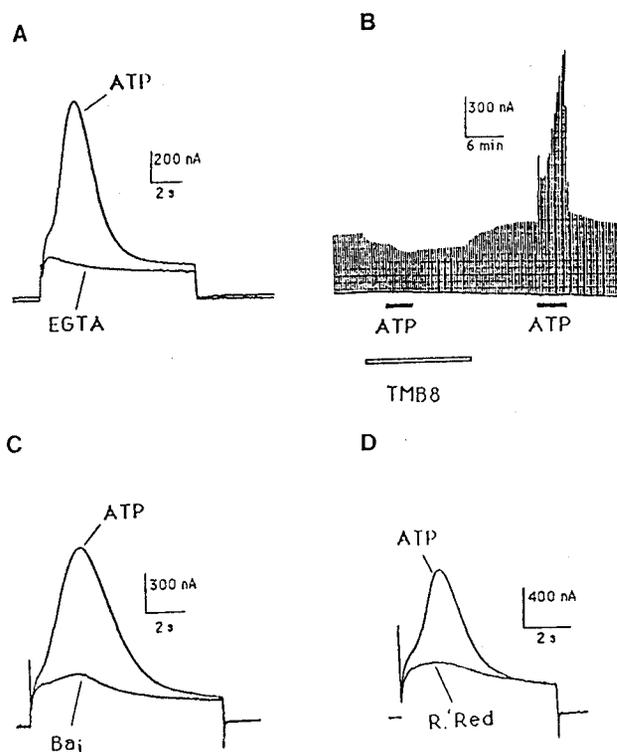


Fig. 5A–D. Involvement of internal calcium pools in the purinergic response. **A** EGTA injection (final concentration: 200 μ M) inhibited the ATP-sensitive chloride current. **B** Chart record of the effects of 100 μ M 3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8-(diethylamino)octyl ester hydrochloride (TMB8) superfusion on the ATP (300 μ M) response. TMB8 superfusion is indicated by the empty bar and ATP by filled bars. **C** 250 pmol Ba^{2+} injection depressed the ATP-activated chloride current. **D** Effects of ruthenium red (60 μ M final concentration) on the ATP response. In these experiments, the holding potential was -100 mV and the oocytes were depolarized to 20 mV every 20 s. In all experiments, oocytes were bathed in normal saline solution (ND 96) and the ATP concentration used was 300 μ M.

Discussion

To our knowledge, the ATP response we described is the first demonstration of purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes injected with brain mRNA.

According to the Burnstock [6] classification, the acquired purinoceptor would correspond to a P_2 type (recognizing ATP and ADP but not adenosine and AMP). ATP and the non-hydrolysable analogue ATP[γ S] were equieffective, demonstrating that ATP hydrolysis was not required. A further subdivision of P_2 receptors was proposed by Burnstock and Kennedy [8]. [Me]ATP, which has been shown specifically to desensitize the P_{2X} receptors, did not affect the ATP response. The reversible blockade induced by superfusion of reactive blue 2, which is known to be a P_{2Y} -receptor-specific antagonist [9, 23], could not be taken into account since this compound inhibited the Cl^- conductance in *Xenopus* oocytes. Nevertheless, the rank order of potency of extracellular adenine nucleotides and the efficiency of the purinoceptor antagonists suggest that the ATP receptor is

of the P_{2Y} subtype, according to the classification of Burnstock and Kennedy [8]. In other studies, P_{2Y} purinoceptors have been identified in the guinea-pig taenia coli and trachea [8, 14], where they cause muscle relaxation, and in the vascular endothelium, where they are thought to release endothelium-derived relaxing factor (or nitric oxides), and probably also prostacyclin to relax vascular smooth muscle. Similarly, identification of P_{2Y} purinoceptors associated with voltage-activated cation channels have been reported in cardiac ventricular myocytes of the rat [4].

The ATP concentrations, which could appear as large ($EC_{50} = 40$ μ M), are nevertheless consistent with those found in central and peripheral nervous systems to trigger purinoceptor-dependent responses. Ehrlich et al. [11] reported that iterative stimulation of cultured neural cells NG 10815 led by discharge to an ATP accumulation over 100 μ M. Other studies in primary culture of sheep anterior pituitary cells showed that full activation of P_2 purinoceptors required concentrations as large as 100 μ M [25]. In fact, studies in man show that during haemostasis, concentrations of adenine nucleotides in the blood may reach levels as high as 20 μ M while one order of magnitude higher levels of adenine nucleotides have been measured in plasma from soldiers suffering from traumatic shock [15]. The present data may, therefore, be compatible with a pathophysiological role for ATP as an extracellular transmitter in the mammalian brain, particularly since compounds such as catecholamines and neuropeptides, which are released together with ATP from neural endings, may enhance the effects of extracellular ATP.

Expression of phagocyte P_2 nucleotide receptors in *Xenopus* oocytes has been recently reported [20]. Acquired ATP[γ S] responsiveness in oocytes injected with mRNA from the promyelocytic leukemia cell line HL60 was investigated by measuring the accelerated efflux of intracellular Ca^{2+} . ADP and AMP were inactive whereas UTP and ITP exhibited activity that was similar in potency to that of ATP[γ S]. These authors concluded that the expressed purinoceptor was distinct from all other previously described P_2 purinoceptor subtypes. By contrast, our results clearly demonstrate that ADP and ATP were equieffective in eliciting a Cl^- current stimulation and therefore may more likely be similar to previously described purinoceptors.

Activation of the P_{2Y} purinoceptors by agonists enhanced both components of Cl^- currents (I_{11} and I_{12}) spontaneously occurring after brain mRNA injection. The main effect consisted in a large increase in the second delayed current component (I_{12}). I_{12} was exclusively found in mRNA-injected oocytes and, therefore, it may be assumed that oocytes have acquired either a novel type of Cl^- channel or a novel process of channel opening. Using the patch-clamp techniques, recent studies of Cl^- currents expressed *de novo* in oocytes injected with brain mRNA gave evidence for only one single-channel conductance [24]. Therefore, it seems that one single type of Cl^- channel would serve both Cl^- components, and that I_{11} and I_{12} may result from two distinct pathways of Ca^{2+} increase.

Removal of extracellular Ca^{2+} or addition of Cd^{2+} reversibly inhibited the ATP response. Furthermore, the bell-shaped I/V relationships and the inactivation properties of the ATP-sensitive current revealed that it may depend on Ca^{2+} entry through voltage-activated Ca^{2+} channels. ADP increased the Ca^{2+} inward current amplitude, although no additional component of Ca^{2+} entry that could account for I_{12} occurrence was found. Moreover, EGTA, which is known to chelate internal Ca^{2+} , totally blocked I_{12} while I_{11} was less affected. These results suggest that I_{11} may be directly initiated by a Ca^{2+} entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels, although I_{12} would arise from a second step of intracellular Ca^{2+} increase. The involvement of internal Ca^{2+} in the ATP response was further suggested by its inhibition with TMB8 and caffeine, both agents known to interact on Ca^{2+} release and uptake from internal stores. Similarly to Gillo et al. [13], using intracellular loading of Ba^{2+} or ruthenium red, we found that a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release process may trigger I_{12} . Taken together, these results indicate that a calcium-release mechanism would be (a) newly expressed in brain-mRNA-injected oocytes as reported by Gillo et al. [13] or (b) revealed by increasing the Ca^{2+} channel density after brain mRNA injection.

To date, there have been no studies of biochemical characterisation of the putative P_2 receptor of any cell. In this context, the present report established that a specific protein from neurons exhibiting ATP responsiveness can be expressed in mRNA-injected *Xenopus* oocytes. Therefore, the primary structure of nucleotide receptors could be obtained by the cloning of cDNA through functional expression in the oocyte, independent of preliminary structure information about the receptor protein.

It is concluded that in addition to the involvement of ATP secreted by neurons in the process that initiates the production of long-term alterations in synaptic function [11], ATP may actually also be involved in short-term regulation of neuronal activity in the central nervous system by acting on specific purinoceptors.

Acknowledgements. We wish to thank Dr. M. Lazdunski (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, Valbonne, France) for his valuable comments on the manuscript. We are grateful to the Association Française contre les Myopathies for financial support.

References

- Alvarez JL, Mongo K, Scamps F, Vassort G (1990) Effect of purinergic stimulation on the Ca^{2+} current in single frog cardiac cells. *Pflügers Arch* 416:189–195
- Barish ME (1983) A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *J Physiol (Lond)* 342:309–325
- Benham CD, Tsien RW (1987) A novel receptor-operated Ca^{2+} permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 328:275–278
- Björsson OG, Monck JR, Williamson JR (1989) Identification of P_{2Y} purinoceptors associated with the voltage activated cation channels in cardiac ventricular myocytes of the rat. *Eur J Biochem* 186:395–404
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509–581
- Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Straut RW, Bolis L (eds) *Cell membrane receptors for drugs and hormones*. Raven, New York, pp 107–118
- Burnstock G (1981) Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. *J Physiol (Lond)* 313:1–35
- Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P_2 purinoceptors. *Gen Pharmacol* 16:433–440
- Burnstock G, Warland JJI (1987) Reactive blue 2 selectively antagonises the relaxant responses to ATP and its analogues which are mediated by the P_{2Y} purinoceptor. *Br J Pharmacol* 90:383–391
- Dubyak GR (1986) Extracellular ATP activates polyphosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization in Ehrlich ascites tumor cells. *Arch Biochem Biophys* 245:84–95
- Ehrlich YH, Snider RM, Kordecki E, Garfield MG, Lenox RH (1988) Modulation of neuronal signal transduction systems by extracellular ATP. *J Neurochem* 50:295–301
- Fournier F, Honoré E, Brulé G, Mironneau J, Guilbault P (1989) Expression of Ba^{2+} current in *Xenopus* oocytes injected with pregnant rat myometrium mRNA. *Pflügers Arch* 413:682–684
- Gillo B, Landau EM, Moriarty TM, Roberts JL, Sealson SC (1989) A novel calcium-dependent chloride current in *Xenopus* oocytes injected with brain messenger RNA. *J Physiol (Lond)* 417:41–67
- Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309–319
- Green HN, Stoner HB (1950) Biological actions of the adenine nucleotides, Lewis HK, London, pp 65–103
- Holton FA, Holton P (1954) The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol (Lond)* 126:124–140
- Jahr CE, Jessel TM (1983) ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurons. *Nature* 304:730–733
- Leonard JP, Nargeot J, Snutch TP, Davidson J, Lester HA (1987) Ca channels induced in *Xenopus* oocytes by rat brain mRNA. *J Neurosci* 7:875–881
- Miledi R (1982) A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocyte. *Proc R Soc Lond [Biol]* 215:491–497
- Murphy PM, Tiffany HL (1990) Characterization of phagocyte P_2 nucleotide receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 265:11615–11621
- Okajima F, Sato K, Kondo Y (1989) P_2 -purinergic agonists activates phospholipase C in a guanine nucleotide- and Ca^{2+} -dependent manner in FRTL-5 thyroid cell membranes. *FEBS Lett* 253:132–136
- Palade P (1987) Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum: 2. Releases involving a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *J Biol Chem* 262:6142–6148
- Rice WR, Singleton FM (1989) P_{2Y} -purinoceptor regulation of surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells is associated with mobilization of intracellular calcium. *Br J Pharmacol* 97:158–162
- Takahashi T, Neher E, Sakmann B (1987) Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5063–5067
- Van der Merwe PA, Wakefield IK, Fine J, Millar RP, Davidson JS (1989) Extracellular adenosine triphosphate activates phospholipase C and mobilizes intracellular calcium in primary culture of sheep anterior pituitary cells. *FEBS Lett* 243:333–336