

RAHIMA ZIANE

**Identification et Caractérisation de
Nouveaux Partenaires Protéiques du Canal
Sodique Cardiaque $\text{Na}_v1.5$.**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)

FACULTE DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé Long

La fonction du canal sodique cardiaque est cruciale pour l'initiation, la propagation et le maintien d'un rythme cardiaque normal. Le rôle crucial de $Na_v1.5$ dans la fonction cardiaque a été mis en évidence par l'identification de mutations naturelles au niveau de son gène (*SCN5A*). Les mutations sur le gène *SCN5A* sont associées à de nombreuses maladies génétiques telles que: le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long et les troubles de conduction. Le point commun à ces pathologies est les arythmies cardiaques qui peuvent mener à la mort subite. Ces mutations sur ce gène n'explique cependant que 20% des cas connus (cas du syndrome de Brugada) (Antzelevitch, 2006). D'où l'implication d'autres facteurs, comme les partenaires de $Na_v1.5$, dans ces pathologies est une éventualité émergente. **Objectif:** Pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces arythmies cardiaques, nous nous proposons dans ce projet d'identifier et de caractériser de nouveaux partenaires de $Na_v1.5$. **Méthodes:** Les interacteurs potentiels de $Na_v1.5$ sont identifiés par la méthode du double hybride chez la levure. Les interactions sont ensuite confirmées *in vivo* et *in vitro* par les méthodes de co-immunoprécipitation et de pull-down. Les effets de ces partenaires sur l'activité de $Na_v1.5$ sont évalués par la méthode du patch clamp en configuration "cellule entière". La co-localisation tissulaire de $Na_v1.5$ avec ses partenaires est obtenue par la microscopie confocale. **Résultats:** Deux nouveaux partenaires de $Na_v1.5$ ont été identifiés: 1) l' α -actinine-2 qui interagit avec la porte d'inactivation et 2) la troponine I cardiaque (TnIc) qui se lie à la boucle cytoplasmique I-II. L' α -actinine-2 se fixe via son domaine spectrine sur la porte d'inactivation de $Na_v1.5$ et augmente ainsi son expression à la surface membranaire. L' α -actinine-2 se co-localise avec $Na_v1.5$ dans les tubules T des cardiomyocytes humains. Quant à la troponine I, elle s'associe avec deux régions de la boucle I-II de $Na_v1.5$ par le biais de sa région C-terminale. La TnIc déplace la courbe d'inactivation de ce canal vers des valeurs plus hyperpolarisées sans affecter son expression à la surface membranaire. Toute fois, cet effet de la TnIc disparaît en présence de la sous-unité β_1 de $Na_v1.5$. **Conclusion:** L'identification de l' α -actinine-2 et la TnIc représente une étape importante dans la compréhension des mécanismes régulant l'activité de $Na_v1.5$ d'une part et d'autre part servira à décrypter les mécanismes moléculaires sous-tendant la complexité des arythmies cardiaques.

Abstract

The function of the cardiac sodium channel ($\text{Na}_v1.5$) is crucial for the initiation, the propagation and the maintenance of a normal rate of heartbeat. The importance of $\text{Na}_v1.5$ on the cardiac function was highlighted by identification of numerous mutations in *SCN5A* (the gene encoding $\text{Na}_v1.5$), causing cardiac arrhythmias which can lead to sudden cardiac death. In 20 to 30 % of these cases of death, a mutation in gene *SCN5A* was reported (Brugada syndrome) (Antzelevitch, 2006). Since $\text{Na}_v1.5$ is organized as a multiproteic complex, the implication of the one of its partners in these pathologies is a possibility. **Aim:** The general aim of my PhD research project has been to screen, identify and characterize new partners of $\text{Na}_v1.5$. **Methods:** The potential interactors of $\text{Na}_v1.5$ are identified by the yeast two-hybrid method. The interaction was then independently confirmed by co-immunoprecipitation and pull-down assays. The patch-clamp recording of whole-cell is done to evaluate the effects of these new partners on channel activity. Finally, the co-localization analysis was performed on human heart tissue by confocal microscopy. **Results:** Two new partners of $\text{Na}_v1.5$ were identified and characterized: 1) The α -actinin-2, which interacts with the III-IV loop or the inactivation gate of $\text{Na}_v1.5$, and 2) the cardiac troponin I (cTnI) which binds to the cytoplasmic loop I-II of sodium channel. Early in this study, we showed that α -actinin-2 binds to $\text{Na}_v1.5$ III-IV loop via its spectrin domain and that this interaction results in increased sodium channel subunit expression at the cell surface. Furthermore, we reported that α -actinin-2 co-localizes the cardiac sodium channel at the T-tubules in human cardiomyocytes. For the second partner, cardiac troponin I (cTnI), we observed that cTnI shifted the inactivation curve to more hyperpolarizing value with no modification of $\text{Na}_v1.5$ expression levels. Interestingly, the cTnI effect on inactivation curve of $\text{Na}_v1.5$ was misplaced when β_1 is co-expressed with $\text{Na}_v1.5$ -cTnI complex in tsA201 cells. **Conclusion:** This study identifies two new partners of $\text{Na}_v1.5$ which could play an important role in cardiac function and bring new insight in cardiac arrhythmias observed in Brugada syndrome and some of the cardiac alterations, which may be caused by overlapping molecular mechanisms leading to a reduction of the cardiac sodium channel expression levels.

Remerciements

La thèse, quelle étape dans une vie, ou tout du moins dans ma vie...

Ces quelques années furent si riches en émotions et événements qu'il va être difficile maintenant de faire une synthèse.

Au terme de ce travail, je voudrais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont permis de mener à bien cette thèse de doctorat.

Je tiens à remercier en premier lieu, le Dr Mohamed Chahine qui m'a accueillie au sein de son laboratoire, m'a accordé sa confiance et m'a donné l'opportunité de travailler sur un sujet qui me tenait à cœur. Il a réussi à me communiquer la réalité de la recherche. J'ai énormément appris à ses côtés et je pense maintenant grâce à lui bénéficier d'une grande autonomie et d'un excellent bagage pour pouvoir continuer dans cette voie.

Je souhaiterais remercier très chaleureusement le Dr Georges Levesque pour toute l'aide et l'attention qu'il m'a apporté durant ces années. Il a toujours répondu présent lorsque j'avais des doutes ou besoin de conseils. Je vous suis très reconnaissante de tout ce que vous avez fait pour moi durant ces années de doctorat.

Mes remerciements vont également aux membres du jury: Dr Laimonis Gailis, Dr Pascal Daleau et le Dr Mohamed Boutjdir pour avoir méticuleusement évalué mon travail de recherche et le Dr Madeleine Carreau de m'avoir donné accès au microscope confocal ainsi que ses remarques instructives durant les réunions de laboratoire.

Je voudrais remercier particulièrement le Dr Michel Vincent pour ses nombreux conseils et ses encouragements durant les moments difficiles de ma thèse.

Merci à notre collaborateur Alain Beggs pour sa contribution.

Tous mes remerciements vont également à l'équipe de mon laboratoire de Neurosciences à Robert-Giffard, du CHUL avec qui j'ai partagé des moments exceptionnels.

Merci à Sylvie Pilote pour sa curiosité scientifique et son sens du défi.

Merci à Valérie Pouliot pour sa rigueur scientifique et son sens de la méthodologie.

Merci à Fatima-Zahra Barrane, qui m'a apportée sa fraîcheur et son amitié au quotidien

Merci à Isabelle Pineau, pour son aide précieuse et son amitié.

Merci à Olivier Thériault pour son soutien, son écoute et son amitié.

Merci à Hai et Juan Huang, Aurélien Chatelier et Hugo Poulin pour leur bonne humeur au quotidien et leurs encouragements

Merci à Dominique Fournier, Isabelle Plante pour les bons moments que j'ai passé avec vous.

Merci à Chantal Godin et Valérie Bourdages pour leur disponibilité et leur précieuse aide.

Merci à Justin Dupuis et Ouassila Habi pour leur affectueuse amitié.

Merci à mes compagnons de fortune: Salima Dahmani, Omar Nyabi, Yakout Mostefaoui, Nabila Matouk, Souad Hanani, Khadidja Adiah, Naima Najah, Marie-Josée Coulombe, Eliane Steben-Chabot, Mausumi Mazumdar et Munjid qui grâce à leur soutien et leurs encouragements m'ont permis d'atteindre la ligne d'arrivée. Merci de m'avoir pardonné mes absences, mes irritabilités et mes coups de déprime.

J'adresse mes remerciements les plus forts à Christian Lessard pour m'avoir initié au double hybride, pour sa grande patience, son soutien sans limite et ses encouragements au quotidien.

Et le meilleur pour la fin, je remercie mes parents pour avoir toujours cru en moi, pour m'avoir donné ma chance à l'université et de m'avoir appris à ne jamais baisser les bras, même dans l'adversité. Si j'en suis là, c'est grâce à vous

Enfin, je remercie mon frère Sofiane de m'avoir redonné courage et confiance quand j'étais au bout du rouleau.

Avant-Propos

Cette thèse est le fruit de nombreuses heures de travail et d'acharnement. Elle renferme l'ensemble des travaux effectués lors de mon doctorat qui a débuté en novembre 2003. Le but de cet ouvrage est d'actualiser le niveau de connaissance relatif aux partenaires connus et inconnus du canal sodique cardiaque ($Na_v1.5$) en apportant une certaine critique à ce qui a été fait jusqu'à date. Pour cela, une recherche plus approfondie a été réalisée afin de mettre le lecteur au parfum de tout ce qui a été fait ou suggéré concernant de loin ou de près le canal $Na_v1.5$. Quant aux articles insérés, ils permettent de mieux comprendre une partie des mécanismes régissant l'activité de ce canal et d'y répondre à certaines interrogations. Dans l'ensemble, ce document renferme 5 chapitres répertoriés de façon classique possédant une partie hypothèse et objectifs, une introduction, un développement et une conclusion. Vous trouverez dans le développement les deux articles scientifiques qui sont en cours de soumission. Une note précisant mon rôle dans la préparation des articles précède chacun des chapitres 3 et 4. Joint à deux articles déjà publiés et qui sont présentés en annexe. Finalement, l'ensemble de ces travaux résume mes recherches effectuées dans le cadre de ce projet d'une part et d'autre part dans le laboratoire.

Ceci étant dit, je vous souhaite une bonne lecture.

*Soul receives from soul that knowledge, therefore not
by book nor from tongue.*

*If knowledge of mysteries come after emptiness of mind,
that is illumination of heart.*

Jelaluddin Rumi

Table des Matières

Résumé Long.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-Propos.....	vi
Table des Matières.....	ix
Liste des Tableaux.....	xiii
Liste des Figures.....	xiv
Liste des Abréviations.....	xvi

Tables des Matières

CHAPITRE I.....	XX
-----------------	----

INTRODUCTION

1.1 Le Cœur Humain	1
1.2 Les Constituants Cellulaires du Cœur	3
1.2.1 Les cardiomyocytes	3
1.2.2 Les fibroblastes.....	5
1.3 Le Système de Conduction Cardiaque	5
1.4 Aspect Électrophysiologique des Cardiomyocytes.....	6
1.4.1 Le potentiel membranaire	6
1.4.2 Le potentiel de repos.....	6
1.4.3 Le potentiel d'action	6
1.5 L'électrocardiogramme (ECG).....	9
1.6 Le Canal Sodique Cardiaque Dépendant du Voltage (Na_v1.5).....	10
1.6.1 Physiologie du Canal Sodique Cardiaque Na _v 1.5	11
1.6.2 Le canal sodique cardiaque Na _v 1.5 et l'excitabilité cellulaire	11
1.6.2 Les Propriétés Biochimiques et Biologiques de Na _v 1.5	13
1.6.2.1 Topologie et Fonction Cellulaire du Canal Sodique Cardiaque Na _v 1.5.....	13
1.6.2.2 La Distribution Cellulaire du Canal Sodique Cardiaque Na _v 1.5	18
1.7 Les Pathophysiologies du Canal Sodique cardiaque Na_v1.5	18
1.7.1 Le Syndrome du QT Long Congénital (QTL).....	19
1.7.2 Le Syndrome de Brugada (SB).....	21
1.7.3 Les Troubles de la Conduction Cardiaque	23
1.7.3.1 La Dysfonction Sinusale ou Sick Sinus Syndrome (SSS).....	23
1.7.3.2 Les Troubles Progressifs de Conduction Cardiaque ou la Maladie de Lenègre.	24
1.7.3.3 Les Cardiomyopathies Dilatées (CMD).....	25
1.8 Régulation du Canal Sodique Cardiaque Na_v1.5	25
1.8.1 Les Sous-unités Auxiliaires β.....	27
1.8.2 Les Protéines Kinases et Phosphatases	28
1.8.2.1 La Protéine Kinase AMP cyclique (AMPC) Dépendante (PKA).....	28
1.8.2.2 La Protéine Kinase C (PKC)	29
1.8.2.3 La Protéine Tyrosine Kinase p59 Fyn (Fyn)	30
1.8.2.4 Les Protéines Tyrosine Phosphatases (PTPH1).....	31
1.8.3 La Calmoduline (CaM)	31
1.8.4 Les Protéines G.....	32

1.8.5 L'Ubiquitine-Protéine Ligase de Type Nedd 4	33
1.8.6 Le Complexe Syntrophine-Dystrophine	35
1.8.7 Les Ankyrines.....	38
1.8.7.1 L'Ankyrine G.....	38
1.8.7.2 L'Ankyrine B.....	39
1.9 Le Facteur de Croissance Homologue du Fibroblaste (FH1B).....	40
1.10 La Protéine 14-3-3	41
CHAPITRE II	43
CELL MEMBRANE EXPRESSION OF CARDIAC SODIUM CHANNEL Na_v1.5 IS REGULATED BY A-ACTININ-2 INTERACTIONS	
2.1 RESUME	44
2.2 Abstract.....	46
2.3 Introduction	47
2.4 Experimental Procedures	48
2.4.1 Yeast two-hybrid and plasmid constructs	48
2.4.2 Mammalian expression constructs.....	48
2.4.3 Yeast two-hybrid studies.....	49
2.4.4 Cell culture and DNA transfection	49
2.4.5 Immunoprecipitation.....	50
2.4.6 Immunoblots.....	50
2.4.7 His ₆ pull-down.....	51
2.4.8 Overlay assay	51
2.4.9 Biotinylation of cell surface proteins.....	52
2.4.10 Na current recordings.....	52
2.4.11 Immunohistochemistry.....	53
2.5 Results	53
2.5.1 α -Actinin-2 interacts with the III-IV linker <i>in vivo</i>	53
2.5.2 α -Actinin-2 associates with III-IV linker of Na _v 1.5 channel both in cyto and in vitro	54
2.5.3 Spectrin-like repeats are required for the interaction with the III-IV linker of Na _v 1.5	55
2.5.4 α -Actinin-2 interacts with others Na ⁺ Channel isoforms <i>in vivo</i>	56
2.5.5 Co-localization of Na _v 1.5 and α -actinin-2 in human cardiac muscle	56
2.5.6 α -Actinin-2 has no effect on the biophysical proprieties but has an effect on expression levels of Na _v 1.5.....	57
2.5.7 α -Actinin-2 increases the expression of Na _v 1.5 on the cell surface	58
2.6 Discussion.....	59
2.7 Figure Legends	63

2.8 Supplemental Data	86
2.9 Acknowledgements.....	88
CHAPITRE III	92
DIRECT INTERACTION BETWEEN THE INTRACELLULAR I-II LOOP OF CARDIAC SODIUM CHANNEL AND CARDIAC TROPONIN I	
3.1 Résumé	93
3.2 Abstract.....	95
3.3 Introduction	96
3.4 Materiels and Methods	98
3.4.1 Yeast Two-Hybrid Assay	98
3.4.2 Molecular Biology	98
3.4.3 Coimmunoprecipitation	99
3.4.3 Immunoblots.....	99
3.4.4 Recombinant protein production and GST-pull-down assay	100
3.4.5 Biotinylation of cell surface proteins.....	99
3.5 Results	102
3.5.1 Identification of cTnI as Binding Partner of human Na _v 1.5	102
3.5.2 Mapping of the Interaction Site on the I-II Loop of Na _v 1.5 channel and on the Cardiac TnI	103
3.5.3 Cardiac TnI Binds to the I-II Loop polypeptide of Na _v 1.5 <i>in Vivo</i>	103
3.5.4 Na _v 1.5 forms a complex with cTnI in adult mouse heart.....	103
3.5.5 Cardiac TnI Interacts Directly to the I-II Loop polypeptide of Na _v 1.5 <i>in vitro</i>	103
3.5.6 Cardiac troponin I is not required for Na _v 1.5 cell surface expression.....	103
3.5.7 Voltage-dependent Sodium Currents in tsA201 Cells Transfected with Na _v 1.5 or Na _v 1.5+cTnI.....	104
3.5.8 Na _v 1.5 Channel Activation Is Not Modulated by cTnI	104
3.5.9 Na _v 1.5 Channel Inactivation is Modulated by Cardiac TroponinI.....	105
3.5.10 β ₁ expression Alters the effect of cTnI on Na _v 1.5 Channel Inactivation	105
3.6 Discussion.....	107
3.6.1 Cardiac Sodium Channel Associate with cardiac troponin I	107
3.6.2 C-terminal domain of cTnI is required for Na _v 1.5 binding.....	108
3.6.3 Physiological role of cTnI on Na _v 1.5 function.....	109
3.7 Figure Legends	111
3.8 Supplemental data.....	131
3.9 Reference.....	133
CHAPITRE IV.....	137

CHAPITRE IV	136
--------------------------	------------

DISCUSSION GENERALE

4.1 Alpha Actinine-2 (Actn-2)	137
4.1.1 Régulation de $Na_v1.5$ par l' α -Actinine-2	137
4.1.2 Caractérisation de l'Interaction entre l' α -Actinine-2 et $Na_v1.5$	137
4.1.3 Interaction de l' α -Actinine-2 avec d'Isoformes de $Na_v1.5$	138
4.1.4 Interaction des Canaux Sodiques avec les Isoformes de l' α -Actinine-2	139
4.1.5 Un Modèle Potentiel de l'Action de l' α -Actinine-2	140
4.2 Troponine I cardiaque (TnIc)	142
4.2.2 Caractérisation de l'Interaction entre la Troponine I Cardiaque Cytoplasmique et $Na_v1.5$	142
4.2.3 Rôle Possible de la Troponine I Cardiaque sur l'Activité de $Na_v1.5$	145

CHAPITRE V	147
-------------------------	------------

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

6. BIBLIOGRAPHIE	153
-------------------------------	------------

ANNEXE	174
---------------------	------------

Liste des Tableaux

Chapitre III

Tableau 1: List the proteins that were identified in this yeast two-hybrid screen.....85

Chapitre IV

Tableau 1: Proteins identified using the yeast two-hybrid screen of a human cardiac cDNA library using the loop I-II region of $\text{Na}_v1.5$ as bait.....165

Tableau 2: Comparison of voltage-dependent properties of $\text{Na}_v1.5$ expressed in tsA201 cells co-expressing cardiac troponin I or β_1 subunit.....166

Liste des Figures

Chapitre II:

Figure 1: Structure anatomique du cœur humain.....	2
Figure 2: Diagramme ultrastructural d'une fibre musculaire cardiaque.....	4
Figure 3: Représentation schématique des différents potentiels d'action cardiaques caractéristiques de divers composants structuraux du myocarde.....	7
Figure 4: Représentation schématique d'un potentiel d'action ventriculaire.....	8
Figure 5: Schéma d'un tracé d'électrocardiogramme normal.....	10
Figure 6: Représentation schématique des différents états du canal sodique cardiaque activé par le voltage.....	12
Figure 7: Structure des canaux sodiques-dépendants du voltage.....	14
Figure 8: Modèles proposés pour le fonctionnement et la structure tridimensionnelle de la porte d'inactivation du canal sodique cardiaque humain ($Na_v1.5$).....	17
Figure 9: Représentation des diverses canalopathies liées à des mutations dans le gène <i>SCN5A</i> qui code pour la sous-unité α de $Na_v1.5$	19
Figure 10: Les bases électrophysiologiques du syndrome du long QT.....	21
Figure 11: Les bases électrophysiologiques du syndrome de Brugada.....	23
Figure 12: Représentation d'un modèle hypothétique de la voie d'ubiquitination de $Na_v1.5$	34
Figure 13: Schéma du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine.....	37
Figure 14: Représentation des partenaires connus de $Na_v1.5$	42

Chapitre III:

Figure 1: Yeast two-hybrid screening of human heart cDNA library identifies α -actinin-2 as binding partner of $Na_v1.5$ III-IV linker region.....	64
Figure 2: Reciprocal co-immunoprecipitation of $Na_v1.5$ channel with α -actinin-2 in co-transfected tsA201 cells.....	66
Figure 3: Co-immunoprecipitation of $Na_v1.5$ channel with α -actinin-2 isoforms in co-transfected tsA201 cells.....	68
Figure 4: α -Actinin-2 interacts directly with $Na_v1.5$ III-IV linker <i>in vitro</i>	70
Figure 5: The α -actinin-2 spectrin like repeats domain is required for interaction of α -actinin-2 with $Na_v1.5$ III-IV linker.....	72
Figure 6: Reciprocal co-immunoprecipitation of $Na_v1.8$ channel with α -actinin-2 in co-transfected tsA201 cells.....	74
Figure 7: Endogenous Na^+ channels and α -actinin-2 interact <i>in vivo</i>	76
Figure 8: $Na_v1.5$ channel and α -actinin-2 co-localize in human cardiac tissue.....	78
Figure 9: α -Actinin-2 over-expression increases sodium current densities (I_{Na}) in co-transfected tsA201 cells.....	80
Figure 10: α -Actinin-2 does not affect the biophysical kinetics of the $Na_v1.5$ channels.....	82
Figure 11: Cell-surface expression of $Na_v1.5$ channel increases in tsA201 cells over-expressing	

α -actinin-2.....	84
Figure 12: α -Actinin-2 did not interact with the I-II loop and N-terminus regions of $\text{Na}_v1.5$	86
Figure 13: The $\text{Na}_v1.5$ III-IV linker shares a high-sequence homology with other voltage-gated Na^+ channel.....	87

Chapitre IV:

Figure 1: Cardiac Troponin I is a novel partner of $\text{Na}_v1.5$	145
Figure 2: Cardiac Troponin I associates with the 560 to 573 and 633 to 711 amino acid sequences of $\text{Na}_v1.5$ I-II loop.....	147
Figure 3: $\text{Na}_v1.5$ I-II loop associates with the 158 to 210 amino acid sequence of cTnI.....	149
Figure 4: Direct interaction of $\text{Na}_v1.5$ and cTnI <i>in vivo</i>	151
Figure 5: Cardiac Troponin I binds to the I-II loop polypeptide of $\text{Na}_v1.5$ <i>in vitro</i>	153
Figure 6: Cardiac Troponin I expression does not alter the amount of $\text{Na}_v1.5$ on the cell surface	155
Figure 7: Analysis of whole-cell currents recorded from tsA201 cell line expressing $\text{Na}_v1.5$ with or without cardiac Troponin I.....	157
Figure 8: The gating properties of intermediate inactivation and recovery from intermediate inactivation Analysis of whole-cell currents recorded from tsA201 cell line expressing $\text{Na}_v1.5/\text{WT}$ with or without cardiac Troponin I.....	159
Figure 9: Analysis of whole-cell currents recorded from tsA201 cell line expressing $\text{Na}_v1.5+\beta_1$ with or without co-expression of cardiac Troponin I.....	161
Figure 10: The gating properties of intermediate inactivation and recovery from intermediate inactivation	163
Figure 11: A yeast two-hybrid assay was used to investigate the interaction between N-terminus or III-IV linker /pGADT7 constructs and cTnI/Gal4DB.....	167

Chapitre V:

Figure 1: Modèle schématique du mécanisme d'action de l' α -actinine-2 dans le fonctionnement du canal $\text{Na}_v1.5$	182
Figure 2: Séquence détaillée de la boucle I-II cytoplasmique de $\text{Na}_v1.5$	185

Liste des Abréviations

a.a:	acide aminé
Actn2:	α -actinine-2
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
Ank1-3:	Gènes qui codent pour les ankyrines B, R et G
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
C :	Cystéine
Ca²⁺ :	Ion calcium
CaM :	Calmoduline
CMD :	Cardiomyopathies dilatées
Ca_v1.2:	Canal calcique de type L
CD8-a:	Antigène de surface
D:	Aspartate
DI-DIV:	Quatre domaines de la sous-unité α des canaux ioniques
DEAE:	Diéthylaminoéthyl-cellulose (support échangeur d'anions)
DEKA:	Aspartate-Glutamate-Lysine-Alanine
del :	Délétion
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DAG:	Diacylglycérol
ΔKPQ:	Délétion des acides aminés K, P et Q dans le canal sodique cardiaque
E:	Glutamate
E1:	Ubiquitin activating enzyme
E2:	Ubiquitin-carrier protein
E3:	Ubiquitin-protein ligase
ECG:	Electrocardiogramme
FBS :	Fetal bovine serum.
FH1b:	Facteur de croissance homologue du fibroblaste.
G:	Glycine
H:	Histidine
HEK293:	Cellules embryonnaires de rein humain
Herg:	Gène qui code pour le canal hERG
hH1:	Canal sodique voltage-dépendant du cœur humain
IA, IB et IC:	Sous classes de drogues anti-arythmiques
<i>I</i>_{Ca,L}:	Courant calcique de type L
IFM:	Isoleucine-Phénylalanine-Méthionine
<i>I</i>_K:	Courant potassique
<i>I</i>_{kur}:	Courant potassique rectificateur retardé
<i>I</i>_{Na}:	Courant sodique
<i>I</i>_{to}:	Courant potassique sortant transitoire
IVF:	Fibrillation idiopathique ventriculaire
K:	Lysine
K⁺:	Ion potassium
KCNE1:	Gène qui code pour la sous-unité régulatrice de KvLQT1

KCNE2:	Gène qui code pour la sous-unité régulatrice de hERG
KCNJ2:	Gène qui code pour le canal potassique (Kir2.1)
kDa:	Kilodalton
Kir2.1:	Canal potassique rectifiant entrant
KvLQT1:	Sous-unité α d'un canal potassique
KvLQT:	Gène qui code pour KvLQT1
LQTS:	Syndrome du QT long
M:	Méthionine
Melan-A:	Antigène de différenciation de mélanocytes
mdx^{scv}:	Souris invalidées pour le gène qui code pour la dystrophine
MinK:	Protéine régulatrice du canal KvLQT1
MiRP1:	Sous-unité régulatrice de HERG
ms:	Milliseconde
mV:	Millivolt
Na⁺:	Ion sodium
Na_v1.5:	Canal sodique cardiaque humain
Nedd4:	Ubiquitine-protéine ligase
NMDA:	N-methyl-D-Aspartate
P:	Proline
PA:	Potentiel d'action
PDZ:	Post synaptic density protein-95/discs large/zona occludens-1
PKA:	Protéine kinase A
PKC:	Protéine kinase C
PR:	Potentiel de repos
P,Q,R,S et T:	Ondes sur un électrocardiogramme
PTPH1:	Protéine tyrosine phosphatase
Q:	Glutamine
QT:	Intervalle entre l'onde Q et l'onde T sur l'ECG
R:	Arginine
RE :	Réticulum endoplasmique
S1 à S6:	Régions transmembranaires
SB:	Syndrome de Brugada
SCN1b-SCN4b:	Gènes qui codent pour les sous-unités auxiliaires β_1 - β_4
SCN5A:	Gène qui code pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque
Scn5a^{+/-}:	Souris hétérozygotes pour le gène <i>SCN5A</i>
SEM:	Erreur standard de la moyenne
ST:	Segment entre l'onde S et l'onde T sur l'ECG
SV40:	Simian virus 40
T:	Thréonine
TnIc:	Troponine I cardiaque
tsA201:	Cellules HEK293 immortalisées avec le virus SV40
TTX:	Tetrodotoxine
Ub:	Ubiquitine

CHAPITRE I

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

I. Hypothèse et objectifs

L'activité électrique des cellules cardiaques est le résultat d'une complexe et harmonieuse interaction entre les canaux sodiques et leurs protéines régulatrices. La fonction des canaux sodiques et particulièrement le canal sodique cardiaque ($\text{Na}_v1.5$) est déterminante pour l'initiation, la propagation et le maintien d'un rythme cardiaque normal. L'importance du rôle de $\text{Na}_v1.5$ sur la fonction cardiaque a été mise en évidence par l'identification de mutations naturelles au niveau de son gène (*SCN5A*). Les mutations dans ce gène sont associées à un grand nombre de maladies génétiques telles que: le syndrome du long QT congénital, le syndrome de Brugada et les désordres progressifs de conduction. Le dénominateur commun à ces pathologies est les arythmies cardiaques qui peuvent être responsables d'une mort subite. Cependant, il a été rapporté que seulement 20% de ces cas de décès sont associés à des mutations dans *SCN5A* (cas du syndrome de Brugada) (Antzelevitch, 2006). Comme $\text{Na}_v1.5$ s'inscrit au sein d'un complexe multiprotéique, l'implication de l'un de ses partenaires dans ces pathologies est une éventualité de plus en plus vraisemblable. En effet, l'identification d'une nouvelle cause génétique de mort subite qui impliquait directement une protéine adaptatrice ayant pour fonction de cibler des canaux ioniques vers des domaines spécialisés de la membrane plasmique ou du réticulum endoplasmique (Mohler et al., 2003) confirme cette hypothèse. Ainsi, l'identification de ces acteurs protéiques est indispensable à la compréhension des mécanismes de la physiopathologie de ces différentes maladies et permet de jeter les bases de nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées. Les objectifs des travaux de ma thèse s'inscrivent dans cette même optique et s'articulent autour de deux axes: 1) l'identification de nouveaux partenaires de $\text{Na}_v1.5$ et 2) la caractérisation du rôle physiologique de ces protéines, pour une meilleure appréhension de leurs fonctions cellulaires et des mécanismes régulant la dynamique (expression, localisation subcellulaire, adressage) de $\text{Na}_v1.5$. Pour mener à bien notre projet, nous avons fait appel à une gamme importante d'approches méthodologiques: le double hybride dans la levure, l'immunoprécipitation et le pull down afin de confirmer le caractère de l'interaction *in vivo* et *in vitro*, l'imagerie par microscopie confocale et l'enregistrement des courants ioniques par la technique du patch clamp. Ces méthodes nous ont permis de lever le voile sur d'autres partenaires de $\text{Na}_v1.5$ qui étaient jusqu'à présents inconnus et d'apporter de nouveaux éléments concernant les mécanismes régulant l'expression ou la stabilité de ce canal à la surface cellulaire.

CHAPITRE II

INTRODUCTION

II. Introduction

II.1 Le Cœur Humain

Le Cœur est un organe musculéux creux dont la fonction principale est l'irrigation des différentes parties du corps en nutriments et oxygène véhiculés par le sang. La paroi du cœur est constituée de trois couches dont l'épaisseur relative et la constitution varient avec la fonction particulière accomplie par chacune (1) l'**endocarde**, est la plus interne des couches, c'est une mince membrane endothéliale qui tapisse la face interne du myocarde, (2) le **myocarde**, la plus importante partie du cœur, principalement formé de **tissu musculaire cardiaque** et (3) la couche externe ou **péricarde**, est une fine membrane, appelée séreuse, qui tapisse le cœur et les gros vaisseaux à leur origine (Aorte et artère pulmonaire).

Le cœur est partagé en deux parties par une cloison dénommée septum. Cette cloison sépare le cœur droit du cœur gauche. Le cœur droit est impliqué dans la circulation pulmonaire et le cœur gauche assure l'acheminement du sang dans l'ensemble du corps. Chaque moitié du cœur est composée de deux cavités, une petite cavité représentée par l'oreillette qui coiffe une grande cavité appelée ventricule. L'oreillette droite est en relation avec deux veines caves tandis que l'oreillette gauche est en relation avec quatre veines pulmonaires. Quant aux ventricules, le droit communique avec les artères pulmonaires et le gauche avec l'artère aorte (Figure II.1).

Un système de valves unidirectionnelles, sensibles à la pression sanguine, sépare les oreillettes des ventricules d'une part et les ventricules des artères d'autre part. Les valves auriculo-ventriculaires canalisent le sang de l'oreillette vers le ventricule et les valves sigmoïdes localisées à la jonction entre le ventricule et l'aorte ou l'artère pulmonaire empêchent un éventuel reflux du sang des artères vers les ventricules pendant leur remplissage. Cette organisation singulière coordonne la circulation sanguine dans l'organisme: le cœur droit éjecte le sang provenant de toutes les parties du corps vers les poumons où il est enrichi par l'oxygène inspiré. Le sang est ensuite chassé vers le cœur gauche qui le propulse dans tout le corps afin d'assurer l'approvisionnement en oxygène de tous les organes: c'est la double circulation sanguine qui est assurée par une contraction rythmé du myocarde. Cette activité mécanique du myocarde est induite par un système électrique autonome représenté par un centre d'automatisme (nœud sinusal) et des voies de conduction (faisceau de His et fibres de Purkinje). Le nœud sinusal "pacemaker naturel"

émet de façon périodique des impulsions électriques sous forme d'un courant de dépolarisation alors que le faisceau de His et les fibres de Purkinje assurent la propagation de cette vague de dépolarisation dans toutes les cellules du myocarde ventriculaire. Ces cellules ainsi stimulées se contractent provoquant à chaque battement cardiaque l'expulsion de sang des ventricules dans la circulation.

Le système électrique est donc à l'origine de la synchronisation du rythme cardiaque et la coordination des contractions auriculo-ventriculaires. Par conséquent, le cœur assure une double fonction: une fonction hémodynamique, c'est la fonction "pompe" et une **fonction électrique**, c'est l'**automatisme cardiaque**.

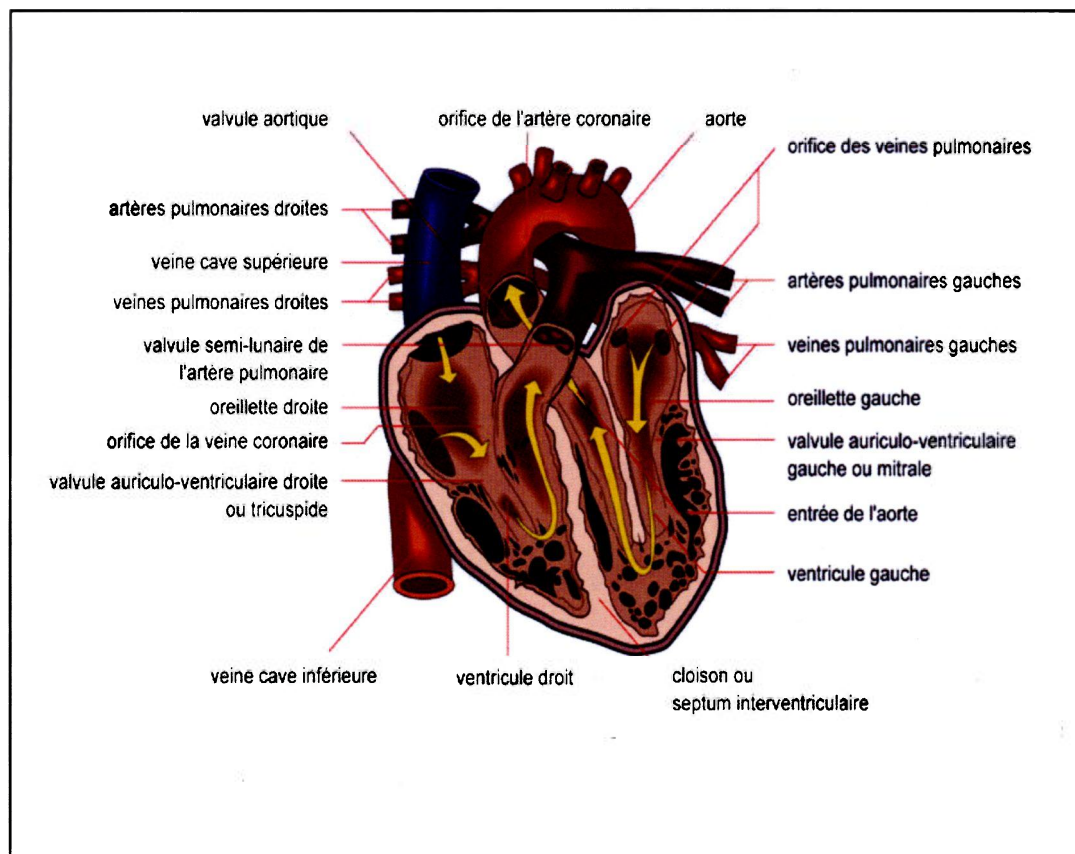


Figure II.1: Structure anatomique du cœur humain. Le cœur est formé de quatre cavités (l'oreillette droite, le ventricule droit, l'oreillette gauche et le ventricule gauche). L'activité hémodynamique de ces différents compartiments est régulée par un système valvulaire (la valvule aortique, la valvule mitrale, la valvule tricuspide et la valvule semi-lunaire de l'artère pulmonaire). La paroi musculaire du ventricule gauche est plus épaisse par rapport à celle du droit. Image modifiée, extraite de: www.infovisual.info.

II.2 Les Constituants Cellulaires du Cœur

Le tissu cardiaque comporte un assemblage très organisé de différentes cellules lui permettant d'assurer des fonctions vitales. Les cardiomyocytes constituent 75% de la masse cardiaque mais ils représentent seulement 25% de toutes les cellules cardiaques. Les fibroblastes représentent 90% des cellules restantes. En charge du réseau de collagène, ces fibroblastes jouent un rôle de soutien majeur pour coordonner la contraction cardiaque. Le reste des cellules se compose de: (1) les cellules endothéliales qui assurent une fonction de sécrétion, (2) les cellules musculaires lisses qui tapissent la paroi des vaisseaux intramyocardiques et jouent un rôle dans la régulation du flux sanguin et (3) les terminaisons nerveuses.

II.2.1 Les cardiomyocytes

Les **cardiomyocytes** sont des cellules contractiles et spontanément excitables. Ils sont formés par trois types cellulaires. (1) **les myocytes fonctionnels**, majoritaires, sont spécialisés dans la contraction cardiaque, (2) **les cellules cardionectrices**, peu contractiles, sont organisées en nœuds sino-auriculaire, atrio-ventriculaire et en fibres de Purkinje. Elles sont impliquées dans la genèse, la conduction et la régulation du potentiel d'action. Et (3) **les cellules myoendocrines**, riches en grains de sécrétion, ont surtout une fonction endocrine.

Chaque **myocyte fonctionnel** possède un seul noyau central, allongé dans le sens du grand axe de la cellule. Le cytoplasme est occupé par des myofibrilles, composées de myofilaments fins d'actine qui glissent sur les myofilaments épais de myosine pendant la phase de contraction. Par ailleurs, les myocytes fonctionnels sont étroitement liés les uns aux autres au niveau des disques intercalaires à l'intérieur desquels on trouve 2 types de jonctions membranaires:

- Les desmosomes: sont situés indifféremment au niveau des portions transversales ou longitudinales des traits scalariformes; les filaments intermédiaires de desmine s'y attachent. Les desmosomes permettent une forte adhésion des cellules entre elles et évitent ainsi que les contractions régulièrement répétées ne les détachent les unes des autres. Ils jouent également un rôle important dans la signalisation intercellulaire.
- Les jonctions communicantes, situées dans la portion longitudinale des disques intercalaires, forment des voies de faible résistance permettant la diffusion des potentiels d'action entre les cellules avoisinantes et par conséquent la propagation rapide de la

stimulation électrique d'une cellule à l'autre à travers le cœur (Figure II.2). De nombreux senseurs sont également présents dans la membrane plasmique de ces myocytes. Ces protéines transmembranaires jouent un rôle clé dans l'activité contractile du cœur. En réponse à un stimulus électrique, les senseurs s'activent et engendrent des mouvements d'ions à travers la membrane plasmique du myocyte ce qui permet à ce dernier de se contracter.

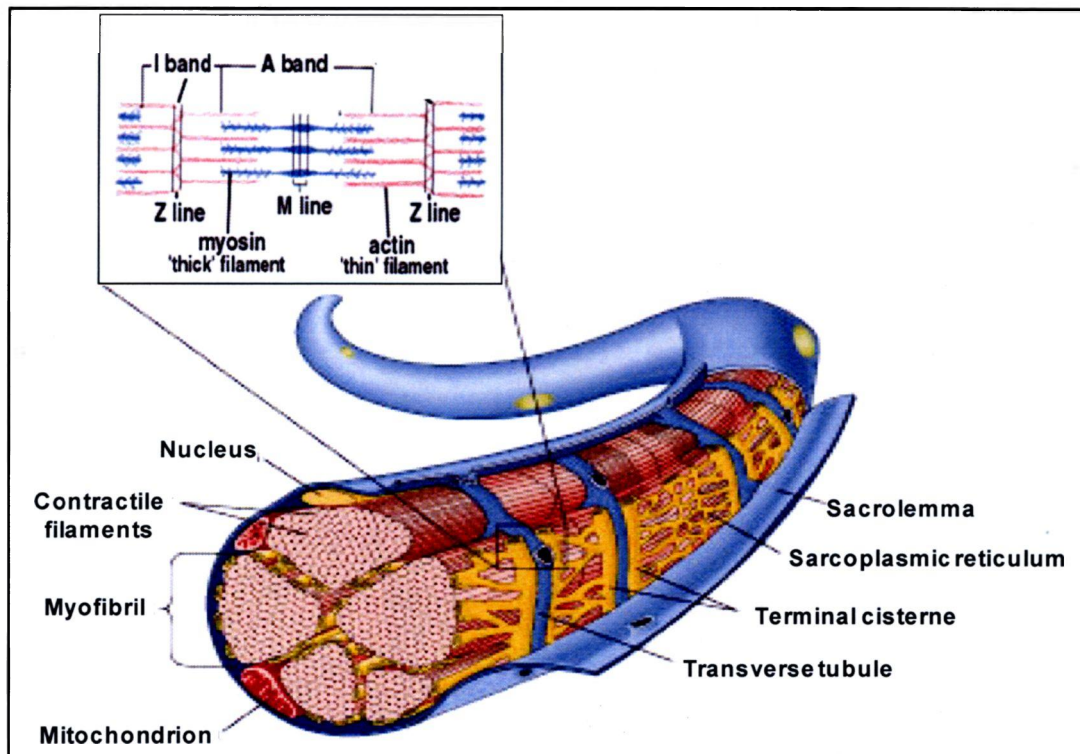


Figure II.2: Diagramme ultrastructural d'une fibre musculaire cardiaque. Chaque fibre musculaire est entourée par du réticulum sarcoplasmique (réticulum endoplasmique musculaire) selon une organisation rigoureuse. A intervalles plus ou moins réguliers, le réticulum sarcoplasmique émet des protubérances appelées citernes terminales. A ces niveaux se trouvent également des invaginations de la membrane cytoplasmique appelées tubules transverses (tubules T). L'unité de base du muscle est la myofibrille. Chaque fibre musculaire en contient plusieurs. Chaque myofibrille est cloisonnée sur sa longueur par des disques (disque Z) comprenant en particulier de l' α -actinine-2, probable protéine d'ancrage des filaments d'actine. L'espace entre deux disques Z est appelé sarcomère. A l'intérieur de celui-ci se trouve des rangées alternées de filaments épais (myosine) et fins (actine-troponine-tropomyosine) glissant les uns contre les autres. Cette organisation joue un rôle important dans le couplage excitation-contraction.

Pour comprendre la nature de ce stimulus, les propriétés électriques de la cellule myocardique seront discutées dans le chapitre II.3.

II.2.2 Les fibroblastes

Ils représentent le type cellulaire prédominant du muscle cardiaque. Leur principal rôle est la sécrétion de composés de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine, collagène.....) et les protéines du tissu conjonctif. Parmi ces produits synthétisés, certains constituent la structure d'échafaudage qui permet le soutien de la forme des cardiomyocytes alors que d'autres interviennent dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes sont également capables de transmettre une contraction au tissu avoisinant par le biais d'interactions entre les protéines de la matrice extracellulaire et leur cytosquelette. En effet, deux types de connexines ont été identifiés dans la jonction cellulaire des fibroblastes. (1) Les connexines 40 impliquées dans la communication fibroblaste-fibroblaste et (2) les connexines 45 qui interviennent dans la l'intercommunication fibroblaste-myocyte.

II.3 Le Système de Conduction Cardiaque

Le cœur possède en lui même tous les éléments nécessaires à son bon fonctionnement. Parmi ces éléments, le système cardionecteur qui regroupe le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et ses branches.

Le **Nœud sinusal** se trouve dans la paroi de l'oreillette droite juste au-dessous de l'orifice de la veine cave supérieure; c'est le principal centre rythmogène. Classiquement, le nœud sinusal émet spontanément et régulièrement des impulsions électriques et détermine la cadence de tous les myocytes contractiles. Ce rythme intrinsèque est appelé rythme sinusal, il est à l'origine de la fréquence cardiaque. Ensuite, l'onde de dépolarisation née du nœud sinusal est acheminée par un relais, le nœud auriculo-ventriculaire, aux fibres cardiaques chargées de la transmission.

Le **nœud auriculo-ventriculaire** est localisé dans la cloison interventriculaire à proximité de la valve tricuspide. À ce niveau, le stimulus électrique est ralenti d'un dixième de seconde de façon à ce que les oreillettes se contractent avant les ventricules. En cas d'anomalie sinusale, le nœud auriculo-ventriculaire prend le relais et ajuste le rythme cardiaque, ce rythme est appelé rythme nodal.

Le **faisceau de His ou faisceau atrio-ventriculaire** est un groupe de fibres musculaires cardiaques spécialisées qui s'étend du nœud atrio-ventriculaire jusqu'à la partie

membraneuse du septum inter-ventriculaire. Il permet une connexion électrique entre le nœud auriculo-ventriculaire et le ventricule par ses deux branches (droite et gauche). Le faisceau est composé de myocytes spécialisés appelés "**les myofibres de conduction ou fibres de Purkinje**". Ces dernières s'infiltrèrent dans l'apex et remontent dans les parois ventriculaires pour induire leur contraction.

II.4 Aspect Électrophysiologique des Cardiomyocytes

II.4.1 Le potentiel de repos

Au repos, la fibre myocardique est électriquement polarisée. Cette polarisation membranaire de repos, appelée **potentiel de repos**, est stable dans les cardiomyocytes contractiles, mais ne l'est pas dans les cellules nodales, dotées d'automatisme (de l'ordre de -90 mV pour les myocytes ventriculaires ou du système His-Purkinje). À l'état de repos, le milieu extracellulaire est riche en ions sodium (Na^+) et pauvre en ions potassium (K^+) contrairement au milieu intracellulaire qui contient trente fois plus de K^+ que de Na^+ . Cette distribution inégale des ions est maintenue grâce à une perméabilité sélective de la membrane vis-à-vis de ces deux ions. En effet, la membrane est plus perméable au K^+ qu'au Na^+ et le flux sortant du K^+ est plus important que le flux entrant du Na^+ . Ce mouvement ionique de part et d'autre de la membrane entraîne une augmentation des charges positives à l'extérieur et des charges négatives à l'intérieur engendrant ainsi une différence de charge entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. La cellule myocardique est alors polarisée et cette différence de charge constitue le potentiel de repos. Ce potentiel présente de grands changements transitoires durant l'activité des cardiomyocytes. Ces changements électriques passagers sont appelés **potentiels d'action (PA)**.

II.4.2 Le potentiel d'action

L'excitation de la cellule par un courant électrique déclenche des modifications de perméabilité aux ions, responsables du potentiel d'action. Le PA a une durée de quelques centaines de millisecondes au niveau des myocytes cardiaques. Il est le résultat d'une entrée massive de Na^+ dans la cellule suivi d'une entrée de Ca^{2+} et d'une sortie de K^+ .

D'une manière générale, une stimulation électrique extérieure engendre une série d'événements: une dépolarisation transitoire et locale du potentiel de repos. La différence de potentiel passe alors de -90 mV environ à +30 mV. L'activation de certains mécanismes

(canaux ioniques) va rétablir les différences de concentration de part et d'autre de la membrane et restaurer progressivement l'état de départ: c'est la phase de repolarisation qui va ramener le potentiel intracellulaire à sa valeur initiale. La contraction des cardiomyocytes est toujours précédée par ces événements électriques qui dépolarisent la cellule et déclenchent les événements mécaniques.

Par ailleurs, la morphologie et la durée du PA dans les cellules cardiaques dépendent de leur origine dans le cœur (Figure II.3). Les cellules conductrices du faisceau de His, par exemple, ont un PA largement plus long que celui des myocytes dans les oreillettes. Les cellules du nœud sinusal et du nœud AV se dépolarisent plus lentement. Cette diversité dans les PA vient du fait de la variabilité dans le nombre, la nature et la fonction des canaux ioniques au niveau des cellules individuelles. Par exemple, le canal potassique KCND3 est plus abondant dans l'épicarde du ventricule droit que dans le reste du tissu ventriculaire cardiaque (Wettwer et al, 1994). Et, le canal $K_{v1.5}$ responsable du courant I_{kur} rectificateur retardé est exprimé surtout dans les oreillettes (Feng et al, 1998).

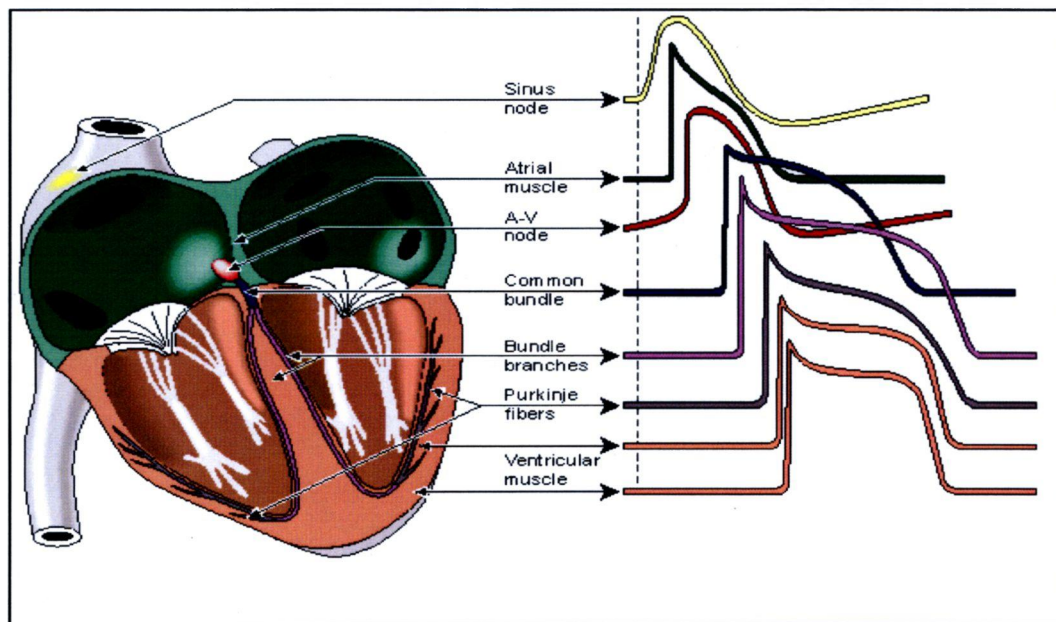


Figure II.3: Représentation schématique des différents potentiels d'action cardiaques caractéristiques des divers composants structuraux du myocarde. De haut en bas: (1), Nœud sinusal de Keith et Flack. (2), Cellules auriculaires musculaires. (3), Cellules auriculo-ventriculaires d'Aschoff-Tawara. (4), Faisceau de His. (5), Branches du faisceau de His. (6), Cellules de Purkinje. (7), Muscle ventriculaire.

De plus le courant transitoire sortant (I_{to}), plus accentué dans l'épicaarde ventriculaire que dans les myocytes de l'endocarde ventriculaire, participe à la génération de deux PA distincts mais synchrones.

Au terme du processus, un PA est constitué de 4 phases successives (Figure II.4). La **phase 0** est la montée rapide ou la dépolarisation du PA. La **phase 1** correspond à une petite repolarisation initiale (précoce), représentée par une brèche sur le PA. La **phase 2** représente le plateau du PA. La **phase 3** est la descente progressive ou la repolarisation. Et finalement, la **phase 4** correspond à l'état de base ou au repos. Ces différentes phases du PA sont étroitement liées aux changements de la perméabilité aux ions de Na^+ , K^+ et Ca^{2+} .

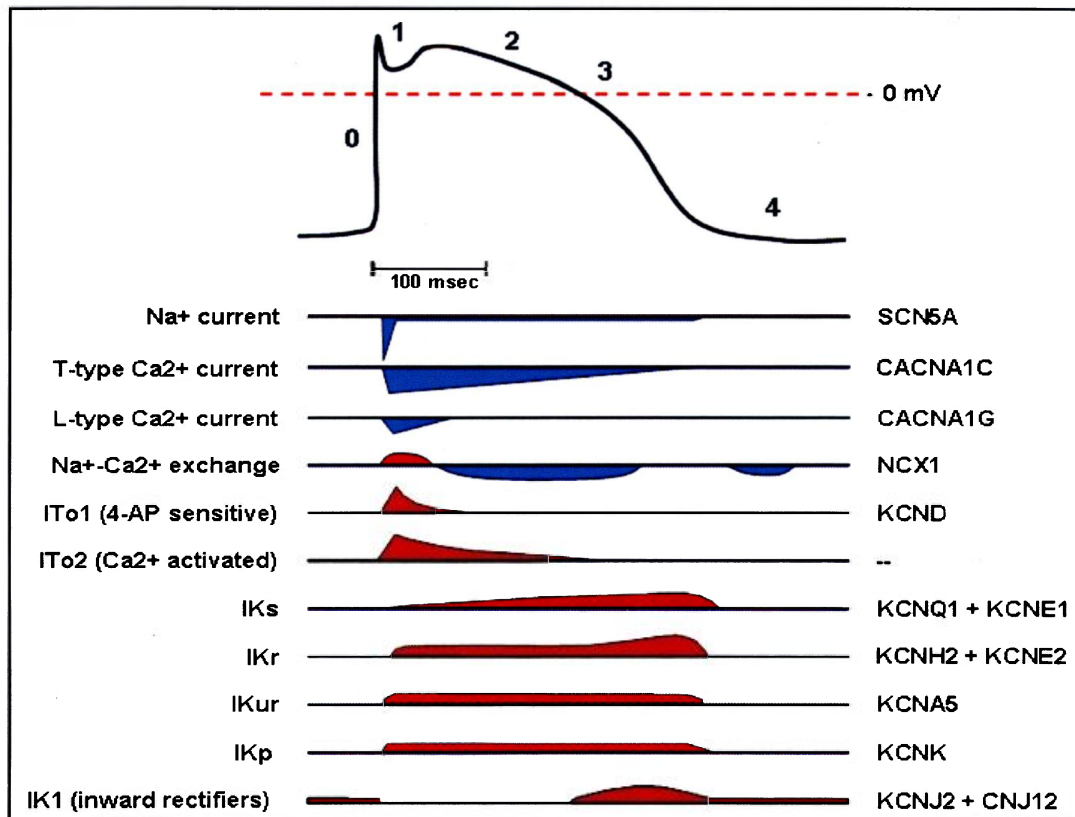


Figure II.4: Représentation schématique d'un potentiel d'action ventriculaire. En haut, les 4 principales phases d'un PA: La **phase 0** correspond à la dépolarisation rapide, la **phase 1** représente la repolarisation précoce, le plateau est représenté par la **phase 2** alors que la **phase 3** désigne la repolarisation. Et enfin, la **phase 4** représente l'état de repos. En bas, représentation des courants ioniques intervenants au cours du PA. Les gènes qui codent pour ces différents canaux ioniques sont représentés à droite de l'image. Le gène codant pour le canal générateur du courant (I_{to2}) est encore inconnu. Tandis que les à gauche. Le gène codant pour le canal générateur du courant (I_{to2}) est encore inconnu. En bleu: Courants sortants et en rouge: Courants entrants.

Ces changements de la perméabilité à un ion au cours d'un PA sont dus à l'ouverture ou la fermeture de canaux ioniques qui sont spécifiques à chaque ion. Ces canaux sont appelés **canaux voltage-dépendants**.

II.5 L'électrocardiogramme (ECG)

Les caractéristiques du PA qui ont été reportées dans le chapitre précédent permettent d'interpréter la morphologie de l'électrocardiogramme de surface (**ECG**). Ce dernier mesure les courants électriques dans le cœur grâce à des électrodes placées à la surface de la peau. Il permet de poser des diagnostics précis dans le cas des troubles de conduction et des troubles du rythme (infarctus, péricardite, syndrome de Brugada, syndrome du QT long, etc.). Typiquement, un ECG est composé de 5 types d'ondes (Figure II.5):

- L'**onde P** générée par le nœud sinusal, se propage dans les oreillettes et entraîne leur contraction. Sa durée est inférieure à 120 ms, son amplitude inférieure à 2 mm, elle est monophasique, arrondie, et toujours positive.
- L'**intervalle PR**: La stimulation atteint ensuite le nœud atrio-ventriculaire. Là, la stimulation est bloquée pour permettre le remplissage des ventricules. L'intervalle PR est donc isoélectrique. Le segment PR, qui va du début de l'onde P au début du QRS dure de 120 à 200 ms. Sa durée est le reflet de la conduction entre le nœud sinusal et le nœud atrio-ventriculaire.
- Le **complexe QRS** composé des ondes QRS correspond à la dépolarisation des ventricules et il est d'une grande amplitude (signal de quelques millivolts) car la masse des ventricules est très supérieure à celle des oreillettes.
- L'**onde T** succède au complexe QRS et correspond au courant de repolarisation des ventricules. Elle ne témoigne d'aucun événement mécanique. C'est un phénomène purement électrique, pendant lequel les ventricules redeviennent stimulables. Elle est généralement dissymétrique et a une durée de 0,16 s. Une entrave aux transferts ioniques pendant ces périodes se traduit le plus souvent par un allongement de la durée de l'intervalle QT.

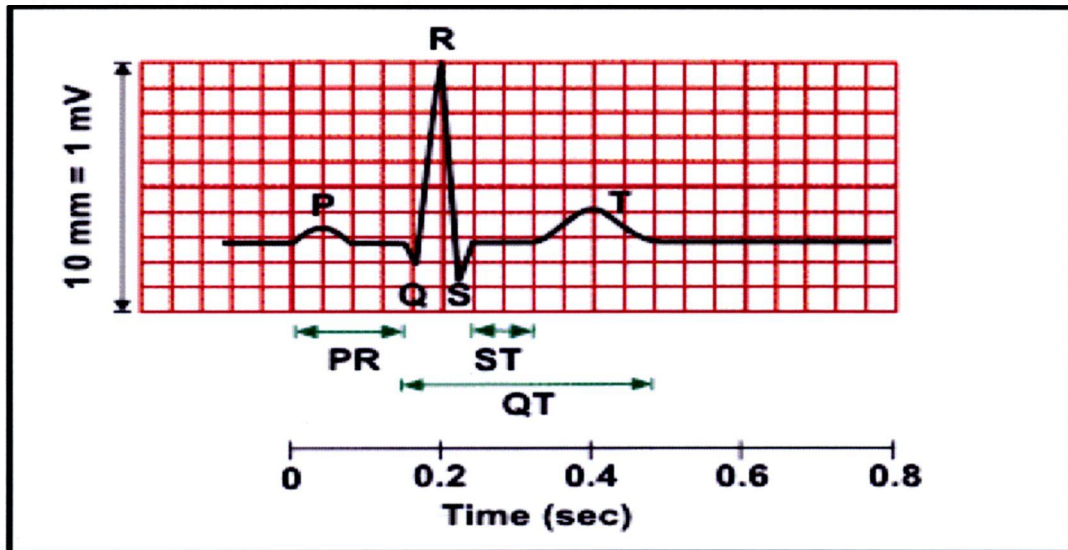


Figure II.5: Schéma d'un tracé d'électrocardiogramme normal. L'onde P résulte de la dépolarisation des oreillettes. Le complexe QRS représente la dépolarisation des ventricules alors que l'onde T correspond à la repolarisation des ventricules. Image extraite de (www.cvphysiology.com/Arrhythmias/A009.htm).

Dans un cœur sain, la forme, la durée et la succession des ondes sont assez constantes. Par conséquent, toute anomalie peut dévoiler un trouble du système de conduction cardiaque. Ainsi, des patients avec un intervalle QT allongé présentent un potentiel d'action ventriculaire prolongé et sont susceptibles à un trouble du rythme ventriculaire complexe nommé "Torsades de pointes" potentiellement mortelles. Le syndrome du QT long est causé par des mutations dans les gènes codant pour les canaux ioniques en général et le canal sodique cardiaque en particulier. Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés uniquement au **canal sodique cardiaque dépendant du voltage ($Na_v1.5$)**.

II.6 Le Canal Sodique Cardiaque Dépendant du Voltage ($Na_v1.5$)

Comme nous l'avons vu précédemment, $Na_v1.5$ est indispensable dans la genèse et la propagation du potentiel d'action dans le cœur. En plus de sa sensibilité aux signaux électriques, $Na_v1.5$ assure deux autres fonctions importantes: la perméabilité et la sélectivité.

II.6.1 Physiologie du Canal Sodique Cardiaque $\text{Na}_v1.5$

L'activité électrique des cellules cardiaques ainsi que leur contraction sont sous contrôle de $\text{Na}_v1.5$. L'activation de $\text{Na}_v1.5$ est responsable de l'initiation et de la propagation du potentiel d'action au niveau des cardiomyocytes. Cette variation au niveau du potentiel membranaire va enclencher ensuite l'activation d'autres canaux ioniques. Le canal $\text{Na}_v1.5$ possède donc un rôle pivot dans l'excitabilité des myocytes cardiaques. Et toute altération du niveau d'expression de ce canal provoquera un déséquilibre dans la répartition des charges ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique et entraînera la modification de la forme normale du PA. Les mutations sur le canal sodique cardiaque sont à l'origine de l'apparition de plusieurs pathologies dont le syndrome du QT long, le syndrome de Brugada et les troubles progressifs de la conduction cardiaque (George, Jr., 2005). Ainsi, par exemple, un gain de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$ se traduira soit par un retard de repolarisation, soit par une réouverture précoce et brève des canaux qui prolongera le courant sodique entrant pendant la phase ascendante rapide du potentiel d'action expliquant l'allongement de l'intervalle QT. Ce mécanisme est à la base du syndrome du QT long.

II.6.2 Le canal sodique cardiaque $\text{Na}_v1.5$ et l'excitabilité cellulaire

L'ouverture de $\text{Na}_v1.5$ est responsable de la première phase du potentiel d'action des cellules cardiaques permettant ainsi la propagation de l'excitabilité d'une cellule à une autre. Cette stimulation induit des mouvements d'ions à travers la membrane cellulaire et inverse la polarité de celle-ci. En effet, lors d'une dépolarisation, la perméabilité de la membrane aux ions sodium croît brusquement pour revenir ensuite à son niveau initial après quelques millisecondes. Ce changement transitoire est décrit sous forme de deux processus qui gouvernent la fonction du canal: l'activation et l'inactivation.

Les ions Na^+ pénètrent dans la cellule cardiaque par les canaux sodiques qui sont contrôlés par deux composantes structurales de ces canaux: la **porte d'activation** et la **porte d'inactivation** (Figure II.6).

L'entrée du Na^+ dans la cellule à travers les canaux sodiques est facilitée par l'ouverture de ces deux portes. Au **repos**, le potentiel de membrane est négatif, la porte d'activation est fermée contrairement à la porte d'inactivation qui est ouverte. Dans ce cas, la perméabilité du canal au Na^+ est au voisinage de zéro et le canal est **inactif**. Suite à une variation brutale du potentiel, la porte d'activation s'ouvre rapidement et la porte d'inactivation se referme graduellement.

Le canal est **actif** et très perméable au Na^+ ce qui entraîne la dépolarisation membranaire. Le courant sodique entrant s'interrompt lorsque la porte d'inactivation se ferme. Quand, la cellule est dépolarisée, la porte d'inactivation se ferme complètement, et le canal sodique revient à sa position de repos. Ce processus active la diminution de la perméabilité au Na^+ et accélère encore plus le processus de repolarisation.

L'**inactivation** du canal disparaît aussitôt que la membrane est repolarisée. Par ailleurs, les canaux sodiques ont au moins deux modes d'inactivation: l'inactivation rapide et l'inactivation lente. Ces états d'imperméabilité aux ions sont vraisemblablement médiés par de nombreux mécanismes moléculaires. L'**inactivation rapide** symbolise une diminution rapide et quasi-complète des courants observés en réponse à une courte dépolarisation de l'ordre de millisecondes. Quant à l'**inactivation lente**, elle survient lorsque les cellules sont dépolarisées pendant des secondes ou bien des minutes (Grissmer & Cahalan, 1989). La réactivation prend place quelques millisecondes après que la membrane cellulaire se repolarise.

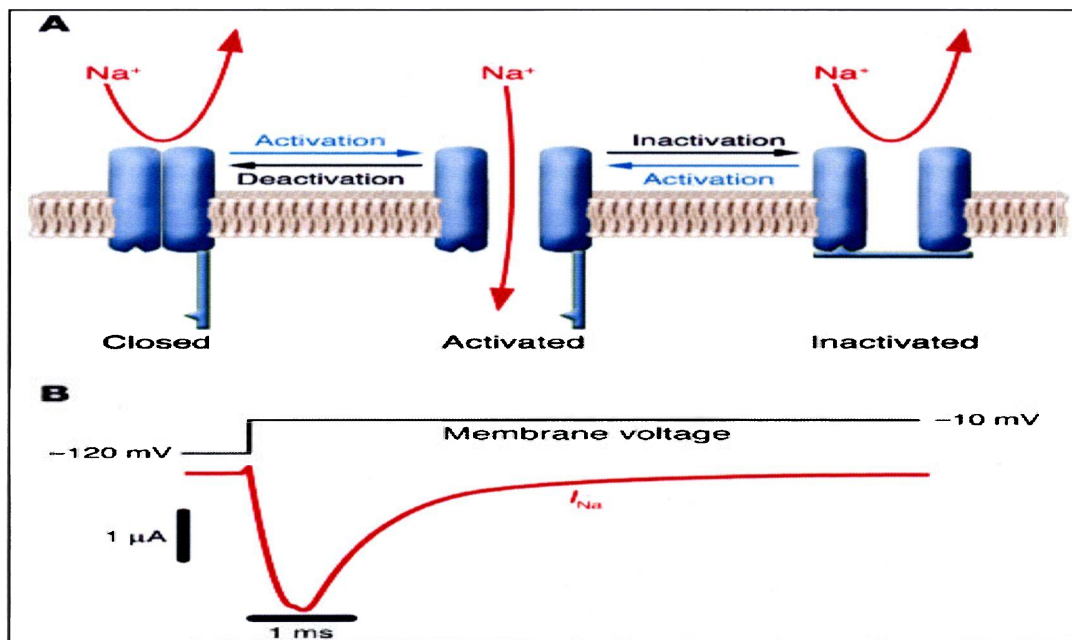


Figure II.6: Représentation schématique des différents états du canal sodique activé par le voltage. Au potentiel de repos, le canal est fermé et ne permet pas le passage d'ions sodium. Lorsque la membrane est dépolarisée, le canal change de conformation, la porte d'activation s'ouvre et permet le passage d'ions sodium. Par la suite, la porte d'inactivation se referme et le passage de ces ions est bloqué malgré le maintien de la dépolarisation. Le canal est dans un état inactivé. Image d'après (George. 2005).

En résumé, le canal sodique cardiaque voltage-dépendant peut se retrouver dans trois états différents: (1) l'état de **repos**, (2) l'état **activé** et (3) l'état **inactivé**. Les états de repos et inactivé sont des états non conducteurs.

II.6.2 Les Propriétés Biochimiques et Biologiques de Na_v1.5

II.6.2.1 Topologie et Fonction Cellulaire du Canal Sodique Cardiaque Na_v1.5

Le canal sodique Na_v1.5 appartient à la grande famille des canaux ioniques voltage-dépendants, canaux dont l'ouverture ou la fermeture est régulée essentiellement par la différence de potentiel de membrane. Cette protéine intégralement membranaire et hautement glycosylée est constituée d'une **sous-unité α** de ~260 kDa à laquelle peuvent être associées une ou quatre **sous-unités auxiliaires β** de 30-40 kDa chacune.

La sous-unité α ou pore du canal est codée par le gène **SCN5A** (Wang et al., 1996b), localisé sur le chromosome 3q21-24 (George, Jr. et al., 1995). Sa structure primaire se résume à **quatre homodomains (I, II, III, IV)**. Chaque domaine contient **six segments** hydrophobes transmembranaires alpha-hélicoïdaux (**S1-S6**) qui sont reliés entre eux par de petits chaînons d'acides aminés intra et extracellulaires, nommés boucles (Gellens et al., 1992). Ces quatre domaines sont jalonnés à leurs extrémités N et C terminales par des segments intracellulaires (Figure II.7). Cette architecture moléculaire spécifique de Na_v1.5 lui confère des propriétés électrophysiologiques indispensables pour la réalisation de son rôle vital dans les cellules cardiaques. En effet, dans sa configuration ouverte, les régions entre les segments S5 et S6 nommées **segments P**, délimitent le pore et commandent la conduction et la **sélectivité ionique** du canal. La séquence en acides aminés du segment P est hautement conservée à travers les isoformes et chez toutes les espèces. Chaque segment P des quatre domaines se distingue par l'unicité de sa structure primaire et la particularité de son positionnement par rapport au pore central du canal (Chiamvimonvat et al., 1996; Yamagishi et al., 1997). Ce qui laisse prédire cela, une contribution différenciée de chacun des segments P dans la sélectivité, la perméabilité du canal ainsi qu'aux propriétés de liaison des ions et des toxines telles que: la tetrodotoxine et la μ -conotoxine (Cestele et al., 2006).

De plus, la présence dans les segments P d'un filtre sélectif, constitué par le motif **DEKA** (Asp-Glu-Lys-Ala) est déterminante dans la sélectivité de ces canaux. En effet, ce motif attire les ions Na⁺ et exclu les ions chargés négativement (Backx et al., 1992). Le rôle crucial de ce motif dans la sélectivité des canaux sodiques a été mis en évidence par

l'observation du comportement électrique des canaux mutants sur cette séquence. En effet, la mutation complète de ce motif altère aussi bien la sélectivité que la fonctionnalité du canal sodique (Hilber et al., 2005).

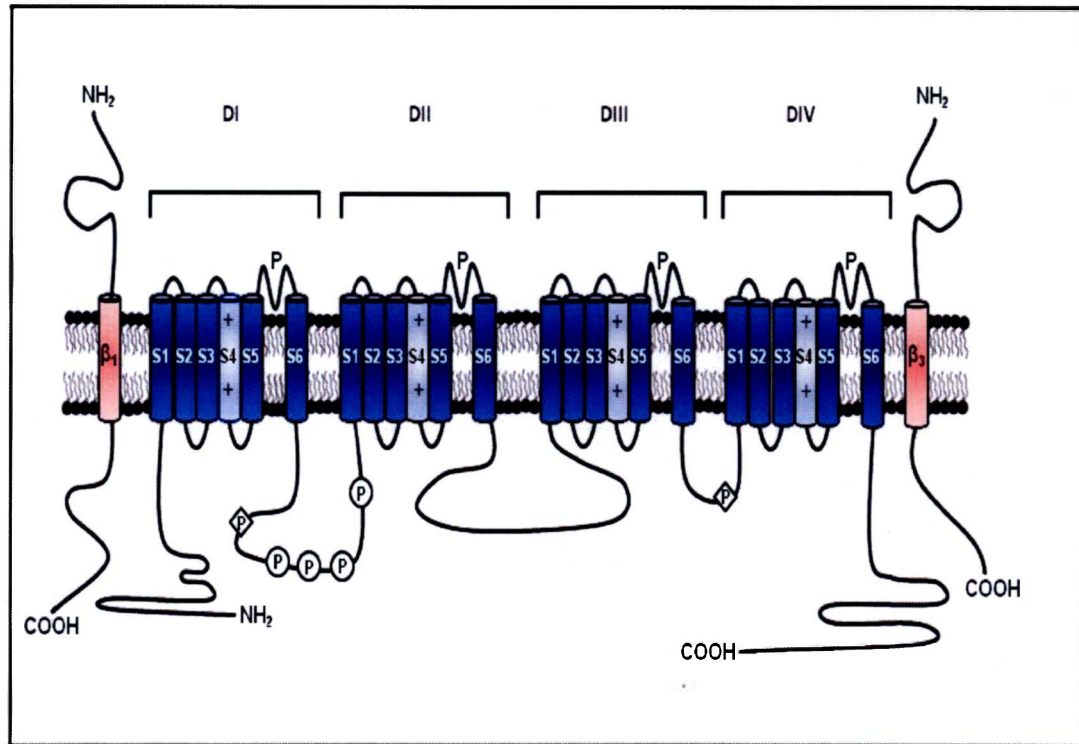


Figure II.7: Représentation schématique de la structure secondaire du canal sodique dépendant du voltage. Le canal sodique est composé d'une sous-unité principale α , associée à une ou deux sous-unités auxiliaires β . La sous-unité α comprend 4 domaines transmembranaires (DI, DII, DIII et DIV). Chaque domaine est formé de 6 segments transmembranaires (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) reliés par des boucles intra et extracellulaires. Le quatrième segment (S4) de chaque domaine joue le rôle d'un senseur de voltage du canal tandis que le segment P forme le pore du canal. Plusieurs sites de phosphorylation par la PKA (cercle) ont été identifiés dans la boucle cytoplasmique reliant l'interdomaine I à II (boucle I-II). De même des sites de phosphorylation par la PKC (losange) ont été également localisés aussi bien dans la boucle I-II mais aussi dans la boucle cytoplasmique reliant l'interdomaine III à IV qui représente la porte d'inactivation du canal.

Les **segments S4** dans chaque domaine sont riches en résidus d'acide aminé chargés positivement (4 à 8 résidus) telles l'arginine et la lysine. Ces résidus confèrent au segment S4 la fonction de **senseur de voltage**. Suite à une dépolarisation, le déplacement du

segment S4 à travers la membrane entraîne un changement de la conformation du canal, suivi par l'ouverture de son pore.

La substitution des résidus positifs par d'autres résidus neutres ou chargés négativement entraîne une diminution de la sensibilité des canaux sodiques au voltage alors que la neutralisation de plus de trois charges dans le segment S4 affecte l'expression de canaux sodiques fonctionnels dans les ovocytes (Stühmer et al., 1989). D'où les segments S4 sont certainement la principale structure d'activation du canal. Ils représentent la partie sensible du canal au potentiel membranaire. En fonction de ce dernier, ils changent leur position au sein du canal provoquant ainsi l'activation et l'inactivation rapide du canal.

D'autres composants du canal sodique participent également à la régulation des canaux sodiques tels les interdomaines I-II et l'interdomaine III-IV. L'**interdomaine I-II** est sans conteste la partie du canal la plus sensible à la phosphorylation. Elle possède 13 sites de phosphorylation par la protéine kinase AMP_C-dépendante (PKA) et un site de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) (Zhou et al., 2002). En effet, Smith et Goldin ont montré que le remplacement de la sérine en position 573 par un aspartate a comme conséquence un canal qui exprime constitutivement un niveau de courant sodique réduit (Smith & Goldin, 1997). Alors que, Muphy *et al* ont rapporté que la phosphorylation d'autres résidus sérine situés aux positions 526 et 529 par la PKA entraîne une augmentation macroscopique du courant sodique (Murphy et al., 1996).

Un autre élément important dans l'organisation structurelle et fonctionnelle du canal sodique est la boucle cytoplasmique qui relie les domaines III et IV (**boucle III-IV, interdomaine III-IV**) est plus impliquée dans l'inactivation rapide de Na_v1.5. Elle est fortement conservée chez toutes les espèces et agit comme une porte d'inactivation qui se lie au pore intracellulaire du canal pour l'inactiver. La perfusion intracellulaire des protéases (Armstrong, 1981) ou l'application intracellulaire d'anticorps spécifiques à cette région du canal (Vassilev et al., 1989) prévient le processus d'inactivation rapide.

Ces expériences ont permis l'identification d'un motif critique responsable de l'inactivation du canal. Il s'agit de trois résidus hydrophobes (**IFM**; Figure II.8a). La substitution de ces trois résidus par des glutamines empêche le canal de s'inactiver alors que l'insertion de peptides renfermant ce motif rétablit cet état fonctionnel du canal sodique (Eaholtz et al., 1994).

Le motif IFM de l'interdomaine III-IV des canaux sodiques est un élément indispensable de la particule d'inactivation, et que le groupement phényle (F1486) joue un rôle primordial dans la fermeture de la porte d'inactivation (Chahine et al., 1997). A la lumière de ces résultats, la porte d'inactivation proposée est une courte boucle qui positionne la particule d'inactivation (IFM) à proximité de la bouche du pore transmembranaire (Figure 8a). Ainsi, la boucle III-IV se lie à deux régions du canal sodique: la région intracellulaire du pore d'un côté et de l'autre côté les domaines III et IV du canal sodique. Pour expliquer cette configuration particulière de la boucle III-IV, un mécanisme de "hinged-lid" pour l'inactivation a été suggéré en analogie avec le modèle de "ball-and-chain" admis dans le cas des canaux potassiques, puisque dans leur cas, la particule d'inactivation est localisée dans la région N-terminale qui n'est attachée que d'un seul côté (West et al., 1992). Par ailleurs, une description plus précise de la structure de la boucle III-IV a été fournie par la méthode de résonance magnétique nucléaire (Figure II.8b). Cette étude a dévoilé une structure α -hélicoïdale rigide, précédée par deux tours qui placent le motif IFM de tel façon qu'il peut interagir avec la partie intracellulaire du pore et la bloquer (Rohl et al., 1999).

De même, la région **C-terminale** semble également jouer un rôle dans le processus de l'inactivation rapide des canaux sodiques (Cormier, 2002; Deschênes et al., 2001; Deschênes et al., 2001; Deschênes et al., 2001). Effectivement, il a été rapporté que la substitution de la région C-terminale du canal provoque une accélération de l'inactivation (Mantegazza et al., 2001). Des résultats similaires ont été obtenus suite à l'utilisation de protéines hybrides formés par la fusion entre différentes régions du canal sodique squelettique et du canal sodique cardiaque (Deschênes et al. 1998). Ces auteurs suggèrent que plusieurs régions du canal sodique peuvent être engagées dans le phénotype d'inactivation.

De plus, l'implication de la région C-terminale dans la stabilisation de l'état inactivé du canal a été confirmée par une analyse structurale de cette région. D'une manière intéressante, Motoike *et al* ont montré pour la première fois, une interaction entre la région C-terminale et l'interdomaine III-IV de $\text{Na}_v1.5$. Ce complexe ainsi formé est nécessaire pour la stabilisation de l'état "fermé" de ce canal. De plus, la dissociation de ce complexe, suite à une mutation, entraînerait une déstabilisation de l'inactivation. Ainsi la réouverture de certains canaux sodiques engendrerait un retard dans la dépolarisation (Motoike et al., 2004).

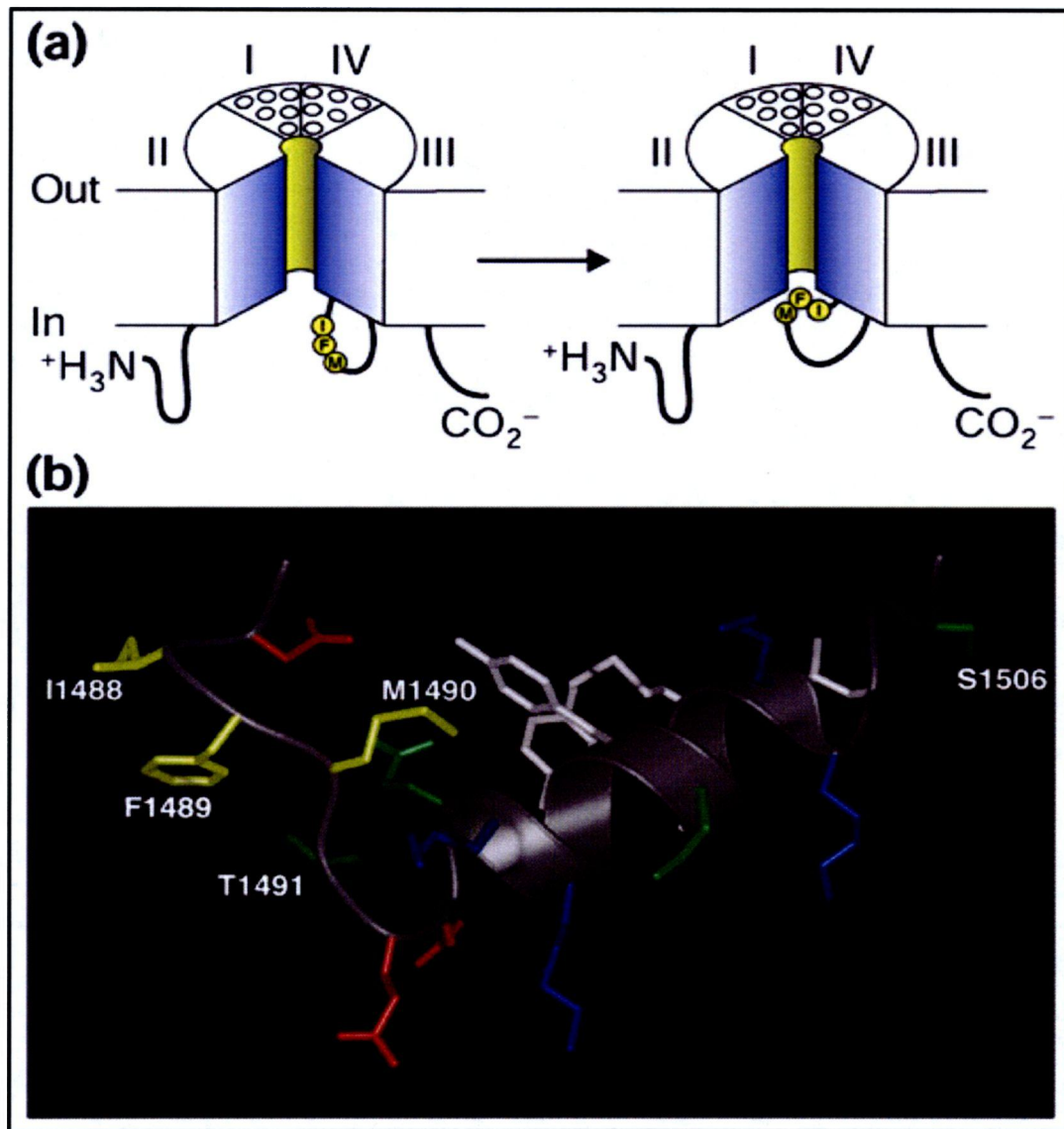


Figure II.8: Modèles proposés pour le fonctionnement et la structure tridimensionnelle de la porte d'inactivation du canal sodique cardiaque humain $Na_v1.5$. Remarquez en (A) les résidus IFM et leur emplacement sur la porte d'inactivation, en jaune. En (B), la structure tridimensionnelle de la porte d'inactivation déterminée par la technique de résonance magnétique nucléaire. Notez la présence de trois importants résidus; Le motif IFM (I1488, F1489 et M1490) en jaune ainsi que les résidus T1491 et S1506. Le résidu T1491 joue un rôle crucial dans l'inactivation du canal alors que le S1506 contient un site de phosphorylation par la protéine kinase C. Image d'après (Yu & Catterall, 2003).

II.6.2.2 La Distribution Cellulaire du Canal Sodique Cardiaque $Na_v1.5$

$Na_v1.5$ est majoritairement exprimé dans le cœur mais il a été également décelé dans le cortex piriforme et dans les noyaux subcorticaux du système limbique (Hartmann et al., 1999). Dans le muscle squelettique, $Na_v1.5$ est exprimé uniquement durant le stade néonatal ou dans certains cas de myopathies (Filatov & Rich, 2004). En effet, il a été remarqué que la dénervation du muscle squelettique entraîne une augmentation du niveau d'ARNm de $Na_v1.5$ après induction de son expression (Yang et al., 1991; Yang et al., 1991; Rich et al., 1999). C'est en 1996, que $Na_v1.5$ a été observé pour la première fois dans les ventricules cardiaques (Cohen, 1996). Ces auteurs ont montré que les canaux sodiques cardiaques sont préférentiellement exprimés au niveau des jonctions cellulaires ou **disques intercalaires** mais ils sont aussi présents à la surface et au niveau des **tubules T** des myocytes ventriculaires. En effet, l'étude de Kucera a montré une co-localisation des canaux sodiques cardiaques avec la connexine 43 au niveau des disques intercalaires de myocytes ventriculaires. (Kucera et al., 2002). Toute fois, la littérature est controversée concernant la présence et le rôle de $Na_v1.5$ dans les tubules T et certains auteurs mettent en cause les anticorps ou le modèle animal utilisé lors des études précédentes. Dans l'ensemble, la présence de $Na_v1.5$ dans ces différents compartiments cellulaires de cardiomyocytes pourrait faciliter la propagation du potentiel d'action aux machines contractiles, coordonnerait le couplage excitation-contraction et finalement influencerait la performance ventriculaire.

En dehors de $Na_v1.5$, des canaux sodiques neuronaux ($Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$) ont également été observés dans les cardiomyocytes mais principalement dans les tubules T et les stries Z (Haufe et al., 2005). Toutefois, le rôle exact de ces canaux est encore mal défini.

II.7 Les Pathophysiologies du Canal Sodique cardiaque $Na_v1.5$.

Le SB est une maladie pouvant être sporadique ou familiale. Dans les formes familiales, la maladie est transmise sur le mode autosomique dominant avec donc une probabilité de transmission de 50%. Le génotypage de grandes familles atteintes du syndrome a permis d'identifier des mutations sur le gène *SCN5A* qui code pour la sous-unité alpha de $Na_v1.5$. Ces mutations sur *SCN5A* sont responsables d'une perte de fonction de $Na_v1.5$ avec diminution du courant sodique responsable de la phase 0 (dépolariation) du potentiel

d'action cardiaque. Depuis, de nombreux locus et gènes ont été associés à des pathologies du rythme cardiaque. Ces maladies sont appelées **canalopathies** car les protéines issues des gènes mutés sont des canaux ioniques essentiels aux fonctions de dépolarisation-repolarisation et contraction-relaxation du myocarde. Dans ce chapitre, nous nous limiterons uniquement aux pathologies associées à des mutations dans le gène **SCN5A** (Figure II.9).

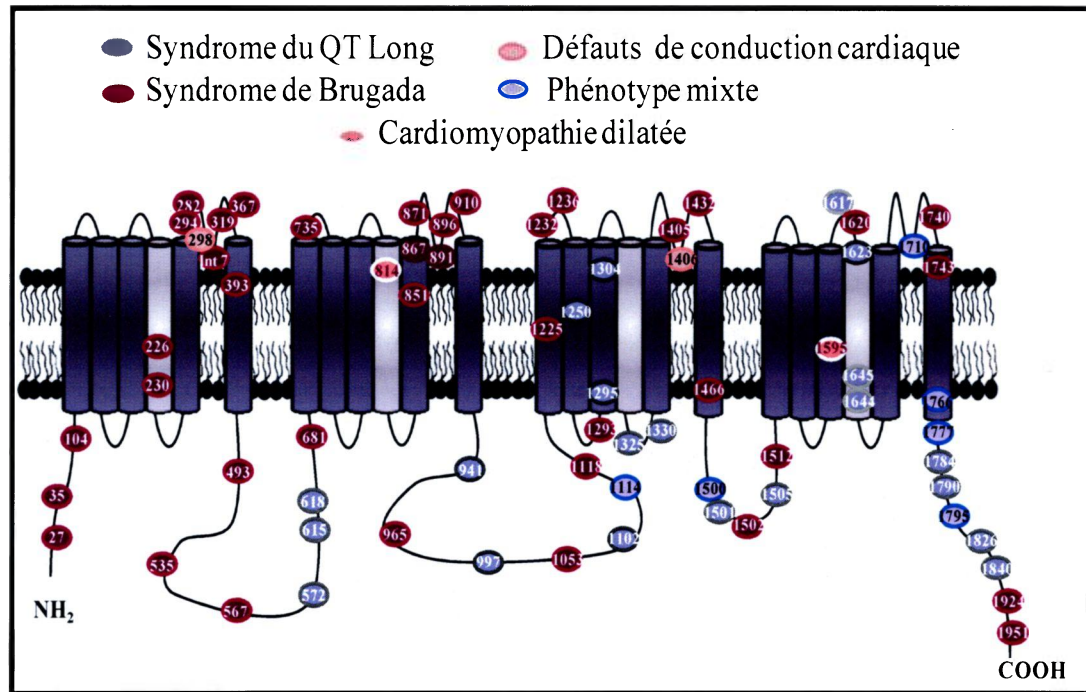


Figure II.9: Représentation des différentes canalopathies liées à des mutations dans le gène *SCN5A* qui code pour la sous-unité α de $Na_v1.5$. Des mutations touchant les diverses parties structurales de $Na_v1.5$ sont à l'origine du syndrome du QT long et du syndrome de Brugada, des troubles de conduction cardiaque et des maladies à phénotype mixte (LQT3 plus Brugada syndrome et/ou troubles de conduction cardiaque).

II.7.1 Le Syndrome du QT Long Congénital (LQT)

Le syndrome du QT long congénital est caractérisé par un espace **QT** anormalement allongé à l'ECG. Il est fréquemment lié à un changement de la morphologie de l'**onde T** (Figure II.10). Ce trouble est témoin d'une anomalie de la repolarisation et peut causer des torsades de pointes et une tachycardie ventriculaire avec un haut risque de mort subite. Il existe classiquement deux formes de LQT: Le syndrome de Jervell-Lange-Nielsen très rare,

récessif, associée à une surdité congénitale et le syndrome de Romano-Ward, autosomique dominant et représentant à lui seul 90% des cas de LQT associés au dysfonctionnement du canal sodique. Présentement, 10 types de syndrome du LQT ont été identifiés génétiquement et cliniquement (LQT1-LQT10). Le type 1 est associé à une mutation sur le gène codant pour le canal potassique KVLQT1 (Wang et al., 1996a), le type 2 à une mutation sur le gène du canal potassique HERG (Curran et al., 1995), le type 3 sur le gène SCN5A du canal sodique Na_v1.5 (Wang et al., 1995b), le type 4 sur le gène d'une protéine adaptatrice, l'ankyrine B (Mohler et al., 2003), le type 5 sur le gène codant la protéine minK (Splawski et al., 1997), le type 6 sur le gène *KCNE2* codant la protéine MiRP1 (Abbott et al., 1999), le type 7 sur le gène *KCNJ2* codant un canal Kir2.1 (Tristani-Firouzi et al., 2002), le type 8 sur le gène codant le canal calcique Ca_v1.2 (Lo-A-Njoe et al., 2005), le type 9 sur le gène codant la protéine caveoline-3 (Cronk et al., 2007) et finalement le type 10 le gène codant la sous-unité auxiliaire β₄ (Medeiros-Domingo et al., 2007). Toutefois, cette diversité des phénotypes observés pour un même génotype demeure encore sans explication. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que: le **manque de connaissance concernant les complexes protéiques régulant ces canaux est l'une des raisons de cette incompréhension.**

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le syndrome du **LQT de type 3** est la conséquence d'une ou de plusieurs mutations dans le gène *SCN5A*. Ces mutations entraînent un **gain de fonction** lié à l'inactivation perturbée de Na_v1.5 (Keller et al., 2003). A date, de multiples mutations ont été identifiées et caractérisées sur ce gène, incluant une délétion de 9 paires de bases codant pour les trois acides aminés successifs K, P et Q (ΔKPQ) situés dans la porte d'inactivation de ce canal. Les conséquences de telles mutations causent: 1) à la fois des brèves ouvertures et des réouvertures répétitives qui durent plus longtemps (Dumaine et al., 1996). En conséquence, l'altération de la fonction du canal sodique par la délétion KPQ est beaucoup plus sévère que les simples substitutions. Ces réouvertures répétitives au niveau d'un canal unitaire correspondent au courant résiduel, ou courant persistant, au niveau du courant cellulaire général. De plus, toutes les mutations engendrant le syndrome du QT long rapportées sur le canal Na_v1.5 induisent un courant résiduel (Dumaine et al., 1996); 2) une augmentation du nombre de canaux sodiques (Na_v1.5) pouvant être réactivés durant le potentiel d'action, mais dans la plupart du temps en l'absence d'un courant persistant. Ceci peut être dû à une altération des propriétés de l'inactivation, telles que la dépendance au voltage, les cinétiques ou la récupération de l'inactivation (Smits et al., 2005).

Bien que plusieurs pistes thérapeutiques aient été proposées pour le traitement du syndrome du QT long, les anti-arythmiques de classe I demeurent les plus efficaces dans la majorité des cas de mutations au niveau du gène *SCN5A*.

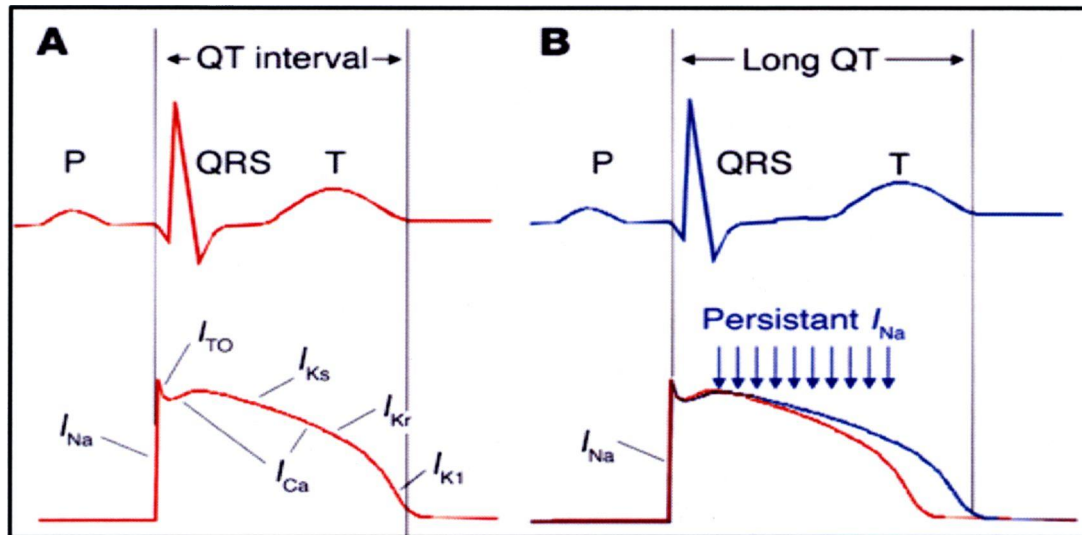


Figure II.10: Les bases électrophysiologiques du syndrome du long QT. (A) En haut, Relation entre l'ECG et le potentiel d'action cardiaque correspondant (en bas). L'intervalle QT prolonge la durée du potentiel d'action. Les courants ioniques individuels responsables des différentes phases du potentiel d'action sont représentés sur la courbe. (B) Prolongation de l'intervalle QT et les anomalies du potentiel d'action qui en découlent (bleu) suite à des réouvertures fréquentes du canal muté. Ces réouvertures produisent un courant sodique (I_{Na}) entrant persistant. Image d'après (George, Jr., 2005).

II.7.2 Le Syndrome de Brugada (SB)

En 1992, le syndrome de Brugada a été décrit pour la première fois chez des patients avec des **cœurs normalement structurés** (Brugada & Brugada, 1992). Cette maladie représente la première cause de mort subite chez les individus de moins de 50 ans ne présentant pas de pathologies cardiaques anatomiques. L'ECG typique d'un SB se caractérise par la présence d'un bloc de branche droit du faisceau de His et un segment **ST** élevé sans une altération de la durée de l'intervalle **QT** ni de la structure du cœur (Figure II.11). Ces patients sont prédisposés à un risque élevé de mort subite par tachycardie-fibrillation ventriculaire. Le SB est associé à des mutations sur le gène *SCN5A* mais seulement dans moins de 30% des cas (Antzelevitch, 2006). Dans plus de **70% des cas, l'origine génétique est inconnue**. Jusqu'à présent, de nombreuses mutations ont été caractérisées. Elles sont majoritairement de type faux sens et changent parfois les sites d'épissage ou déplacent le cadre de lecture

avec apparition d'un codon stop prématuré (Antzelevitch, 2001). À l'inverse du syndrome du LQT, la relation génotype phénotype n'est pas aussi simple. Dans le cas du SB, les **mutations** induisent une **perte de fonction** de **Na_v1.5** et leurs répercussions sur ce canal se résument à: 1) une réduction du nombre de canaux fonctionnels ou une altération de la structure tertiaire de Na_v1.5 qui cause un mauvais repliement de la protéine canal ce qui peut générer un défaut d'adressage de cette dernière à la membrane (Baroudi et al., 2004); 2) une diminution de l'amplitude des courants sodiques suite à une mutation dans le pore du canal (Amin et al., 2005); 3) une altération des propriétés biophysiques de Na_v1.5 telle: une inactivation rapide du canal (Keller et al., 2006).

De manière intéressante, l'identification de la mutation (**E1053K**) dans le gène *SCN5A* entraînant ainsi une réduction de l'expression de Na_v1.5 à la membrane était très révélatrice. En effet, cette mutation touche le site d'interaction de l'**ankyrine G** situé sur la **boucle I-II** de **Na_v1.5** et abolit la capacité de ce canal à lier l'ankyrine G (Mohler et al., 2004a). **L'importance de cette étude réside dans le fait que d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans le SB mais leur rôle précis dans cette maladie reste encore à déterminer. Ainsi, il est fortement plausible que des mutations délétères sur les partenaires ou leurs sites d'interaction avec Na_v1.5 interviennent dans certains cas de SB. Par ailleurs, la grande méconnaissance des acteurs protéiques responsables de la régulation de Na_v1.5 limite les investigations dans ce domaine et l'interprétation physiopathologique de ce syndrome.**

D'autre part, la complexité de la relation génotype-phénotype de certaines mutations dans le gène *SCN5A* soulève plusieurs interrogations. Par exemple, comment certains patients porteurs de mutations de type syndrome du Brugada peuvent développer un trouble progressif de la conduction (Probst et al., 2006). De plus, certaines mutations (1795insD) dans le gène *SCN5A* (également impliquées dans le syndrome du QTL congénital) ont été mises en évidence chez des sujets porteurs du SB (Bezzina et al., 1999).

Actuellement, la seule thérapeutique ayant fait preuve d'efficacité dans le cas su SB est le défibrillateur automatique implantable. Sur le plan pharmacologique, les drogues administrées visent à réduire le courant potassique transitoire: I_{to} (la quinidine) ou à accroître le courant calcique de type L: $I_{Ca,L}$ (l'isoprénaline).

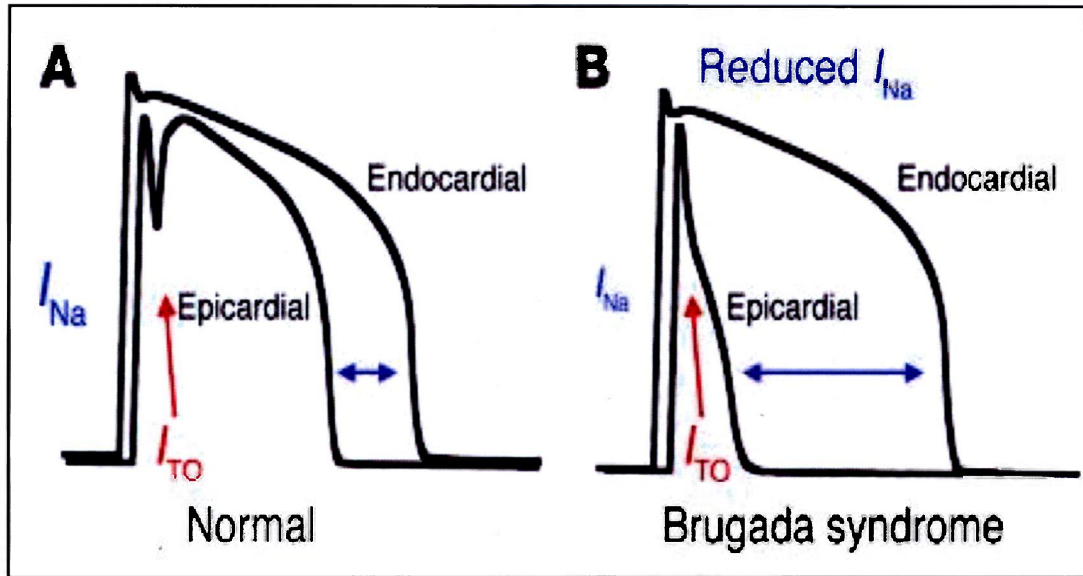


Figure II.11: Les bases électrophysiologiques du syndrome de Brugada. Les potentiels d'action des myocardes épicaudiques et endocardiques normaux, à gauche. Noter le "notch" qui caractérise le potentiel d'action épicaudique dû au courant sortant I_{to} . À droite, les deux potentiels d'action chez un patient atteint du syndrome de Brugada. Le blocage des canaux sodiques résulte en une repolarisation précoce du potentiel d'action épicaudique dû au courant I_{to} qui est plus intense à ce niveau du tissu cardiaque. Image d'après (George, Jr., 2005).

II.7.3 Les Troubles de la Conduction Cardiaque

II.7.3.1 La Dysfonction Sinusale ou Sick Sinus Syndrome (SSS)

Une bradycardie sinusale, voire même un arrêt de la conduction sinusale et des variations de la fréquence cardiaque sont les signes avant-coureurs de ce syndrome. Le nœud sinusal est constitué de cellules spécialisées, à l'origine du rythme sinusal visible sur l'ECG, et de cellules conductrices. Quand la conduction entre le nœud sinusal et le nœud auriculo-ventriculaire est altérée, le rythme est alors imposé par les cellules en aval de la conduction. Sur l'ECG, aucune onde P n'est donc perceptible lorsque la conduction au niveau du nœud sinusal est totalement déficiente. L'étude de Benson a montré l'implication de certaines mutations du canal $Na_v1.5$ dans le développement de cette maladie (Benson et al., 2003). Sur l'ensemble des 7 familles étudiées dont au moins l'un des membres était porteur du SSS, 3 familles étaient porteuses d'autres mutations au niveau de ce canal. In vraisemblablement, deux des mutations trouvées avaient été déjà identifiées comme

responsables du syndrome du LQT ou du SB. Quant à l'étude électrophysiologique, elle a révélé que ces mutations engendrent soit un canal non fonctionnel (G1408R et R1623X) ou une perte de fonction suite à une altération des propriétés biophysiques du canal (T220I; P1298L; delF1617 et R1632H). Cette étude soulève certaines interrogations. Par exemple, la prédominance des signes uniquement au niveau atrial alors que l'expression de $Na_v1.5$ a été décelée dans toutes les cellules cardiaques. De même, les mutations caractérisées lors de cette étude ont été déjà rapportées comme responsables d'autres canalopathies. Ces remarques ne font que confirmer la **complexité des mécanismes physiopathologiques liés à ces mutations. Les réponses pourraient être apportées par l'identification des protéines régulatrices de ce canal et leur mécanisme d'action. De plus, la diversité de ces protéines et leur profil d'expression parfois très spécifique peut être la cause de cette différence observée entre les oreillettes et les ventricules.** Finalement, l'implantation d'un pacemaker est sans conteste le traitement de choix dans ce type de syndrome.

II.7.3.2 Les Troubles Progressifs de Conduction Cardiaque ou la Maladie de Lenègre

Responsable de 20% des morts subites, ces troubles de conduction héréditaires progressifs peuvent dans certains cas être la cause de torsades de pointes liées à la bradycardie. Ils se manifestent par une altération de la conduction atrio-ventriculaire, un ralentissement de la vitesse de conduction intra-myocardique et/ou une inexcitabilité atriale (arrêt atrial) (George, Jr., 2005; Wang et al., 2002). Comme dans le SB, les mutations à l'origine de ces troubles entraînent une perte de fonction de $Na_v1.5$. Les mécanismes sont multiples: 1) la protéine canal est correctement traduite, mais elle ne parvient pas à la membrane plasmique (Del1711) (Schott et al., 1999; Herfst et al., 2003); 2) les canaux mutés sont adressés à la membrane plasmique, mais ils ne sont pas fonctionnels (G1406R) (Kyndt et al., 2001) ou leur activité électrophysiologique est défectueuse (G514C et G298S) (Tan et al., 2001; Wang et al., 2002). Les conséquences des troubles progressifs de la conduction sur l'activité cardiaque se compliquent avec l'âge en raison du développement d'une **fibrose cardiaque** (Schott et al., 1999; Probst et al., 2003).

Par ailleurs dans les troubles de conduction progressifs, la transmission est autosomique dominante. Les individus porteurs de la mutation n'ont donc que 50% de leurs canaux fonctionnels. Ce phénotype d'haplo-insuffisance a également été observé notamment dans le SB. En parallèle, il a été rapporté au sein d'une même famille qu'une mutation dans le gène *SCN5A* peut causer soit un SB, soit la maladie de Lenègre (Kyndt et al., 2001).

Cette hétérogénéité du phénotype pourra être attribuée à un effet combiné entre un polymorphisme d'une protéine associée non encore identifiée de $Na_v1.5$ et une mutation dans ce canal.

II.7.3.3 Les Cardiomyopathies Dilatées (CMD)

Dans 40% des cas, les cardiomyopathies dilatées peuvent être familiales. Parmi les patients porteurs de ces mutations, 38% montrent une cardiomyopathie dilatée bien marquée et 27% présentent des signes avant-coureurs d'une CMD (McNair et al., 2004; Olson et al., 2005). Ces mutations peuvent être en rapport avec une activation du canal $Na_v1.5$ muté à des voltages plus positifs entraînant ainsi une réduction de l'excitabilité des myocytes (Groenewegen et al., 2003), des troubles de la conduction, une fibrillation atriale (Laitinen-Forsblom et al., 2006) et enfin une dégénérescence des cellules du myocarde (Frustaci et al., 2005). En revanche, ces résultats sont controversés du fait que la CMD peut être secondaire à une arythmie auriculaire chronique (Groenewegen & Wilde, 2005) ou une cardiomyopathie induite par une tachycardie (Adler & Fuster, 2005).

Récemment, l'équipe de Hesse a rapporté la présence de troubles de conduction cardiaque chez des souris transgéniques présentant un phénotype de cardiomyopathie dilatée sévère et exprimant un répresseur transcriptionnel "Snail". Ces auteurs observent également une diminution significative de l'expression de *SCN5A* chez ces souris (Hesse et al., 2007). Les gènes "Snail" sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de différents gènes tels ceux codant les protéines qui assurent les jonctions cellulaires (Barrallo-Gimeno & Nieto, 2005). L'étude de Hesse est d'une grande importance car elle associe pour la première fois un dysfonctionnement dans *SCN5A* avec la CMD. **Néanmoins, il est primordial d'établir une relation causale directe entre les changements dans l'expression du canal $Na_v1.5$ et la cardiomyopathie dilatée observée dans ce modèle animal.**

II.8 Régulation du Canal Sodique Cardiaque $Na_v1.5$

Dans le cœur humain, **trois variants d'épissage alternatif** pour le canal sodique ont été mis en évidence (**hH1, hH1a et hH1b**). Ces derniers diffèrent dans leur séquence soit par la présence d'un polymorphisme (**H558R**), soit par l'absence d'une glutamine en position 1077 (**Q1077del**) ou la présence simultanée du polymorphisme et de la délétion (**H558R;**

Q1077del). Exprimés dans les cellules HEK293, ces variants présentent un profil d'inactivation plus positif que hH1. De plus, le variant Q1077del montre des courants sodiques de faible amplitude. Cet effet est plus prononcé chez le variant (H558R; Q1077del). Toutefois, cette réduction du courant ionique n'affecte pas l'adressage du canal à la surface membranaire (Makielski et al., 2003). **Cette diversité dans la séquence de ces trois variants du canal sodique cardiaque se reflète dans la variété de leur fonctionnalité dans un système d'expression hétérologue. En conséquence, il serait intéressant de caractériser leur comportement génétique et électrophysiologique tant au niveau physiologique et pathologique.**

Dans cette étude, nous avons utilisé le canal sodique cardiaque hH1 ou Na_v1.5 car il est le plus étudié et le mieux caractérisé.

En effet, ce canal joue un rôle important dans la plasticité cardiaque et dans les phénomènes de remodelage ionique. Ce rôle primordial retentit dans les différentes pathologies cardiaques sévères chez l'homme et dans les phénotypes létaux chez l'animal. Il a été reporté que les embryons de **souris mutantes nulles pour le gène *Scn5a* meurent pendant la mi-gestation** probablement des suites de malformations cardiaques importantes (Papadatos et al., 2002). Tandis que les souris **hétérozygotes *Scn5a*^{+/-}** présentent principalement un **ralentissement de la conduction** atriale, atrio-ventriculaire et intra-ventriculaire ainsi qu'une augmentation de l'inductibilité des arythmies ventriculaires (Papadatos et al., 2002). Parallèlement, Royer *et al* **ont décelé la présence de fibroses dans le myocarde ventriculaire chez les souris hétérozygotes *Scn5a*^{+/-}** (Royer et al., 2005). Ces **fibroses** se produisent de manière **âge-dépendante** et causent une altération des propriétés globales de la conduction cardiaque. Dans certains aspects, ce phénotype mime la **maladie de Lenègre** (Schott et al., 1999). **Ces résultats soulèvent la question de savoir si la fibrose pourrait être la conséquence d'une perte de fonction de Na_v1.5, comme il a été récemment suggéré chez l'homme dans le contexte du syndrome de Brugada (Frustaci et al., 2005; Coronel et al., 2005).**

Vu l'importance fonctionnelle de Na_v1.5 sur l'activité cardiaque, il n'est donc pas surprenant que d'autres protéines soient impliquées directement ou indirectement dans sa régulation et la médiation de ses effets. Nous essayerons de répondre à ces interrogations dans le chapitre suivant.

II.8.1 Les Sous-unités Auxiliaires β

$\text{Na}_v1.5$ est une protéine **hétéromérique** composé d'une **sous-unité α** fonctionnant comme un canal fonctionnel, lors d'expression dans des systèmes hétérologues mais elle est souvent associée à des **protéines auxiliaires β** , appelées aussi sous-unités régulatrices. Quatre sous-unités β ont été décrites dans la littérature, la sous-unité β_1 de 36 kDa et son variant par épissage alternatif (β_{1A}), la β_2 de 33 kDa, la β_3 de 20 kDa et la β_4 de 38 kDa (Isom et al., 1992; Isom et al., 1995; Morgan et al., 2000; Kazen-Gillespie et al., 2000; Yu & Catterall, 2003). Ils sont le produit de 4 gènes différents (*SCN1b-SCN4b*) et leur structure primaire se résume à un court domaine C-terminal intracellulaire, un seul domaine transmembranaire hydrophobe et un large domaine N-terminal extracellulaire.

Les sous-unités β_1 et β_3 présentent une grande homologie dans leur séquences d'acides aminés et sont associées d'une manière non covalente à la sous-unité α , tandis que les sous-unités β_2 et β_4 sont des protéines relativement identiques qui se lient à la sous-unité α par des ponts disulfures. Les études immunohistochimiques dans les cœurs de souris ont démontré la présence de $\text{Na}_v1.5$, la sous-unité β_2 et/ou β_4 dans les disques intercalaires (Maier et al., 2004) alors que les sous-unités β_1 et β_3 sont surtout présentes dans les tubules T ou une fraction de $\text{Na}_v1.5$ a été également détectée (Malhotra et al., 2001). Le rôle des sous-unités β sur les canaux sodiques neuronaux est multiple. Elles régulent les **cinétiques des canaux sodiques neuronaux** et fonctionnent comme des **molécules d'adhérence cellulaire** par l'interaction avec le cytosquelette, la matrice extracellulaire, et d'autres molécules d'adhérence cellulaire telles que: les ankyrines G et B (Isom, 2001). L'impact de ces sous-unités β sur le fonctionnement de $\text{Na}_v1.5$ fait l'objet d'une controverse. Cette disparité dans les résultats obtenus peut s'expliquer par la variabilité des systèmes d'expression cellulaire utilisés. En effet, la co-expression de la sous-unité β_1 avec $\text{Na}_v1.5$, dans les ovocytes de grenouille, entraîne une augmentation de manière concentration dépendante du courant sodique (I_{Na}) sans altérer la cinétiques ou les caractéristiques biophysiques de ce canal (Qu et al., 1995) alors que la co-expression de sous-unité β_3 provoque un déplacement significatif de la courbe d'inactivation de $\text{Na}_v1.5$ (Fahmi et al., 2001). Dans les cellules de mammifères, il a été rapporté que l'expression de la sous-unité β_1 avec $\text{Na}_v1.5$ pourrait: 1) moduler les caractéristiques biophysiques de $\text{Na}_v1.5$ (Malhotra et al., 2001), 2) faciliter l'adressage de ce canal à la membrane des cellules HEK293 (Zimmer et al., 2002) ou 3) augmenter la densité du courant sodique (I_{Na}) sans altérer les

propriétés de fermeture et d'ouverture de $\text{Na}_v1.5$ (Nuss et al., 1995). A l'opposé, d'autres équipes n'ont observé aucun effet de la sous-unité β_1 sur l'activité du canal $\text{Na}_v1.5$ (Yang et al., 1993; Makita et al., 1994).

Récemment, l'importance des sous-unités β dans la régulation de $\text{Na}_v1.5$ a été mise en évidence par la découverte de Medeiros-Domingo *et al* qui ont établi le fondement moléculaire du **syndrome du LQT10** (Lopez-Santiago et al., 2007). Jusqu'à présent, la quasi-totalité des anomalies génétiques prédisposant à des arythmies mortelles impliquaient directement la sous-unité α des canaux ioniques. Mais, l'identification d'une **mutation dans le gène** codant pour *SCN4b* comme une nouvelle cause génétique de **mort subite** a mis en exergue un nouvel élément crucial pour la fonction électrique cardiaque. En effet, l'expression de la **sous-unité β_4 mutée** montre une **augmentation du courant sodique tardif** et une **altération significative de l'inactivation de $\text{Na}_v1.5$** dans les cellules HEK293. D'un autre côté, Lopez-Santiago *et al* ont observé un **allongement de l'intervalle QT** chez les souris portant une mutation nulle sur *SCN1b* similaire à celui des patients atteints du syndrome du LQT. Ces mutations nulles sur le gène *SCN1b* provoquent aussi une augmentation du courant I_{Na} persistant ainsi que l'expression de $\text{Na}_v1.5$ dans les cardiomyocytes (Lopez-Santiago et al., 2007). Ces **résultats constituent une première évidence que des troubles d'inactivation causant le syndrome du LQT peuvent également être provoqués par des mutations dans les protéines associées à $\text{Na}_v1.5$ telle la sous-unité auxiliaires β . Ces études élargissent le spectre génotypique des mutations liées aux canalopathies et fournissent une nouvelle perspective dans la base moléculaire du fonctionnement de $\text{Na}_v1.5$ dans le cœur humain.**

Dans la présente thèse, l'étude électrophysiologique de $\text{Na}_v1.5$ a été réalisée en présence de la sous-unité auxiliaire β_1 car c'est la sous-unité la mieux caractérisée aussi bien sur le plan cellulaire que biophysique.

II.8.2 Les Protéines Kinases et Phosphatases

II.8.2.1 La Protéine Kinase AMP cyclique (AMPC) Dépendante (PKA)

A date, les effets de la protéine kinase (AMPC) dépendante (**PKA**) sur l'inactivation de $\text{Na}_v1.5$ sont les mieux documentés (Frohnwieser et al., 1997). Généralement, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques déclenche, par l'intermédiaire de boucles de rétrocontrôle impliquant la PKA, la phosphorylation de $\text{Na}_v1.5$. Ce dernier possède au moins 13 sites de phosphorylation par la PKA, localisés principalement dans l'interdomaine I-II (Zhou et al.,

2002). L'**activation de la PKA** induit une augmentation rapide du courant sodique (I_{Na}) en fonction du temps alors que les propriétés biophysiques de ce canal ne semblent pas être affectées (Baba et al., 2004; Zhou et al., 2000). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans les ovocytes de *Xenopus laevis* où la PKA augmente le courant sodique généré par $Na_v1.5$ (Schreibmayer et al., 1994; Frohnwieser et al., 1995; Frohnwieser et al., 1997). Cette augmentation du courant a été attribuée à un accroissement du nombre des canaux sodiques à la surface membranaire (Yarbrough et al., 2002). Cette hypothèse fut appuyée par les résultats de Hallaq *et al* qui ont démontré une implication directe de la PKA dans l'adressage de $Na_v1.5$ à la membrane des cellules HEK293. Ces auteurs suggèrent l'existence de multiples pools intracellulaires de stockage de la "protéine canal" qui permettent ainsi sa mobilisation suite à un stimulus physiologique (Hallaq et al., 2006). En d'autre terme, l'activation de la PKA résulte en une redistribution dans la membrane plasmique de $Na_v1.5$ présent dans les différents compartiments sous membranaire. Cette hypothèse est basée sur les observations de Shibata. En effet, cette étude a révélé l'existence d'**un pool de $Na_v1.5$ dans les vésicules cavéolaires** dans lesquelles les canaux sodiques ne sont pas en contact avec la partie extracellulaire du myocyte. Une **stimulation β -adrénergique** consécutive à l'activation de la protéine G_{α} induit **l'ouverture de ces vésicules** entraînant ainsi une **augmentation de $Na_v1.5$ à la surface membranaire** (Shibata et al., 2006). **Quoique ces résultats soient très prometteurs, les aspects moléculaires du modèle d'adressage dépendant de la PKA aussi bien que les effets de la stimulation β -adrénergique dans la modulation du courant sodique demeurent largement inconnu. D'autres études sont nécessaires afin d'interpréter la pertinence physiologique de ces phénomènes.**

II.8.2.2 La Protéine Kinase C (PKC)

De nombreuses observations physiologiques ont néanmoins révélé la PKC comme un modulateur potentiel de l'activité de $Na_v1.5$. L'activation de la PKC est dépendante de la production de diacylglycérol (DAG) à l'issue d'une stimulation β -adrénergique. Cette protéine kinase est également activée par la phosphosérine, l'oléoyl-2-acétyl-sn-glycérol et les esters de phorbol. En effet, Qu *et al* ont montré que l'activation de PKC en présence de (10 μ M) d'oléoyl-2-acétyl-sn-glycérol mène à une diminution de 33% du courant sodique (Qu et al., 1994). Cette réduction du pic de courant a été partiellement liée à un déplacement de la courbe d'inactivation vers des valeurs hyperpolarisantes. L'activation de

la PKC entraîne également une réduction de l'ouverture du canal sodique unitaire sans affecter sérieusement sa conductibilité (Murray et al., 1997). Par ailleurs les mécanismes susceptibles d'expliquer ces effets de la PKC sur la réduction de l'activité de $Na_v1.5$ ont fait l'objet de l'étude de Shin et Murray. Ces derniers ont fourni l'évidence que la PKC module le canal sodique cardiaque humain par au moins deux mécanismes: le premier semblable à celui observé dans les canaux neuronaux de rat et impliquant un site putatif conservé de la PKC (**sérine 1503**) dans l'**interdomaine III-IV**. Ce deuxième mécanisme consiste en une internalisation de $Na_v1.5$, plutôt qu'une modulation directe du fonctionnement de ce dernier (Shin & Murray, 2001). **Néanmoins, des expériences supplémentaires seront cependant nécessaires afin d'expliquer les mécanismes cellulaires et moléculaires à travers lesquels la phosphorylation de $Na_v1.5$ par la PKC induit son internalisation.**

II.8.2.3 La Protéine Tyrosine Kinase p59 Fyn (Fyn)

La protéine tyrosine kinase Fyn appartient à la famille de tyrosine Src. Ces protéines sont connues pour être de puissants modulateurs des canaux ioniques (Siegelbaum, 1994). L'expression de la protéine **Fyn** dans les cellules HEK293 provoque un **déplacement** de -10 mV de la courbe d'**inactivation de $Na_v1.5$** alors que la mutation **Y1495** dans la **boucle intracellulaire III-IV de $Na_v1.5$** abolit l'**effet de la Fyn** sur l'**inactivation** de ce canal (Ahern et al., 2005). Ainsi, ces résultats montrent que la boucle III-IV est un substrat de Fyn *in vitro* et que l'acide aminé Y1495 compris dans cette boucle intracellulaire est son site de phosphorylation préférentiel. Cependant, le mécanisme d'action de cette interaction est inconnu et ces auteurs n'excluent pas l'implication d'autres éléments intermédiaires vu que **Fyn** a un effet opposé sur les autres isoformes de **$Na_v1.5$** . Dans les cardiomyocytes, les protéines tyrosine kinases Src et $Na_v1.5$ sont situés dans les disques intercalaires à proximité des jonctions adhérentes. D'où, la phosphorylation de $Na_v1.5$ par les protéines tyrosine kinases Src pourrait jouer un rôle dans la propagation du potentiel d'action cardiaque à travers le myocarde. D'autre part, l'activation des kinases du type **Src** est impliquée dans bien d'autres phénomènes que le **couplage jonctionnel**, et pouvant être impliqués dans la modulation de la propagation du PA (Toyofuku et al., 2001). **En conclusion, la pertinence physiologique de la modulation de $Na_v1.5$ par les kinases de la famille de Src reste à approfondir.**

II.8.2.4 Les Protéines Tyrosine Phosphatases (PTPH1)

Les PTPH jouent un rôle principal dans la régulation des niveaux de phosphorylation des tyrosines et dans la signalisation cellulaire. La protéine PTPH1 a été identifiée comme un nouveau partenaire de Na_v1.5. Elle se lie au motif **PDZ du domaine C-terminal de Na_v1.5**. L'association PTPH1/Na_v1.5 **déplace** la courbe d'**inactivation** vers des potentiels plus négatifs alors que la PTPH1 mutée (n'ayant plus d'activité catalytique) a un effet opposé sur ce canal (Jespersen et al., 2006). Ces résultats laissent supposer que la stabilité de l'état d'inactivation de Na_v1.5 est régulée par les niveaux de phosphorylation de ces résidus tyrosine par la PTPH1. Néanmoins, le rôle précis de la phosphorylation de Na_v1.5 sur ces résidus tyrosine dans les conditions physiologiques ou physiopathologiques reste à établir.

II.8.3 La Calmoduline (CaM)

La calmoduline est une protéine ubiquitaire, distribuée dans l'ensemble du cytosol et dans le noyau et agit comme senseur de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire. Cette protéine est organisée en deux lobes connectés par une hélice flexible et capable de fixer 4 ions Ca²⁺. La fixation de ces ions entraîne un allongement progressif de la structure tertiaire de la CaM, ce qui dévoile les domaines hydrophobes permettant l'attachement de ses partenaires de signalisation.

Les canaux ioniques utilisent la calmoduline comme leur partenaire constitutif ou passager (Saimi & Kung, 2002; Saimi & Kung, 2002). En effet, Na_v1.5 exhibe dans sa région **C-terminale** une séquence consensus conservée **IQxxxRxxxxR** où IQ est le motif qui lie la CaM, R= arginine, et X = tout acide aminé qui est impliquée dans la liaison à la calmoduline (Kim et al., 2004; Tan et al., 2002; Deschênes et al., 2002). Bien que cette interaction soit bien décrite dans la littérature, la modulation de l'activité de Na_v1.5 par la calmoduline fait encore l'objet de controverse. Par exemple, Deschênes *et al* ont rapporté que la CaM n'a aucun effet sur les propriétés biophysiques de Na_v1.5 contrairement à la calmoduline kinase II dont l'inhibition cause un déplacement de la courbe d'inactivation vers des valeurs dépolarisées et accélère la récupération du canal de l'inactivation rapide (Deschênes et al., 2002).

D'un autre côté, l'équipe de Tan suggère que la **CaM favorise l'entrée de Na_v1.5** dans un **état inactivé lent** (Tan et al., 2002). Fait intéressant, une mutation naturelle (**A1924T**) située dans le **motif IQ** de **Na_v1.5** élimine l'effet de la CaM sur ce canal. Par ailleurs,

Wingo *et al* se sont intéressés à l'étude de l'impact du complexe CaM/Ca²⁺ sur l'activité de Na_v1.5. Soulignant le rôle prépondérant du Ca²⁺ dans la régulation du couplage excitation-contraction du muscle cardiaque (Maier & Bers, 2002), ces auteurs suggèrent une voie alternative de régulation de Na_v1.5 par le Ca²⁺. Cette voie serait déclenchée par la fixation du Ca²⁺ aux motifs EF-hand présents dans la région C-terminale de Na_v1.5 (Wingo et al., 2004). Cette hypothèse fut rapidement écartée par les travaux de Kim *et al* qui démontrent clairement l'absence d'une telle liaison et suggèrent que le Ca²⁺ s'associe à Na_v1.5 par le biais de la CaM (Kim et al., 2004). Les auteurs de ces travaux pensent que la fixation de la CaM au motif IQ de Na_v1.5 pourrait également moduler l'interaction entre la porte d'inactivation (**interdomaine III-IV**) et la région **C-terminale de Na_v1.5**. Cette interaction semble **stabiliser l'état inactivé et non conducteur du canal** (Motoike et al., 2004).

L'ensemble de ces observations soulève la possibilité que la CaM et l'interdomaine III-IV peuvent se concurrencer pour des motifs de liaison communs ou que leur liaison peut être couplée par des interactions allostériques médiées par le domaine C-terminal entraînant ainsi la modulation de l'inactivation du canal. Sachant que toute surcharge intracellulaire en Ca²⁺ peut être à l'origine d'arythmies cardiaques, il serait très intéressant de décrypter l'impact physiologique de ces interactions afin d'élucider un rôle potentiel des ions Ca²⁺ dans la régulation de Na_v1.5.

II.8.4 Les Protéines G

Il est bien établi que les protéines G et particulièrement la protéine G α sont impliquées dans la régulation des canaux ioniques par deux voies différentes (Breitwieser, 1991; Hille, 1992). La première implique les seconds messagers incluant les niveaux intracellulaires de Ca²⁺, les nucléotides cycliques et le diacylglycérol. La seconde est indépendante des seconds messagers et est impliquée dans la modulation des canaux sodiques, potassiques et calciques (Kurachi, 1994; Manavalan et al., 1995; Schreibmayer et al., 1996). De plus, il a été démontré que la présence d'un peptide de 16 acides aminés situé à proximité de la région N-terminale de G α est suffisante pour moduler l'activité du canal sodique cardiaque Na_v1.5 (Matsuda et al., 1992). Cependant, la région d'interaction de G α avec ce canal et le mécanisme par lequel elle modulerait son activité restent à préciser. Plus de détails à ce sujet ont été apporté par l'étude de Lu *et al*. Ces derniers ont observé que l'activité des **canaux sodiques** dans les **myocytes** ventriculaires de rat est directement régulée par la **G α** . Cette régulation entraîne une **augmentation du courant sodique** suite à un

accroissement du nombre de canaux sodiques fonctionnels à la surface membranaire (Lu et al., 1999).

II.8.5 L'Ubiquitine-Protéine Ligase de Type Nedd 4

L'ubiquitine est une petite protéine présente dans toutes les cellules des eucaryotes. Sa fonction principale est de marquer d'autres protéines en vue de leur dégradation. Ce marquage se fait par une liaison covalente de l'ubiquitine (Ub) par un lien isopeptidique à un résidu lysine du substrat. Cette réaction fait intervenir 3 types d'enzymes, appelées: E1, E2 et E3. E1 (ubiquitin activating enzyme) active l'Ub en formant avec elle un thiol-ester, et la transfère à E2 (ubiquitin-carrier protein) qui également lie l'Ub par un thiol-ester. E2 à son tour va transporter l'Ub sur le substrat en s'associant avec E3 (ubiquitin-protein ligase). Cette réaction de conjugaison de l'Ub se répète plusieurs fois, l'Ub étant conjuguée à elle-même, ce qui se traduit par l'accumulation sur le substrat d'une véritable chaîne d'Ub qui sert de signal de protéolyse.

L'ubiquitination a été récemment reconnue comme une voie de signalisation pour la régulation du trafic cellulaire et l'internalisation des protéines transmembranaires ou leur transport vers des voies de dégradations (Hicke & Dunn, 2003). Dans ce processus, les ubiquitines-protéines ligases du type Nedd4, jouent un rôle important dans la reconnaissance de protéines cibles qui contiennent une séquence consensus PPxY, PY est le motif liant la Nedd4 et X = tout acide aminé), qui peut être reconnu par la Nedd4 (Rotin et al., 2000). La protéine Nedd4 (précurseur neuronal 4 exprimé dans les cellules et réprimé au cours du développement) a deux ou quatre domaines WW (Staub et al., 1996) qui lient la séquence consensus PPxY avec le motif PY (Figure II.12). De tels motifs ont été trouvés dans la partie C-terminale intracellulaire de la plupart des canaux sodiques dépendants du voltage, y compris Na_v1.5 (Abriel & Kass, 2005). En effet, il a été démontré que la **Nedd4-2** s'associe directement avec les **motifs PY de la région C-terminale de Na_v1.5** via ses **domaines WW** et catalyse ainsi son **ubiquitination** dans les cellules de mammifères (van Bemmelen et al., 2004). Dans les cellules HEK293, l'interaction Na_v1.5/Nedd4-2 se traduit par une **diminution de la densité membranaire** de Na_v1.5 et une **diminution drastique du courant sodique (I_{Na})** suite à une augmentation du niveau d'**internalisation de ce canal** (Rougier et al., 2005).

Des résultats similaires ont été rapportés dans les ovocytes de *Xenopus leavis* exprimant la Nedd4 (homologue à la Nedd4-2 humaine) et Na_v1.5 (Abriel et al., 2000). De plus, la découverte de fractions de Na_v1.5 ubiquitinylés dans le tissu cardiaque laisse supposer

l'implication de l'ubiquitination dans le turnover de ce canal (van Bemmelen et al., 2004). Sur la base de ces observations, l'hypothèse centrale qui émerge est que la régulation de $Na_v1.5$ par son ubiquitination peut contrôler l'excitabilité des myocytes en modulant la densité du canal à la membrane. Néanmoins, plusieurs questions demeurent sans réponse, en particulier l'identité de Nedd4/Nedd4-like qui contrôle l'activité de $Na_v1.5$ dans le contexte physiologique. Jusqu'à présent, toutes les expériences électrophysiologiques et biochimiques présentent Nedd4 comme le régulateur central. Toute fois, l'expression de cinq autres membres de la famille Nedd4/Nedd4-like dans le cœur laisse supposer leur possible participation dans l'ubiquitination de $Na_v1.5$.

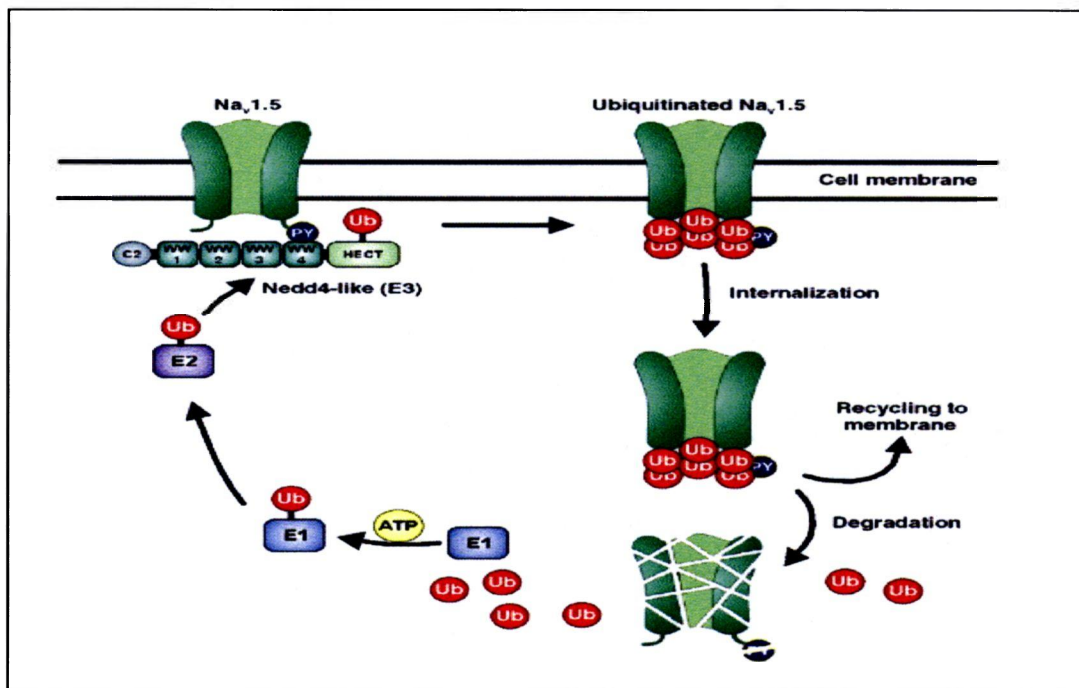


Figure II.12. Représentation d'un modèle hypothétique de la voie d'ubiquitination de $Na_v1.5$. L'ubiquitine est une protéine de 7 kDa qui lie d'une manière covalente les protéines cibles telles que: $Na_v1.5$. Différentes enzymes participent au mécanisme d'ubiquitination selon une action séquentielle: L'enzyme E1 d'activation de l'ubiquitine, l'enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine et l'E3-ubiquitine ligase (Nedd4/Nedd4-like enzymes). L'enzyme Nedd4 reconnaît le motif PY dans la partie C-terminale intracellulaire de $Na_v1.5$ et catalyse ainsi son ubiquitination. L'interaction entre Ub/ $Na_v1.5$ se fait par l'intermédiaire des domaines WW situés sur Nedd4 et le motif PY de $Na_v1.5$. Le fonctionnement de ce modèle se résume à: 1) les enzymes Nedd4/Nedd4-like ubiquitinent $Na_v1.5$, 2) le canal ainsi ubiquitinylé est reconnu par la machinerie d'internalisation, et 3) est transporté vers les voies de dégradation ou de désubiquitination (par des enzymes peu caractérisées). Dans ce dernier cas, le canal est recyclé à la surface membranaire. Image d'après (Abriel & Kass, 2005).

Comme dans le cas de la protéine membranaire (Melan-A) des mélanocytes. En effet, il a été montré que la Melan-A est ubiquitinée par Nedd4-1 alors que sa dégradation est sous le contrôle de la protéine Nedd4/Nedd4-like (Levy et al., 2005). Des approches utilisant de petits ARN interférant (ARN_i), des souris "knock-out" et des tissus spécifiques de souris "knock-out" peuvent fournir des informations qui aideront à éclaircir cette interrogation.

Finalement, l'ubiquitination des canaux sodiques par les protéines **Nedd-4/Nedd4-like** a fait l'objet de plusieurs études mais **le rôle fonctionnel de ces protéines reste toutefois à préciser d'autant que chez l'homme aucune maladie n'a pu être rattachée à des mutations liées au gène codant pour les protéines Nedd-4/Nedd4-like.**

D'où des études d'association chez l'homme ou des ciblage géniques chez la souris sont nécessaires pour répondre à cette question. Il serait également intéressant d'explorer l'impact de l'ubiquitination de Na_v1.5 sur sa compartimentation subcellulaire et sa dégradation dans les pathologies humaines.

II.8.6 Le Complexe Syntrophine-Dystrophine

Les **syntrophines** sont des **protéines adaptatrices** des muscles squelettique et cardiaque. Elles jouent un rôle de lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette sous-jacent. A date, la famille des syntrophines est composée de 5 membres (α , β 1, β 2, γ 1 et γ 2), codés par différents gènes et sont distribuées de façon différentielle dans le muscle (Adams et al., 1993; Albrecht & Froehner, 2002). Ces protéines, issues de gènes différents mais ayant une séquence protéique semblable, possèdent une masse moléculaire de ~59 kDa et partagent 50% d'identité de séquence. La présence dans leur structure d'un domaine **PDZ** retrouvé dans les protéines PSD (Post Synaptic Density protein-95/discs large/zona occludens-1) prédit leur probable implication dans les **interactions avec les canaux ioniques** et autres protéines de signalisation (Ahn et al., 1996; Yang et al., 1995). L'équipe de Gee fut la première à observer une interaction entre Na_v1.5 *in vivo*. A l'aide d'expériences biochimiques, ces auteurs ont purifié à partir de tissus cardiaque et musculaire un **complexe protéique** constitué par le **canal sodique**, la **syntrophine** et la **dystrophine** (Gee et al., 1998). En parallèle, le groupe de Schultz a mis en évidence les **deux motifs consensus** qui sont impliqués dans cette interaction entre les canaux sodiques cardiaques et les syntrophines. Le premier **motif E[S/T]XV** (E=glutamate, S/T=sérine/thréonine, V=valine et X = tout acide aminé) est situé dans la région **C-terminale** de ces **canaux** tandis que le second n'est autre que le **domaine PDZ** des **syntrophines** (Schultz et al., 1998).

Le rôle fonctionnel de la liaison de ces deux protéines demeure cependant encore éluif. Deux importantes études ont traitées ce sujet. Dans la première, des expériences réalisées sur un système d'**ovocytes de *Xenopus*** qui expriment une protéine canal tronquée (Abolition du site d'interaction avec la syntrophine) ont montré un déplacement de -5 mV de la **courbe d'inactivation** et un ralentissement des **cinétiques d'inactivation** rapide (Zhou et al., 2002). Cet effet est perdu une fois que ces deux protéines sont exprimées dans les cellules **HEK293** (Ou et al., 2003). En effet dans cette seconde étude, le groupe de Ou a montré que l'expression de la **syntrophine $\gamma 2$** avec **Na_v1.5** dans les cellules HEK293 a plutôt un effet sur la courbe d'**activation** de ce canal. Les autres paramètres biophysiques ne sont pas affectés. Le rôle des syntrophines demeure donc encore largement incompris. Toutefois, ces résultats discordants peuvent être dus aux différents systèmes d'expression cellulaires utilisés. D'où le recours à d'autres modèles cellulaires plus physiologique peut apporter plus de précision à ce sujet.

Néanmoins, ces travaux n'excluent en aucun cas, le rôle des syntrophines dans la **stabilisation de Na_v1.5 à la surface membranaire** probablement **suite à leur interaction avec la dystrophine (Castello et al., 1996)**. Le mécanisme mis en jeu est mal connu mais le scénario proposé est que la liaison syntrophine/dystrophine va permettre de relier Na_v1.5 au cytosquelette assurant ainsi son immobilisation et son bon fonctionnement à la surface membranaire (Figure II.13). Cette hypothèse est consistante avec des observations récentes réalisées par Gavillet *et al* suggérant une importante **diminution du niveau d'expression de Na_v1.5** dans les **lysats ventriculaires** de souris déficientes pour la dystrophine (**mdx^{5cv}**). Cette réduction de la "protéine canal" est accompagnée d'une baisse de 29% du courant sodique et des troubles de conduction (Gavillet et al., 2006). Les mécanismes détaillés par lesquels l'absence de la dystrophine réduit l'expression de la protéine Na_v1.5 sans altérer son niveau d'ARNm restent toute fois à explorer. De même, une diminution de l'expression de la syntrophine a également été observée chez ces souris mdx^{5cv}.

Enfin, le rôle émergent de la dystrophine dans la modulation de l'activité de Na_v1.5 pourrait ainsi être relié au fait que la dystrophine n'est exprimée que dans les membranes latérales de cardiomyocytes (Stveneson et al., 2005; Kaprielian et al., 2000) où une fraction de Na_v1.5 est également présente (Maier et al., 2004). Il serait ainsi très intéressant d'évaluer les conséquences de l'absence de la dystrophine de ces régions sur l'expression de Na_v1.5 ainsi que celle de ses partenaires spécifiques, comme par exemple la syntrophine

et/ou l' α -actinine-2. Ces résultats pourraient en outre se révéler très éclairants concernant le rôle de $\text{Na}_v1.5$ dans les disques intercalaires des cardiomyocytes. En effet, une importante **diminution de la densité du courant sodique** consécutive à une **réduction significative du marquage de $\text{Na}_v1.5$** a été observée **dans les membranes latérales** de myocytes de chien atteints d'**infarctus du myocarde** (Baba et al., 2005). En revanche, le **marquage de $\text{Na}_v1.5$** présent dans **les disques intercalaires** ne révèle **aucune différence significative**. Ceci laisse supposer que le pool de $\text{Na}_v1.5$ exprimé dans les membranes latérales est le siège de diverses interactions (syntrophine, dystrophine) d'une part et d'autre part est la cible de certaines pathologies (ischémie) comparativement au pool exprimé dans les disques intercalaires des cardiomyocytes.

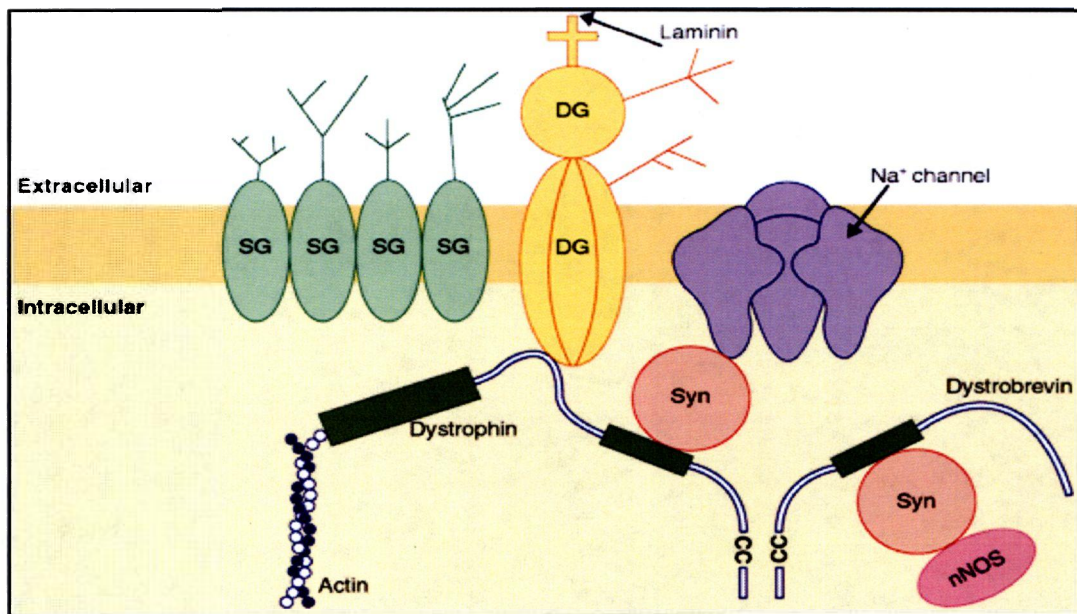


Figure II.13: Schéma du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine. Dans le sarcolemme, la dystrophine, une protéine d'échafaudage a pour fonction de lier les filaments d'actine au complexe glycoprotéique, composé du sarcoglycane (SGs) et du dystroglycane (DG). En retour, le Dystroglycane interagit avec la laminine- $\alpha 2$, un composant de la matrice extracellulaire (MEC) et ainsi la dystrophine contribue à la liaison de la MEC au cytosquelette. De plus, la dystrophine s'associe à la syntrophine (Syn). Cette dernière lie les canaux sodiques et une forme neuronale d'oxyde nitrique synthétase (nNos). D'où la dystrophine intervient également dans la stabilisation des canaux sodiques via son interaction avec la syntrophine. D'après Geoffrey Camirand, inspiré de (Straub et al. 1997).

Il faut noter également que des mutations dans le gène de la dystrophine sont à l'origine de maladies congénitales chez l'être humain telles que: la dystrophie musculaire de Duchenne, la dystrophie musculaire de Becker et les cardiomyopathies liées au chromosome X (Townsend et al., 2007). Ces pathologies se manifestent par des troubles de conduction cardiaque, une altération de la repolarisation et un arrêt cardiaque (Finsterer et Stöllberger 2003). **Cependant, les mécanismes moléculaires restent encore à éclaircir d'autant que la dystrophine forme un important complexe multimérique avec $Na_v1.5$ et la syntrophine. Le rôle fonctionnel de ce complexe dans les cardiomyocytes et dans les maladies cardiaques telles que les dystrophies musculaires n'a pas été encore exploré. Nous pouvons spéculer que ce complexe est important pour l'ancrage de $Na_v1.5$ à la membrane des cardiomyocytes et dans la stabilité et l'intégrité du muscle cardiaque au cours du couplage contraction-relaxation.**

II.8.7 Les Ankyrines

Les ankyrines ont été observée pour la première fois dans les érythrocytes mais elles sont également exprimées dans le cerveau, le muscle squelettique et le cœur. Les **ankyrines** forment un **complexe** avec deux **protéines d'adhérence**: la neurofascine et la NrCam (NgCAM related cell adhesion molecule). Une des fonctions principales des ankyrines serait de stabiliser à la membrane les canaux sodiques dépendants du voltage en les couplant avec des molécules d'adhésion (Bennett & Baines, 2001). Chez les mammifères, trois différents gènes (*ANK1*, *ANK2* et *ANK3*) encodent respectivement pour trois isoformes: ankyrines G, B, et R. Seules les **ankyrines G et B** sont impliquées dans la **régulation de $Na_v1.5$** .

II.8.7.1 L'Ankyrine G

L'ankyrine G est une protéine de 190 kDa et est exprimée à haut niveau dans de très nombreux tissus tels que le cerveau, le muscle et le cœur. L'**ankyrine G** s'associe directement à la **boucle cytoplasmique II-III** de $Na_v1.5$ et particulièrement à la séquence (**VPIAVAESD**) dans les systèmes hétérologues (Lemaillet et al., 2003). En plus de sa fonction principale comme protéine adaptatrice, **l'ankyrine G peut faciliter l'adressage de $Na_v1.5$ à la membrane des cardiomyocytes**. Récemment, il a été identifié qu'une **mutation (E1053K)** dans cette séquence de liaison est associée au **syndrome de Brugada** (Mohler et al., 2004a). Cette mutation **empêche le canal $Na_v1.5$ à lier l'ankyrine G** et **affecte ainsi l'expression du canal $Na_v1.5$ à la surface membrane des cardiomyocytes**

(Mohler et al., 2004a). Toute fois, le rôle exact de l'ankyrine G dans l'adressage du canal $\text{Na}_v1.5$ à la membrane des cardiomyocytes reste à approfondir.

II.8.7.2 L'Ankyrine B

L'ankyrine B, protéine de 220 kDa, est potentiellement impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires et est considérée comme une **protéine adaptatrice** qui relie les protéines membranaires au cytosquelette. L'ankyrine B est composée de trois domaines distincts: un domaine N-terminal constitué de 22 répétitions d'une séquence de 33 acides aminés appelée ankyrine, un domaine central hautement conservé riche en domaine liant la spectrine et un domaine C-terminal variable. Cette structure singulière de l'ankyrine B lui confère la capacité d'interagir avec de nombreuses partenaires y compris celles qui interviennent dans le processus d'homéostasie ionique cardiaque comme les canaux sodiques dépendants du voltage, la pompe Na^+/K^+ -ATPase, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et le récepteur à la ryanodine (Mohler et al., 2002; Bennett & Baines, 2001). L'importance fonctionnelle de l'ankyrine B a été révélée par la découverte d'une **mutation** dans le **gène ANK2** associée à une **forme du QT long congénitale (LQT4)** chez une famille française. Cette mutation engendre des **arythmies cardiaques** et peut mener à une **mort subite**. Par ailleurs, cette équipe a observé chez des **souris hétérozygotes** invalidées pour un seul des allèles codant pour l'**ankyrine B** (*Ankyrine B^{+/-}*) un **phénotype** semblable à celui observé chez les **sujets** atteints du LQT4 (Mohler et al., 2003). Cependant, contrairement à leur étude précédente, ces auteurs ont également identifié d'autres **mutations "perte de fonction" de l'ankyrine B** entraînant un tableau clinique différent des syndromes du QT long. En effet, ils ont noté chez ces patients des troubles cardiaques de sévérité variable avec **un intervalle QT prolongé qui n'est pas une caractéristique constante** (Mohler et al., 2004b). **Le rôle putatif de l'ankyrine B dans la régulation de $\text{Na}_v1.5$ est toujours à l'étude. Jusqu'à présent, il n'y a aucune donnée rapportant une interaction directe entre l'ankyrine B et $\text{Na}_v1.5$. De plus, l'expression et la localisation de $\text{Na}_v1.5$ dans les cardiomyocytes de souris *Ankyrine B^{+/-}* n'est pas altérée comparativement aux souris sauvages** (Mohler et al., 2003; Mohler et al., 2004b).

A l'inverse, l'équipe de Chauhan a observé des courants Na^+ anormaux, dont la **densité est diminuée** et l'**inactivation altérée** dans les cardiomyocytes de **souris nouveau-nées ankyrine B^{-/-}** (Chauhan et al., 2000). Ces résultats corroborent le phénotype observé dans le syndrome du **QT long de type 3**. En effet, il a été noté autant chez la souris *ankyrine B^{-/-}*

que chez l'humain, un **ralentissement de l'inactivation du courant sodique** et un **courant persistant** entraînant ainsi **l'allongement de l'intervalle QT**. Si ces études répondent à plusieurs questions, elles en soulèvent également d'autres. Ainsi, **l'allongement de l'intervalle QT observé aussi bien chez la famille française (Mohler et al., 2003) que chez les individus porteurs d'une mutation "perte de fonction" de l'ankyrine B (Mohler et al., 2004b) ne peut être attribué simplement à une accumulation intracellulaire de Ca^{2+} liée à une défaillance de la pompe Na^+/K^+ -ATPase**. D'où la possibilité que **l'arythmie décelée dans le syndrome du QTL4 soit liée à une altération du courant sodique** comme il a été observé dans le cas des cardiomyocytes de souris *ankyrine B^{-/-}* (Chauhan et al., 2000). Par conséquent, il ne faut pas exclure le fait qu'une déficience du gène codant pour l'ankyrine B peut affecter les canaux sodiques cardiaques.

II.9 Le Facteur de Croissance Homologue du Fibroblaste (FHF1B)

FHF1B est un nouveau membre de la famille des **facteurs de croissance du fibroblaste**. Il est exprimé de façon ubiquitaire dans le cytoplasme de toutes les cellules (Liu et al., 2001). Des travaux ont révélé l'implication de FHF1B dans des interactions avec les canaux sodiques dépendants du voltage. **FHF1B** se fixe à la région **C-terminale des canaux sodiques** et module leur activité. En effet, la co-expression de FHF1B avec **Na_v1.5** dans les cellules HEK293 **déplace la courbe d'inactivation** vers des **valeurs plus hyperpolarisées** sans affecter les autres paramètres biophysiques de ce canal (Liu et al., 2001; Liu et al., 2003). Cet effet de FHF1B est fortement atténué dans les canaux sodiques cardiaques ayant la mutation **D1790G**, associée au **syndrome LQT3** (Wehrens et al., 2000). En effet, cette mutation altère la capacité d'interaction de FHF1B avec **Na_v1.5** et abolit son effet sur ce canal. A la lumière de ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que le **FHF1B** pourrait agir comme **une protéine d'échafaudage** en reliant les **protéines kinases aux canaux sodiques**. Cependant, il reste à définir le rôle exact de cette protéine dans le fonctionnement et la régulation de **Na_v1.5**. De plus, il serait intéressant d'investiguer si **l'interaction FHF1B/Na_v1.5 est dépendante du Ca^{2+} vu que le FHF1B possède un motif (EF-hands) susceptible de lier directement le Ca^{2+}** (Wingo et al., 2004).

II.10 La Protéine 14-3-3

Les protéines **14-3-3** sont des protéines ubiquistes et hautement conservées chez les eucaryotes. Elles sont présentes sous forme d'homo ou d'hétérodimères. Les nombres qui composent leur nom "14-3-3" font référence au numéro de fraction issue d'une chromatographie sur DEAE cellulose et à une position de migration après séparation ultérieure par électrophorèse sur gel d'amidon. Comme les protéines 14-3-3 existent sous forme de dimères, elles peuvent donc lier simultanément deux partenaires différents ou identiques, ou interagir avec deux domaines distincts d'une même protéine. Les protéines 14-3-3 interagissent avec une grande variété de protéines chez les cellules eucaryotes et sont impliquées dans la **régulation de certaines voies de signalisation cellulaire** ainsi que le **fonctionnement de certains canaux ioniques**. Une interaction entre la protéine 14-3-3 et le canal $\text{Na}_v1.5$ a été révélée par la méthode du double hybride chez la levure (Allouis et al., 2006). En effet, cette protéine se fixe à la **boucle cytoplasmique I-II de $\text{Na}_v1.5$** et induit un **déplacement de sa courbe d'inactivation vers des valeurs plus négatives** d'une part et d'autre part un **retard dans la récupération de l'inactivation**. De plus, la co-localisation de ces deux protéines au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes témoigne de l'importance de leur rôle dans l'activité cardiaque et spécialement dans la transmission du potentiel d'action.

En conclusion, cette revue de la littérature ne se veut pas exhaustive mais fournit une image préliminaire et inachevée sur les connaissances acquises à travers les années au sujet des partenaires protéiques du canal sodique cardiaque ($\text{Na}_v1.5$). Elle permet de mieux comprendre certains mécanismes qui font appels à ces protéines régulatrices dans le tissu cardiaque (Figure II.14). De plus, ces développements montrent la complexité des interactions régissant le fonctionnement de $\text{Na}_v1.5$ d'une part et d'autre part ouvrent des possibilités incomparables pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant l'ambiguïté des arythmies cardiaques puisqu'il a été démontré que des mutations génétiques dans le site d'interaction (ankyrine G) ou dans les protéines associées (sous-unité β_4) peuvent altérer sérieusement l'activité de $\text{Na}_v1.5$. Ces travaux ouvrent par conséquent la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des **canalopathies**.

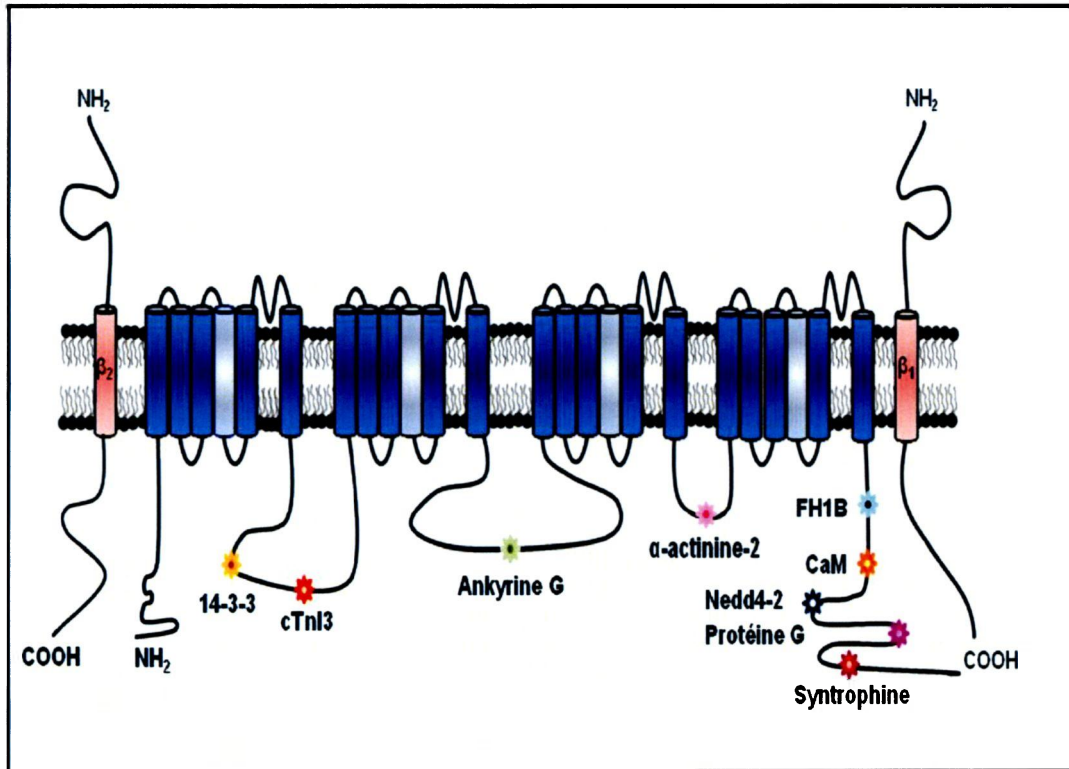


Figure II.14: Représentation schématique des partenaires connus de Na_v1.5. Les sous-unités β₁ et β₂ sont représentées de part et d'autre de la sous-unité α de Na_v1.5 (le domaine extracellulaire de la sous-unité β₁ interagit avec la loupe P de la sous-unité α alors que son domaine intracellulaire lie la région C-terminale de la sous-unité α). En dehors de ces sous-unités régulatrices du canal, d'autres protéines associées au canal Na_v1.5 ont été récemment identifiées. Il s'agit de l'ankyrine G, dont une mutation dans la région de liaison au canal cause le syndrome de Brugada chez l'homme, les syntrophines, la protéine 14-3-3, le facteur homologue de croissance (FHF1B), la calmoduline (CaM), et l'ubiquitine ligase (Nedd-4 like). Notre étude nous a permis l'enrichissement de cette liste inachevée des "protéines canalaires" par deux nouveaux éléments, à savoir l'α-actinine-2 et la troponine I cardiaque.

CHAPITRE III

CELL MEMBRANE EXPRESSION OF CARDIAC SODIUM CHANNEL Na_v1.5 IS REGULATED BY α - ACTININ-2 INTERACTIONS

Note: Ce chapitre, présenté sous la forme d'un manuscrit prêt à la soumission pour une revue scientifique, résume une partie des travaux effectués dans le cadre de mon projet de doctorat. Plus spécifiquement, ce travail contient des expériences visant à atteindre mes objectifs de travail décrits dans le chapitre 1. Étant donné que ma contribution dans la conception (approches expérimentales), la réalisation (constructions plasmidiques et manipulations) et la rédaction (incluant le montage des figures) de ce travail est majoritaire, mon nom apparaît comme premier auteur sur le manuscrit. Toutefois, il est important de souligner l'apport très apprécié de mon collègue de laboratoire, M^r Hai Huang dans la réalisation des expériences de patch clamp.

Nous tenons également à remercier les Drs. Alain Beggs et Behzad Moghadaszadeh de l'université de Harvard pour leur contribution dans la partie d'immunohistochimie.

III.1 Résumé

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires essentielles à la genèse et la conduction du potentiel d'action dans les cellules excitables. Ils interviennent également dans la signalisation cellulaire, la prolifération, le transport transépithélial, la sécrétion et l'adhésion cellulaire. Lors de cette étude, notre intérêt s'est porté sur le canal sodique cardiaque humain ($\text{Na}_v1.5$) dont le rôle crucial dans la cinétique électrique des cardiomyocytes a été mis en évidence par l'identification de maladies génétiques associées dans ~20% des cas à une mutation au niveau de son gène (*SCN5A*), comme par exemple le syndrome de Brugada. Pour certaines de ces maladies, les mécanismes pathogénétiques exacts demeurent inconnus vu le faible nombre des sujets symptomatiques d'une part et d'autre part l'absence d'un modèle expérimental approprié. Dernièrement, la piste protéomique tente d'apporter une réponse via l'étude et la compréhension des interactions fonctionnelles existantes entre les divers composants de la cellule ainsi que sur la façon dont ces interactions changent dans les états de maladies. Dans le cadre de cette optique, nous nous sommes intéressés à l'identification de candidats potentiels interagissant avec le canal $\text{Na}_v1.5$. Pour y parvenir à cette fin, plusieurs approches ont été mises en œuvre telles que: le double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la co-immunoprécipitation, l'overlay et l'His-Pull down. L'ensemble de ces techniques nous a permis l'identification d'un nouveau partenaire de $\text{Na}_v1.5$, à savoir l' α -actinine-2. L' α -actinine-2 est une protéine du cytosquelette joue un rôle important dans le pontage et l'ancrage d'une panoplie de protéines. Dans notre présente étude, elle semble lier directement la boucle III-IV de $\text{Na}_v1.5$ comme le démontrent clairement les résultats de la co-immunoprécipitation et d'overlay. De plus, les différentes délétions de la protéine α -actinine-2 ont défini avec précision le domaine d'interaction de cette dernière avec la boucle III-IV. En effet, il en ressort que le domaine spectrine de l' α -actinine-2 est essentiel pour que l'interaction $\text{Na}_v1.5/\alpha$ -actinine-2 ait lieu. Nous avons également observé une co-localisation de ces deux protéines au niveau des tubules T à proximité de la membrane plasmique des cardiomyocytes humains. Sur le plan fonctionnel, l' α -actinine-2 semble augmenter la densité du canal $\text{Na}_v1.5$ et cela suite à une augmentation du nombre de canaux sodiques $\text{Na}_v1.5$ à la surface des cellules comme le montrent clairement nos résultats de patch-clamp et de biotinylation. A la lumière de ces observations, l' α -actinine-2 semble être impliquée dans l'ancrage et la stabilisation à la membrane du canal $\text{Na}_v1.5$ comme il a été récemment rapporté dans le cas des canaux potassiques.

Cell Membrane Expression of Cardiac Sodium Channel Na_v1.5 is Regulated by α -Actinin-2 Interactions

Rahima Ziane*, Hai Huang*, Behzad Moghadaszadeh[#], Alan H. Beggs[#]
Georges Levesque[†] and Mohamed Chahine*[@]

*Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard and Département de médecine,
Université Laval, Québec City, Québec, Canada.

[†]Centre de recherche du CHUL (CHUQ), Unité de Neurosciences, Québec, Canada

[#]Division of Genetics and Program in Genomics, Children's Hospital Boston, Harvard
Medical School, 320 Longwood Avenue, Boston, MA, USA.

Running title: α -Actinin-2 interacts with Na_v1.5

[@]Correspondence to:

Mohamed Chahine, Ph.D.

Le Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard

Local F-6539

2601 chemin de la Canardière

Quebec City, QC, Canada, G1J 2G3

Tel.: (418) 663-5747, ext. 4723

Fax: (418) 663-8756

E-mail: mohamed.chahine@phc.ulaval.ca

III.2 Abstract

Cardiac voltage-gated Na⁺ channels play a critical role in heart excitability and conduction. They are composed of one α -subunit (Na_v1.5) and several auxiliary β -subunits. This complex is thought to interact with several cytoskeleton proteins. In this study, we used yeast two-hybrid screening to identify cardiac Na⁺ channel-associated proteins that might be involved in channel function and expression. We found that α -actinin-2, a major sarcomeric F-actin cross-linking protein, interacts directly with the cytoplasmic III-IV linker of Na_v1.5. The interaction was further demonstrated by both *in vitro* His₆ pull-down and co-immunoprecipitation assays in both tsA201 cells with co-expression of Na_v1.5 and α -actinin-2 and native tissue. Co-expression of α -actinin-2 with Na_v1.5 in tsA201 cells increased sodium current densities. Biotinylation assay revealed that α -actinin-2 increased cell-surface expression of Na_v1.5, which may be the underlying mechanism by which α -actinin-2 increased sodium current densities. Moreover, we demonstrate that the spectrin-like repeats of α -actinin-2 are essential for binding Na_v1.5 III-IV linker. Finally, immunostaining revealed that in human heart, Na_v1.5 and α -actinin-2 co-localized at the Z line and the plasma membrane, indicating that α -actinin-2 in the heart might function as an anchoring protein by connecting Na_v1.5 to the actin cytoskeleton, and that this interaction is crucial for stabilizing Na_v1.5 expression at the cell surface.

III.3 Introduction

Muscular contraction and neuronal firing are physiological responses to voltage-gated ion channel activation in excitable tissues. Regulating the expression and/or function of these channels on the plasma membrane of excitable cells is important for maintaining impulse propagation. Channel dysfunctions cause a wide range of diseases, including cardiac arrhythmia, sudden cardiac death, epilepsy, seizure disorders, paramyotonia congenita, and periodic paralysis (1). These channelopathies are inherited disorders caused by mutations in the genes that encode channel proteins. Voltage-gated Na^+ channels are integral membrane proteins consisting of a single pore-forming α -subunit (~260 kDa) and several auxiliary β -subunits (~30-35 kDa) that modulate channel function. The β_1 and β_2 subunits interact with other proteins and stabilize channel density within the plasma membrane (2). In addition, the β_1 and β_3 subunits might enhance the trafficking efficiency of Na^+ channels in the endoplasmic reticulum (3;4).

Cytoskeleton-associated proteins seem to play a critical role in modulating channel function. For example, adapter proteins such as syntrophin, dystrophin, and ankyrin participate in the targeting and stabilization of skeletal and cardiac Na^+ channels at the cell membrane (5-8). Co-expressing syntrophin γ_2 and $\text{Na}_v1.5$ alters gating kinetics and reduces the availability of Na^+ currents (9). Another adapter protein, ankyrin, plays a critical role in targeting and anchoring Na^+ channels in the membrane (6). The E1053K $\text{Na}_v1.5$ mutation abolishes the interaction between ankyrin-G and $\text{Na}_v1.5$ and reduces the expression of $\text{Na}_v1.5$ on the cell surface, causing Brugada syndrome (6). Binding of fibroblast growth factor homologous factor 1B (FHF1B) to $\text{Na}_v1.5$ causes a hyperpolarizing shift in the steady-state inactivation of the channel, whereas binding to $\text{Na}_v1.9$ might modulate this channel directly or indirectly by recruiting other proteins to the channel complex (10). Other classes of proteins, such as ubiquitin-protein ligase (Nedd4-2) are involved in the ubiquitination of Na^+ channels (11). The regulatory role of Nedd4-2 depends on the presence of the PY motif in Na^+ channels. An annexin II light chain protein facilitates the expression of $\text{Na}_v1.8$ on the plasma membrane (12) while protein 14-3-3 is a cofactor in the regulation of $\text{Na}_v1.5$ Na^+ channel (13).

To gain further insight into the physiological regulation of the $\text{Na}_v1.5$ channel, we sought to identify biochemical partners using the yeast two-hybrid approach. We demonstrated that α -actinin-2 interacts with the cytoplasmic III-IV linker of $\text{Na}_v1.5$. The α -actinins belong to a superfamily of F-actin-crosslinking proteins that includes spectrin and dystrophin. The four

known α -actinin isoforms are encoded by four separate genes. *ACTN2* and *ACTN3* encode sarcomeric striated muscle forms whereas *ACTN1* and *ACTN4* encode more ubiquitously expressed cytoskeletal isoforms (14). All four isoforms are ~100 kDA, rod-shaped molecules that form anti-parallel dimers composed of an N-terminal actin-binding domain, four central spectrin-like repeats and a C-terminal calmodulin-like domain (15). α -Actinins perform a number of important physiological functions, many of which involve binding interactions with other proteins. They link various transmembrane proteins to the actin filament network (16;16-19), they regulate K⁺ channel activity (19-22) and they help to maintain cytoskeleton organization (23). In the present study, we characterized the binding of α -actinin-2 to Na⁺ channels *in vitro* and *in vivo* and showed that this interaction might play an important role in the physiology of these channels.

III.4 Experimental Procedures

III.4.1 Yeast two-hybrid and plasmid constructs

Yeast two-hybrid bait vector was obtained through recombinational GatewayTM cloning technology (Invitrogen). The full-length construct (amino acids 1471-1523) of the cytoplasmic loop between domains DIII and DIV of Na_v1.5 (Na_v1.5 LIII-IV) was amplified by PCR from pcDNA1-Nav1.5. The PCR product was recombined into the pDEST32 vector (Invitrogen) by an LR reaction, resulting in translational fusions between the open reading frame and the GAL4 DNA binding domain.

Na_v1.5 LIII-IV and α -actinin-2 construct (amino acids 1-894) were also expressed as fusion proteins with a GAL4 DNA-binding domain and a GAL4 activation domain into the pGBKT7 and pGADT7 vectors, respectively. (Matchmaker, Clontech). All above constructs were verified by sequencing.

III.4.2 Mammalian expression constructs

The coding segment of human Na_v1.5 (24) was cloned into the *Hind*III and *Xba*I sites of pcDNA1 (Invitrogen). The Na_v1.5 His₆-III-IV linker fusion protein construct and the pcDNA3-V5-Na_v1.5 vector were kindly provided by Dr. C. Ahern (Jefferson Medical College, Philadelphia, PA, USA). Human Na⁺ channel β_1 -subunit and Na_v1.8 channel were constructed in the piRES vector (Invitrogen). The cDNA encoding the calponin hand domain (amino acids 1-86) of human α -actinin-2 were generated by PCR from a pcDNA3- α -actinin-2 vector (a gift from Dr. D. Fedida; University of British Columbia, BC, Canada) and

subcloned into the EcoRI and EcoRV sites of pcDNA3.1 (Invitrogen), in frame with the NH2-terminal Xpress epitope. Fragments encoding truncated forms of α -actinin-2 (pcDNA3- α -actinin-2/SPEC1 [amino acids 1-390], pcDNA3- α -actinin-2/SPEC2 [amino acids 1-505], pcDNA3- α -actinin-2/SPEC3 [amino acids 1-626], and pcDNA3- α -actinin-2/SPEC4 [amino acids 1-739]) were generated by introducing stop codon into specific regions of the α -actinin-2 gene. Constructs of full-length human α -actinin-1, α -actinin-3 and α -actinin-4 were provided by Dr AH. Beggs (14). All constructs were sequenced prior to use.

III.4.3 Yeast two-hybrid screen

The two-hybrid screen was performed in yeast strain MaV203 (MAT α ; *leu2-3,112*; *trp1-901*; *his3 Δ 200*; *ade2-101*; *cyh2R*; *can1R*; *gal4 Δ* ; *gal80 Δ* ; *GAL1::lacZ*; *HIS3_{UAS-GAL1::HIS3@LYS2}*; *SPAL10::URA3*) containing HIS3, LacZ, and URA reporter genes under the control of the GAL4-activating sequences. Briefly, after determining the self-activation and basal expression of the HIS3 reporter gene, >10 million cotransformants of pDEST32/III-IV linker and human adult heart cDNA library (Invitrogen) were screened for interacting proteins by growth on synthetic dropout media lacking tryptophan, leucine histidine (-TLH) and containing 10 mM of 3-amino-1,2,4-triazole. Positive colonies were tested further for induction of the URA reporter gene that allowed growth on synthetic dropout media lacking leucine, tryptophan and uracile, and conferred sensitivity to 5-fluoroorotic acid. Plasmid DNA was rescued from the candidate clones and retransformation assays were performed to verify interactions using the Matchmaker yeast two-hybrid protocol (Clontech). The inserts of positive colonies were identified by sequencing and BLAST searches.

III.4.4 Cell culture and DNA transfection

TsA201, a mammalian cell line derived from human embryonic kidney HEK293 cells by stable transfection with SV40 large T antigen, was grown in high glucose DMEM supplemented with fetal bovine serum (10%), L-glutamine (2 mM), penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (10 mg/ml) (Gibco BRL Life Technologies) in 5% CO₂ humid atmosphere incubator. The tsA201 cells were transfected using the following plasmid composition: 1) pcDNA3-V5-Na_v1.5 & pcDNA3- α -actinin-1; 2) pcDNA3-Na_v1.5 & pcDNA3- α -actinin-2; 3) pcDNA3-V5-Na_v1.5 & pcDNA3- α -actinin-3; 4) pcDNA3-V5-Na_v1.5 & pcDNA3- α -actinin-4; 5) pIRES-Na_v1.8 & pcDNA3- α -actinin-2 (5 μ g for each plasmid) using the calcium phosphate method. For the patch clamp studies, the transfections were performed according to Margolskee *et al.* (25), with a few modifications.

III.4.5 Co-immunoprecipitation assay

Transfected tsA201 cells were lysed in STEN buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1% [v/v] Triton X-100) supplemented with complete mini EDTA-free protease inhibitors (Roche Diagnostics). The lysate was clarified by centrifuging at 15,000 x g for 30 min. Equal volumes of total protein (500 μ l) from post-nuclear supernatants were incubated overnight with polyclonal rabbit anti-III-IV loop (2 μ g; Upstate), monoclonal mouse anti-V5 (2 μ g; Invitrogen), polyclonal rabbit anti-Na_v1.8 (2 μ g; Alomone); polyclonal rabbit anti- α -actinin-2 "4B" (2 μ g; 26) control mouse IgG or control rabbit IgG (2 μ g; Sigma) at 4°C overnight. Next, 40 μ l of a suspension of protein G cross linked to agarose beads (Calbiochem) were added for 4 h. The immune complexes were centrifuged and the pellets were washed 3x with STEN buffer. Samples from the pellets were resuspended in reducing sample buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 10% SDS, 0.1 bromophenol blue and 5% β -mercaptoethanol), boiled for 5 min, and then subjected to SDS-PAGE.

A similar procedure was followed for endogenous co-immunoprecipitation of α -actinin-2 and Na⁺ channel isoforms using mouse skeletal muscle and brain tissues.

III.4.6 Immunoblots

Cell lysates and immunoprecipitated proteins were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (Millipore) in transfer buffer (150 mM glycine, 20 mM Tris-base and 20% methanol) for 2 hours at 4°C. The blots were blocked with TBST for 1 h at room temperature (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% (w/v) nonfat skim milk. The membranes were incubated with the corresponding antibodies: loop III-IV (1:500), Na_v1.8 (1:200), V5 (1:5000), α -actinin-1 "3A3" (1:1,000), α -actinin-2 "4B" (1:20,000), α -actinin-3 "5A3" (1:1,000), α -actinin-4 "6A3" (1:1000) (26), and Xpress (1:5000, invitrogen) for 1 h at room temperature, and then with HRP-goat anti-rabbit or HRP-goat anti-mouse (1:10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratorie) antibody for 1 h at room temperature. Reactive bands were detected using ECL chemiluminescence reagent according to the manufacturer's instructions (Amersham).

III.4.7 Expression and purification of His fusion protein

Recombinant fusion protein, Na_v1.5/His₆-III-IV linker (amino acids 1481-1523) was transformed into XL1-Blue competent cells (Stratagene). Overnight culture was diluted (1:50) into fresh Luria Bertani broth, grown to A₆₀₀= 0.5 and induced with 1 mM isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (Sigma) for 7 h at 37°C. XL1-Blue pellet harboring the Na_v1.5/His₆-III-IV linker was resuspended in 200 mM Tris (pH 8), 300 mM NaCl and 10 mM Imidazole, supplemented with EDTA-free Complete protease inhibitor mixture (Roche Applied Science) and sonicated for 6 x 2 s (27). The bacteria lysate was then centrifuged at 10,000 x g for 30 min and the supernatant was applied to Ni²⁺-NTA columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

III.4.8 His₆-pull-down Assay

For examination of the binding of α-actinin-2 to Na_v1.5/His₆-III-IV linker in vitro, Equal volumes of cells extracts (TsA201 cells transfected with full-length and various truncation of α-actinin-2 constructs) were incubated with either Ni²⁺-NTA beads (negative control) or Ni²⁺-NTA beads preincubated with His-tagged III-IV linker, respectively. The reactions were mixed for 60 min at room temperature and the mixtures were extensively washed with 200 mM Tris (pH 8), 300 mM NaCl and 20 mM Imidazole. Bound proteins were eluted with the same buffer, containing 250 mM imidazole. Finally, the co-precipitated proteins were resolved by 12% SDS-PAGE gel and detected by Western blot using the corresponding antibodies.

III.4.9 Overlay assay

TsA201 cells transiently expressing α-actinin-2 were washed twice with cold PBS and homogenized in STEN buffer. The homogenate was clarified by centrifugation at 15,000 x g for 30 min, and total protein was quantified using the Bradford assay with BSA as the standard. Different concentrations of total protein extracts (15-45 μg) were resolved by SDS-PAGE (10%) and blotted onto PVDF membrane (Millipore). Membranes were blocked in 4% nonfat dry milk in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween-20 (TBST) overnight at 4°C. For, III-IV linker binding, the blot was incubated for 90 min at room temperature with 5 ml of 1μg/ml of purified His₆-III-IV linker fusion protein in 5% milk/TBST buffer. For negative control, membrane was incubated with 5 ml of 1μg/ml of bovine serum albumin (Sigma) in 4% milk/TBST buffer. Following incubation, the membranes were extensively

washed in TBST buffer and exposed to anti-III-IV linker antibody (1:500 in TBST buffer), washed, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:10 000 in TBST buffer).

III.4.10 Biotinylation of cell surface proteins

Cell surface proteins were isolated using the Pinpoint Cell Surface Protein Isolation kit following the manufacturer's protocol (Pierce). Briefly, tsA201 cells transiently transfected with Na_v1.5 channel in the absence, or presence, of α -actinin-2 construct were rinsed twice in ice cold PBS and then incubated with 10 ml of freshly prepared EZ-Link[®] Sulfo-NHS-SS-Biotin solution at 4°C for 30 min with intermittent mixing. The reaction was terminated by the addition of 500 μ l of Quenching Solution, and the cells were washed twice with TBS [25 mM Tris-HCl (pH 7.2) and 150 mM NaCl]. The cells were then lysed in 500 μ l of Lysis Buffer containing protease inhibitors, sonicated, incubated on ice for 30 min, and centrifuged at 10,000 x g for 2 min at 4°C. The clarified supernatant containing the solubilized proteins was incubated with immobilized NeutrAvidin Gel for 1 h at room temperature by end-over-end mixing. Unbound proteins were removed by three washes with TBS containing protease inhibitors. Biotinylated proteins bound to the gel were eluted by incubation with SDS-PAGE Sample Buffer containing 50 mM DTT for 1 h at room temperature and subsequent centrifugation at 1,000 x g for 2 min. The eluted proteins were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes. The membranes were incubated with antibodies against the III-IV linker (1:500), the Na⁺/K⁺ ATPase (1:5000; Santa Cruz Biotechnology) and β -tubulin (1:10000; a gift from Dr. M.W. Klymkowsky, University of Colorado, Boulder, USA). As a control for cell surface biotinylation, we used Na⁺/K⁺-ATPase α 1 subunit as plasma membrane marker.

III.4.11 Na⁺ current recordings

The macroscopic Na currents of transfected tsA201 cells were recorded using the whole-cell configuration of the patch clamp technique as described (Chahine et al., 2004). Briefly, patch electrodes were made from 8161 Corning borosilicate glass and coated with Sylgard (Dow-Corning) to minimize their capacitance. Patch clamp recordings were made using low resistance electrodes (<1M Ω). A routine series resistance compensation using an Axopatch 200 amplifier (Molecular Devices) was performed to values >80% to minimize voltage-clamp errors. Voltage-clamp command pulses were generated by microcomputer using pCLAMP software v8.0 (Molecular Devices). Na currents were filtered at 5 kHz, digitized at

10 kHz, and stored on a microcomputer equipped with an AD converter (Digidata 1300, Molecular Devices). The data were analyzed using a combination of pCLAMP software v9.0 (Molecular Devices), Microsoft Excel, and SigmaPlot for Windows version 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

III.4.12 Immunohistochemistry

The primary antibodies used were rabbit anti- $\text{Na}_v1.5$ (Sigma-Aldrich) raised against a purified peptide (DRLPKSDSEGDGPRALNQLSC) and monoclonal anti-sarcomeric α -actinin (clone EA53) (Sigma-Aldrich). The secondary antibodies used were Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA). A human adult cardiac ventricle autopsy specimen was snap frozen and cut into 10- μm sections, then fixed in methanol. The slides were blocked in 10% fetal bovine serum for 30 min, and then incubated with primary antibodies (anti- $\text{Na}_v1.5$ and anti- α -actinin) at a 1:70 dilution for 2 h at room temperature. After three 5-min washes in PBS, the slides were incubated with secondary antibodies (1:200) for 30 min at room temperature, washed again in PBS, and mounted with Vectashield hardset mounting medium with DAPI (to counterstain nuclei) (Vector laboratories). The immunolabeled cryosections were examined on an LSM 510 META two-photon confocal microscope (Carl Zeiss AG). Argon and helium/neon lasers were used to detect Alexa Fluor 488 and 594, respectively. DAPI was detected by two-photon chameleon laser. Twenty-two serial optical sections of 0.45 μm were produced at 2048x2048 pixel resolution. Images were analyzed and processed using LSM image (Carl Zeiss AG) and Adobe Photoshop CS 2.0 (Adobe Systems).

III.5 Results

III.5.1 α -Actinin-2 protein was confirmed to be associating with the III-IV linker region of $\text{Na}_v1.5$ channel by a yeast two-hybrid system.

The $\text{Na}_v1.5$ intracellular III-IV linker, a critical element in Na^+ channel fast inactivation, (amino acids D1471-D1523) was used as bait in this study (Fig. 1A). Using yeast two-hybrid screening, 4 positive clones were isolated from human heart cDNA library, as listed in Table 1 (supplemental data). Most clones were excluded as false positives as they were derived from mitochondrial DNA or because the encoded peptides were out of frame with the GAL4 activation domain. One of the positive clones encoded a 2-kb cDNA fragment of human cardiac α -actinin-2 (GenBank accession no. NM-001103) was independently identified twice

from the library screening. The isolated α -actinin-2 clone comprises amino acids 388 to 887 that include part of the spectrin-like motif and the Ca^{2+} binding domain. To identify the specificity of the protein interaction, $\text{Na}_v1.5$ III-IV linker and full-length α -actinin-2 were subcloned in fusion to either the Gal-4 DNA binding domain (BD) in pGBKT7 vector or the Gal-4 DNA activating domain (AD) in pGADT7 vector. AH109 yeast cells were then co-transformed with $\text{Na}_v1.5$ III-IV linker and α -actinin-2 constructs. Negative controls were the empty DNA binding domain (pGBK7-empty) and activation domain (pGADT7-empty) vectors. All of the transformants grew on synthetic complete medium lacking leucine and tryptophan (-TL), verifying that they carried the bait and prey plasmids (Fig. 1B, upper panel). In contrast, yeast co-transformed either with positive controls (Fig. 1B, lower panel, lane 1) or the $\text{Na}_v1.5$ III-IV linker and an α -actinin-2 plasmids (Fig. 1B, lower panel, lane 5) grew more efficiently on synthetic complete medium lacking tryptophan, leucine, histidine, and adenine (-TLHA) than yeast co-transformed with either the negative control or the empty vector controls (Fig. 1B, lower panel, lanes 2, 3 and 4). These results established that $\text{Na}_v1.5$ III-IV linker bait or the α -actinin-2 prey are not self-activating (Fig. 1B, lower panel, lanes 3 and 4) and α -actinin-2 and $\text{Na}_v1.5$ III-IV linker physically interact in yeast, leading to the activation of a reporter gene. Additionally, the N-terminus region or cytoplasmic loop I-II of $\text{Na}_v1.5$ failed to interact with α -actinin-2 (Fig. 1, supplemental data).

III.5.2 α -Actinin-2 associates with $\text{Na}_v1.5$ channel in transfected tsA201 cells.

To determine whether the III-IV linker and α -actinin-2 can interact *in cyto*, we examined whether these proteins are prone to co-immunoprecipitate after expression in tsA201 cells. Cells were transfected with full-length human $\text{Na}_v1.5$ (pcDNA3- $\text{Na}_v1.5$) and full-length human α -actinin-2 (pcDNA3-ACTN2) (Fig. 2). Equal amounts of cell lysates were immunoprecipitated using anti III-IV linker antibody (Fig. 2A, right part, lane 1) or rabbit pre-serum IgG control (Fig. 2A, right part, lane 2). The bound proteins were then detected by Western blot analysis using the anti- α -actinin-2 antibody. The anti-III-IV linker antibody, but not the control IgG, precipitated a 100 kDa α -actinin-2 protein. Reciprocal co-immunoprecipitation was also performed. The anti- α -actinin-2 antibody was used for immunoprecipitation, and the anti-III-IV linker antibody was used for Western blot analysis. $\text{Na}_v1.5$ protein was successfully precipitated by the anti- α -actinin-2 antibody (Fig. 2B, right part, lane 1), but not by the rabbit pre-serum negative control (Fig. 2B, right part, lane 2). Additional control samples from tsA201 cells, singly transfected with $\text{Na}_v1.5$ (Fig. 2A, left

part) or α -actinin-2 (Fig. 2B, left part) were used to confirm the identities of the immunoprecipitated bands. α -Actinin-2 did not immunoprecipitate with anti-Nav1.5 antibody (Fig. 2A, left part, IP: anti-III-IV linker) and anti- α -actinin-2 antibody failed to immunoprecipitate Nav1.5 (Fig. 2B, left part, IP: anti- α -actinin-2). Together, these data demonstrate a physical and specific interaction between Nav1.5 and α -actinin-2 in mammalian tsA201 cells. Moreover, taking in consideration the high homology between α -actinin-2 and the other three α -actinin isoforms, we looked if these isoforms can bind Nav1.5 (Fig. 3). Using an experimental setup similar to the one described above, we found that only α -actinin-3 seems to interact with Nav1.5 (Fig. 3A, lane 1) while α -actinin-1 and -4 failed to bind this channel (Figs. 3B and C, lane 1).

III.5.3 α -Actinin-2 binds directly to the III-IV linker region of Nav1.5 channel *in vitro*.

Overlay assays using different amounts of α -actinin-2 cell extract (15-45 μ g) subjected to electrophoresis and transferred onto PVDF membrane revealed a direct interaction between the III-IV linker peptide and α -actinin-2 *in vitro* (Fig 4A, upper panel, lanes 1, 2 and 3). While no III-IV linker binding was detected in the control lane containing untransfected cell (Fig 4A, upper panel, lane 4) or with gel overlay membrane incubated with BSA (negative control) (Fig 4A, middle panel). A small fraction of the cell extract was set aside as positive control (Fig 4A, lower panel). Moreover, the III-IV linker signals increased with increasing amount of α -actinin-2 cell extracts (Fig 4A, middle panel, lanes 2 and 3), indicating that Nav1.5 III-IV linker specifically bound to α -actinin-2 *in vitro*. We further confirmed this interaction by using His pull-down experiment (Fig 4B). For this purpose, tsA201 cell lysates transiently expressing α -actinin-2 were directly mixed with His₆-III-IV linker bound to nickel beads or nickel beads alone (negative control). Western blot analysis against α -actinin-2 revealed α -actinin-2-specific reactive band of ~100 kDa in the crude extracts from tsA201 cells transiently expressing α -actinin-2 (upper panel, lane 2). This band was also observed in pull-down assay when cell lysates were incubated with immobilized His₆-III-IV linker fusion protein (upper and lower panels, lane 3). No signal was detected when cell lysates were incubated with nickel beads alone (upper panel, lane 4). These results demonstrate that Nav1.5 III-IV linker and α -actinin-2 can form a complex *in vitro*.

III.5.4 The Spectrin-like repeats are required for the interaction with the III-IV linker.

α -Actinin-2 has an actin binding domain (CH), 4 spectrin-like repeats (SPEC1-SPEC4), and an EF hand domain (EF). To refine the binding region on α -actinin-2, we carried out a His pull-down assay using tsA201 cells transiently expressing full-length and 5 truncation constructs of α -actinin-2 (Fig 5A). The His₆-III-IV linker was expressed as fusion protein in *E.coli* XL1 Blue, purified, and incubated with full-length and truncated α -actinin-2 protein. As shown in Fig 5B, the full-length α -actinin-2 protein (amino acids 1-887) (lane 1), SPEC4 domain (amino acids 1-739) (lane 2), SPEC3 domain (amino acids 1-626) (lane 3), SPEC2 domain (amino acids 1-505) (lane 4), SPEC1 domain (amino acids 1-390) (lane 5) of α -actinin-2 bound to His₆-III-IV linker fusion protein (right part, upper panel); however, the actin-binding domain (amino acids 1-86) (lane 1) did not (left part, upper panel). As a negative control, nickel beads alone did not pull down either of the α -actinin-2 derivatives polypeptides (right part, lower panel and left part, lane 2). These findings demonstrate that the central rod domain (amino acids 87-739), or at least one spectrin repeat domain (amino acids 87-390) of α -actinin-2 is necessary and essential for the interaction between α -actinin-2 and Na_v1.5 III-IV linker polypeptide.

III.5.5 α -Actinin-2 interacts with others Na⁺ Channel isoforms *in cyto* and *in vivo*.

The III-IV linker region of Na⁺ channels is highly conserved in different tissues and species. The III-IV linker polypeptide of human cardiac sodium channel Na_v1.5 shares the highest sequence identity (93% to 97%) with voltage-gated sodium channel subfamily members (Na_v1.1 to Na_v1.9) (Fig. 2, supplemental data). α -Actinin-2 is expressed in tissues in which other Na⁺ channels are expressed; thus, we performed a co-immunoprecipitation assay to investigate whether the conserved III-IV linker region of other Na⁺ channels interacts with α -actinin-2 (Fig. 6). In this assay, tsA201 cells were transiently transfected either with Na_v1.8 channel and α -actinin-2 or α -actinin-2 alone. Equal amounts of the cell lysate were incubated with anti- α -actinin-2 antibody and the immunoprecipitated complexes were counter-tested with the anti-Na_v1.8 antibody. A single immunoreactive band of ~180 kDa which corresponds to the Na_v1.8 channel was observed in the sample brought down by anti- α -actinin-2 antibody from the tsA201 cells lysate expressing both proteins (Fig 6A, right part, lane 1). Interestingly, this band did not appear in immunoprecipitates from tsA201 cells singly transfected with α -actinin-2 (Fig 6A, left part, IP: anti- α -actinin-2) (negative control).

Reciprocally, α -actinin-2 was co-immunoprecipitated using anti- $\text{Na}_v1.8$ antibody (Fig 6B, right part, lane 1), but not with pre-serum control (Fig 6B, right part, lane 2). In addition, no signal was observed in tsA201 cells expressing $\text{Na}_v1.8$ alone (Fig 6B, left part, IP: anti- $\text{Na}_v1.8$). These data show that α -actinin-2 is specifically associated with $\text{Na}_v1.8$ channel *in cyto*.

Next, we investigated the ability of α -actinin-2 and other Na^+ channels to interact at the endogenous protein level (Fig. 7). Adult mouse skeletal muscle was homogenized in STEN buffer and co-immunoprecipitation experiments were undertaken using an III-IV linker Na^+ channel antibody to immunoprecipitate α -actinin-2 (Fig. 7A, upper panel, lane 1). The bound proteins were then detected by Western blot analysis with an anti- α -actinin-2 antibody. α -Actinin-2 protein was successfully brought down by the anti-III-IV linker antibody, but not by the rabbit pre-serum control (Fig. 7A, middle panel, lanes 1 and 2). As $\text{Na}_v1.4$ is expressed at high levels in adult skeletal muscle (29), the Na^+ channel isoform immunoprecipitated with α -actinin-2 is most likely $\text{Na}_v1.4$. Additionally, α -actinin-2 has been shown to form heterodimers with α -actinin-3 in skeletal muscle (26). So we explored the ability of α -actinin-3 to interact with the skeletal Na^+ channel in native tissue. For this purpose, the blot was stripped and reprobed with anti- α -actinin-3 antibody. As shown in Fig 7A, α -actinin-3 was also immunoprecipitated by the III-IV linker antibody (lower panel, lane 1). Taking together, these results indicate that both α -actinin-2 and α -actinin-3 bind to the skeletal muscle Na^+ channel *in vivo*. Likewise, α -actinin-2 appears to interact with endogenous brain Na^+ channel (Fig. 7B, lane 1) but more experiments with specific antibodies will be necessary to determine which brain isoform is implicated in this interaction. Finally, these findings demonstrate clearly that α -actinin-2 can interact with several Na^+ channel isoforms, and suggest that α -actinin-2 might play a significant role in modulating their functions.

III.5.6 α -Actinin-2 and $\text{Na}_v1.5$ channel co-localize in human cardiac muscle tissue.

To confirm the *in vitro* and *in cyto* data on $\text{Na}_v1.5$ and α -actinin-2 interaction, we used indirect double label immunofluorescence and confocal microscopy to investigate whether these two proteins are colocalized (Fig. 8). A series of confocal optical serial sections at 0.45 μm showed that $\text{Na}_v1.5$ is expressed in a similar striated pattern within the myocytes (Figs. 8A and D) as well as sometimes a dotted pattern outlining similar striations and some diffuse intracellular and surface labeling, whereas the α -actinin-2 staining revealed a striated pattern corresponding to sarcomeric Z-lines as expected (Figs. 8B and E). When the two images were

merged, the striations and dots corresponding to $\text{Na}_v1.5$ staining are seen in yellow (Figs. 8C and F), demonstrating co-localization of $\text{Na}_v1.5$ with α -actinin-2 along certain portions of the Z lines.

III.5.7 α -Actinin-2 has no effect on the biophysical proprieties but has an effect on expression levels of $\text{Na}_v1.5$

The conserved region of the III-IV linker bound to α -actinin-2 *in vitro* and *in vivo*. This led us to look at whether this interaction affected Na^+ channel gating. We co-expressed $\text{Na}_v1.5$ and α -actinin-2 cDNA in tsA201 cells. We used the patch-clamp technique in the whole-cell configuration to determine whether α -actinin-2 increased the current density of the $\text{Na}_v1.5$ channel. Fig. 9A shows the peak current-voltage relationships for I_{Na} in $\text{Na}_v1.5$ -transfected tsA201 cells and in tsA201 co-transfected with $\text{Na}_v1.5$ and α -actinin-2. Currents were activated at about -80 mV for both types of cells and reached a maximum at about -40 mV and -30 mV, respectively. Current densities were estimated by dividing the peak current value by the membrane capacitance. The maximum Na^+ current density in tsA201 cells co-expressing α -actinin-2 was, on average, 68% higher than in the control cells ($p < 0.01$) (Figs 9B and 9C). This increase in Na^+ current density in tsA201 cells co-expressing $\text{Na}_v1.5$ and α -actinin-2 did not result from alterations in voltage-dependence or from steady-state activation or inactivation, as shown in Figs. 10A and 10B, respectively, from a difference in cell surface area: the average cell sizes were not different based on capacitance measurements (16.69 ± 1.7 pF for control cells and 12.94 ± 1.43 pF for tsA201 cells expressing α -actinin-2; difference is not significant; $n=6$ cells for each). This clearly shows that α -actinin-2 increased the current density of the $\text{Na}_v1.5$ channel.

III.5.8 α -Actinin-2 increases the expression of $\text{Na}_v1.5$ channel on the cell surface.

The electrophysiological data presented so far argue for an α -actinin-2-mediated increase in the number of functional $\text{Na}_v1.5$ channels on the cell surface. To determine whether co-expression of α -actinin-2 would impact the expression of $\text{Na}_v1.5$ at cell surface, we performed the surface biotinylation labeling procedure. Briefly, tsA201 cells were transiently transfected with $\text{Na}_v1.5$ channel in the absence or presence of several different concentrations of α -actinin-2 cDNAs (1.5-5.0 μg). Membrane-bound proteins labeled with sulfo-NH-SS-biotin were isolated with streptavidin beads and equal amount of proteins were analysed by Western blotting using the anti-III-IV linker antibody (Fig. 11). Accordingly, the surface

Na_v1.5 amount was found to be much higher in tsA201 cells co-transfected with α -actinin-2 compared with cells expressing Na_v1.5 alone (Cell-surface proteins, first panel). There was, however, no appreciable change in the total Na_v1.5 content in the lysates at all concentrations of α -actinin-2 cDNAs (Whole cell extracts). For control purposes, the blot was stripped and probed with antibodies that recognize the Na⁺/K⁺-ATPase α 1 subunit, which is ubiquitously expressed in cell membranes, and with β -tubulin, a known cytoplasmic protein, to demonstrate surface expression and a lack of intracellular proteins in surface lanes. Under these conditions, the Na⁺/K⁺-ATPase α 1 subunit immunoreactivity confirmed equal loading of the protein samples (Cell-surface proteins, second panel). In contrast, none of the biotin-labelled samples contained β -tubulin, indicating that there was no contamination of the surface exposed protein samples with intracellular proteins (Intracellular proteins). These findings suggest that α -actinin-2 mediated-Na_v1.5 channel plasma membrane expression, which is consistent with the observation that co-expression of α -actinin-2 and Na_v1.5 increased Na⁺ channel density (Fig. 9).

III.6 Discussion

One indication that Na⁺ channels interact with the cytoskeleton is that ankyrin B^(-/-), a family of cytoskeletal "adaptor" proteins, disrupts the cardiomyocyte cytoskeleton and modifies the kinetics of the Na⁺ currents. Biophysical and biochemical data show that the cytoskeleton interacts both directly and indirectly with Na⁺ channels and participates in modulating the gating and anchoring of Na⁺ channels in the plasma membrane (30-32). Here, we used *in vitro* and *in vivo* approaches to demonstrate that the III-IV linker of Na⁺ channels interacts directly with α -actinin-2, and that this interaction regulates the expression of these channels on the cell surface. Furthermore, given that both proteins are found in heart tissue and that an anti-III-IV linker antibody immunoprecipitates α -actinin-2 from lysates of skeletal muscle and brain, it is likely that the Na⁺ channel/ α -actinin-2 interaction is physiologically relevant.

We found that α -actinin-2 binds to the Na_v1.5-III-IV linker and modulates the Na⁺ current density of the channel with no effects on channel steady-state activation or inactivation. The Na_v1.5 channel is predominantly expressed in intercalated disks and T tubules (in heart) and in certain regions of the brain (24;33). Confocal microscopy of indirect immunofluorescence assays for Na_v1.5 in cardiac ventricle revealed a striated, sometimes dotted, staining pattern, consistent with localization at T tubules, with additional diffuse staining within the sarcoplasm and at cell membranes, similar to the distribution reported by Haufe *et al.* (34).

The Na_v1.5-positive striations co-localized with α -actinin-2 positive Z lines, demonstrating a likely site of interaction between Na_v1.5 channels and α -actinin-2 at the regions where T tubules contact Z lines, much as proposed for the similar interactions between SK2 and L-type Ca²⁺ channels (22).

Due to the strong conservation of the III-IV linker among the Na⁺ channel family, our findings show that α -actinin-2 also binds to other members of the voltage-gated sodium channel family (Na_v1.8 and endogenous Na⁺ channels from skeletal muscle tissue and brain). Na_v1.8 is an essential component of small peripheral sensory neurons (DRG), which are believed to play an important role in pain sensation (37). Na_v1.5 and Na_v1.8 share ~97% amino acid identity in the III-IV linker region, and both interact with α -actinin-2. In skeletal muscle, the endogenous Na⁺ channel most likely corresponds to the skeletal sodium channel (Na_v1.4). Two types of sodium channel isoforms are present in skeletal muscle. The Na_v1.4 isoform is expressed at high levels in adult rat skeletal muscle and at low levels in neonatal skeletal muscle, whereas the Na_v1.5 isoform is not observed in adult skeletal muscle, but it is detectable in neonatal skeletal muscle and after denervation of adult muscle (35;36). The effect of the interaction of α -actinin-2 with those Na⁺ channel isoforms has yet to be determined.

α -Actinin-2 belongs to the spectrin family of actin-crosslinking proteins. It is expressed in cardiac and skeletal muscles and in the brain (38;39). These isoforms are involved in multiple cellular functions (16;23;40). α -Actinin-2 has three types of functional domains: two highly conserved calponin-homology domains in the N-terminus that are necessary for actin binding, followed by four spectrin-like repeats making up a central rod domain that is required for the anti-parallel dimerization of α -actinin-2, and two carboxy-terminal EF-hand CaM domains. In our work, the Na_v1.5 III-IV linker-binding site is mapped to the spectrin domain of α -actinin-2 and this spectrin-like repeat is curved axially and twisted to form high-affinity binding sites for several cytoplasmic tails of transmembrane proteins such as NMDA receptor, potassium channels (K_v1.4 and K_v1.5), and the polycystin-2 channel (19;42;41;43). In addition to α -actinin-2, the striated muscle isoform (α -actinin-3) but not the cytoskeletal isoforms (α -actinin-1 and α -actinin-4) was also found to interact with Na_v1.5. Indeed, antibody against Na⁺ channel was able to immunoprecipitate α -actinin-2 and α -actinin-3 proteins from lysates of skeletal muscle, indicating a direct physical interaction between both isoforms of α -actinin and skeletal Na⁺ channel *in vivo*. The conserved 53-amino acid region of the III-IV linker modulates inactivation gating through hydrophobic interactions between the inactivation particle and the receptor site. Studies using site-specific antibodies and site-

directed mutagenesis have shown that the hydrophobic IFM motif in the III-IV linker plays a key role in fast inactivation (44;45). Not surprisingly, an inherited mutation in one of the 12 positively charged residues in the III-IV linker is associated with various diseases, such as arrhythmia, epilepsy (1), myotonias (46), and autism (47). The NMR solution structure of the isolated inactivation gate indicates that it has a stably folded core composed of an α helix capped by an NH_2 -terminal turn, which provides support for a model in which the tightly folded core contains a latch motif (IFM) that pivots on a flexible hinge to occlude the inner pore during fast inactivation (48). While the molecular structure of the III-IV linker is well known, the molecular mechanisms that regulate Na^+ channel gating are not. Investigators recently reported that the C-terminus domain of $\text{Na}_v1.5$ interacts with the III-IV linker, and that the resulting complex stabilizes the inactivation gate-occluded channel (49). Little is known about how the molecules that interact with the III-IV linker modulate Na^+ channel function, but α -actinin-2 appears to be a potential modulator.

What is the functional significance of the interaction of α -actinin-2 with the $\text{Na}_v1.5$ channel?

We performed two sets of experiments to detect changes in $\text{Na}_v1.5$ channel activity associated with α -actinin-2 expression. Patch clamp experiments showed that the over-expression of α -actinin-2 induced an average of 68% increase in Na^+ current density but had no significant effect on the kinetic properties of the channel. These observations prompted us to explore the possibility that an increase in the number of $\text{Na}_v1.5$ channels on the cell surface might be the underlying mechanism for the finding of increased Na^+ current densities by α -actinin-2. This hypothesis was tested by biotinylation experiments which corroborated the results of the patch-clamp, and revealed an increase in $\text{Na}_v1.5$ expression at the cell surface of tsA201 cells co-expressing α -actinin-2. Taken together, our results suggest a model in which α -actinin-2 increases the number of Na^+ channel and/or availability on cell surface, which then causes an increase in Na^+ current density. A similar hypothesis has been suggested for nonmuscle α -actinin isoform (α -actinin-1) which has been shown to interact with metabotropic glutamate receptor (mGlu_{5b}). Interaction with α -actinin-1 is believed to promote cell surface of the mGlu_{5b} receptor. This α -actinin-1-dependent cell surface expression of the receptor is achieved through interaction with actin cytoskeleton; because α -actinin-1 mutants lacking the calponin homology domain, which renders them unable to bind actin, do not promote cell expression of the receptor. (50). Recent studies also have

demonstrated a significant increase in $I_{K,Ca}$ density when α -actinin-2 was co-expressed with the Ca^{2+} -activated K channel (SK2), whereas incubation with an antisense α -actinin-2 construct significantly increased $K_v1.5$ current density in HEK293 cells expressing $K_v1.5$ (51). Here, our binding and functional studies strongly suggest that α -actinin-2 directly modulates $Na_v1.5$ cell-surface expression. However, indirect effects mediated through other cellular targets of α -actinin-2 could not be excluded. Several investigators have reported that others spectrin proteins similar to α -actinin-2 interact also with Na^+ channels. For example, syntrophins link Na^+ channel proteins to dystrophin, which then interact with cytoskeleton proteins (52). α -Actinin-2 binds to dystrophin (53) and the complex regulates the activity of the cardiac L-type Ca^{2+} channel (54). The absence of dystrophin causes a 50% decrease in $Na_v1.5$ protein levels and a 29% reduction in sodium currents in isolated mdx^{5cv} cardiomyocytes, whereas $Na_v1.5$ mRNA levels remain unchanged (8). In skeletal muscle, the absence of dystrophin leads to a moderate reduction in skeletal muscle channel density and a significant decrease in syntrophin levels (55) while the tissue distribution of α -actinin-2 is unaffected (56). α -Actinin-2 might partly compensate for the absence of syntrophin and dystrophin, as in syntrophin and dystrophin-null mice, by helping to stabilize Na^+ channels. It thus appears that α -actinin-2 might anchor and/or stabilize $Na_v1.5$ at the cell surface by attaching $Na_v1.5$ to the cytoplasmic actin network, either through a direct interaction with $Na_v1.5$ or through interactions with additional $Na_v1.5$ -associated proteins.

Do Changes in the Expression Level of $Na_v1.5$ Alter Cardiac function?

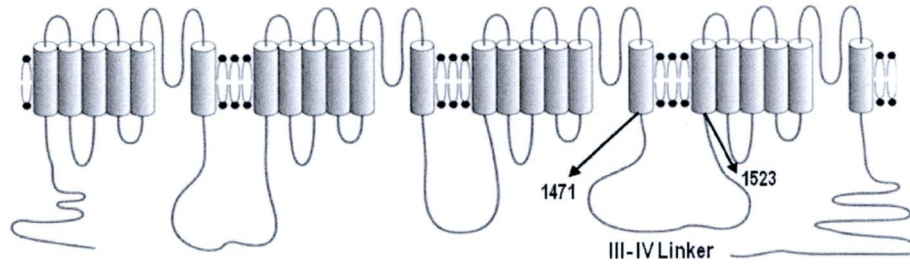
It is important to note that reduction in cardiac Na^+ current density and/or membrane expression of $Na_v1.5$ have been associated with atrial fibrillation and Brugada syndrome (57;61;62). Thus, the genetic mutations in α -actinin-2 may disrupt the expression and function of $Na_v1.5$, leading to similar cardiac abnormalities. Further experiments focused on testing this hypothesis and exploring the functional significance of α -actinin-2/ $Na_v1.5$ interaction *in vivo* in mammalian myocardium are warranted. Resolving these issues will improve our understanding of the various roles that are played by α -actinin-2 in cardiac physiology and may serve as interesting targets for new therapeutic strategies against lethal arrhythmias associated with $Na_v1.5$. In addition, the RNA interference (RNAi) and gene-targeted knockout approaches would enable one to examine rigorously whether loss of this interacting protein leads to similar cardiac pathological events.

In conclusion, a direct interaction between α -actinin-2 and Na_v1.5 III-IV linker has been identified by the yeast two-hybrid system and confirmed by convergent techniques in transfected tsA201 cells and in skeletal muscle and brain homogenates. We also demonstrate that α -actinin-2 interacts specifically with III-IV linker region of Na_v1.5 via its spectrin domain and increases Na_v1.5 expression at the cell surface. Further studies are required to assess the role of α -actinin-2 on cardiac Na⁺ channel function in failing and normal myocardium.

III.7 Figure Legends

Figure III.1 Yeast two-hybrid screening of human heart cDNA library identifies α -actinin-2 as binding partner of Na_v1.5 III-IV linker region. (A) Transmembrane topology of the Na_v1.5 α -subunit showing the four homologous domains, each of which is composed of six membrane spanning segments. The location of the cytoplasmic linker connecting domains III and IV (III-IV linker or LIII-IV) used as bait is indicated by arrows and the numbers correspond to the amino-acid location. (B) α -Actinin-2 was isolated from yeast two-hybrid screen and subcloned into pGADT7 vector. To confirm the interaction between LIII-IV/BD and α -actinin-2/AD, the AH109 yeast strain was co-transformed with LIII-IV/BD-bait constructs combined with α -actinin-2/AD-prey or pGADT7-empty vector as negative control. p53 (pGBKT7-p53) and SV40 large T-antigen (pGADT7-T) co-transformant was used as a positive control whereas lamin C (pGBKT7-LamC) and pGADT7-T co-transformant as negative control. BD and AD denote Gal4 DNA binding domain and activation domain fusion proteins, respectively. The viability of the isolated clones and controls was assessed on medium that lacked tryptophan and leucine (-TL; co-transformed cells survive) and on counterselective medium that lacked tryptophan, leucine, histidine and adenine (-TLHA; only yeast cells with interaction between bait and prey proteins survive). The interaction was monitored by histidine and adenine prototrophy. Yeasts only co-transformed with either positive control or LIII-IV/BD and α -actinin-2/AD grew on the -TLHA plate (lower panel, lanes 1 and 5). This experiment was repeated four times with similar results.

A



B

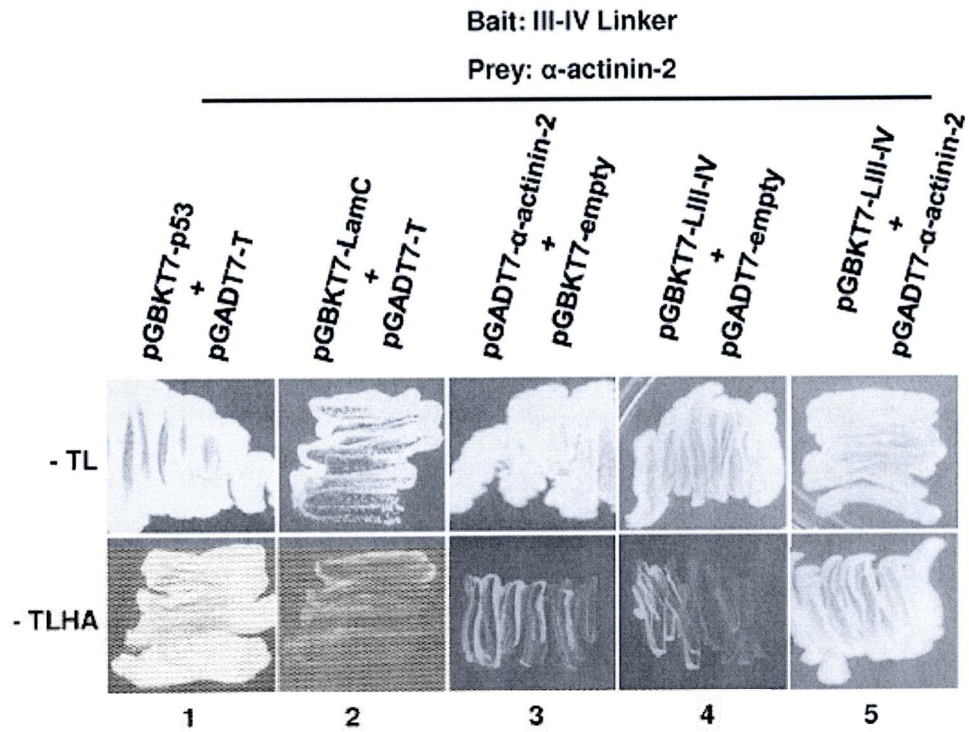
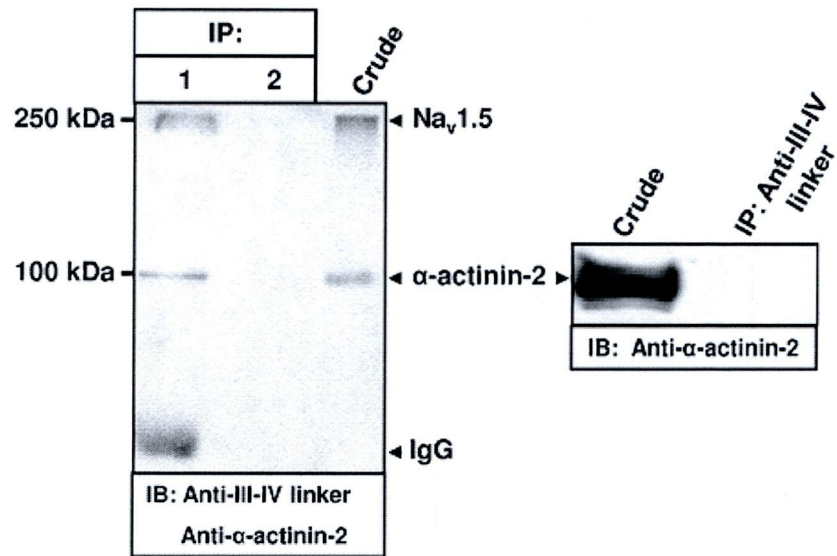


Figure III.2 Reciprocal co-immunoprecipitation of Na_v1.5 channel with α -actinin-2 in co-transfected tsA201 cells. (A) In the right part: TsA201 cells were transiently transfected with Na_v1.5 and α -actinin-2. Soluble cell fractions were immunoprecipitated (IP) with an anti-III-IV linker antibody (lane 1) or rabbit pre-serum control (lane 2) overnight at 4°C and antigen-antibody complexes were captured with protein-G-agarose (2h, 4°C). The crude extracts (Crude) and immunoprecipitates were subjected to Western blot and probed with anti-III-IV linker and anti- α -actinin-2 antibodies, which reveal the presence of Na_v1.5 with α -actinin-2 (lane 1). In the left part: As an additional control, the same IP was carried out with lysates from tsA201 cells transiently expressing Na_v1.5 but not α -actinin-2 (IP control). Crude extracts from tsA201 cells, transiently transfected with Na_v1.5 and α -actinin-2 were used to confirm the identities of bands as indicated. (B) Reciprocal co-immunoprecipitation with an anti- α -actinin-2 antibody for immunoprecipitation and the anti-Na_v1.5 antibody for Western blotting. The anti- α -actinin-2 antibody successfully precipitated Na_v1.5 (right panel, lane 1). No signal was detected in the anti- α -actinin-2 antibody precipitate obtained from cells without Na_v1.5 co-expression. Arrows indicate the position of Na_v1.5 and α -actinin-2 immunoreactive bands. IB: immunoblot. Three separate experiments yielded similar results.

A



B

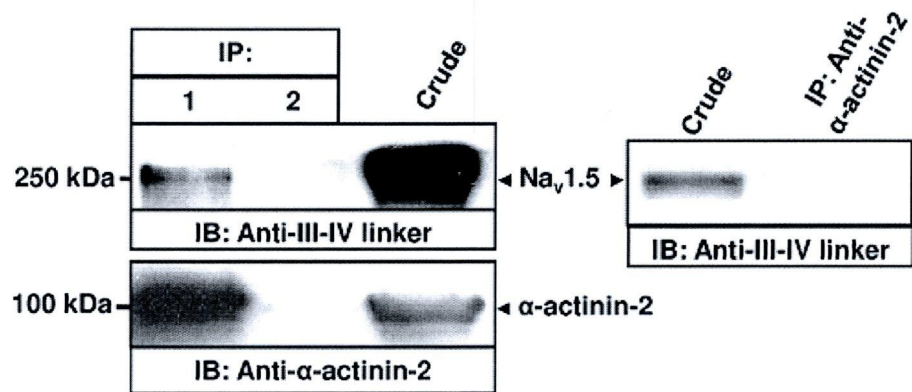
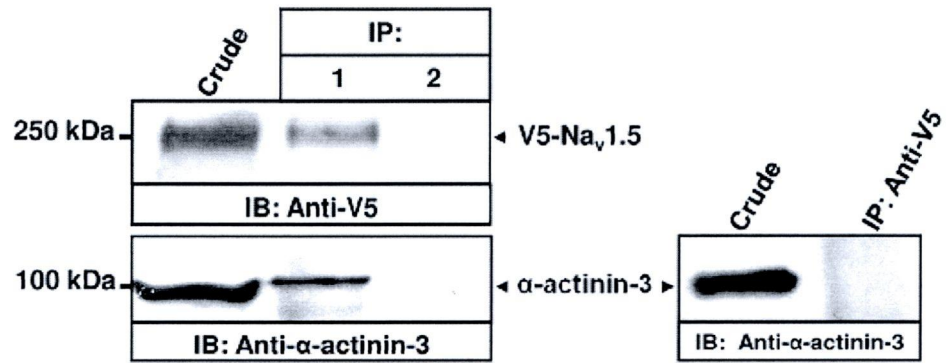
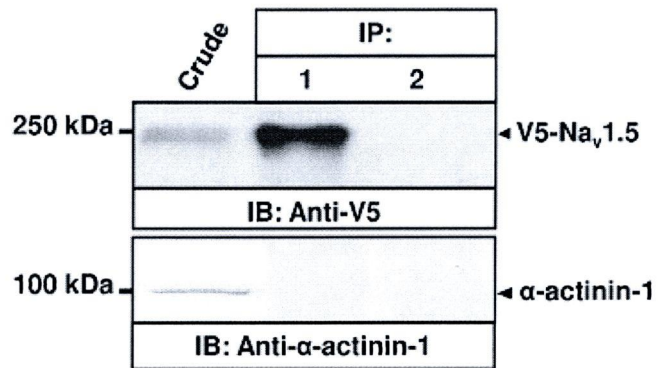


Figure III.3 Co-immunoprecipitation of Na_v1.5 channel with α -actinin-2 isoforms in co-transfected tsA201 cells. (A) Right part: Lysates of tsA201 cells co-expressing V5-tagged Na_v1.5 and α -actinin-3 were immunoprecipitated (IP) by monoclonal anti-V5 antibody (upper panel, lane 1) or mouse pre-serum negative control (upper panel, lane 2), and subjected to immunoblot (IB) analysis using anti- α -actinin-3 antibody. α -Actinin-3 signal was detected with anti-V5 antibody (lower panel, lane 1), but not with control serum (lower panel, lane 2). Left part: To confirm the specificity of the co-immunoprecipitation, tsA201 cells singly transfected with V5-tagged Na_v1.5 were immunoprecipitated with anti-V5 antibody (IP: anti-V5) and detected with anti- α -actinin-3 antibody. (B) Protein extracts prepared from tsA201 cells co-transfected with V5-tagged Na_v1.5 and α -actinin-1 were immunoprecipitated with either anti-V5 antibody (upper panel, lane 1) or non-immune mouse IgG (upper panel, lane 2). The immunoprecipitated protein complex was detected by immunoblotting with an anti- α -actinin-1 antibody (lower panel). (C) Lysates of tsA201 cells co-expressing V5-tagged Na_v1.5 and α -actinin-4 were immunoprecipitated by anti-V5 antibody (upper panel, lane 1) or mouse IgG (upper panel, lane 2), and subjected to immunoblot analysis using an anti- α -actinin-4 antibody (lower panel). Each cell lysate (Crude) was probed with anti-V5, anti- α -actinin-3, anti- α -actinin-1 or anti- α -actinin-4 antibodies as shown to confirm that all proteins were expressed. Arrows indicate the main immunoprecipitation bands. This experiment was repeated three times with similar results.

A



B



C

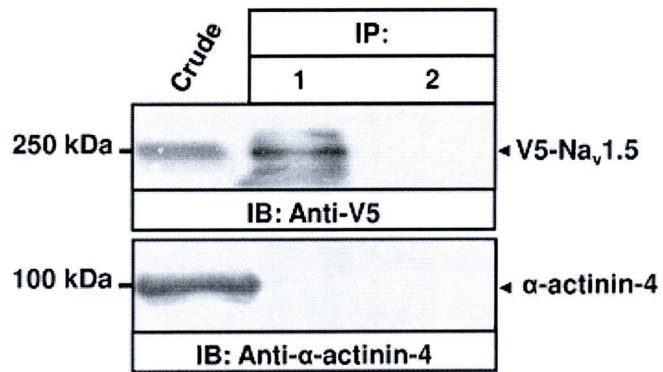
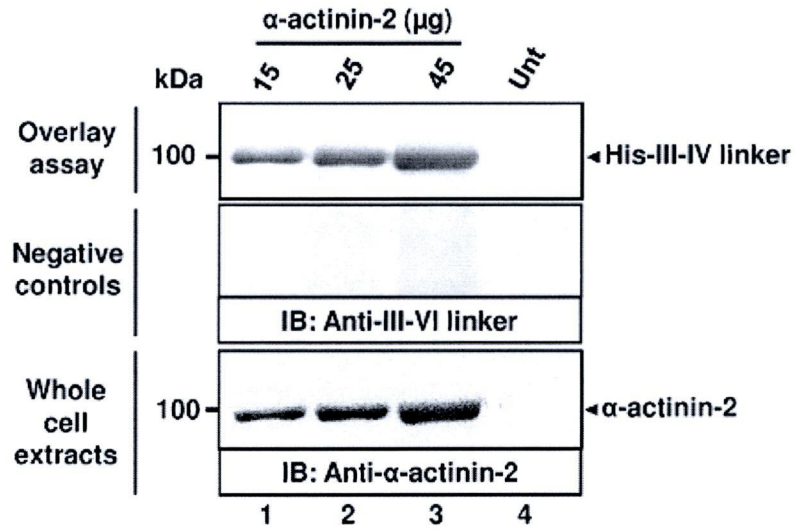


Figure III.4 α -Actinin-2 interacts directly with Na_v1.5 III-IV linker *in vitro*. (A) Lysates of tsA201 cells expressing various amounts of α -actinin-2 (15, 25 and 45 μ g) and untransfected control cells were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Membranes were then incubated with 1 μ g/ml of purified III-IV linker fusion protein (upper panel) or BSA (negative control) (middle panel). After washing, bound proteins were detected with anti-III-IV linker antibody. Binding of III-IV linker peptide was detected in all lanes containing α -actinin-2 cell lysates (upper panel, lanes 1, 2 and 3). However, a higher signal of III-IV linker was detected in lane containing 45 μ g of α -actinin-2 cell lysates compared to lanes containing 15 and 25 μ g of α -actinin-2 cell lysates. No binding was detected in the control lane containing extracts from untransfected cells (upper panel, lane 4) or membrane incubated with BSA (middle panel). The same membrane was stripped and probed with anti- α -actinin-2 specific antibody to assess the relative quality and quantity of α -actinin-2 samples (lower panel). (B). His-pull down experiment was performed as described in "Experimental procedures". Ni²⁺-NTA beads loaded with His₆-III-IV linker (lane 3) and unloaded (lane 4) were incubated with tsA201 cell lysates expressing α -actinin-2 (lanes 3 and 4). The eluted proteins were separated by SDS-PAGE, blotted, and detected by anti- α -actinin-2 (upper panel) or anti-III-IV linker antibodies (lower panel). α -Actinin-2 was pulled-down from His₆-III-IV linker (upper panel, lane 3). In contrast, no α -actinin-2 was detected in the samples incubated with unloaded beads (upper panel, lane 4). The same amount of α -actinin-2 cell extracts and purified His₆-III-IV linker fusion protein was directly loaded as control of Western blot (lanes 1 and 2). The binding of α -actinin-2 to unloaded beads was used as negative control. Ni²⁺-NTA beads: Nickel agarose beads. A is representative of work repeated five times with similar results; B is representative of work repeated three times with similar results.

A



B

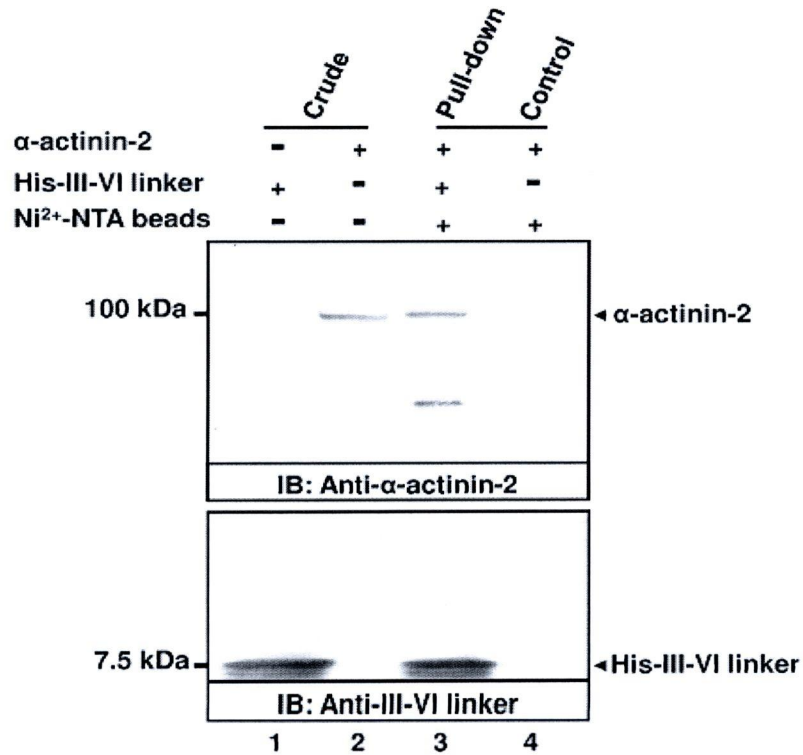
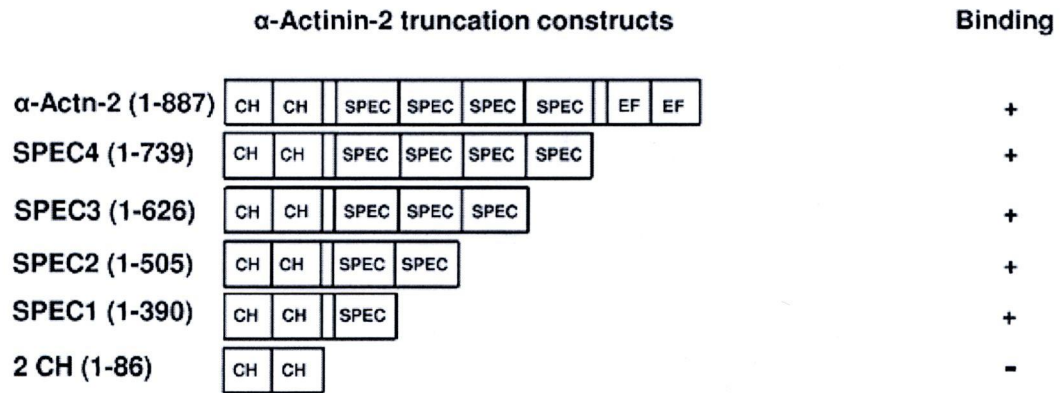


Figure III.5. The α -actinin-2 spectrin like repeats domain is required for interaction of α -actinin-2 with Na_v1.5 III-IV linker. (A) Schematic representations of the α -actinin-2 full-length and truncated constructs used to map the binding site in α -actinin-2 for Na_v1.5 III-IV linker. α -Actinin-2 has an actin binding domain (CH), 4 spectrin-like repeats (SPEC1-SPEC4), and an EF hand domain (EF). The numbers refer to the amino acid residues in α -actinin-2 constructs. The binding or lack of binding of the various α -actinin-2 segments to Na_v1.5 III-IV linker, as revealed in B, are indicated by plus or minus signs, respectively. (B) In the right part, 2 μ g of His₆-III-IV linker fusion protein (upper panel, lanes 1, 2, 3, 4 and 5) immobilized on Ni²⁺-NTA beads or unloaded Ni²⁺-NTA beads (lower panel, lanes 1, 2, 3, 4 and 5) were incubated with cell extracts prepared from tsA201 cells transfected with either full-length α -actinin-2 (1-887) (lane 1), SPEC4 (1-739) (lane 2), SPEC3 (1-626) (lane 3), SPEC2 (1-505) (lane 4) or SPEC1 (1-390) (lane 5). The bound and unbound proteins were examined by immunoblotting with anti- α -actinin-2 antibody (upper and middle panel) and the His₆-III-IV linker fusion proteins with anti-III-IV linker antibody (lower panel). In the left part, transiently expressed Xpress-tagged calponin hand domain (Xpress-2CH) in tsA201 cells extracts (Crude) was pulled-down with His₆-III-IV linker immobilized on Ni²⁺-NTA beads (upper panel, lane 1) or unloaded Ni²⁺-NTA beads (upper panel, lane 2). Xpress-2CH protein was detected using a monoclonal anti-Xpress antibody (upper panel) and the His₆-III-IV linker fusion protein with a polyclonal anti-III-IV linker antibody (lower panel). The unloaded Ni²⁺-NTA beads were used as negative control. Ni²⁺-NTA beads: Nickel agarose beads. B is representative of work repeated three times with similar results.

A



B

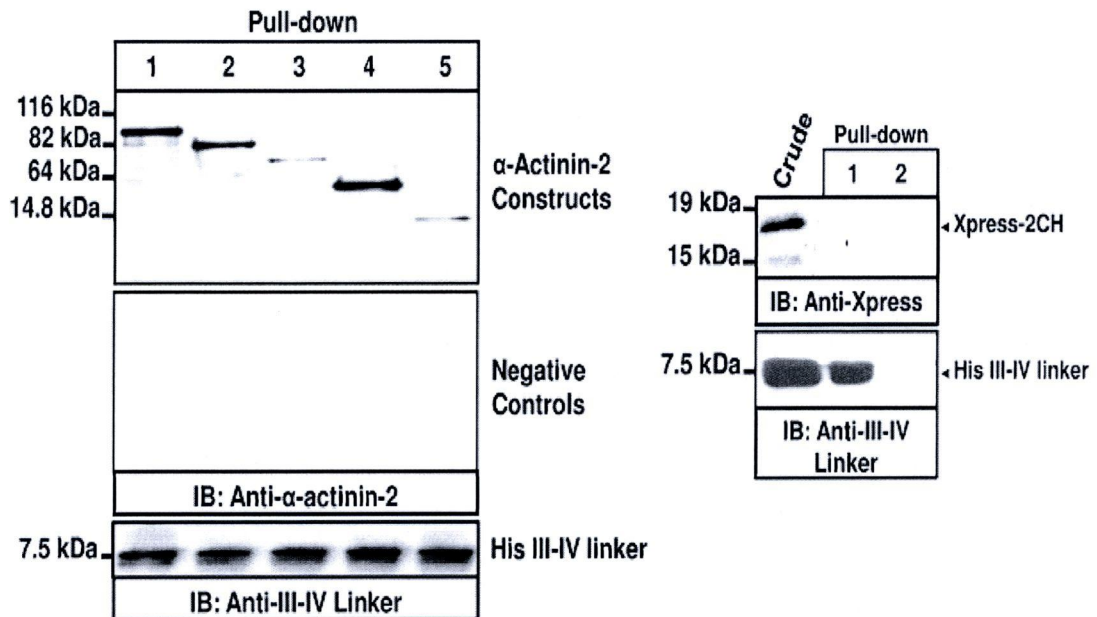
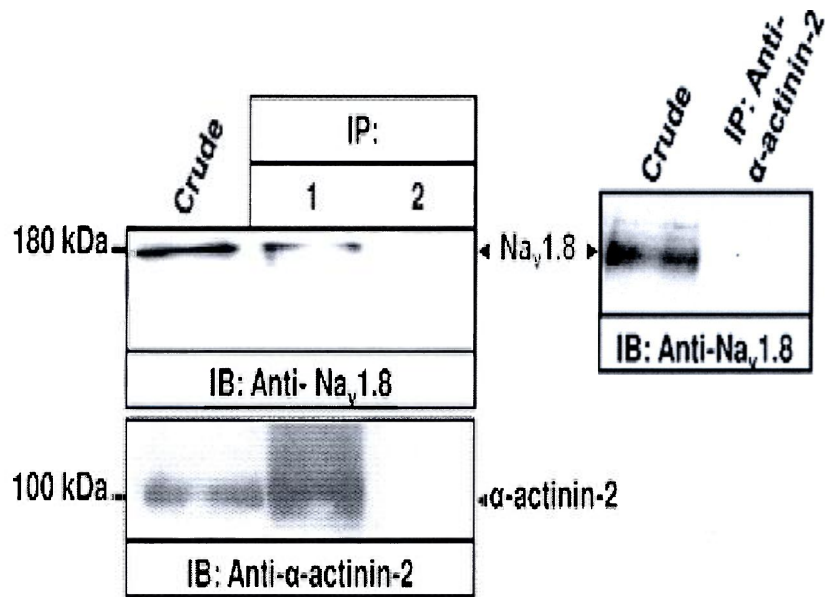


Figure III.6. Reciprocal co-immunoprecipitation of Na_v1.8 channel with α -actinin-2 in co-transfected tsA201 cells. (A) Lysates of tsA201 cells co-expressing Na_v1.8 and α -actinin-2 were immunoprecipitated (IP) by anti- α -actinin-2 antibody (right part, lane 1) or rabbit pre-serum control (right part, lane 2), and subjected to immunoblot analysis using anti-Na_v1.8 antibody. Na_v1.8 is easily immunoprecipitated by the anti- α -actinin-2 antibody, but not by the IgG control (upper panel, lanes 1 and 2). In contrast, no signal was observed in lysates of tsA201 cells singly expressing Na_v1.8 (negative control) (left part, IP: anti- α -actinin-2). (B) Conversely, α -actinin-2 was immunoprecipitated using the anti-Na_v1.8 antibody (right part, lane 1) but, not with rabbit pre-serum negative control (right part, lane 2). As an additional negative control, the same IP was carried out with lysates of cells expressing Na_v1.8 alone (left part, IP: anti-Na_v1.8). Twenty-five μ g of whole cell lysates (Crude) were also directly loaded onto the gel to serve as a positive control for the Western blot. IB: immunoblot. This experiment is representative of work repeated four times with similar results.

A



B

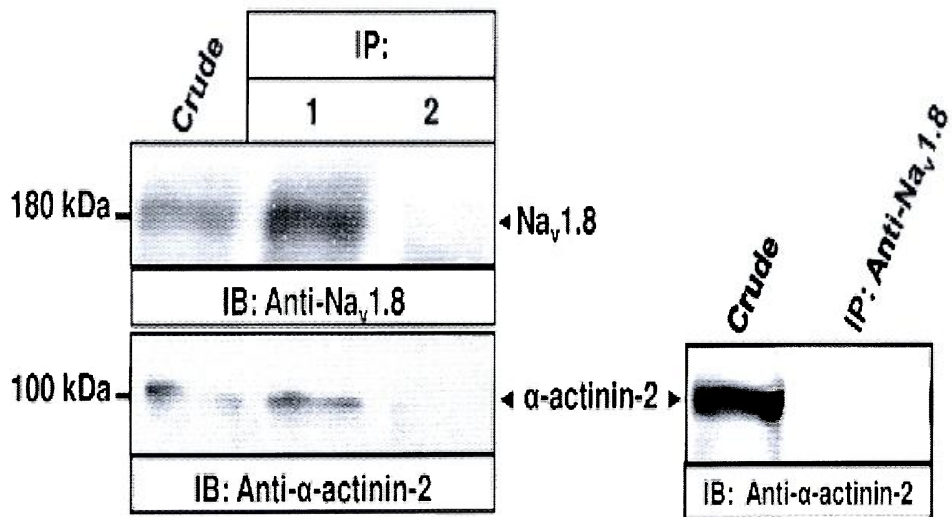
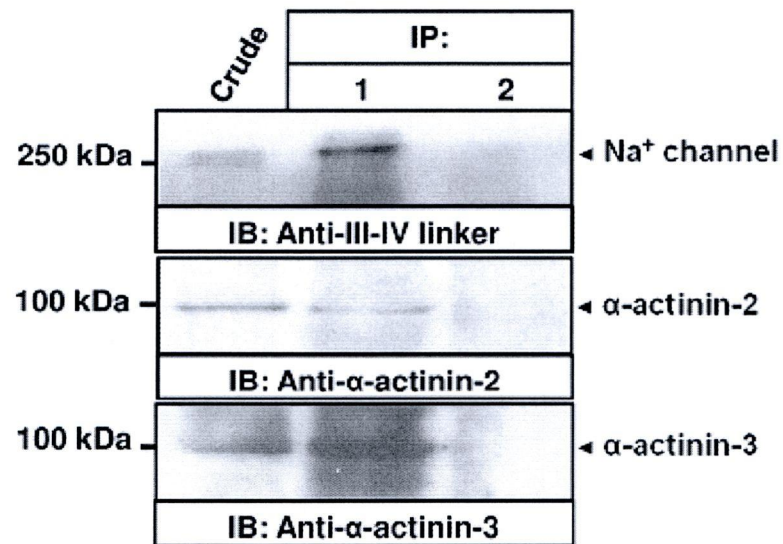


Figure III.7. Endogenous Na⁺ channels and α -actinin-2 interact *in vivo*. (A) Adult mouse skeletal muscle protein lysates were immunoprecipitated with polyclonal anti-III-IV linker antibody (upper panel, lane 1) or rabbit pre-serum negative control (upper panel, lane 2). The immunoprecipitates (IP) were separated by SDS-PAGE and were subjected to immunoblot (IB) analysis with anti-III-IV linker (upper panel), anti- α -actinin-2 (middle panel) or anti- α -actinin-3 (lower panel) antibodies. (B) Soluble Na⁺ channel proteins obtained from adult mouse brain were immunoprecipitated with either polyclonal anti-III-IV linker antibody (upper panel, lane 1) or rabbit pre-serum negative control (upper panel, lane 2), and blots were probed with anti-III-IV linker (upper panel) or anti- α -actinin-2 (lower panel) antibodies. Aliquots of total cell extracts (Crude) were also loaded on the gel to serve as a positive control for the Western blot. This experiment was performed 2 times with similar results.

A



B

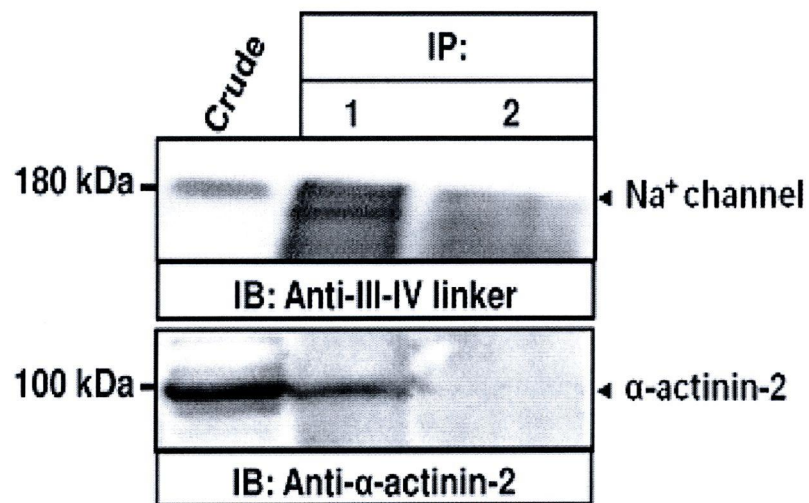


Figure III.8. Na_v1.5 channel and α -actinin-2 co-localize in human cardiac tissue.

Confocal microscopic examination of 0.45- μ sections of a human cardiac ventricle autopsy section stained with anti-Na_v1.5 (green in **A**, **C**, **D**, and **F**) and anti- α -actinin-2 4B antibodies (red in **B**, **C**, **E**, and **F**). Nuclei are stained with DAPI (blue) in all images. Merged images (**C**, **F**) reveal yellow striations, confirming co-localization of α -actinin-2 and Na_v1.5 at Z lines. **D**, **E** and **F** are higher magnification views of the boxed regions. Rod-shaped structures in **A**, **B**, and **C**, fluorescing at all wavelengths, were also seen in unstained sections and represent lipofuscin deposits in this autopsy specimen from an aged individual. This experiment was performed 2 times with similar results.

Na_v1.5

α-actinin-2

Merge

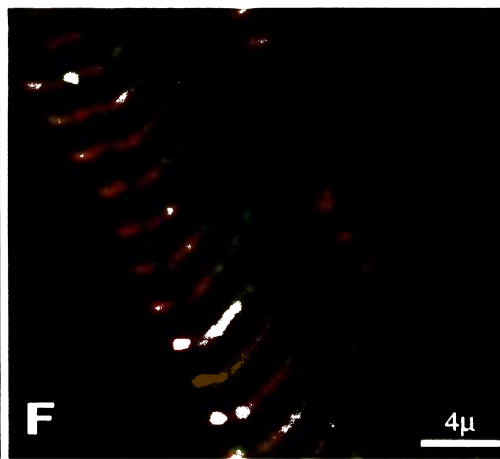
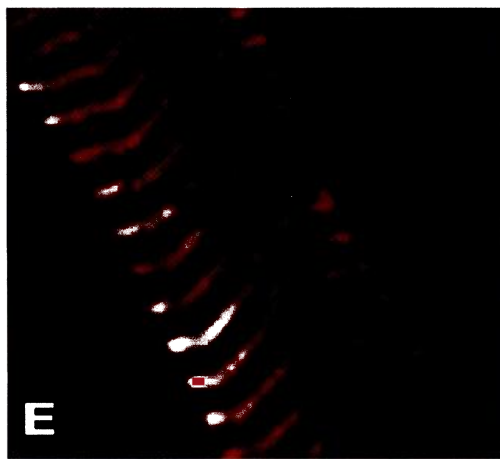
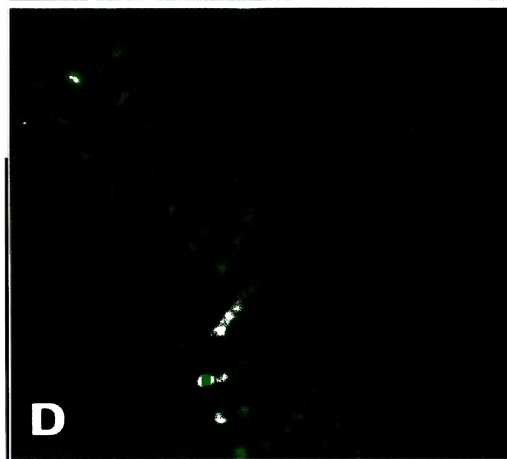
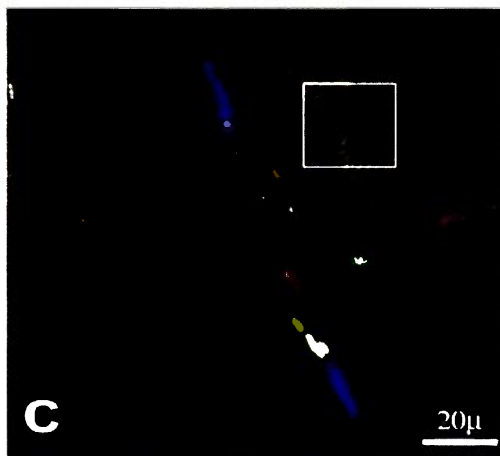
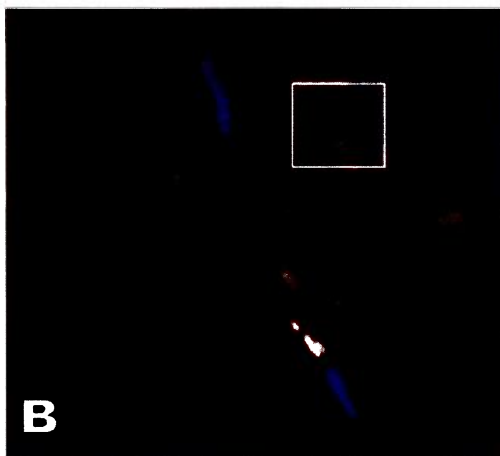
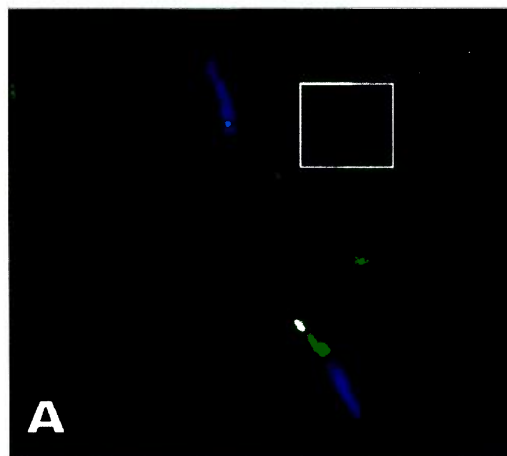


Figure III.9. α -Actinin-2 over-expression increases sodium current densities (I_{Na}) in co-transfected tsA201 cells. (A) Representative traces of the current recorded from control and co-transfected tsA201 cells transiently expressing $Na_v1.5$ and α -actinin-2. **(B)** Normalized current density-voltage relationships of I_{Na} in control cells ($Na_v1.5 + \beta_1$) and in co-transfected cells ($Na_v1.5 + \beta_1 + \alpha$ -actinin-2). The protocol is given in the inset and the numbers of cells used in the experiment are specified next to the symbols. **(C)** Bar graph showing the current density obtained from the peak current after 500 ms pre-pulses to potentials ranging from -140 mV to 5 mV. α -actn-2: α -actinin-2. The experiment was repeated at least three times and similar results were obtained.

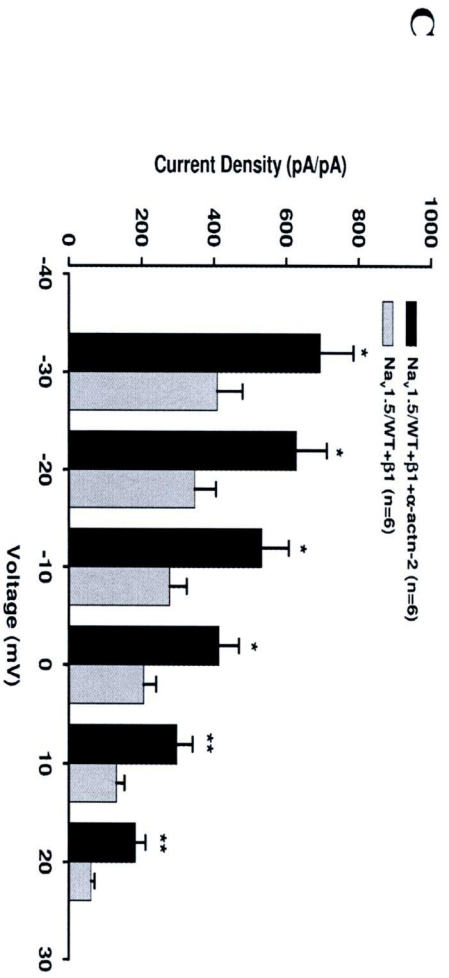
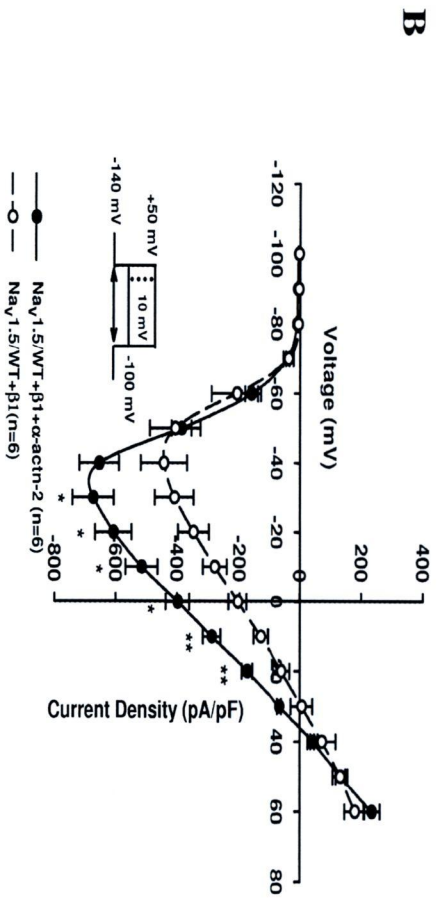
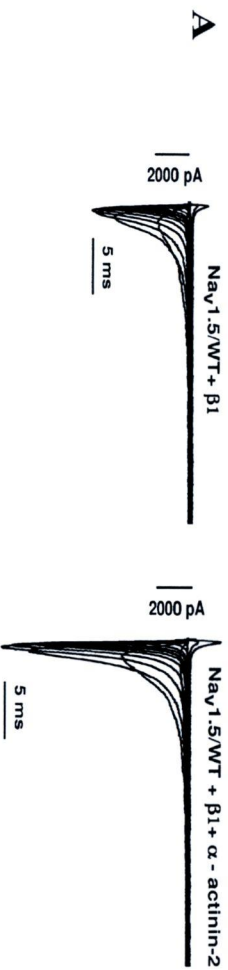
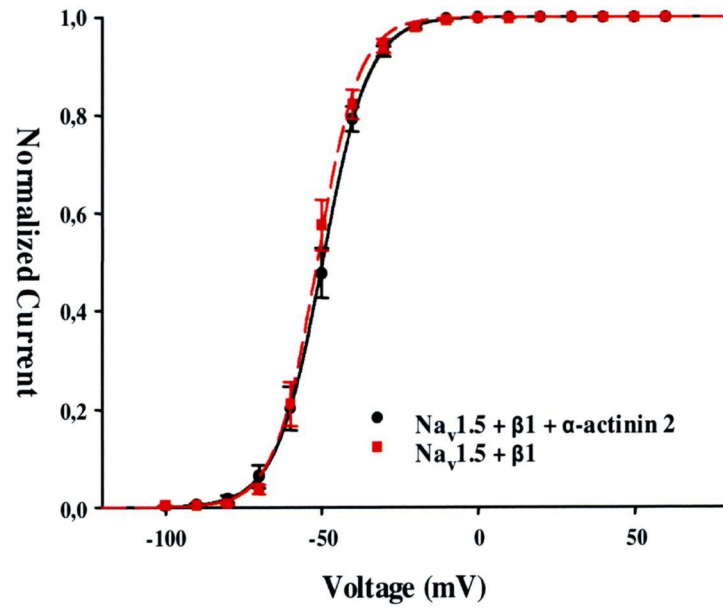


Figure III.10. α -Actinin-2 does not affect the biophysical kinetics of the $\text{Na}_v1.5$ channels. (A and B) Steady state inactivation and activation curves in tsA201 cells transiently co-transfected with $\text{Na}_v1.5$ and β_1 (control) with or without α -actinin-2. Currents were elicited using depolarization for 50 ms steps from -90 to +60 mV in 10 mV increments. The cells were held at a holding potential of -140 mV (see inset for protocol). The activation curves were derived from the same family of currents used for the I/V curve shown on panel A of Figure 7 using the following Boltzmann equations: $G/G_{\text{max}}=1/[1+\exp(V_{1/2}-V)/k_v]$ where G is the measured conductance, G_{max} is the maximal conductance, $V_{1/2}$ is the voltage at which the channels are part-maximal activated, and k_v is the slope factor. For the inactivation curves, the peak current (I) was normalized relative to the maximal value (I_{max}). The peak current amplitude was elicited by 20 ms test pulses to +15 mV after 500 ms pre-pulses to potentials ranging from -140 mV to 5 mV (see inset for protocol). The inactivation curve was fitted to the following Boltzmann equation: $I/I_{\text{max}}=a*(1/(1+\exp((V-V_{1/2})/k_v)))$, where V is the membrane potential during the pre-pulse, $V_{1/2}$ is the voltage at which the channels are part-maximally inactivated, and k_v is the slope factor. α -actn-2: α -actinin-2. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained.

A



B

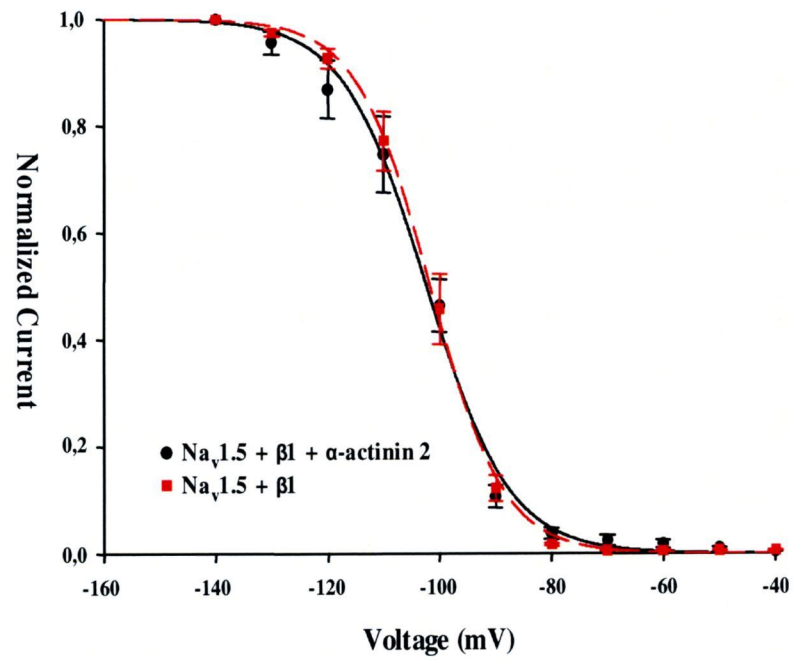
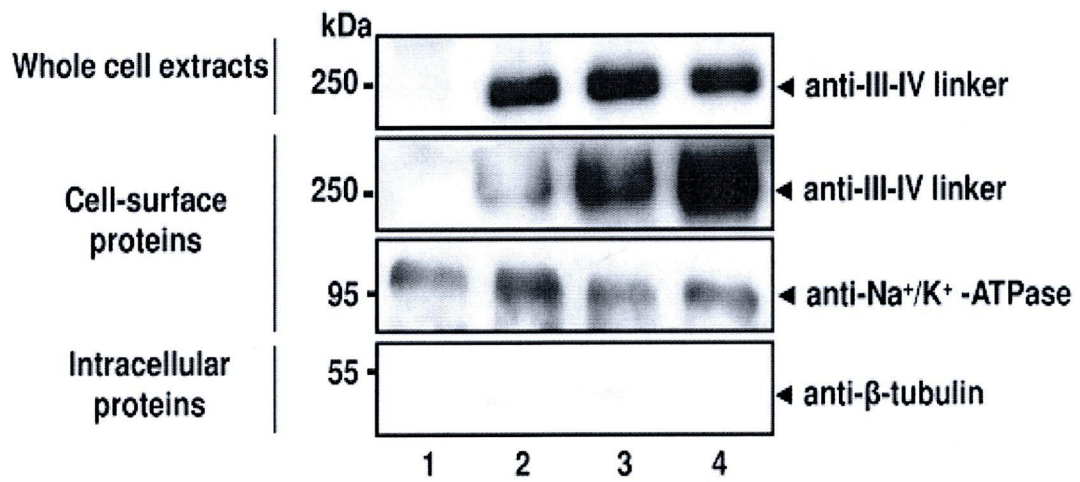


Figure III.11. Cell-surface expression of Na_v1.5 channel increases in tsA201 cells over-expressing α -actinin-2. TsA201 cells were transiently transfected with Na_v1.5 in combination with either pcDNA3 vector encoding none (mock) or increasing amounts of α -actinin-2 cDNAs. Transfected tsA201 cells expressing either mock (lane 1) or Na_v1.5 (lane 2) were used as negative and positive controls, respectively. The cell surface biotinylation assay was performed as described in "Experimental procedures". Briefly, tsA201 cells were labelled with a membrane-impermeable biotinylation reagent biotin at 4°C for 4 h. The cells are then lysed and surface channels are isolated using streptavidin-agarose beads, and examined by immunoblot analysis using antibody against III-IV linker (Cell-surface proteins, first panel). Expression of Na_v1.5 was confirmed by immunoblotting using the aliquot of the same lysates in which surface proteins have not been removed (Whole cell extracts). Cell-surface biotinylation assay shows much greater cell-surface expression of Na_v1.5 channels in tsA201 cells co-transfected with α -actinin-2 compared with cells expressing Na_v1.5 alone (lanes 2, 3 and 4). As a control for cell surface biotinylation, we used Na⁺/K⁺-ATPase α 1 subunit as plasma membrane marker (Cell-surface proteins, second panel). The β -tubulin content of each fraction was analysed to confirm the integrity of the cells during biotinylation (Intracellular proteins). This experiment was repeated at least four times and similar results were obtained.

α -actinin-2 (μ g)	0	0	1.5	5
Na _v 1.5 (μ g)	0	5	5	5
Mock (μ g)	5	5	0	0



III.8 Supplemental Data

III.1. Tableau 1. List the proteins that were identified in this yeast two-hybrid screen.

To exclude incorrect identification of interactors resulting from the presence of more than one prey plasmid in the same yeast colony, all proteins listed were confirmed by plasmid extraction and sequencing.

Hits#	Name of the protein identified	GenBank number
2	Alpha actinin-2 [Homo sapiens]	NM001103
1	Utrophin [Homo sapiens]	NM007124
1	Inhibitor of apoptosis protein-1 [Homo sapiens]	AF070674
1	Kruppel-like factor-12 [Homo sapiens]	NM007249

#: The number of hits represents the number of positive yeast clones for the identified protein.

Figure III.12 α -Actinin-2 did not interact with the I-II loop and N-terminus regions of $\text{Na}_v1.5$. Yeast, AH109 was transformed simultaneously with either I-II loop region plus α -actinin-2 or N-terminus region plus α -actinin-2 plasmids, and co-transformants were selected on media lacking tryptophan and leucine (-TL). The interaction was monitored by histidine and adenine prototrophy. Yeasts which do not have both plasmids will not have the ability to survive on media lacking tryptophan, leucine, histidine and adenine (-TLHA). Yeast co-transformed with either N-terminus and empty plasmids or I-II loop and empty plasmids serve as negative control.

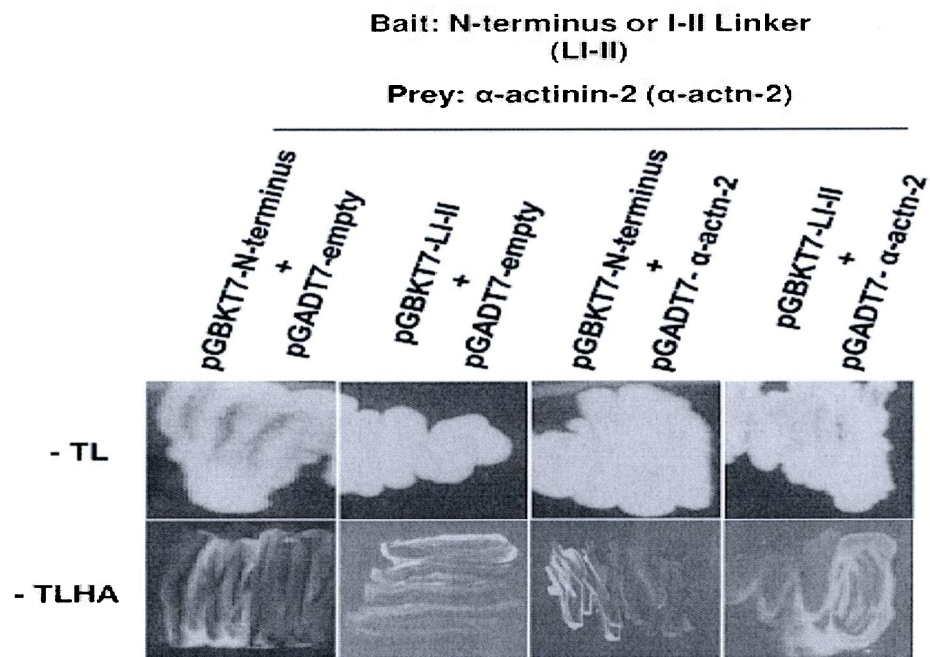


Figure III.13. The Na_v1.5 III-IV linker shares a high-sequence homology with other voltage-gated Na⁺ channel. Sequence alignments of the Na_v1.5 III-IV linker (residues 1471-1523, boxed region) demonstrate structural homology with other voltage-gated Na⁺ channels. Furthermore, this region is well conserved in sodium channels from neuronal and cardiac tissue (Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.5, and Na_v1.6), skeletal muscle (Na_v1.4), and the peripheral nervous system (Na_v1.7, Na_v1.8, and Nav1.9). The different amino acids are indicated in bold.

Na_v1.1: NFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPGNKFQG
 Na_v1.2: NFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPANKFQG
 Na_v1.3: NFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPANKFQG
 Na_v1.4: NFNQQKKKLGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPQNKIQG
Na_v1.5: NFNQQKKKLGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPLNKYQGEF
 Na_v1.6: NFNQQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPLNKIQG
 Na_v1.7: NFNQQKKKLGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPGNKFQG
 Na_v1.8: NFNQQKKKLGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPLNKFQGF
 Na_v1.9: NFNQQKKKLGQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPLNKCQGL

III.9 Acknowledgements

B. Moghadaszadeh and A.H. Beggs were supported by R01-AR44345 from the NIAMS of the National Institutes of Health (USA) and by grant 3971 from the Muscular Dystrophy Association (USA). Confocal microscopy was performed in the Children's Hospital Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Center Imaging Core supported by NIH P30 HD18655.

We thank Dr. D. Fedida (University of British Columbia, BC, Canada) for the generous gift of the full-length α -actinin-2.

III.10 Référence

1. George, A. L., Jr. (2005) *J. Clin. Invest.* 115, 1990-1999
2. Yu, F. H. and Catterall, W. A. (2003) *Genome Biol.* 4, 207

3. Patton, D. E., West, J. W., Catterall, W. A., and Goldin, A. L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10905-10909
4. Bennett, P. B., Valenzuela, C., Chen, L. Q., and Kallen, R. G. (1995) *Circ. Res.* 77, 584-592
5. Rohl, C. A., Boeckman, F. A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W. A., and Klevit, R. E. (1999) *Biochemistry* 38, 855-861
6. McEwen, D. P., Meadows, L. S., Chen, C., Thyagarajan, V., and Isom, L. L. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 16044-16049
7. Fahmi, A. I., Patel, M., Stevens, E. B., Fowden, A. L., John, J. E., III, Lee, K., Pinnock, R., Morgan, K., Jackson, A. P., and Vandenberg, J. I. (2001) *J. Physiol.* 537, 693-700
8. Zimmer, T., Biskup, C., Bollensdorff, C., and Benndorf, K. (2002) *J. Membr. Biol.* 186, 13-21
9. Lemaillet, G., Walker, B., and Lambert, S. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 27333-27339
10. Mohler, P. J., Rivolta, I., Napolitano, C., Lemaillet, G., Lambert, S., Priori, S. G., and Bennett, V. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 17533-17538
11. Attali, B., Lesage, F., Ziliani, P., Guillemare, E., Honor \check{z} , E., Waldmann, R., Hugnot, J. P., Matt \check{z} i, M.-G., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 24283-24289
12. Gavillet, B., Rougier, J. S., Domenighetti, A. A., Behar, R., Boixel, C., Ruchat, P., Lehr, H. A., Pedrazzini, T., and Abriel, H. (2006) *Circ. Res.* 99, 407-414
13. Ou, Y., Strege, P., Miller, S. M., Makielski, J., Ackerman, M., Gibbons, S. J., and Farrugia, G. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 1915-1923
14. Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., Renganathan, M., Cummins, T. R., and Waxman, S. G. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 1029-1036
15. Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., Black, J. A., Greenwood, J., Lian, Z., and Waxman, S. G. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 46553-46561
16. Rougier, J. S., van Bemmelen, M. X., Bruce, M. C., Jespersen, T., Gavillet, B., Apoth \check{z} loz, F., Cordonier, S., Staub, O., Rotin, D., and Abriel, H. (2005) *Am. J. Physiol.* 288, C692-C701
17. Okuse, K., Malik-Hall, M., Baker, M. D., Poon, W. Y. L., Kong, H., Chao, M. V., and Wood, J. N. (2002) *Nature* 417, 653-656
18. Allouis, M., Le, B. F., Wilders, R., Peroz, D., Schott, J. J., Noireaud, J., Le, M. H., Merot, J., Escande, D., and Baro, I. (2006) *Circ. Res.* 98, 1538-1546

19. Beggs, A. H., Byers, T. J., Knoll, J. H., Boyce, F. M., Bruns, G. A., and Kunkel, L. M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 9281-9288
20. Otey, C. A. and Carpen, O. (2004) *Cell Motil. Cytoskeleton* 58, 104-111
21. Maruoka, N. D., Steele, D. F., Au, B. P. Y., Dan, P., Zhang, X., Moore, E. D. W., and Fedida, D. (2000) *FEBS Lett.* 473, 188-194
22. Schulz, T. W., Nakagawa, T., Licznerski, P., Pawlak, V., Kolleker, A., Rozov, A., Kim, J., Dittgen, T., Kohr, G., Sheng, M., Seeburg, P. H., and Osten, P. (2004) *J. Neurosci.* 24, 8584-8594
23. Li, Q., Montalbetti, N., Shen, P. Y., Dai, X. Q., Cheeseman, C. I., Karpinski, E., Wu, G., Cantiello, H. F., and Chen, X. Z. (2005) *Hum. Mol. Genet.* 14, 1587-1603
24. Maruoka, N. D., Steele, D. F., Au, B. P., Dan, P., Zhang, X., Moore, E. D., and Fedida, D. (2000) *FEBS Lett.* 473, 188-194
25. Schulz, T. W., Nakagawa, T., Licznerski, P., Pawlak, V., Kolleker, A., Rozov, A., Kim, J., Dittgen, T., Kohr, G., Sheng, M., Seeburg, P. H., and Osten, P. (2004) *J. Neurosci.* 24, 8584-8594
26. Djinovic-Carugo, K., Gautel, M., Ylanne, J., and Young, P. (2002) *FEBS Lett.* 513, 119-123
27. Gellens, M. E., George, A. L., Jr., Chen, L. Q., Chahine, M., Horn, R., Barchi, R. L., and Kallen, R. G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 554-558
28. Margolskee, R. F., McHendry-Rinde, B., and Horn, R. (1993) *Biotechniques* 15, 906-911
29. Ahern, C. A., Zhang, J. F., Wookalis, M. J., and Horn, R. (2005) *Circ. Res.* 96, 991-998
30. Chahine, M., Pilote, S., Pouliot, V., Takami, H., and Sato, C. (2004) *J. Membr. Biol.* 201, 9-24
31. Maltsev, V. A. and Undrovinas, A. I. (1997) *Am. J. Physiol.* 273, H1832-H1840
32. Gee, S. H., Madhavan, R., Levinson, S. R., Caldwell, J. H., Sealock, R., and Froehner, S. C. (1998) *J. Neurosci.* 18, 128-137
33. Strege, P. R., Holm, A. N., Rich, A., Miller, S. M., Ou, Y., Sarr, M. G., and Farrugia, G. (2003) *Am. J. Physiol.* 284, C60-C66
34. Mills, M., Yang, N., Weinberger, R., Vander Woude, D. L., Beggs, A. H., Eastal, S., and North, K. (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10, 1335-1346
35. Shirao, T. and Sekino, Y. (2001) *Neurosci. Res.* 40, 1-7
36. Broderick, M. J. and Winder, S. J. (2005) *Adv. Protein Chem.* 70, 203-246

37. Tang, J., Taylor, D. W., and Taylor, K. A. (2001) *J. Mol. Biol.* 310, 845-858
38. Wyszynski, M., Kharazia, V., Shangvi, R., Rao, A., Beggs, A. H., Craig, A. M., Weinberg, R., and Sheng, M. (1998) *J. Neurosci.* 18, 1383-1392
39. Cukovic, D., Lu, G. W. K., Wible, B., Steele, D. F., and Fedida, D. (2001) *FEBS Lett.* 498, 87-92
40. Vassilev, P., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8147-8151
41. West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., and Catterall, W. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10910-10914
42. Yang, N., Ji, S., Zhou, M., Ptáček, L. J., Barchi, R. L., Horn, R., and George, A. L., Jr. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12785-12789
43. Weiss, L. A., Escayg, A., Kearney, J. A., Trudeau, M., MacDonald, B. T., Mori, M., Reichert, J., Buxbaum, J. D., and Meisler, M. H. (2003) *Mol. Psychiatry* 8, 186-194
44. Motoike, H. K., Liu, H., Glaaser, I. W., Yang, A. S. Y., Tateyama, M., and Kass, R. S. (2004) *J. Gen. Physiol.* 123, 155-165
45. Maruoka, N. D., Steele, D. F., Au, B. P. Y., Dan, P., Zhang, X., Moore, E. D. W., and Fedida, D. (2000) *FEBS Lett.* 473, 188-194
46. Schultz, J., Hoffmuller, U., Krause, G., Ashurst, J., Macias, M. J., Schmieder, P., Schneider-Mergener, J., and Oschkinat, H. (1998) *Nat. Struct. Biol.* 5, 19-24
47. Hance, J. E., Fu, S. Y., Watkins, S. C., Beggs, A. H., and Michalak, M. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 216-222
48. Sadeghi, A., Doyle, A. D., and Johnson, B. D. (2002) *Am. J. Physiol.* 282, C1502-C1511
49. Ribaux, P., Bleicher, F., Couble, M. L., Amsellem, J., Cohen, S. A., Berthier, C., and Blaineau, S. (2001) *Pflugers Arch.* 441, 746-755
50. Yue, L., Melnyk, P., Gaspo, R., Wang, Z., and Nattel, S. (1999) *Circ. Res.* 84, 776-784
51. Pu, J. and Boyden, P. A. (1997) *Circ. Res.* 81, 110-119
52. Baroudi, G., Pouliot, V., Denjoy, I., Guicheney, P., Shrier, A., and Chahine, M. (2001) *Circ. Res.* 88, E78-E83
53. Brugada, J., Brugada, R., and Brugada, P. (1998) *Circulation* 97, 457-460

CHAPITRE IV

Cardiac troponin I, a novel component of the cardiac sodium channel protein complex

Note : Ce chapitre, présenté sous la forme d'un manuscrit prêt à la soumission pour une revue scientifique, résume une partie des travaux effectués dans le cadre de mon projet de doctorat. Plus spécifiquement, ce travail contient des expériences visant à atteindre mes objectifs de travail décrits dans le chapitre 1. Étant donné que ma contribution dans la conception (approches expérimentales), la réalisation (constructions plasmidiques et manipulations) et la rédaction (incluant le montage des figures) de ce travail est majoritaire, mon nom apparaît comme premier auteur sur le manuscrit. Toutefois, il est important de souligner l'apport très apprécié de mon collègue de laboratoire, M^r Hai Huang dans la réalisation des expériences de patch clamp.

VI.1 Résumé

Le canal sodique cardiaque ($\text{Na}_v1.5$) appartient à la famille des canaux sodiques dépendants du voltage et résistants à la tétrodothine. Il est exprimé de façon abondante dans différentes régions du cœur et joue un rôle déterminant dans la génération et la propagation du potentiel d'action. Des mutations au niveau du gène *SCN5A* qui code pour le canal sodique $\text{Na}_v1.5$ ont été identifiées chez des patients atteints de diverses maladies congénitales telles le syndrome du QT long, le syndrome de Brugada et les troubles de conduction qui peuvent provoquer des arythmies cardiaques et même la mort subite. Étant donnée son importance dans la rythmicité cardiaque et ses propriétés de conduction, il n'est pas surprenant que l'activité de $\text{Na}_v1.5$ soit soumise à une régulation rigoureuse par divers facteurs intrinsèques. En effet, de nombreuses protéines identifiées comme partenaires de ce canal modulent le niveau d'expression et les propriétés biophysiques de celui-ci. Dans cette étude, nous avons identifié grâce à la méthode du double hybride chez la levure un nouveau partenaire de $\text{Na}_v1.5$, à savoir la troponine I cardiaque (TnIc). Par la suite, nous avons confirmé cette interaction *in cyto* et *in vitro* par les méthodes d'immunoprécipitation et du "pull-down". Comme le montre clairement nos résultats, la TnIc interagit spécifiquement avec l'interdomaine I-II de $\text{Na}_v1.5$ et ce via sa région C-terminale (acides aminés de 158 à 210). Concernant, l'interdomaine I-II de $\text{Na}_v1.5$, deux régions (acides aminés 507 à 560 et 634 à 711) semblent être impliquées dans l'interaction avec la TnIc. Sur le plan fonctionnel, nous avons observé que la présence de la TnI modulait considérablement l'activité biophysique de $\text{Na}_v1.5$. En effet, la co-expression de la TnIc avec $\text{Na}_v1.5$ dans les cellules tsA201 induit un déplacement significatif de l'activation de ce canal. Toutefois, cet effet disparaît dès que la sous-unité β_1 est exprimée avec le complexe TnIc- $\text{Na}_v1.5$. Par conséquent, la présente étude est la première en son genre à montrer qu'une protéine importante dans le système contractile a un effet modulateur sur l'activité biophysique de $\text{Na}_v1.5$ d'une part et d'autre part le rôle de la sous-unité β_1 dans la stabilisation de cette interaction TnIc- $\text{Na}_v1.5$.

Cardiac troponin I, a novel component of the cardiac sodium channel protein complex

Rahima Ziane*, Hai Huang*, Georges Levesque[†] and Mohamed Chahine*[@]

*Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard and Département de Médecine, Université Laval, Québec City, Québec, Canada.

[†]Centre de Recherche du CHUL (CHUQ), Unité de Neurosciences, Québec, Canada

Running title: Identification of cardiac troponin I, a novel Nav1.5 interactor.

[@]Correspondence to:

Mohamed Chahine, Ph.D.

Le Centre de recherche Université Laval Robert-Giffard

Local F-6539

2601 chemin de la Canardière

Quebec City, QC, Canada, G1J 2G3

Tel.: (418) 663-5747, ext. 4723

Fax: (418) 663-8756

E-mail: mohamed.chahine@phc.ulaval.ca

IV.2 Abstract

The Na_v1.5 sodium channel belongs to the tetrodotoxin-resistant voltage gated sodium channel family. It is expressed abundantly in heart, where it plays a key role in the generation and propagation of the action potential. Given the importance of Na_v1.5 in the rhythmicity and conductivity of the heart, it is not surprising that its activity is regulated by several factors. It has been reported that numerous partners modulate the biophysical and expression properties of multiple voltage gated sodium channel subtypes. In this study, using yeast two-hybrid screens for proteins that bind with the cytoplasmic loop between domains I and II of Na_v1.5, we identified cardiac troponin I (cTnI) as an interacting partner of Na_v1.5. Cardiac troponin I is a central regulatory component of the actin microfilament complex in cardiac muscle cells and is also present in lower abundance in the cytoplasm. Furthermore, we demonstrated that cardiac troponin I selectively interacts with the I-II loop region of Na_v1.5 but not with its intracellular N-terminal and III-IV loop segments. Reciprocal co-immunoprecipitation experiments demonstrated that Na_v1.5 physically associates with cardiac troponin I in mammalian cells overexpressing troponin I. Mouse cardiac tissue GST pull-down binding assays further verified this interaction, and yeast two-hybrid analysis defined the corresponding interacting domains of the Na_v1.5 I-II loop and cardiac troponin I. Finally, using the patch-clamp technique, we showed that the expression of cTnI in tsA201 cells produces a significant hyperpolarizing shift in the voltage dependence of channel inactivation. This effect is lost in the presence of the β₁ subunit. Taken together, our findings demonstrate an unexpected and direct interaction between the Na_v1.5 channel and cardiac troponin I and suggest that cardiac troponin I acts as a regulatory subunit of the Na_v1.5.

IV.3 Introduction

Voltage-gated sodium channels are involved in the generation and propagation of electrical signals and muscle contraction. They are heteromeric membrane proteins consisting of a single pore-forming α -subunit (~260 kDa) and four auxiliary β -subunits (β_1 - β_4) (~30-35 kDa) that modulate channel function by changing their gating and cell surface expression. In mammals, nine genes encode highly homologous α -subunit isoforms ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$). These isoforms have remarkably comparable functional properties and are expressed in the central and peripheral nervous systems, while other isoforms are restricted to striated muscles (Yu & Catterall, 2003). The α -subunit comprises four homologous domains (DI-DIV), each of which consists of six transmembrane segments (S1-S6) and a pore-lining loop located between S5 and S6. The S4 segment in each domain includes positively charged amino acid residues at every third position and is thought to play an important role in channel activation, whereas the intracellular loop connecting homologous DIII and DIV is believed to act as a gate that inactivates voltage gated sodium channels (Guy & Seetharamulu, 1986; Yu & Catterall, 2003). Mutations in members of the sodium channel superfamily, like mutations in the cardiac sodium channel gene (*SCN5A*), are associated with various cardiac disorders, including long QT syndromes (LQTS), Brugada syndrome (BrS), conduction disorders, sudden infant death syndrome, and dilated cardiomyopathy (Brugada et al., 2005). However a large fraction of cases with inherited cardiac diseases cannot be explained by mutation of the *SCN5A* gene. Several recent studies demonstrated that $\text{Na}_v1.5$ activity is regulated by various “accessory partners”. Indeed, Mohler and colleagues identified a mutation of the gene encoding the membrane adaptor protein ankyrin-B as the cause of type 4 long QT syndrome in man (Mohler et al., 2004b). Likewise, dystrophin-deficient mdx^{Scv} mice present a decrease in $\text{Na}_v1.5$ protein level and sodium current (I_{Na}) and ECG alterations of conduction defects similar to those detected in up to 60% of Duchenne muscular dystrophy patients (Finsterer & Stollberger, 2003). Moreover, mutation of human $\text{Na}_v1.5$ (E1053K) abolishes the interaction of ankyrin-G with $\text{Na}_v1.5$ and generates the abnormal surface expression of $\text{Na}_v1.5$ cell that causes Brugada syndrome (Mohler et al., 2004a). In addition, coexpression of syntrophin $\gamma 2$ and $\text{Na}_v1.5$ modulates the gating kinetics and decreases the availability of Na^+ currents (Ou et al., 2003). Nedd4-2 also interacts with $\text{Na}_v1.5$ and increases the internalization rate of the channel in heterologous expression systems (Rougier et al., 2005). We recently demonstrated that $\text{Na}_v1.5$ is directly associated with α -actinin-2, an important regulatory element of the

cytoskeleton. These observations indicate that channel associated proteins are essential for the normal function and regulation of sodium channels.

Troponin I is a constituent of the troponin complex, which plays a critical role in regulating excitation-contraction coupling in the heart. Cardiac troponin I (cTnI) consists of 182-210 amino acid residues and shares high sequence homology with its isoforms, except for its N-terminus region, which is larger in the cTnI isoform (Vallins et al., 1990). The cTnI is restrictively expressed in cardiac tissue, where it is mostly bound to the contractile apparatus in the myocardium, but 6% to 8% of it is found free in the cytoplasm (Bleir et al., 1998). Cardiac TnI may be separated into two functionally distinct domains: the N-terminal domain, which plays a structural role in the troponin complex and binds to the C-terminal region of TnC, and the C-terminal domain, which plays a regulatory function and binds to the N-terminal region of TnC (Filatov et al., 1999). The structure and function of cTnI have been studied mostly because it is an important component in the cardiac contraction mechanism and is involved in heart disease (Farah & Reinach, 1995; Filatov et al., 1999). Moreover, the presence of cTnI in serum provides a specific and sensitive biochemical marker of acute myocardial infarction, and autosomal dominant mutations in cTnI have been described both in patients affected by hypertrophic and in restrictive cardiomyopathy (Mogensen et al., 2003; Mogensen et al., 2004; Kimura et al., 1997). Recent studies revealed that cTnI is also involved in other functions. Varsanyi and colleagues observed that troponin I, through its association with the ryanodine receptor, modulates Ca^{2+} release channel (Varsanyi et al., 2002). Similarly, Li and colleagues reported a direct interaction between troponin I and polycystin-2 channel (Li et al., 2003).

In the present study, we identified cardiac troponin I as a novel binding partner of cardiac sodium channel ($Na_v1.5$) by using yeast two-hybrid screen. Cardiac troponin I was found to interact directly and with high affinity with sodium channels, demonstrated by co-immunoprecipitation and *in vitro* recombinant protein binding assays. A binding site was identified on the cytoplasmic loop between domains I and II of $Na_v1.5$ subunit. We show that the $Na_v1.5$ /cTnI interaction altered the cardiac Na^+ channel function. Based on these findings, we propose that the cTnI protein is a new player in the regulation of cardiac Na^+ channel gating.

VI.4 Materials and Methods

VI.4.1 Yeast Two-Hybrid Assay

Plasmid constructs. Human SCN5A cDNA encoding the I-II loop domain (amino acids E417-K711, named LI-II) was used as template in all PCR amplifications used in construction of plasmids encoding full-length and various deletion fragments of I-II loop protein. PCR products were subcloned in pGBKT7 (Clontech) in frame with the open reading frame (ORF) encoding the GAL4 DNA binding domain (BD).

Yeast two-hybrid analysis. The MATCHMAKER 3 yeast two-hybrid system was purchased from Clontech. The GAL4 BD-LI-II fusion bait plasmid and GAL4 AD-human heart cDNA library prey plasmid were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (type **a**) and Y187 (type α), respectively, by the lithium acetate method. All transformant clones were grown on SD/-Trp-Leu plates and spread on SD/-Trp-Leu-His-Ade plates to estimate self-activation before assaying yeast mating. Briefly, the transformed yeast AH109 was mated with yeast Y187 in 2xYPDA medium, and diploid yeast was plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp-Leu-His-Ade) for selecting protein interaction. After 6-18 days of growth, plasmid DNAs from positive colonies were isolated and retransformed separately against the bait plasmid pGBKT7-LI-II, the empty plasmid pGBKT7, the negative controls, pGBKT7-LamC (human lamin C) and pGBKT7-p53 (murine p53), and the positive controls, such as pGADT7-T (simian virus 40 T antigen) and pGBKT7-p53 plasmids. Only clones positive in all the reporter assays were selected for potential interactions and sequenced. In the same way, the different truncated fragments of the I-II loop were subcloned in-frame into the GAL4 DNA binding domain of vector pGBKT7 as bait, while the full-length TnI3 and its different truncated fragments were constructed in the GAL4-activation domain of vector pGADT7 as prey. Transformants were grown on SD/-Trp-Leu-His-Ade, and then assayed to map precisely the domain of interaction.

IV.4.2 Molecular Biology

Cell culture and DNA transfection. TsA201, a mammalian cell line derived from human embryonic kidney HEK 293 cells by stable transfection with SV40 large T antigen, was grown in high glucose DMEM supplemented with fetal bovine serum (10%), L-glutamine (2 mM), penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (10 mg/ml) (Gibco BRL Life Technologies),

and incubated in a 5% CO₂ humid atmosphere incubator. The tsA201 cells were transfected by the calcium phosphate method. For the patch clamp studies, the transfections were performed according to a published protocol (Margolskee et al., 1993), with a few modifications (Chahine et al., 2004).

IV.4.3 Co-immunoprecipitation

TsA201 cells were transiently transfected with the full length Na_v1.5 and Myc-tagged with cardiac troponin I. Twenty four hours after transfection, cell were lysed in STEN buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1% [v/v] Triton X-100) supplemented with complete mini EDTA-free protease inhibitors (Roche Diagnostics) The cell lists were clarified by centrifuging at 13,000 x g for 15 min. Equal volumes of total protein (500 µl) from post-nuclear supernatants were incubated overnight with gentle rocking at 4°C with 2 µg III-IV loop (Upstate) or Myc monoclonal antibody sc-40 (Santa Cruz Biotechnology). Pre-blocked protein G/A-agarose beads (30 µl; Calbiochem) were added and the lysates were incubated for 4 h at 4°C with gentle rocking. The mixtures were centrifuged in a refrigerated microcentrifuge (1000 x g for 1 min) and the pellets were washed three times in cold STEN buffer. Samples from the pellets were resuspended in reducing sample buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 10% SDS, 0.1 bromophenol blue and 5% β-mercaptoethanol), boiled for 5 min, and then subjected to SDS-PAGE.

A similar method was followed for immunoprecipitation using mouse adult heart tissues (10 mg of total protein extracts), except that the membrane was probed with monoclonal cardiac troponin I antibody (1:2000; Fitzgerald).

IV.4.3 Immunoblots

Cell lysates or immunoprecipitated proteins were separated on 10% SDS-PAGE and transferred on PVDF membrane in 150 mM glycine, 20 mM Tris-base and 20% methanol for 2 h at 4°C. The blots were blocked for 1 h at room temperature with TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% (w/v) nonfat skim milk. The membranes were incubated with III-IV loop (1:500), Myc (1:2000) or TnI3 (1:2000) antibody for 1 h at room temperature and then with HRP-goat anti-rabbit or HRP-goat anti-mouse (1:10,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories) antibody for 1 h at room temperature. Reactive bands were detected using ECL chemiluminescence reagent according to the manufacturer's instructions (Amersham).

IV.4.4 Recombinant protein production and GST-pull-down assay

A PCR-amplified cDNA fragment encoding the full length Na_v1.5 I-II loop (amino acids 417-711) and another encoding the C-terminal fragment of Na_v1.5 I-II loop (amino acids 610-711) were cloned, separately and in frame with Glutathione-S-Transferase (GST), in pGEX-3X vector (Amersham Biosciences) using *Bam*HI and *Eco*RI sites. These constructs were transformed into bacterial strain BL21 (DE3). The bacterial culture was induced for 1h at 37°C by 1 mM of isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Following induction, the bacterial pellets were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and sonicated for 3x20 sec on ice in lysis buffer (PBS, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L-PMSF) supplemented with complete protease inhibitor (Roche). The bacterial protein extracts were precleared by centrifugation at 13,000 g for 15 min. GST and GST-full length Na_v1.5 I-II loop or GST-C-terminus fragment of Na_v1.5 I-II loop were purified on glutathione-sepharose beads (Amersham Biosciences). TsA201 cells were transfected with cTnI, and after 24 h they were lysed in STEN buffer. Insoluble material was pelleted by centrifugation (15 min at 13,000 x g), and the lysates were precleared with GST bound to glutathione-sepharose beads. The precleared lysates were then incubated for 3 h at 4°C with GST-full length Na_v1.5 I-II loop or GST-C-terminus fragment of Na_v1.5 I-II loop fusion protein or GST alone, attached to glutathione-Sepharose beads, washed extensively in STEN buffer, and analyzed by western blotting using anti-troponin I mouse monoclonal or anti-GST antibody (1:20,000; Amersham, Pharmacia).

IV.4.5 Na current recordings

The macroscopic Na currents of transfected tsA201 cells were recorded using the whole-cell configuration of the patch clamp technique as previously described (Chahine et al., 2004). Briefly, patch electrodes were made from 8161 Corning borosilicate glass and coated with Sylgard (Dow-Corning) to minimize their capacitance. Patch clamp recordings were made using low resistance electrodes (<1 MΩ), and a routine series resistance compensation using an Axopatch 200 amplifier (Molecular Devices) was performed to values >80% to minimize voltage-clamp errors. Voltage-clamp command pulses were generated by microcomputer using pCLAMP software v8.0 (Molecular Devices). Na currents were filtered at 5 kHz, digitized at 10 kHz, and stored on a microcomputer equipped with an AD converter (Digidata 1300, Molecular Devices). The data were analyzed using a combination of pCLAMP

software v9.0 (Molecular Devices), Microsoft Excel, and SigmaPlot for Windows version 8.0 (SPSS Inc).

IV.5 Results

IV.5.1 Identification of cTnI as a novel binding partner for Na_v1.5 by a yeast two-hybrid screening

The I-II loop connects the domains I and II of Na_v1.5 (Na_v1.5 LI-II). This cytoplasmic region corresponds approximately to the 295-amino acid residues that contain eight PKA phosphorylation sites and three endoplasmic reticulum (ER) retention motifs (Figure 1A). To identify proteins that physically interact with Na_v1.5 LI-II, we performed a yeast two-hybrid screen. The Na_v1.5 LI-II fused in frame to the GAL4 DNA binding domain (GAL4-BD) was used as a bait to screen 1 x 10⁶ clones of a human heart cDNA prey library using high-stringency. After eliminating redundancy, false reading frame artifacts, and clones representing *E. coli* or noncoding genomic DNA contaminants of the cDNA library, 12 preys were chosen for additional analysis. Eight out of the twelve clones selected encoded the full-length cardiac troponin I (Table 1, supplemental data). Secondary, yeast cotransformation experiments were done to identify false-positive interactions between Na_v1.5 LI-II and cardiac troponin I (cTnI) attributable to nonspecific interactions. For this purpose, the Na_v1.5 LI-II DNA binding domain plasmid was cotransfected into AH109 yeast with cTnI DNA activation domain (GAL4-AD) plasmid and a positive interaction was determined by scoring for growth on standard quadruple dropout medium lacking leucine, tryptophan, histidine, and adenine (-TLHA). As shown in Fig. 2B, an interaction was detected between cTnI and Na_v1.5 LI-II but not between cTnI and empty plasmid. Large T antigen and p53 protein plasmids represented de facto positive controls. These results clearly suggest that our screen had been effective at finding true Na_v1.5 LI-II interactor and cTnI was identified as a valid Na_v1.5 LI-II interactor in yeast.

Similarly, we explored whether cTnI interacts with other regions of Na_v1.5 like N-terminus and III-IV loop. Unfortunately, no binding was detected between the cTnI and these regions of Na_v1.5 (Supplemental data).

IV.5.2 Mapping of the interaction site on the I-II Loop of Na_v1.5 channel and on the cardiac TnI by a yeast two-hybrid.

To precisely define the region of I-II loop responsible for the interaction with full-length cTnI, we constructed seven plasmids encoding truncated cytoplasmic fragments of I-II loop fused to the GAL4 DNA binding domain as described by Allouis and colleagues (Allouis et al., 2006) (Fig. 2A). The truncated proteins carrying amino acids 504 to 573 and 610 to 711 interacted with cTnI, while the four peptides carrying amino acids 445 to 488, 468 to 507, 417 to 507 and 560 to 633 did not interact, as determined by growth on the quadruple dropout medium lacking leucine, tryptophan, histidine, and adenine (-TLHA). The N-terminal portion of I-II loop residues (417 to 467) was eliminated because this protein undergoes self auto-activation in yeast (Fig. 2B). Taken together, these results suggest that the C-terminal portion of I-II loop residues (507 to 560 and 634 to 711) is necessary and sufficient for association with cTnI.

In the same way, we constructed five plasmids encoding truncated cytoplasmic fragments of cTnI fused to the GAL4 DNA activation domain (Fig. 3A) as has been reported previously (Li et al., 2003). Positive result was obtained only with proximal C-terminal truncated protein, indicating that residues 158 to 210 of cTnI were sufficient to interact with the full-length I-II loop (Fig. 3B). Thus, this 52 amino acids segment of the proximal C terminus is likely to form an interaction site for the II loop and may contain the molecular determinants for the interaction of cTnI with the I-II loop polypeptide of Na_v1.5.

IV.5.3 The amino acid residues (417 to 711 and 610 to 711) of I-II loop are essential for the Na_v1.5-cTnI interaction.

Having determined that residues 417 to 711 and 610 to 711 of Na_v1.5 I-II loop were participated in interaction with full-length cTnI in the yeast two-hybrid assay, we proceeded to confirm this interaction by an *in vitro* binding assay. GST pull-down assays were performed from adult mouse heart or tsA201 cell lysate using GST-I-II loop fusion proteins (Figure 4). The GST-tagged I-II loop proteins, either full-length [GST-LI-II (417-711)] or the truncated form [GST-LI-II (610-711)] were expressed and purified (Fig. 4, upper panel) where the Myc-tagged cTnI was transiently transfected into tsA201 cells. The solubilized heart tissue and cell extracts were

then incubated with immobilized GST-tagged I-II loop proteins or GST alone (negative control). The bound substances were then eluted and analyzed by Western blot using a monoclonal antibody against Myc. As shown in Fig. 4, an immunoreactive band of ~26 kDa corresponding to the full-length cTnI could be detected in the crude extracts from heart or tsA201 cells mouse homogenates (Crude). This band was detected in pull-down assays when tissue or cell lysates were incubated with full-length GST-LI-II (Figs. 4A and B, lower panel, lanes 1 and 2 respectively) and GST-LI-II (610-711) (Fig. 4B, lower panel, lane 1), but was not observed with GST beads alone (Figs 4A and B, lower panel, lanes 2 and 3 respectively). Therefore, these results are consistent with that of the yeast two-hybrid experiments (Fig. 2) and indicate that the carboxyterminal domain of Na_v1.5 I-II loop protein directly associate with cTnI

IV.5.4 Specific interaction between Na_v1.5 channels and cTnI *in cyto* and *in vivo*.

We next investigated whether cTnI binds to Na_v1.5 in mammalian cells and adult mouse heart by immunoprecipitation (IP)(Fig. 5). TsA201 cells were transiently transfected with either Na_v1.5, myc-tagged cTnI, or both constructs and the resulting complexes were immunoprecipitated from cell extracts using anti-III-IV linker antibody or rabbit pre-serum IgG control. The bound proteins were then detected by Western blot analysis using anti-Myc and anti-III-IV linker antibodies. Figure 5A shows that the anti-III-IV linker antibody, but not the control IgG or, precipitated a ~26 kDa Myc-tagged cTnI (lower panel, lanes 1 and 2, respectively). Reciprocal co-immunoprecipitation was also performed; the anti-myc antibody was used for immunoprecipitation, and the anti-III-IV linker antibody was used for Western blot analysis (Fig. 5B). Na_v1.5 protein was successfully precipitated by the anti-myc antibody, but not by the mouse pre-serum negative control (Fig. 5B, lower panel, 1 and 2, respectively). In lysates from singly transfected cells, anti-III-IV linker antibody did not immunoprecipitate myc-tagged cTnI and anti-myc antibody did not immunoprecipitate Na_v1.5 (Figs. 5A and B, lower panel, lane 3). For comparison, soluble extracts from tsA201 cells co-expressing Na_v1.5 and myc-tagged cTnI were added in separate lane and shown both cTnI and Na_v1.5 signals (Crude). These data demonstrate that myc-tagged cTnI formed a complex with Na_v1.5 in mammalian cells expressing both proteins and suggest that an association between cTnI and Na_v1.5 might occur *in vivo*. To

address this possibility, adult mouse heart tissues were homogenized in STEN buffer and the III-IV linker specific antibody was used to immunoprecipitate the Na_v1.5 channel complex. The bound proteins were then detected by Western blot analysis with an anti-cTnI antibody. As shown in Fig. 5C, immunoreactive band corresponding to cTnI protein was detected in the IP fraction with anti-III-IV linker antibody, but not in the IP fraction with rabbit pre-serum control (lower panel). This specific immunoreactivity indicates an interaction between Na_v1.5 and cTnI *in vivo*.

IV.5.5 cTnI does not alter sodium current density in a mammalian expression system.

The observations that cTnI binds to the I-II intracellular loop of Na_v1.5 and that cTnI and Na_v1.5 form a complex *in cyto* and *in vivo*, prompted us to explore whether this interaction modulates Na_v1.5 currents. For this reason, Na_v1.5 channels were co-expressed together with cTnI in tsA201 cells and were compared with Na_v1.5 channels that were co-expressed with EBO empty vector (control vector). Whole-cell sodium currents were measured in cells transiently co-transfected with Na_v1.5 plus empty vector or Na_v1.5 plus cTnI (Figure 6). Functional association of the cTnI protein with Na_v1.5 channel did not significantly alter the current density of the peak Na⁺ current. As shown in Figures 6A and B, the Na⁺ current density (expressed as peak current normalized to cell capacitance, pA/pF) across the range of test potentials was -52.6 pA/pF (n = 6) for Na_v1.5 plus control vector and -59.8 pA/pF for Na_v1.5+cTnI (n = 6, *p* = not significant), respectively.

IV.5.6 Effects of cTnI on the voltage-gating properties of Na_v1.5 in transfected tsA201 cells.

To further examine the effects of cTnI on Na_v1.5 gating, steady-state activation and inactivation, intermediate inactivation and recovery from intermediate inactivation were evaluated using the pulse protocols shown in the *insets* of Fig. 6C and Fig. 7. A very small shift in the positive direction was observed in the midpoint activation curve ($V_{1/2act}$: -56.23 ± 1.43 mV versus -55.05 ± 0.30 mV, n = 6; *k* (slope): -6.09 ± 0.25 mV versus -7.40 ± 0.21 mV; Fig. 6C) (Table 1). This shift is not statistically significant (*p* = 0.21). Steady-state inactivation was recorded using a two-

pulse protocol with 500 ms conditioning depolarizing pulses from -140 to -30 mV followed by a test pulse to +30 mV (Figure 6C). cTnI elicited a significant 12.5 mV depolarizing shift in the steady-state inactivation curve from -101.11 ± 0.86 mV ($n = 6$) to -113.26 ± 1.38 ($n = 6$) ($p < 0.01$), with no significant difference in the slope factor between control (5.45 ± 0.23 mV) and cTnI group (5.37 ± 0.33 mV). Additional experiments were performed to characterize intermediate inactivation and recovery from intermediate inactivation (Figure 7). Intermediate inactivation was examined using a two-pulse protocol illustrated in Figure 7A (inset) that includes an initial conditioning prepulse to -30 mV, followed by a 20 ms step to -140 mV to remove fast inactivation, and a final test pulse to -30 mV. There is no difference in slow inactivation parameters between control and cTnI groups (277.61 ± 56.83 ms versus 262.92 ± 57.13 ms, $n = 6$, $p =$ not significant; Table 1). Similarly, the time course of recovery from intermediate inactivation was not changed ($\tau = 8.49 \pm 1.18$ ms ($n = 6$) versus 11.6 ± 1.66 ms ($n = 6$), $p =$ not significant; Table 1), as this was assessed by 20 ms test pulses to -30 mV applied after variable recovery intervals (Fig. 7B). In summary, the functional association of cTnI with $\text{Na}_v1.5$ causes a significant hyperpolarizing shift in the voltage-dependent inactivation of the channel.

IV.5.7 Co-expression of β_1 subunit abolishes the effect of cTnI on inactivation gating of $\text{Na}_v1.5$

Further experiments were carried out to explore whether the presence of β_1 subunit alters $\text{Na}_v1.5$ -cTnI interaction in the tsA201 cells. As illustrated in Figure 8A and B, co-expression of β_1 subunit with $\text{Na}_v1.5$ alone and $\text{Na}_v1.5$ +cTnI had no significant effect on current magnitude (-96.1 ± 6.6 pA/pF ($n = 6$) versus -99.3 ± 5.2 pA/pF; $n = 7$; Table 1) or steady-state activation ($V_{1/2\text{act}}$: -54.87 ± 2.12 mV, $n = 6$ versus -56.98 ± 2.36 mV, $n = 7$; Table 1) (Figure 8C). In contrast, co-expression of β_1 subunit with $\text{Na}_v1.5$ +cTnI abrogated the effects of cTnI on channel inactivation gating and the midpoint of the steady-state inactivation curve was not significantly different from control ($V_{1/2\text{inact}}$: -100.71 ± 1.28 mV, $n = 6$ versus -99.11 ± 1.79 mV, $n = 7$; Table 1) (Figure 8C). No change in the intermediate inactivation and recovery from intermediate inactivation was observed between the presence and in the absence of β_1 subunit (Figs.9A and B). Thus, the presence of β_1 subunit seems to disrupt the effect of cTnI on the steady-state inactivation of $\text{Na}_v1.5$.

IV.6 Discussion

IV.6.1 Cardiac Sodium Channel Associates with Cardiac Troponin I

Troponin I belongs to the troponin family, which includes three isoforms that are differentially expressed in fast and slow skeletal muscle fibers. The expression of cardiac troponin I is restricted to cardiac muscle. Cardiac troponin I (cTnI) is a key regulatory protein in cardiac muscle contraction and relaxation, linking the binding of Ca^{2+} to troponin C activation of cross bridge reactions with the thin filament (Parmacek & Solaro, 2004). In the present study, a direct interaction between the cardiac voltage-dependent Na^+ channel $\text{Na}_v1.5$ and cardiac troponin I was identified using a two-hybrid screen. The physical association of $\text{Na}_v1.5$ with cTnI was also confirmed by co-immunoprecipitation and *in vitro* assays using recombinant proteins, whereas functional studies using the whole-cell patch-clamp configuration brought further light to the regulation of $\text{Na}_v1.5$ activity by cTnI.

Further yeast two-hybrid complementation experiments showed that the cTnI-binding region of $\text{Na}_v1.5$ mapped to residues 507-560 and 634-711, which encompass ER-retention motifs (RRR at positions 533 to 535 and RQR at 659 to 661) and six consensus sites for phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase (PKA). There are thirteen consensus sites for phosphorylation of serine or threonine by PKA having the motif $(\text{R/K})_{1-2}(\text{X})_{1-2}(\text{S/T})$ and $(\text{R/K})_2(\text{X})(\text{S/T})$, (where R is arginine, S/T is serine or threonine, X is any amino acid) and three endoplasmic reticulum retention motifs (ER) in $\text{Na}_v1.5$ I-II loop (Fitzgerald et al., 1999; Smith & Goldin, 2000; Zhou et al., 2002). Despite the presence of these phosphorylation sites, there is no evidence showing that binding of cTnI to its target depends on phosphorylation of serine or threonine. Phosphorylation of S^{525} and S^{528} in $\text{Na}_v1.5$ I-II loop and the presence of ER-retention sites are essential for the PKA-mediated rise in cardiac Na^+ current, an effect that likely involves interaction with other I-II loop associated proteins or region of the channel (Zhou et al., 2002). Furthermore, Zhou and colleagues hypothesized that phosphorylation of PKA sites flanking the RXR motif of $\text{Na}_v1.5$ I-II loop may contribute to the assembly of $\text{Na}_v1.5$ α -subunit with other proteins, possibly by masking the ER retention signals and thereby modulate channel expression. So, additional

experiments will be needed to determine whether any of the PKA and/or ER-retention sites are involved in Na_v1.5 I-II loop-cTnI interaction such as recombinant cTnI binding experiments with Na_v1.5 I-II loop bearing multiple mutations in the PKA binding site and/or ER retention site. In contrast, cTnI failed to interact with other regions of Na_v1.5 like N-terminal region or cytoplasmic loop III-IV (Figure 1, supplemental data).

IV.6.2 C-terminal domain of cTnI is required for Na_v1.5 binding

The C-terminal region of cTnI is highly conserved between isoforms suggesting that it might have functional importance, especially in protein-protein interaction (Farah & Reinach, 1995). Here, we demonstrated that the distal C-terminal residues 158-210 of cTnI were critical for Na_v1.5 I-II loop binding. Similarly, Li and colleagues showed that the amino acids 1-107 and 106-210 are required for cTnI binding to polycystin-L channel (Li et al., 2003). The C-terminal region of cTnI is also involved in the interaction with troponin C (amino acids 161-178 and 191-210) and actin (amino acids 173-181) (Gomes & Potter, 2004). Residues 151-198 (cTnI C-terminal) was also found to be essential for full inhibitory activity and Ca²⁺-sensitivity of cardiac myofilaments (Gomes & Potter, 2004). Hence, the cTnI C-terminal segment seems to play a pivotal role in activation of cardiac myofilaments and mutations in this region lead to an altered interaction within the actin-troponin-tropomyosin complex and thus cause either severe diastolic dysfunction and restrictive cardiomyopathy, or myocardial hypertrophy (reviewed in Solaro, 1999 and Gomes & Potter, 2004). In another study, the S199N mutation was reported to cause sudden cardiac death, left ventricular dysfunction or arrhythmia in the affected family (Mogensen et al., 1999). Interestingly, these clinical symptoms were similar to those of sudden unexplained death. Overall, it is likely that cTnI C-terminal plays a role in heart failure-dependent arrhythmias involving Na_v1.5. However, further investigation is needed in order to confirm this hypothesis.

Finally, sequence alignment of the C-terminal region of cTnI, involved in Na_v1.5 binding (residues 158-210), shows that cTnI shares 71% amino acid identity with slow skeletal muscle troponin (Data not shown). Therefore, it is most likely that slow skeletal muscle troponin, which is also expressed in heart, can also interact with Na_v1.5 I-II loop.

IV.6.3 CTnI specifically modulates the steady-state inactivation of Na_v1.5

The interaction between cTnI and Na_v1.5 is critical for the physiological function of Na_v1.5. Co-expression of cTnI in tsA201 cells with Na_v1.5 was shown to acutely shift the steady-state inactivation curve of Na_v1.5 toward depolarized potentials but has no effect on activation or intermediate inactivation of sodium channels. Likewise, phosphorylation of Ser¹⁵⁰⁵ in the cytoplasmic III-IV loop of the cardiac sodium channel by protein kinase C causes a strong shift of steady-state channel inactivation (Qu et al., 1994; Qu et al., 1996). In addition, phosphorylation of serine residues in Na_v1.2 I-II loop by PKA is mediated by AKAP15, which targets PKA to the channel (Tibbs et al., 1998). In our case, the cTnI-interacting sequences in Na_v1.5 I-II loop contain several residues (e.g. Ser⁵²⁶ and Ser⁵²⁹) that have been reported to be phosphorylated by PKA. Hence, it is possible that the binding of cTnI to the Na_v1.5 I-II loop might recruit a kinase to the channel complex to phosphorylate Ser⁵²⁶ or Ser⁵²⁹, or possibly other residues, and influence the inactivation of the channel. The identity of the kinase that might be targeted to Na_v1.5 remains to be further investigated.

Another novel finding in the present study is that the co-expression of β_1 subunit with Na_v1.5+cTnI abolishes the functional effects of cTnI on the channel. Taking together these results, two different modes of action can be considered for β_1 subunit: (1) direct competition with cTnI for the α -subunit of Na_v1.5 or (2) allosteric modulation of the formation of the complex. Effective competition is expected if the β_1 subunit binds to Na_v1.5 I-II loop with higher affinity than cTnI. Na_v1.5 and the auxiliary subunit β_1 are present in cardiac myocytes (Malhotra et al., 2001; Maier et al., 2004). But very little is known about the sites of interaction between β_1 and α -subunits. Until now, the interaction between α and β_1 subunits is thought to be mediated by the extracellular P-loop of domain IV (McCormick et al., 1998; Qu et al., 1999) or by the C-terminal domain of the Na⁺ channel α -subunit (Spampanato et al., 2004). Co-expression of β_1 subunit with Na_v1.5 results in significant shifts in the voltage-dependence of steady-state inactivation (An et al., 1998; Malhotra et al., 2001) and/or in the rate of recovery from inactivation (Fahmi et al., 2001; Ko et al., 2005). Other groups have reported that expression of Na_v1.5 in oocytes produces channels that inactivate rapidly in the absence of β_1 subunit (Qu et al., 1995). So according to these results, the differential effects of β_1 subunit may be due to the different binding sites for β_1 subunit in the pore forming α -subunit. Another explanation is that the β_1 subunit may form an

allosteric binding interface with the α -subunit of $\text{Na}_v1.5$ which reduces the binding affinity of $\text{Na}_v1.5$ to cTnI.

Although our identification and characterization of the interaction between cTnI and $\text{Na}_v1.5$ in heterologous expression systems supports an important role in modulating sodium channel gating, we do not yet know to what extent such an interaction occurs in the intact heart. Indeed, the low level of free cytoplasmic cTnI expression in heart (Bleier et al., 1998) may be functionally important. Hence, it is essential to determine whether overexpression of cTnI in the heart under pathological conditions or by transgenic techniques is sufficient to cause physiological changes similar to those of the Long QT syndrome.

IV.7 Figure Legends

Figure IV.7.1 Cardiac troponin I is a novel partner of Na_v1.5. (A) Representative amino acid sequence of I-II loop of human cardiac Na⁺ channel (Na_v1.5). The Na_v1.5 I-II loop polypeptide (amino acid residues 417-711) contains 13 consensus sites for phosphorylation by PKA and 3 endoplasmic retention motifs (RXR sites). Phosphorylation site motif for PKA was identified as (R/K)₁₋₂(X)₁₋₂(S/T) in which the amino acids for S/T are indicated by the bold character while the underlined amino acids represent the RXR sites. (B) The Na_v1.5 I-II loop fragment interacts with cardiac troponin I (cTnI) in the yeast two-hybrid system. To confirm the Na_v1.5 I-II loop/cTnI interaction identified by yeast two-hybrid screen, Na_v1.5 I-II loop fused to the pGBKT7 (bait) and cTnI fused to the Gal4 AD (prey) were co-transformed into yeast strain AH109. Yeast colony growth was determined in medium lacking essential amino acids, tryptophan and leucine, which are encoded by each plasmid (-TL, transformation control) or medium that lacked tryptophan, leucine, histidine and adenine (-TLHA). Binding of cTnI to Na_v1.5 I-II loop is indicated by yeast colony growth on -TLHA medium. No colony growth on this selection medium was detected in the negative controls with bait and empty prey vector (pGADT7) or prey and empty bait vector (pGBKT7). The known interaction between pGBKT7-p53 and pGADT7-T served as a positive control. All growth assays were repeated three times with identical results. BD: binding domain; AD: activation domain.

A

417 EEQNQATIAE TEEKEKRFQE AMEMLKKEHE ALTIRGVDTV SRSSLEMSPL
467 APVNSHERRS KRRKRMSSGT EECGEDRLPK SDSEDGPRAM NHLSLTRGLS
517 RTSMKPRSSR GSIFTFRRRD LGSEADFADD ENSTARESES HHTSLLVPWP
567 LRRTSAQGQP SPGTSAPGHA LHGKKNSTVD CNGVVSLLGA GDPEATSPGS
617 HLLRPVMLEH PPDTTTPSEE PGGPQMLTSQ APCVDGFEEP GARQRALSAV
667 SVLTSALEEL EESRHKCPPC WNRLAQRILI WECCOLWMSI KQGVK

B

Bait: Loop I-II
Prey: cTnI

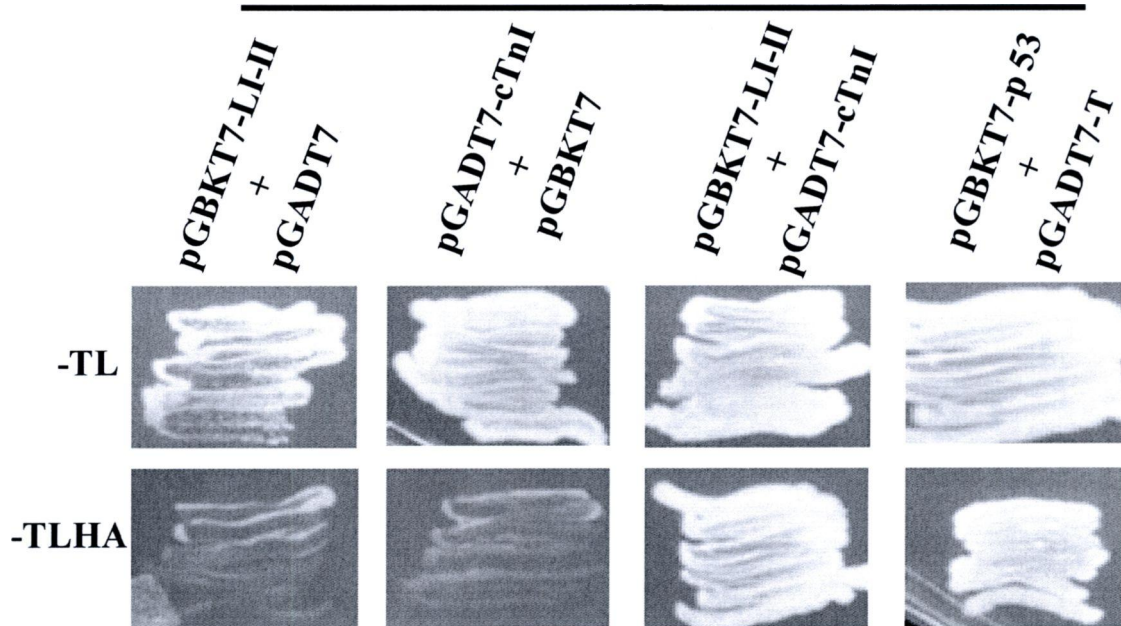


Figure IV.2 Mapping the cTnI binding region on Na_v1.5 I-II loop. (A) Schematic representation of domains responsible for the interaction between Na_v1.5 I-II loop and cTnI. (B) Interaction between various Na_v1.5 I-II loop and cTnI domains was examined by the yeast two-hybrid analysis. The cTnI domain was constructed in the pGADT7 and those of Na_v1.5 I-II loop in pGBKT7 vector. Next, all the Na_v1.5 I-II loop constructs were co-transformed with cTnI into AH109 yeast and growth on selective medium lacking tryptophan, leucine, histidine and adenine (-TLHA). Interaction strength is indicated as follows: +++, very strong; ++, medium interaction; +, weak interaction. The positive interaction between pGADT-cTnI and pGBKT-L417-467 was false, because pGBKT-417-467 was self-activated. The start and termination amino acid residue numbers for each domain are indicated. LI-II: Na_v1.5 I-II loop. All growth assays were repeated three times with identical results.

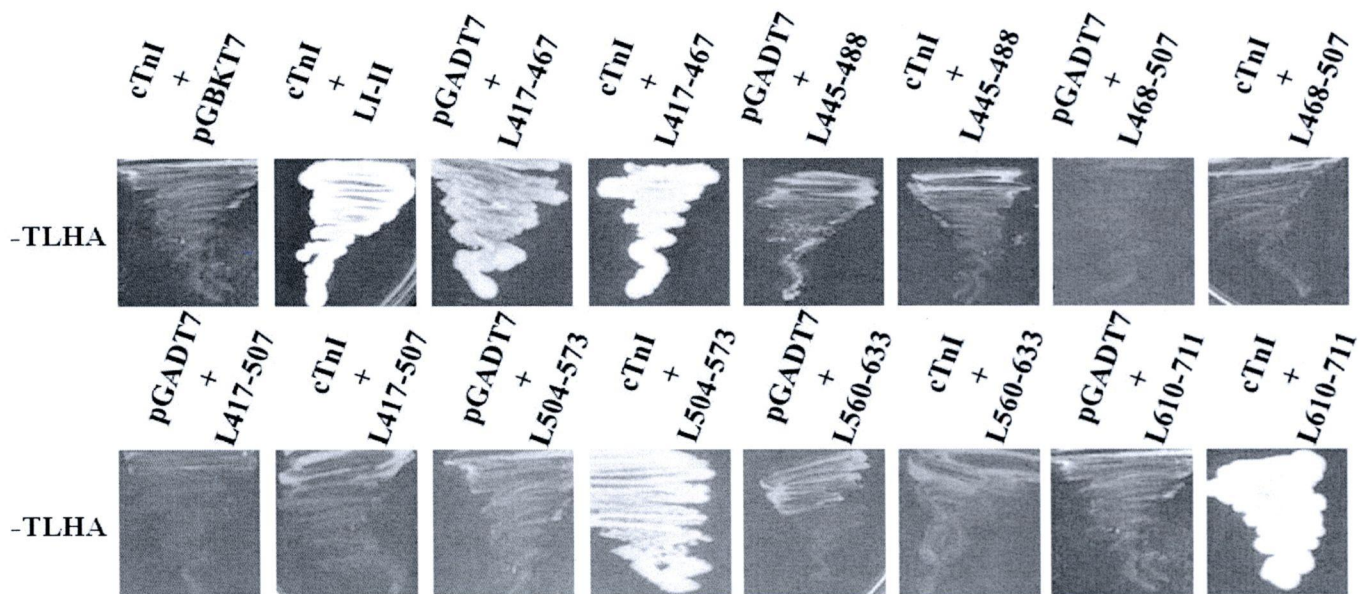
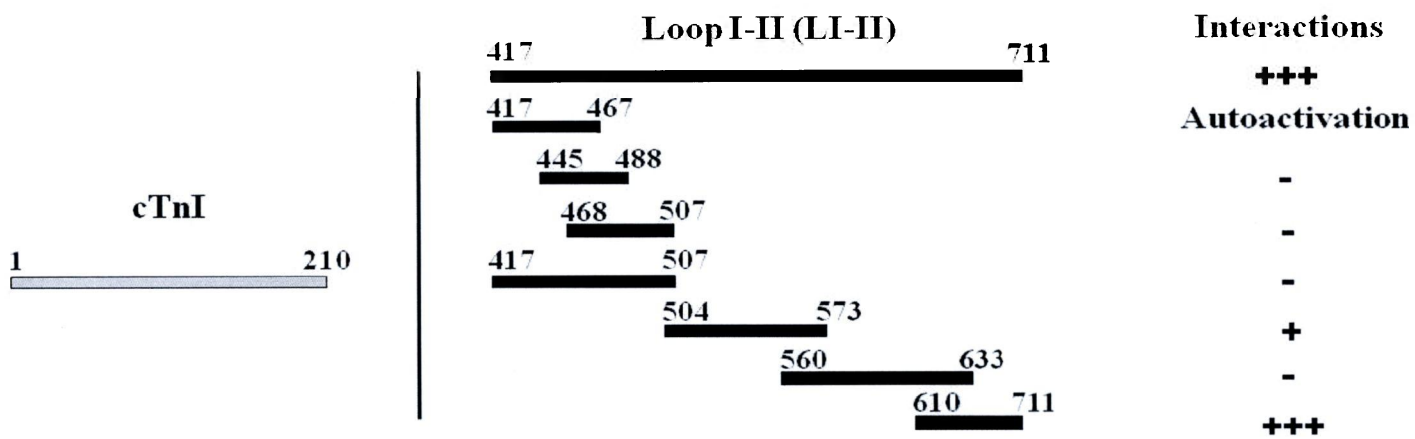


Figure IV.3 Mapping the Na_v1.5 I-II loop binding region on cTnI. (A) Schematic representation of domains responsible for the interaction between Na_v1.5 I-II loop and cTnI. (B) Interaction between various cTnI domains and Na_v1.5 I-II loop was examined by the yeast two-hybrid analysis. Various cTnI truncations constructs were co-transformed with full-length Na_v1.5 I-II loop (pGBKT-LI-II) into AH109 yeast and growth on selective medium lacking tryptophan, leucine, histidine and adenine (-TLHA). The start and termination amino acid residue numbers for each domain are indicated. “+++”, “+”, and “-” indicate strong, weak, and no interaction, respectively. T: cTnI; LI-II: Na_v1.5 I-II loop. All growth assays were repeated three times with identical results.

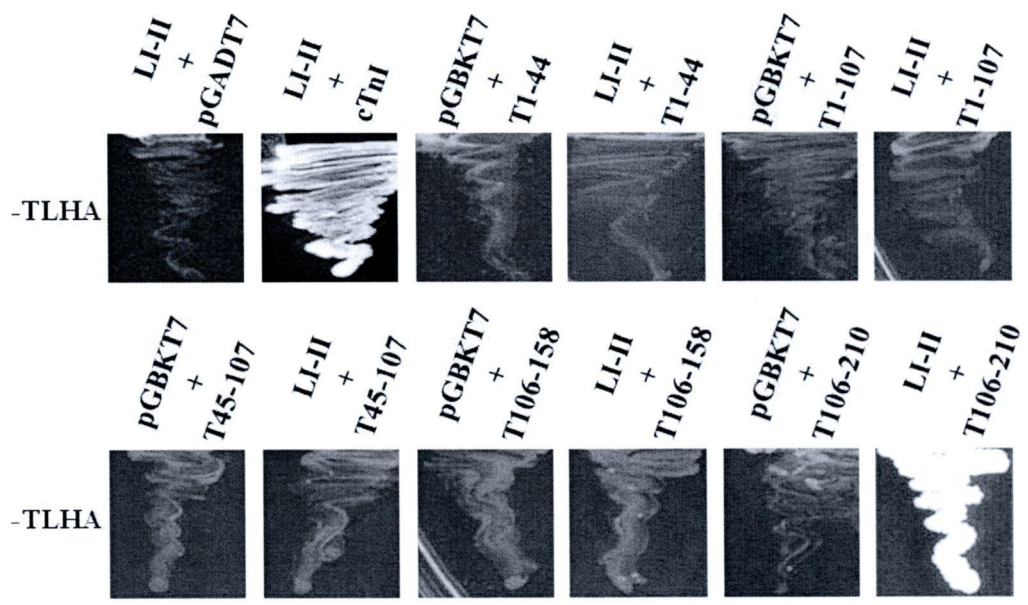
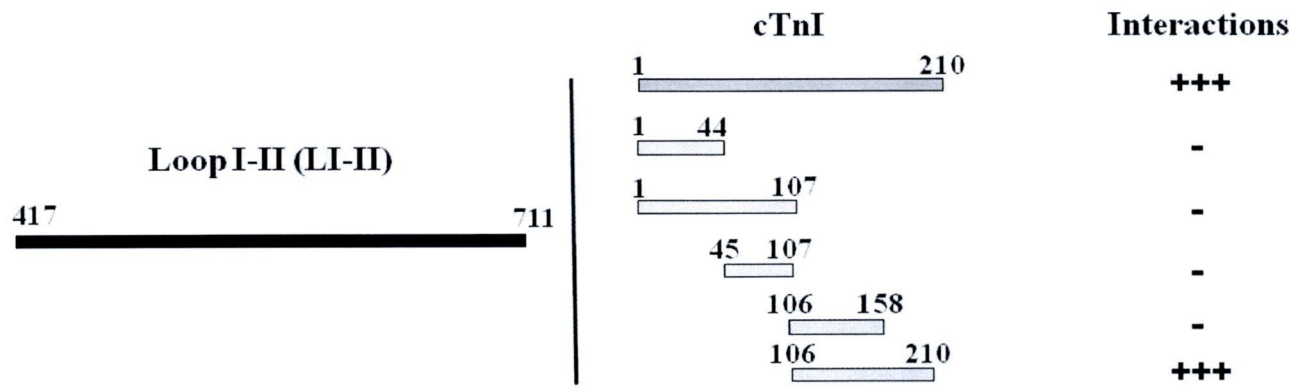
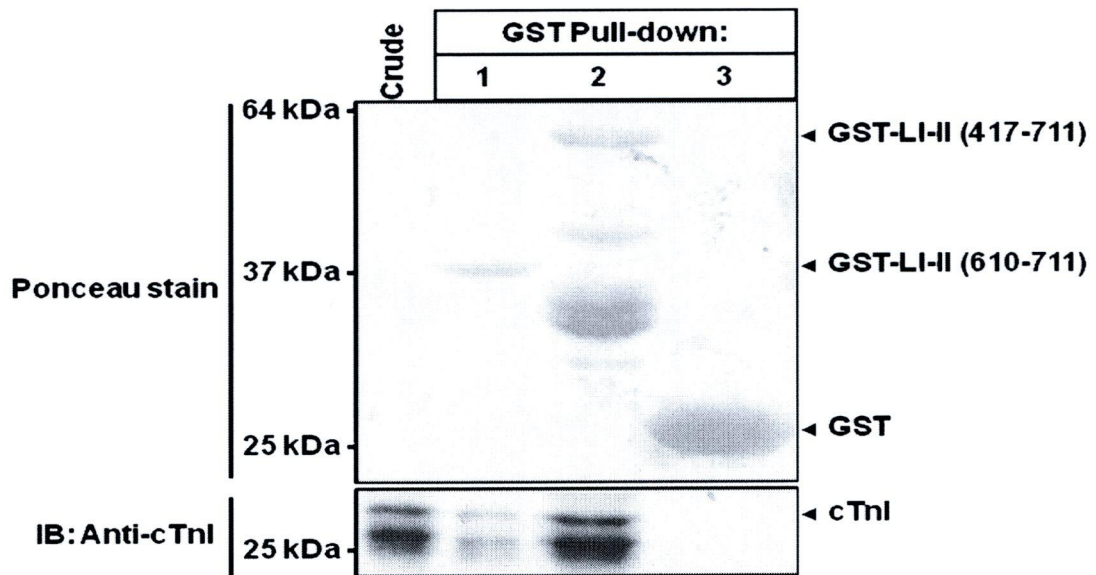


Figure IV.4 Cardiac Troponin I binds to the I-II Loop polypeptide of Na_v1.5 *in vitro*. (A) GST-Pull down assay of cTnI from tsA201 cells. Ponceau stain shows expression of purified GST-LI-II (417-711), GST-LI-II (610-711) and GST used as bait (lanes 1, 2 and 3; top) with tsA201 cell lysates transfected with a plasmid encoding cTnI (Crude, lanes 1, 2 and 3). Samples were separated by SDS-PAGE and then probed with monoclonal myc antibody (bottom). Cardiac troponin I was specifically pulled down from tsA201 lysate incubated with glutathione beads coupled to GST-LI-II (417-711) or GST-LI-II (610-711) but not GST alone (negative control). (B) Investigation of the interaction between GST Na_v1.5 loop I-II recombinant proteins and cTnI in cardiac muscle from adulte mice. Full-length GST-LI-II (417-711) is able to bind cTnI. but not GST (lanes 1 and 2). Arrows indicate the position of Na_v1.5 and cTnI immunoreactive bands. IB: immunoblot. Three separate experiments yielded similar results.

A



B

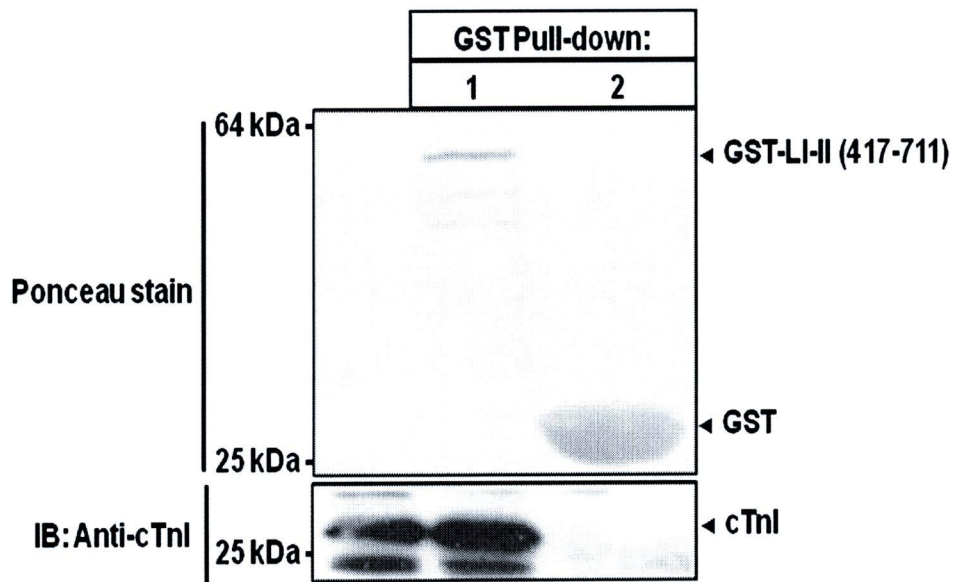
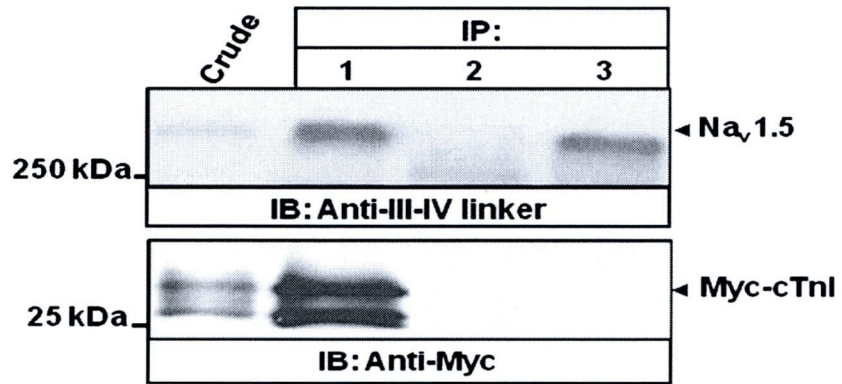
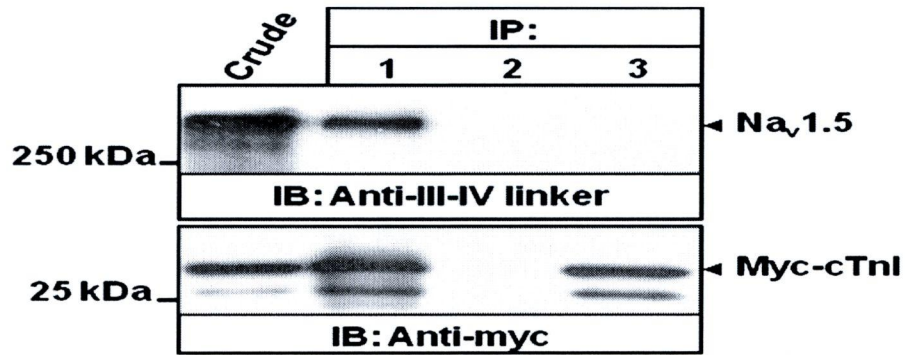


Figure IV.5 Na_v1.5 co-immunoprecipitates cTnI from transfected tsA201 cell lysates and mouse heart. (A) TsA201 cell lysates transfected with either Na_v1.5 and myc-tagged cTnI vectors (lanes 1, 2) or Na_v1.5 alone (lane 3) were immunoprecipitated with polyclonal anti-III-IV linker antibody (lanes 1, 3) or rabbit pre-serum control (lane 2). Western blot show the expression of Na_v1.5 with polyclonal anti-III-IV linker antibody (top) and cTnI was detected using monoclonal myc antibody (bottom). The crude extracts (Crude) show the expression of Na_v1.5 and cTnI in the whole-cell lysates, using their corresponding antibodies as a positive control. Lanes 1 and 2 show that cTnI was brought down by anti-III-IV linker antibody but not by the IgG serum (negative control). Polyclonal anti-III-IV linker antibody failed to immunoprecipitate cTnI from tsA201 cells singly transfected with Na_v1.5 (lane 3). **(B)** Reciprocal co-immunoprecipitation with an anti-myc antibody for immunoprecipitation and the anti-III-IV linker antibody for Western blotting. The anti-myc antibody successfully precipitated Na_v1.5 but not the pre-immune serum (lanes 1 and 2, respectively). No signal was detected in the anti-myc antibody precipitate obtained from cells singly transfected with myc-tagged cTnI (lane 3). **(C)** Mouse heart cell lysate was used to pull down Na_v1.5 (top) and cTnI (bottom). The total lysate (Crude) and immunoprecipitated proteins were run on SDS-PAGE and immunoblotted with either anti-III-IV linker (top) or anti-cTnI (bottom) antibody. IgG lane represent the immunoprecipitation assay performed in the absence of the primary antibody (lane 1). The anti-III-IV linker antibody recognizes cTnI (lane 2). Arrows indicate the position of Na_v1.5 and myc-tagged cTnI immunoreactive bands. IP: immunoprecipitation; IB: immunoblot. Three separate experiments yielded similar results.

A



B



C



Figure IV.6 Analysis of whole-cell currents recorded from tsA201 cell line expressing Na_v1.5/WT with or without cardiac Troponin I. (A) I_{Na} from Na_v1.5/WT (left) and Na_v1.5/WT with cardiac troponin I (right), was elicited by depolarizing pulses from -100 mV to +50 mV in 10 mV increments. (B) Current-voltage relationship of Na_v1.5/WT (●, n=6) and Na_v1.5/WT with cardiac troponin I (○, n=6). The current amplitude was normalized to the membrane capacitance. (C) Voltage-dependence of steady-state activation and inactivation in Na_v1.5/WT (● for activation, n=6; ■ for inactivation, n=6) and Na_v1.5/WT with cardiac troponin I (○ for activation, n=6; □ for inactivation, n=6). Activated currents were generated from a holding potential of -140 mV, following 50 ms voltage steps from -100 to +20 mV in 10 mV increments (see protocol as inset). Voltage-dependence of inactivation was obtained by measuring the peak Na⁺ current during a 20 ms test pulse to -30 mV, which followed a 500 ms pre-pulse to membrane potentials between -140 and -30 mV from a holding potential of -140 mV (see protocol as inset). The data were fitted to a Boltzman equation with parameters shown in Table 1.

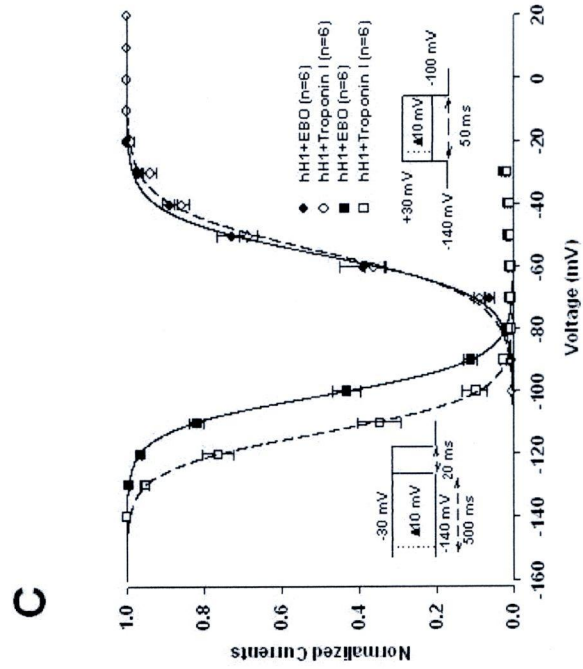
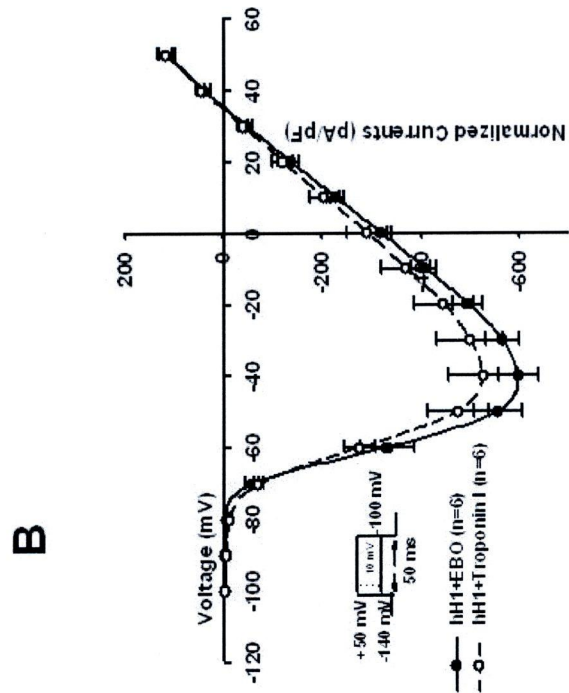
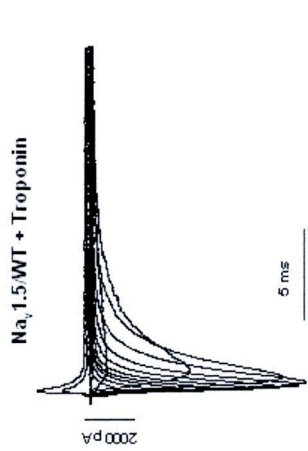
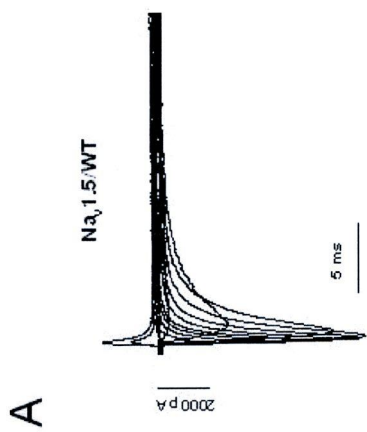


Figure IV.7 The gating properties of intermediate inactivation and recovery from intermediate inactivation. (A) Intermediate inactivation in Na_v1.5/WT (●, n=6) and Na_v1.5/WT with cardiac troponin I (○, n=6). A two-pulse protocol was used with a variable conditioning pre-pulse to -30 mV ranging from 2 to 1000 ms, followed by a 20 ms step to -140 mV and a 40 ms test pulse to -30 mV (see protocol as inset). The time constants (shown in table 2) were yielded by a mono-exponential function, $y = y_0 + A \cdot \exp(-t/\tau)$. (B) Time courses of recovery from intermediate inactivation in Na_v1.5/WT (●, n=6) and Na_v1.5/WT with cardiac troponin I (○, n=6). A 500 ms conditioning pre-pulse was used to monitor recovery by a 20 ms test pulse after a variable recovery interval from 1-1000 ms (see protocol as inset). The time constants (shown in Table 1) were yielded by a mono-exponential function, $y = y_0 + A \cdot (1 - \exp(-t/\tau))$.

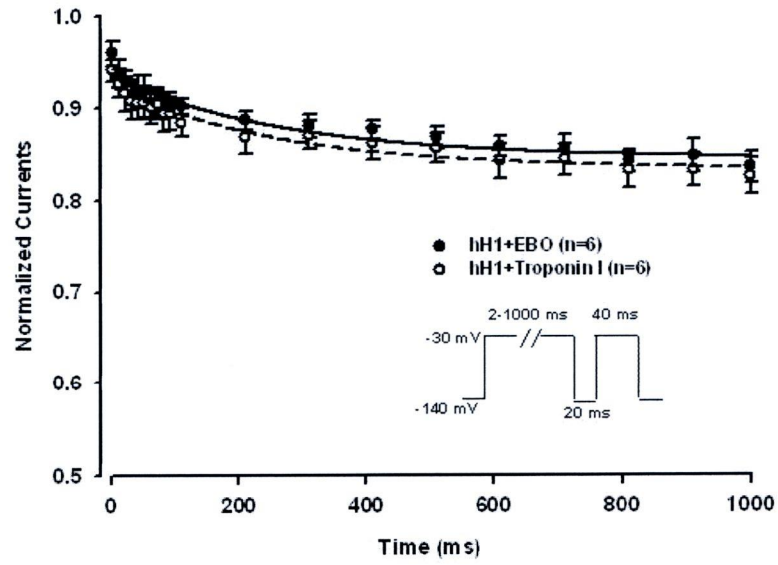
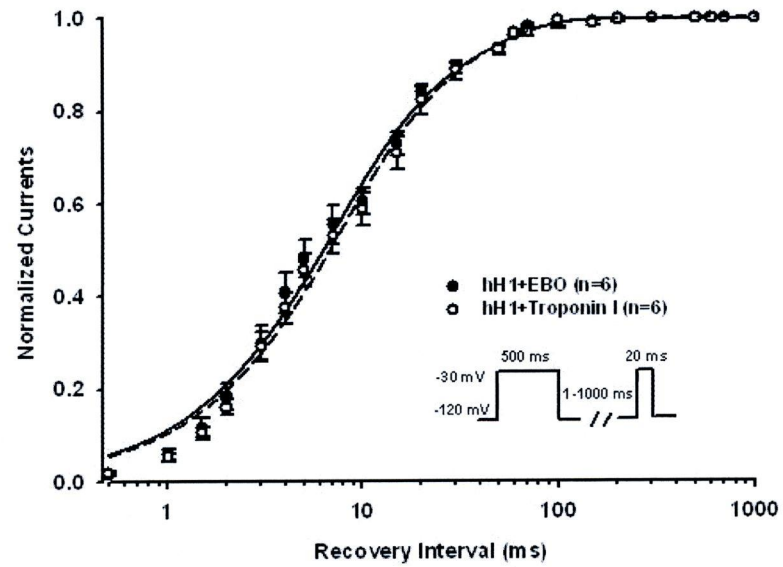
A**B**

Figure IV.8 Analysis of whole-cell currents recorded from tsA201 cell line expressing $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ with or without coexpression of cardiac troponin I. (A) I_{Na} from $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ (left) and $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ with coexpression of cardiac troponin I (right), was elicited by depolarizing pulses from -100 mV to +50 mV in 10 mV increments. (B) Current-voltage relationship of $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ (●, n=6) and $\text{Na}_v1.5/\text{WT} + \beta_1$ with co-expression of cardiac troponin I (○, n=7). The current amplitude was normalized to the membrane capacitance. (C) Voltage-dependence of steady-state activation and inactivation in $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ (● for activation, n=6; ■ for inactivation, n=6) and $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ with coexpression of cardiac troponin I (○ for activation, n=7; □ for inactivation, n=7). Activated currents were generated from a holding potential of -140 mV, following 50 ms voltage steps from -100 to +20 mV in 10 mV increments (see protocol as inset). Voltage-dependence of inactivation was obtained by measuring the peak Na^+ current during a 20 ms test pulse to -30 mV, which followed a 500 ms pre-pulse to membrane potentials between -140 and -30 mV from a holding potential of -140 mV (see protocol as inset). The data were fitted to a Boltzman equation with parameters shown in Table 1.

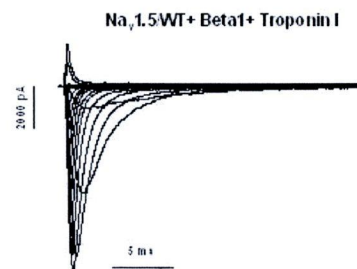
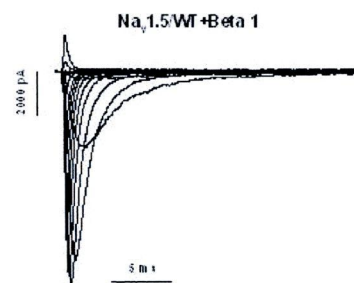
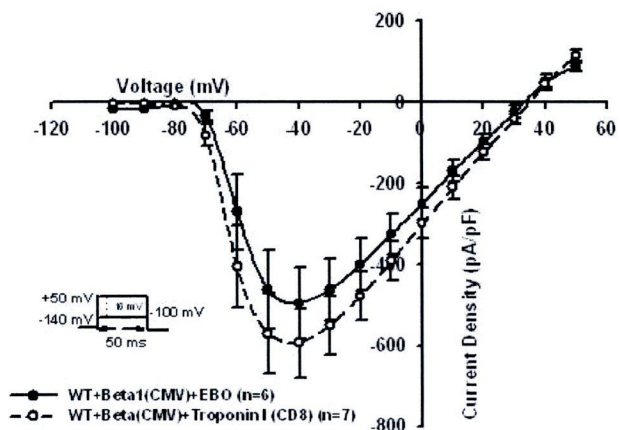
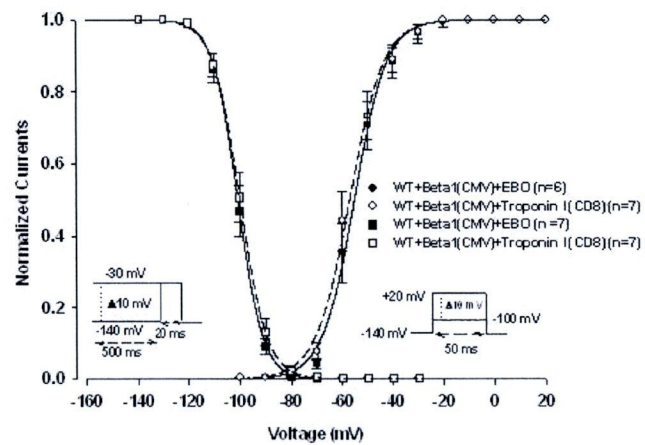
A**B****C**

Figure IV.9 The gating properties of intermediate inactivation and recovery from intermediate inactivation. (A) Intermediate inactivation in $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ (\bullet , $n=6$) and $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ with coexpression of cardiac troponin I (\circ , $n=7$). A two-pulse protocol was used with a variable conditioning pre-pulse to -30 mV ranging from 2 to 1000 ms, followed by a 20 ms step to -140 mV and a 40 ms test pulse to -30 mV (see protocol as inset). The time constants (shown in table 1) were yielded by a mono-exponential function, $y = y_0 + A \cdot \exp(-t/\tau)$. (B) Time courses of recovery from intermediate inactivation in $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ (\bullet , $n=6$) and $\text{Na}_v1.5/\text{WT}+\beta_1$ with coexpression of cardiac troponin I (\circ , $n=7$). A 500 ms conditioning pre-pulse was used to monitor recovery by a 20 ms test pulse after a variable recovery interval from 1-1000 ms (see protocol as inset). The time constants (shown in Table 1) were yielded by a mono-exponential function, $y=y_0+A \cdot (1-\exp(-t/\tau))$.

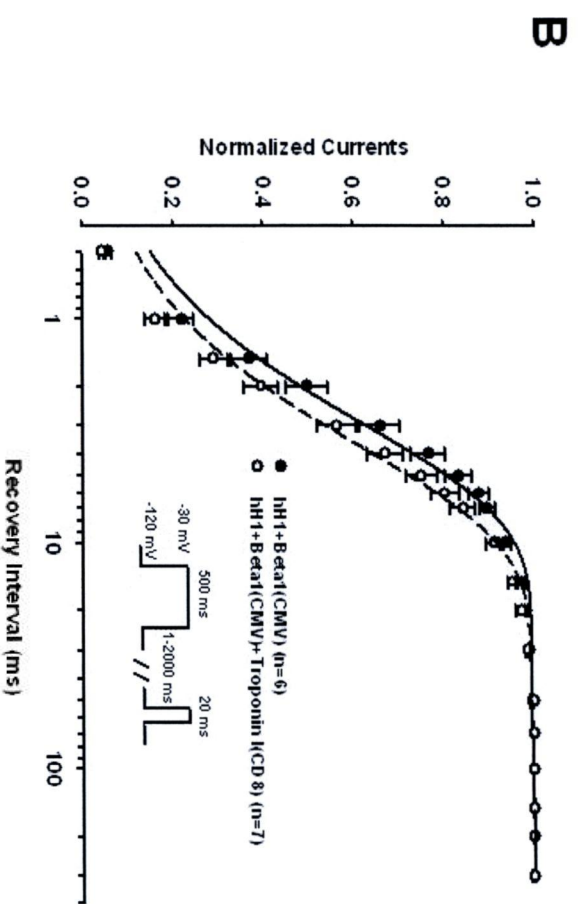
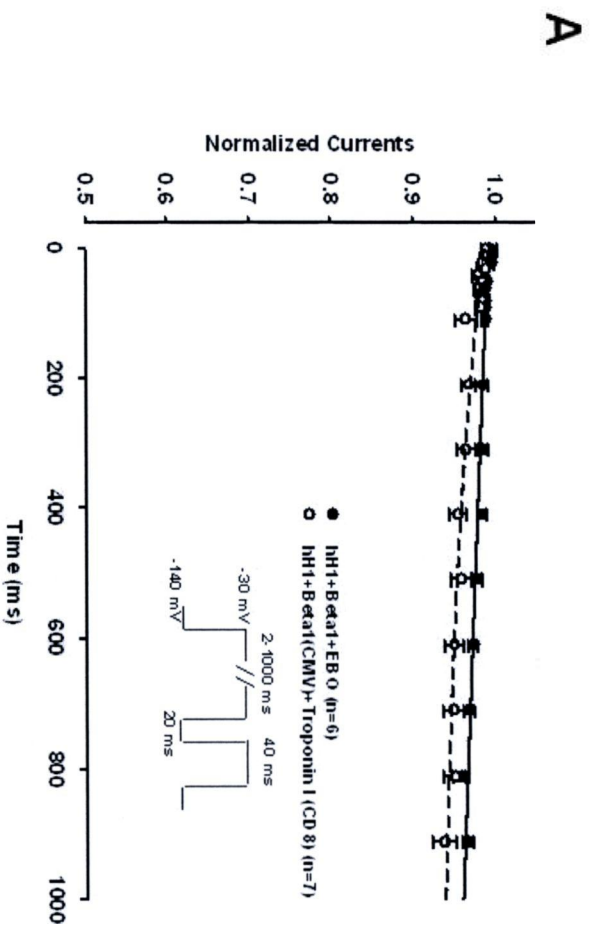


Table VI.1: Biophysic proprieties of cardiac sodium channel ($\text{Na}_v1.5$) expressed alone or eitherwith cTnI, beta subunit (β_1) or in combination with both (cTnI+ β_1).

	Na _v 1.5-WT (n=6)	Na _v 1.5-WT+Troponin I (n=6)	Na _v 1.5-WT+β1 (n=6)	Na _v 1.5-WT+β1+Troponin I (n=7)
<i>Steady-state activation</i>				
$V_{1/2}$ (mV)	-56.23 ± 1.43	-55.05 ± 0.30	-54.87 ± 2.12	-56.98 ± 2.36
K (mV)	-6.09 ± 0.25	-7.40 ± 0.21	-5.89 ± 0.84	-5.73 ± 0.46
<i>Steady-state inactivation</i>				
$V_{1/2}$ (mV)	-101.11 ± 0.86	-113.26 ± 1.38 **	-100.71 ± 1.28	-99.11 ± 1.79
K (mV)	5.45 ± 0.23	5.37 ± 0.33	4.45 ± 0.13	4.17 ± 0.52
<i>Slow inactivation</i>				
τ (ms)	277.61 ± 56.83	262.92 ± 57.13	397.61 ± 69.85	325.92 ± 54.05
<i>Recovery from intermediate inactivation</i>				
τ (ms)	8.49 ± 1.18	11.60 ± 1.66	2.55 ± 0.32	3.77 ± 0.47

$V_{1/2}$ = mid point for activation or inactivation

K_v = slow factor for activation or inactivation

τ = time constant

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

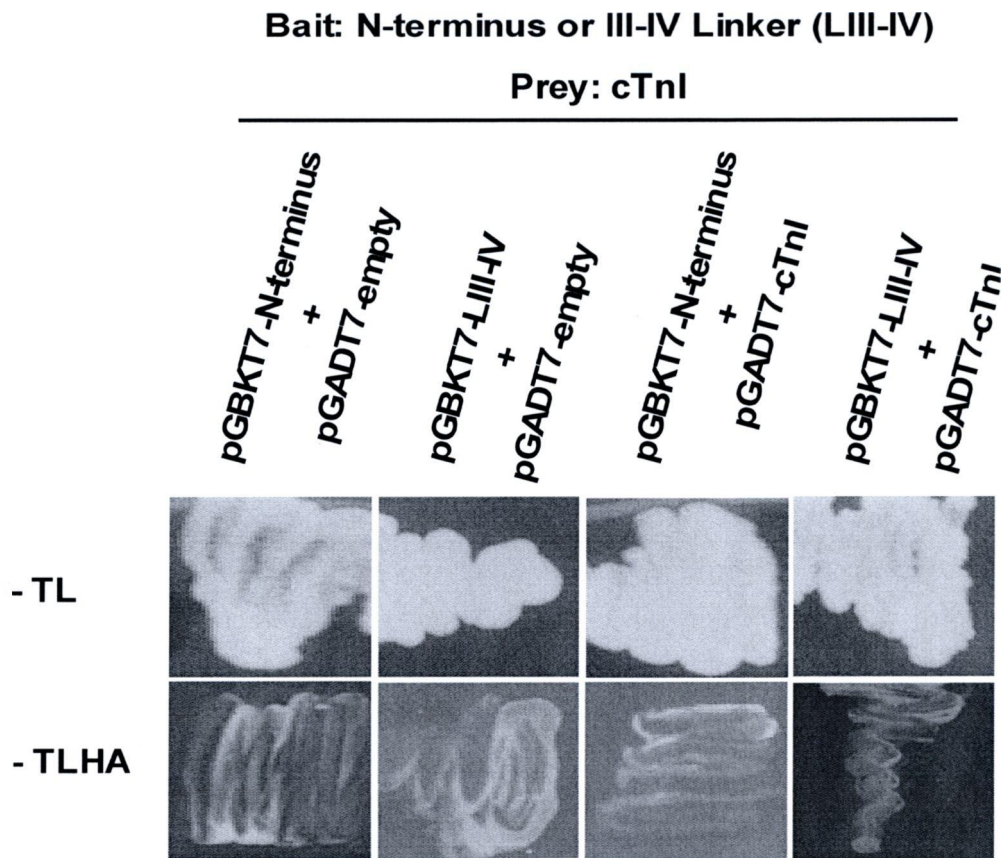
IV.8 Supplemental data

Table IV.2 Proteins identified using the yeast two-hybrid screen of a cardiac human cDNA library using the loop I-II region of Na_v1.5 as bait.

Hits #	Name of the protein identified	GenBank number
8	Troponin I, cardiac variant [<i>Homo sapiens</i>]	AK223451
2	Lysosomal associated protein transmembrane 4 beta (LAPTM4B) [<i>Homo sapiens</i>]	BC038117
1	Eukaryotic initiation factor 5A isoform I variant A [<i>Homo sapiens</i>]	AY129319
1	Connective tissue growth factor [<i>Homo sapiens</i>]	NM_001901

The number of hits represents the number of positive yeast clones for the identified protein.

Figure VI.10 A yeast two-hybrid assay was used to investigate the interaction between regions on the N-terminus domain or the III-IV linker of Na_v1.5 and cTnI. Yeast cells were co-transformed with plasmid pairs coding for the indicated proteins fused to Gal4 BD or Gal4 AD. Transformants were then selected on selective dropout plates lacking histidine and adenine (-TLHA). Empty plasmids were used as an auto-activation control. The positive and negative controls were the same as those described in figure VI.1. BD: binding domain; AD: activation domain.



IV.9 Reference

- Allouis M, Le BF, Wilders R, Peroz D, Schott JJ, Noireaud J, Le MH, Merot J, Escande D, & Baro I** (2006). 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circ Res* **98**, 1538-1546.
- An RH, Wang XL, Kerem B, Benhorin J, Medina A, Goldmit M, & Kass RS** (1998). Novel LQT-3 mutation affects Na⁺ channel activity through interactions between a and b 1-subunits. *Circ Res* **83**, 141-146.
- Bleier J, Vorderwinkler KP, Falkensammer J, Mair P, Dapunt O, Puschendorf B, & Mair J** (1998). Different intracellular compartmentations of cardiac troponins and myosin heavy chains: a causal connection to their different early release after myocardial damage. *Clin Chem* **44**, 1912-1918.
- Brugada P, Brugada R, Antzelevitch C, & Brugada J** (2005). The Brugada Syndrome. *Arch Mal Coeur Vaiss* **98**, 115-122.
- Chahine M, Pilote S, Pouliot V, Takami H, & Sato C** (2004). Role of arginine residues on the S4 segment of the *Bacillus halodurans* Na⁺ channel in voltage-sensing. *J Membr Biol* **201**, 9-24.
- Fahmi AI, Patel M, Stevens EB, Fowden AL, John JE, III, Lee K, Pinnock R, Morgan K, Jackson AP, & Vandenberg JI** (2001). The sodium channel b-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *J Physiol* **537**, 693-700.
- Farah CS & Reinach FC** (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J* **9**, 755-767.
- Filatov VL, Katrukha AG, Bulargina TV, & Gusev NB** (1999). Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry (Mosc)* **64**, 969-985.
- Finsterer J & Stollberger C** (2003). The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology* **99**, 1-19.
- Fitzgerald EM, Okuse K, Wood JN, Dolphin AC, & Moss SJ** (1999). cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J Physiol* **516**, 433-446.
- Guy HR & Seetharamulu P** (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 508-512.

Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, & Sasazuki T (1997). Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **16**, 379-382.

Ko SH, Lenkowski PW, Lee HC, Mounsey JP, & Patel MK (2005). Modulation of Na(v)1.5 by b1- and b3-subunit co-expression in mammalian cells. *Pflügers Arch* **449**, 403-412.

Li Q, Liu Y, Shen PY, Dai XQ, Wang S, Smillie LB, Sandford R, & Chen XZ (2003). Troponin I binds polycystin-L and inhibits its calcium-induced channel activation. *Biochemistry* **42**, 7618-7625.

Maier SKG, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, & Catterall WA (2004). Distinct subcellular localization of different sodium channel a and b subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* **109**, 1421-1427.

Malhotra JD, Chen C, Rivolta I, Abriel H, Malhotra R, Mattei LN, Brosius FC, Kass RS, & Isom LL (2001). Characterization of sodium channel a- and b-Subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* **103**, 1303-1310.

Malhotra JD, Kazen-Gillespie K, Hortsch M, & Isom LL (2000). Sodium channel b subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J Biol Chem* **275**, 11383-11388.

Margolskee RF, McHendry-Rinde B, & Horn R (1993). Panning transfected cells for electrophysiological studies. *Biotechniques* **15**, 906-911.

McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T, & Catterall WA (1998). Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the b1 subunit. *J Biol Chem* **273**, 3954-3962.

Mogensen J, Bahl A, & McKenna WJ (2003). Hypertrophic cardiomyopathy-the clinical challenge of managing a hereditary heart condition. *Eur Heart J* **24**, 496-498.

Mogensen J, Murphy RT, Shaw T, Bahl A, Redwood C, Watkins H, Burke M, Elliott PM, & McKenna WJ (2004). Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **44**, 2033-2040.

Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, Lemaillet G, Lambert S, Priori SG, & Bennett V (2004a). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17533-17538.

Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, Priori SG, Keating MT, & Bennett V (2004b). A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9137-9142.

Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang J, Ishida M, Hiai H, Matsumori A, Minato N, & Honjo T (2003). Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* **9**, 1477-1483.

Ou Y, Strege P, Miller SM, Makielski J, Ackerman M, Gibbons SJ, & Farrugia G (2003). Syntrophin g2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem* **278**, 1915-1923.

Parmacek MS & Solaro RJ (2004). Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Prog Cardiovasc Dis* **47**, 159-176.

Qu Y, Isom LL, Westenbroek RE, Rogers JC, Tanada TN, McCormick KA, Scheuer T, & Catterall WA (1995). Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in *Xenopus* oocytes by b1 subunits. *J Biol Chem* **270**, 25696-25701.

Qu Y, Rogers J, Tanada T, Scheuer T, & Catterall WA (1994). Modulation of cardiac Na⁺ channels expressed in a mammalian cell line and in ventricular myocytes by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3289-3293.

Qu Y, Rogers JC, Chen SF, McCormick KA, Scheuer T, & Catterall WA (1999). Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel α subunit in voltage-dependent gating and modulation by b1 subunits. *J Biol Chem* **274**, 32647-32654.

Qu Y, Rogers JC, Tanada TN, Catterall WA, & Scheuer T (1996). Phosphorylation of S1505 in the cardiac Na⁺ channel inactivation gate is required for modulation by protein kinase C. *J Gen Physiol* **108**, 375-379.

Rougier JS, van Bemmelen MX, Bruce MC, Jespersen T, Gavillet B, Apothéloz F, Cordonier S, Staub O, Rotin D, & Abriel H (2005). Molecular Determinants of Voltage-Gated Sodium Channel Regulation by the Nedd4/Nedd4-like Proteins. *Am J Physiol* **288**, C692-C701.

Smith RD & Goldin AL (2000). Potentiation of rat brain sodium channel currents by PKA in *Xenopus* oocytes involves the I-II linker. *Am J Physiol* **278**, C638-C645.

Solaro RJ (1999). Troponin I, stunning, hypertrophy, and failure of the heart. *Circ Res* **84**, 122-124.

Spampanato J, Kearney JA, de Haan G, McEwen DP, Escayg A, Aradi I, MacDonald BT, Levin SI, Soltész I, Benna P, Montalenti E, Isom LL, Goldin AL, & Meisler MH (2004). A novel epilepsy mutation in the sodium channel *SCN1A* identifies a cytoplasmic domain for β subunit interaction. *J Neurosci* **24**, 10022-10034.

Tibbs VC, Gray PC, Catterall WA, & Murphy BJ (1998). AKAP15 anchors cAMP-dependent protein kinase to brain sodium channels. *J Biol Chem* **273**, 25783-25788.

Vallins WJ, Brand NJ, Dabhade N, Butler-Browne G, Yacoub MH, & Barton PJ (1990). Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction. *FEBS Lett* **270**, 57-61.

Varsanyi M, Sarkozi S, Szegedi C, Herzog A, & Jona I (2002). Troponin I converts the skeletal muscle ryanodine receptor into a rectifying calcium release channel. *FEBS Lett* **515**, 155-158.

Yu FH & Catterall WA (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* **4**, 207.

Zhou J, Shin HG, Yi J, Shen W, Williams CP, & Murray KT (2002). Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ Res* **91**, 540-546.

Chapitre V

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les avancées des connaissances concernant les protéines associées à $\text{Na}_v1.5$ ont mis en exergue leur incroyable capacité à réguler ce canal. Le cas des ankyrines illustre parfaitement cette évolution. Jusqu'à présent, cinq partenaires privilégiés de $\text{Na}_v1.5$ ont été identifiés et caractérisés. Certains ont un rôle crucial dans l'électrophysiologie cardiaque au point qu'une mutation sur l'une de ces protéines peut avoir des conséquences aussi délétères qu'une mutation sur la protéine canal. C'est le cas par exemple, d'une mutation dans la sous-unité auxiliaire des canaux sodiques, à savoir la sous-unité β_4 , qui est à l'origine du syndrome du QT long (Lopez-Santiago et al., 2007). Au cours de cette thèse, nous avons enrichi la liste des partenaires potentiels de $\text{Na}_v1.5$ par deux protéines: l' α -actinine-2 et la troponine cardiaque I. Le rôle présumé de ces nouveaux associés de $\text{Na}_v1.5$ sera discuté dans les paragraphes V.1 et V.2.

V.1 Alpha Actinine-2 (α -actn-2)

V.1.1 Caractérisation de l'Interaction entre l' α -Actinine-2 et $\text{Na}_v1.5$

Une approche basée sur le double hybride chez la levure a permis d'identifier l' α -actinine-2 comme un nouveau partenaire du canal sodique dépendant du voltage ($\text{Na}_v1.5$) (Chapitre III). L'utilisation de cellules tsA201 exprimant le canal $\text{Na}_v1.5$ et l' α -actinine-2, des expériences de co-immunoprécipitation, d'overlay et de pull-down ont montré que l' α -actinine-2 s'associait directement à la porte d'inactivation de $\text{Na}_v1.5$ *in cyto*, *in vivo* et *in vitro*. Nous avons également observé que le domaine spectrine de l' α -actinine-2 est requis pour que l'interaction $\text{Na}_v1.5/\alpha$ -actinine-2 ait lieu. Ce résultat concorde avec ceux observés pour les canaux potassiques (Cukovic et al., 2001), les récepteurs NMDA (Wyszynski et al., 1998) ou le canal polycystine 2 (Li et al., 2005). De plus, l'étude structurale de l' α -actinine-2 constitue un argument en faveur d'un rôle du domaine spectrine dans le recrutement de divers partenaires de l' α -actinine-2 (Ylanne et al., 2001). En effet, cette étude suggère que la présence de nombreux résidus acides au sein de ce domaine pourrait être à l'origine de son interaction avec les nombreuses protéines transmembranaires.

L' α -actinine-2 est l'archétype des protéines du cytosquelette. Elle est exprimée exclusivement dans le cerveau, le muscle cardiaque et le muscle squelettique (Mills et al., 2001; Sorimachi et

al., 1997). Dans le tissu cardiaque, l' α -actinine-2, composant principal des stries Z, possède trois fonctions principales: 1) le maintien de l'intégrité structurale des cardiomyocytes via ses interactions avec diverses protéines des stries Z et les filaments d'actine (Otey & Carpen, 2004); 2) relier directement ou indirectement les récepteurs transmembranaires à des protéines ou enzymes impliquées dans la transduction de signal comme les PKA (Mason et al., 2002) et les intégrines (Wu et al., 2001) et 3) la stabilisation et l'ancrage d'un grand nombre de récepteurs à la surface membranaire (Sadeghi et al., 2002; Maruoka et al., 2000a; Cukovic et al., 2001; Mason et al., 2002). Finalement, l'importance de l' α -actinine-2 dans l'intégrité du sarcomère et l'organisation du disque Z a été également confirmé par l'identification de cardiomyopathies dilatées associées à des mutations dans le gène codant pour l' α -actinine-2 (Mohapatra et al., 2003).

Sur le plan histologique, il a été rapporté que l' α -actinine-2 est le composant principal des stries Z (Sorimachi et al., 1997) alors que $Na_v1.5$ est majoritaire dans les disques intercalaires mais il est également présent dans les membranes latérales ou tubules T des myocytes cardiaques (Maier et al., 2004). Nos expériences de doubles marquages vont dans le même sens et révèlent une co-localisation du marquage $Na_v1.5$ avec le marquage α -actinine-2 au niveau des points d'intersection entre les stries Z et les tubules T des cardiomyocytes humains. La proximité de ces deux protéines suggère que l' α -actinine-2 pourrait jouer un rôle dans le recrutement de $Na_v1.5$ et/ou dans la régulation de sa fonction au niveau des membranes latérales des cardiomyocytes.

V.1.2 Interaction de l' α -Actinine-2 avec d'Isoformes de $Na_v1.5$

L'existence d'une forte homologie dans la séquence de la boucle reliant le domaine III à IV entre les différents isoformes des canaux sodiques, nous a incité à explorer une éventuelle interaction entre l' α -actinine-2 et certains isoformes de ces canaux. Pour cela, nous avons eu recours à la technique de co-immunoprécipitation. Les résultats obtenus montrent que l' α -actinine-2 interagit avec les canaux sodiques neuronaux et squelettiques *in vivo* et *in cyto*. Dans le muscle squelettique, nous supposons que la bande observée correspond au canal sodique squelettique ($Na_v1.4$). Notre hypothèse s'appuie surtout sur les diverses études s'intéressant à

la répartition des canaux sodiques dans le muscle squelettique à l'aide des techniques de patch-clamp et d'immunohistochimie (Kallen et al., 1990; Goldin, 1999; Caldwell & Milton, 1988). En effet, tous ces travaux ont conclu que $Na_v1.4$ est majoritaire dans le muscle squelettique contrairement à $Na_v1.5$ dont l'expression est restreinte au stade néonatal et dans les fibres musculaires dénervées (Rich et al., 1999). En parallèle, nous avons également observé une interaction entre l' α -actinine-2 et le canal sodique neuronal ($Na_v1.7$ et $Na_v1.8$) dans un système hétérologue.

Enfin, les canaux sodiques sont connus par leur action régulatrice de l'activité électrique cellulaire et sont donc impliqués dans chaque battement du cœur ($Na_v1.5$) dans chaque contraction des muscles striés ($Na_v1.4$) et même dans la perception de la douleur ($Na_v1.8$) (Laird et al., 2002). D'autre part, des mutations dans ces canaux sodiques sont à l'origine d'arythmie cardiaque (Wang et al., 1995a; Walker et al., 2003), de myopathie musculaires (Filatov & Rich, 2004; Filatov & Rich, 2004) et de douleurs chroniques (Gold et al., 1996; Gold et al., 1996). Il en résulte alors que l'association de l' α -actinine-2 à ces différents canaux sodiques distincts par leur contribution et leur localisation tissulaire est à ce titre très intéressante. Il est donc important d'évaluer dans quelle mesure cette interaction influencerait l'activité de ces canaux dans les conditions physiologique que pathologique?

V.1.3 Interaction des Canaux Sodiques avec les Isoformes de l' α -Actinine-2

Les trois isoformes connues de l' α -actinine-2 sont codées par trois gènes différents et présentent donc une homologie très importante de séquence (70% d'identité) (Virel & Backman, 2004). Les α -actinines-1 et -4 sont exprimées de façon ubiquitaires (Tokue et al., 1991) alors que l' α -actinine-3 est l'isoforme du muscle squelettique (Mills et al., 2001). Cette forte homologie suggère une probable interaction entre ces isoformes et les canaux sodiques. Cependant, aucune interaction n'a été observée en présence des α -actinines-1 et -4. Seule l' α -actinine-3 paraît interagir avec $Na_v1.5$ et $Na_v1.4$ *in cyto* et *in vivo* respectivement. En plus, nos résultats montrent que l' α -actinine-2 et l' α -actinine-3 forment un complexe avec $Na_v1.4$ dans le muscle squelettique. En effet, Chan *et al* ont rapporté que l' α -actinine-2 et -3 forment un hétéro-dimère dans le muscle squelettique dont le rôle est totalement inconnu (Chan et al., 1998). Nos résultats font ressortir deux points intéressants: 1) un rôle potentiel de l'hétéro-

dimère α -actinine-2/-3 dans l'activité de $\text{Na}_v1.4$. Dans ce cas, la technique du patch-clamp est la meilleure stratégie expérimentale pour répondre à cette hypothèse; 2) l' α -actinine-2 pourrait être impliquée dans un mécanisme de compensation et par conséquent, la présence de cette dernière permet de pallier la déficience de l' α -actinine-3 et assurera ainsi au canal un fonctionnement suffisamment normal pour ne pas induire d'anomalies détectables. Cette hypothèse est renforcée par l'existence chez l'humain d'une forte redondance fonctionnelle entre l' α -actinine-2 et -3 qui a été prouvée par le chevauchement des séquences protéiques de ces deux protéines d'une part et d'autre part par l'absence d'un phénotype délétère dans les mutations *ACTN3* nulles (Mills et al., 2001).

En fin, Il n'est donc pas surprenant que l' α -actinine-3 s'associe avec $\text{Na}_v1.5$ vu que cette isoforme une homologie de séquence d'environ 75% avec l' α -actinine-2.

V.1.4 Un Modèle Potentiel de l'Action de l' α -Actinine-2

Afin d'évaluer l'effet de l' α -actinine-2 sur l'activité de $\text{Na}_v1.5$, deux approches expérimentales ont été menées, à savoir: le patch-clamp et la biotinylation. Or une augmentation de 68% dans l'intensité du courant sodique, l' α -actinine-2 ne semble pas affecter les autres paramètres biophysiques de $\text{Na}_v1.5$. La biotinylation corrobore ces résultats et montre une étroite relation entre la concentration intracellulaire totale de l' α -actinine-2 et les niveaux d'expression de la «protéine canal» à la surface membranaire. Des résultats très similaires ont également été observés par les groupes de Lu (Lu et al., 2007) et Maruoka (Maruoka et al., 2000a). Finalement, l'ensemble de ces résultats pointe vers l'idée que l' α -actinine-2 accroît la densité de $\text{Na}_v1.5$, vraisemblablement en favorisant son adressage et sa stabilisation à la surface cellulaire.

Toutefois, la participation indirecte d'autres protéines associées à l' α -actinine-2 dans la régulation de $\text{Na}_v1.5$ n'est pas exclue. En effet, nous pensons que certaines protéines associées à l' α -actinine-2, telles que la dystrophine (Hance et al., 1999) et l'actine (Matsudaira, 1994) contribuent également à la stabilisation de $\text{Na}_v1.5$ à la surface membranaire par le recrutement de la syntrophine (Figure V.1). De plus, il a été montré que les syntrophines stabiliseraient

l'ancrage des canaux sodiques à la membrane (Gee et al., 1998) suite à leur interaction avec la dystrophine (Castello et al., 1996). Par ailleurs, il est important de noter que la syntrophine se lie à la région C-terminale de $Na_v1.5$. Cette région est soupçonnée de jouer un rôle dans la stabilisation de l'état d'inactivation de ce canal à la suite de son interaction avec la boucle reliant le domaine III à IV (Motoike et al., 2004). Par analogie, l' α -actinine-2 pourrait également jouer la fonction d'une protéine d'échafaudage en connectant $Na_v1.5$ soit directement au cytosquelette, ou indirectement à travers son association avec des protéines adaptatrices telles que: les syntrophines ou les dystrophines. En effet, nous pensons que: 1) l'interaction α -actinine-2/ $Na_v1.5$ forme un complexe avec la dystrophine et 2) une fois ce complexe formé, il facilitera le recrutement de la syntrophine d'une part et d'autre part la connexion de $Na_v1.5$ aux filaments d'actine. Cette hypothèse s'appuie sur deux importantes études, la première a suggéré un rôle combiné de la dystrophine et l' α -actinine-2 dans la régulation de l'activité des canaux calciques cardiaques de type L (Sadeghi et al., 2002). Tandis que la seconde a montré une importante réduction du niveau d'expression des canaux sodiques cardiaques et de la syntrophine suite à une déficience en dystrophine (Gavillet et al., 2006) alors que la distribution tissulaire de l' α -actinine-2 ne semble pas être affectée (Williams & Bloch, 1999).

De plus, les homologies existantes entre les produits des gènes de dystrophine et d' α -actinine-2 suggèrent que ces deux protéines peuvent avoir des fonctions redondantes. Effectivement, des études fonctionnelles ont montré que l'expression des protéines chimères (dystrophine/ α -actinine-2) ne corrigeait pas l'aspect morphologique de la myopathie de Duchenne mais elles sont capables de restaurer à la membrane le complexe protéique associé à la dystrophine chez les souris déficientes en dystrophine (Harper et al., 2002). L'hypothèse avancée par cette étude est la capacité de l' α -actinine-2 à prendre le relais lors de l'absence de certains acteurs privilégiés des canaux sodiques. A la lumière de ces observations, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'absence d' α -actinine-2 sur l'expression et la distribution des canaux sodiques dans les différents compartiments cellulaires.

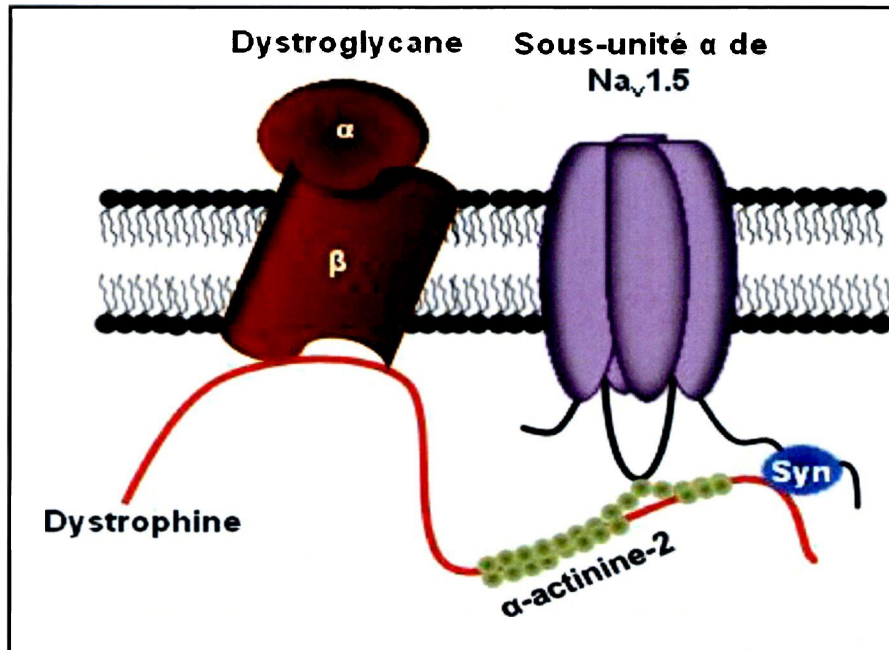


Figure V.1: Modèle schématique du mécanisme d'action de l' α -actinine-2 dans le fonctionnement du canal $\text{Na}_v1.5$. Le rôle de l' α -actinine-2 dans l'expression et l'ancrage de $\text{Na}_v1.5$ peut être médié par plusieurs facteurs. Le plus probable à notre avis est que l' α -actinine-2 permet la stabilisation du canal à la membrane par le recrutement d'autres protéines d'ancrages telles que: la syntrophine et la dystrophine. En effet, la liaison de l' α -actinine-2 avec des protéines impliquées dans l'ancrage de ce canal d'une part et d'autre part avec les éléments du cytosquelette lui confère un rôle de protéine d'échafaudage.

Dans la section suivante, nous discuterons d'un autre partenaire pertinent de $\text{Na}_v1.5$, à savoir la troponine I cardiaque et son impact sur le fonctionnement de ce canal.

V.2. Troponine I cardiaque (TnIc)

V.2.1. Caractérisation de l'Interaction entre la Troponine I Cardiaque Cytoplasmique et $\text{Na}_v1.5$

Une approche basée sur le double hybride chez la levure a permis d'identifier la troponine I cardiaque (TnIc) comme un nouveau partenaire de $\text{Na}_v1.5$. La TnIc appartient au complexe des troponines et n'est présente que dans le myocarde (Hunkeler et al., 1991). Sa fonction principale

est d'inhiber l'activité ATPasique du complexe actine-myosine, c'est-à-dire la contraction en l'absence de calcium (Perry, 1979). La TnIc est représentée sous forme structurale de façon quasi exclusive 96-97% pour 3-6% de forme cytosolique (Bleier et al., 1998; Bertinchant & Polge, 1999). Ainsi, il est vraisemblable que seule la fraction cytoplasmique de la TnIc est associée à la boucle I-II.

L'utilisation des tsA201 sur-exprimant $Na_v1.5$ et TnIc, des expériences de pull-down et de co-immunoprécipitation ont montré que la TnIc s'associait directement à la boucle I-II de $Na_v1.5$. En parallèle, la délimitation de la (ou des) région(s) de TnIc interagissant avec la boucle I-II a également été engagée sur la base de données du double hybride chez la levure et l'utilisation de différents fragments de la protéine tronquée TnIc. Les résultats obtenus indiquent que la région C-terminale (L158-S210) de la TnIc est requise pour l'interaction avec la boucle I-II de $Na_v1.5$. Cette partie est connue pour interagir avec les canaux polycystines de type -L et -2 (Li et al., 2003), la troponine C (Li et al., 1999) et l'actine (Farah and Reinach. 1999). Le rôle putatif de cette région dans le fonctionnement des canaux ioniques n'est cependant pas établi. Toute fois, il faut noter que 90% des mutations identifiées jusqu'à date sont localisées dans la partie C-terminale de la TnIc. Ces mutations entraînent soit des cardiomyopathies dilatées familiales (Mogensen et al., 2004; Gomes & Potter, 2004; Richard et al., 2003), des cardiomyopathies hypertrophiques (Kimura et al. 1997) ou des cardiomyopathies restrictives (Mogensen et al., 2003). En conséquence, nous jugeons pertinent dans le futur d'identifier la région minimale nécessaire à l'interaction de la TnIc sur la boucle I-II de $Na_v1.5$ afin de mieux comprendre les conséquences de cette interaction sur l'activité de ce canal. Pour ce faire, nous comptons générer des mutations aléatoires ou dirigées dans la région d'interaction potentielle de la TnIc (L158-S210) sur la boucle I-II de $Na_v1.5$. Ces différents mutants seront dans un premier temps expérimentés afin de mettre en évidence une perte éventuelle d'interaction avec la boucle I-II. Dans un second temps, nous étudierons l'implication de cette perte d'interaction sur le fonctionnement de $Na_v1.5$ et notamment dans les pathologies cardiaques.

Après avoir délimité la région d'interaction de la TnIc à la boucle I-II, une cartographie fine de la région de la boucle I-II interagissant avec la TnIc en double hybride, a permis de définir précisément deux régions, une, des a.a 507 et 560 et l'autre des a.a 634 et 711. Bien que la région en amont semble jouer un rôle prédominant en raison de la présence d'un motif de rétention dans

le réticulum endoplasmique (RQR) et cinq séquences de reconnaissance consensus (R/K-R/x-x-S/T) pour la PKA (Figure V.2), il faut muter simultanément les deux régions de la boucle I-II pour abolir l'interaction Na_v1.5-TnIc. De toute évidence, ces résultats suggèrent que l'affinité de la TnIc pour Na_v1.5 peut être éventuellement déterminée par le degré de phosphorylation de ce dernier. De manière plus ciblée, nous pourrions visualiser si l'addition de PKA commerciale par des techniques d'incorporation de phosphate radioactif modulerait l'interaction Na_v1.5-TnIc.

```

417 EEQNQATIAE  TEEKEKRFQE  AMEMLKKEHE  ALTIRGVDTV  SRSSLEMSPL
467 APVNSHERRS  KRRRRMSSGT  EECGEDRLPK  SDSEEDGPRAM  NHLSLTRGLS
517 RTSMKPRSSR  GSIFTFRRRD  LGSEADFADD  ENSTARESES  HHTSLLVPWP
567 LRRTSAQQQP  SPGTSAPGHA  LHGKKNSTVD  CNGVVSLGGA  GDPEATSPGS
617 HLLRPVMLEH  PPDTTTPSEE  PGGPQMLTSQ  APCVDGFEEP  GARORALSAV
667 SVLTSALEEL  EESRHKCPPC  WNRLAQRYLI  WECCOLWMSI  KQGVK

```

Figure V.2. Séquence détaillée de la boucle I-II cytoplasmique de Na_v1.5. Cette figure permet une illustration précise des régions de la boucle I-II de Na_v1.5 impliquées dans la liaison à la TnIc. Les deux régions de la boucle I-II identifiées sont indiquées en jaune (N507-S560) et vert (S634-K711) respectivement. Les séquences de reconnaissance consensus (R/K-R/x-x-S/T) pour la PKA sont représentées en rouge alors que les motifs de rétention par le réticulum endoplasmique sont en italique et en orange.

En dehors de la phosphorylation de Na_v1.5, les motifs de rétention par le réticulum endoplasmique (RE) semblent également favoriser l'assemblage et la cinétique d'ouverture et de fermeture du canal (Zhou et al., 2002). En effet, il a été montré que la phosphorylation de Na_v1.5 et la présence de motifs (RE) facilitent l'augmentation du courant sodique induit par la PKA (Zhou et al., 2002). Pour conclure, l'identification exacte des résidus d'acides aminés de la boucle I-II permettrait de mieux comprendre le mécanisme par lequel la TnIc régule l'activité de Na_v1.5. Cette approche sera menée par la réalisation de mutations aléatoires ou dirigées dans les régions (N507-S560 et S634-K711) de la boucle I-II et observer la persistance de l'interaction ou produire des protéines de fusion de 10-20 acides aminés et rechercher celle qui permet l'association avec la TnIc. Cette dernière étape est nécessaire pour répondre aux interrogations

suivantes: 1) une éventuelle participation de la TnIc dans l'adressage de $Na_v1.5$ suite à sa liaison aux motifs (RE), 2) les effets de la phosphorylation de $Na_v1.5$ par la PKA sur son interaction avec la TnIc et 3) l'existence d'une relation entre les sites de liaison ($Na_v1.5/TnIc$) et les différentes pathologies cardiaques. En effet, il a été constaté que des mutations dans les régions (N507-S560 et S634-K711) de la boucle I-II provoquent des troubles de conduction dans le myocarde (Tan et al., 2001; Viswanathan et al., 2003).

V.2.2 Rôle Possible de la Troponine I Cardiaque sur l'Activité de $Na_v1.5$

La boucle I-II des canaux sodiques est essentielle à la cinétique d'inactivation de ces canaux (Zhou et al., 2002). En plus de sa caractéristique structurale, elle est également le siège d'interaction avec d'autres protéines clés tels, la synaptogamine (Sampo et al., 2000), l'ankyrine G (Bouzidi et al., 2002), la protéine 14.3.3 (Allouis et al., 2006) et les protéines kinases p38 et AKAP-15 (Wittmack et al., 2005; Cantrell et al., 2002). Ces multiples partenaires semblent moduler l'activité des canaux sodiques selon des mécanismes variables. Afin de mieux comprendre l'impact de la TnIc sur l'activité électrique de $Na_v1.5$, des expériences de patch-clamp ont été réalisées en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire β_1 . La TnIc agit en déplaçant significativement la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs et par conséquent elle rend le canal moins disponible pour le potentiel d'action cardiaque. Par contre, cet effet disparaît en présence de la sous-unité β_1 . Les autres données électrophysiologiques n'indiquent aucun effet de la TnIc sur l'activation du courant sodique ou la densité du canal. De même, la TnIc n'affecte pas l'expression membranaire de $Na_v1.5$ comme le confirme le résultat de la biotinylation. L'ensemble de ces observations suggère que la TnIc cytoplasmique pourrait contribuer à la stabilisation de $Na_v1.5$ à la membrane. Toute fois, le mécanisme par lequel elle opère est inconnu. De plus, l'inhibition de cet effet suite à l'expression de la sous-unité β_1 soulève une série d'hypothèses:

(1) Une compétition entre la sous-unité β_1 et la TnIc sur le même site de liaison situé dans la boucle I-II. A date, seule la région cytoplasmique C-terminale des canaux sodiques est connue pour pouvoir interagir avec la sous-unité β_1 (Spampanato et al., 2004). La sous-unité β_1 est impliquée dans l'ancrage et la stabilisation des canaux sodiques. Le rôle précis de la sous-unité β_1 sur les cinétiques des canaux sodiques in vivo est sujet à une grande variabilité.

(2) L'interaction de la sous-unité β_1 avec la sous-unité α de $\text{Na}_v1.5$ peut entraîner un changement conformationnelle de cette dernière ce qui rend les sites d'interaction inaccessible à la TnIc.

(3) La présence de la sous-unité β_1 confère une meilleure stabilité au canal $\text{Na}_v1.5$.

Pour vérifier l'ensemble de ces hypothèses, il serait intéressant d'examiner si l'expression de la sous-unité β_1 déplacerait l'interaction TnIc/ $\text{Na}_v1.5$ *in vivo* et *in vitro*.

Finalement, une élévation de la TnIc est corrélée à l'élévation du segment ST dans certaines myocardites (Bonneyoy et al., 2000). Il serait intéressant de voir si la surexpression de la TnIc cytoplasmique a un quelconque effet sur l'activité ou la stabilité du canal $\text{Na}_v1.5$ et trouver ainsi un lien avec les cas pathologiques.

Chapitre VI

CONCLUSION GÉNÉRALE

ET

PERSPECTIVES

L'activité électrique des cellules cardiaques est le résultat d'une complexe et harmonieuse interaction entre les canaux sodiques et leurs protéines régulatrices. Le canal sodique cardiaque ($Na_v1.5$) appartient à la famille des canaux sodiques dépendants du voltage. Il joue un rôle vital dans le processus de propagation de l'excitabilité. L'importance de $Na_v1.5$ a été confirmée par l'étude de nombreuses mutations naturelles dans le gène *SCN5A* qui code pour la sous-unité α de ce canal. Ces mutations sont à l'origine de canalopathies pouvant entraîner la fibrillation ventriculaire et mener à la mort subite. Dans 15 à 20% de ces cas de décès, une mutation dans le gène *SCN5A* a été rapportée (syndrome de Brugada) et 38% d'entre eux présentent une maladie structurelle du myocarde, certains avec des signes d'inflammation, et/ou de la fibrose avec un aspect histologique typique de dysplasie ventriculaire droite arythmogène (Corrado et al., 2001; Splawski et al., 2002). Parmi les hypothèses avancées, un dysfonctionnement des autres canaux ioniques est évoqué. Mais leur diversité multiplie les candidats et le rôle de certains d'entre eux dans la physiologie et la physiopathologie du rythme cardiaque est encore mal élucidé. Récemment, l'identification d'une nouvelle cause génétique de mort subite cardiaque impliquant des protéines associées aux canaux ioniques laisse supposer l'implication d'autres protéines non encore identifiées dans ces pathologies cardiaques dont l'origine génétique demeure encore inconnue (cas du syndrome de Brugada). En conséquence, l'identification de ces protéines et leurs polymorphismes est essentielle à la compréhension des mécanismes de la physiopathologie de ces différentes canalopathies et permet de jeter les bases de nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées. Les objectifs des travaux de ma thèse s'articulent autour de deux axes: l'identification et la caractérisation fonctionnelle de nouveaux partenaires de $Na_v1.5$. L'approche protéomique utilisée a permis d'identifier de nouveaux candidats et a associé des études électrophysiologiques pour une meilleure appréhension de leurs fonctions cellulaires et des mécanismes régulant la dynamique (expression, localisation subcellulaire; adressage) de $Na_v1.5$.

En effet, un criblage global utilisant le système de double hybride a révélé deux nouveaux partenaires de $Na_v1.5$, l' α -actinine-2 et la troponine I cardiaque. L' α -actinine-2 s'associe à la porte d'inactivation du canal et ce via son domaine spectrine. Quant à la troponine I, c'est sa partie C-terminale qui interagit avec deux régions distinctes de la boucle cytoplasmique I-II de $Na_v1.5$. L'analyse fine du mode d'action moléculaire et cellulaire de ces deux partenaires de

Na_v1.5 met une emphase particulière sur leur implication dans l'adressage et la stabilisation à la membrane plasmique de ce canal. En dehors de son rôle dans la structure du myocarde, l' α -actinine-2 est impliquée dans de nombreux mécanismes qui régulent l'activité des canaux ioniques (Rycroft & Gibb, 2004; Robison et al., 2005; Bouhamdan et al., 2006; Lu et al., 2007). Dans notre étude, nous avons démontré que le domaine spectrine de l' α -actinine-2 est indispensable pour que l'interaction avec Na_v1.5 ait lieu. Par contre, d'autres expériences sont nécessaires pour délimiter avec exactitude le site de la boucle III à IV de Na_v1.5 impliqué dans l'interaction avec l' α -actinine-2, et ce pour deux raisons majeures: 1) l'importance fonctionnelle de la boucle reliant le domaine III à IV de Na_v1.5 dans le processus d'inactivation de ce canal, 2) la présence d'un site de phosphorylation par la PKC dans cette région du canal soulève la question si la phosphorylation de Na_v1.5 par la PKC influence son interaction avec l' α -actinine-2. De ce fait, des mutations aléatoires ou dirigées dans la séquence de la boucle reliant le domaine III à IV est une meilleure stratégie pour répondre à ces interrogations.

Parallèlement, les résultats d'immunohistochimie ont montré que l' α -actinine-2 se retrouve à la périphérie des tubules T, où elle est co-localisée avec le canal Na_v1.5. En parallèle, les analyses fonctionnelles dans un système hétérologue ont montré qu'en présence de l' α -actinine-2, le niveau d'expression de Na_v1.5 à la membrane plasmique accroît significativement. La fraction de Na_v1.5 présente dans la membrane plasmique est un facteur déterminant la contribution de ce canal dans la physiologie de la transmission électrique et par conséquent dans l'excitabilité des cardiomyocytes. Récemment, Baba *et al* ont remarqué une diminution drastique de Na_v1.5 dans les membranes latérales des cardiomyocytes de chiens atteints d'un infarctus cardiaque à l'inverse des canaux sodiques situés dans les disques intercalaires (Baba et al., 2005). Ces auteurs suggèrent que cette distribution particulière des canaux sodiques leur confère différents rôles. En conséquence les canaux sodiques présents dans les membranes latérales des cardiomyocytes seraient plutôt impliqués dans la conduction des impulsions cardiaques. Conjointement, une autre étude a observé dans les cardiomyocytes de chien ou d'humain une importante réduction du niveau d'expression de l' α -actinine-2 suite à un infarctus cardiaque (Katagiri, 1977). Sur la base de ces observations cliniques, il serait donc très intéressant d'évaluer dans quelle mesure la variation de l'expression d' α -actinine-2 influencerait la

distribution tissulaire et/ou le fonctionnement de $Na_v1.5$ et vis versa dans les conditions physiologiques et pathologiques. L'utilisation d'ARN interférents ou l'élaboration de souris transgéniques invalidées pour le gène α -actinine-2 apportera plus de précision sur l'importance fonctionnelle de l'interaction α -actinine-2/ $Na_v1.5$ et son impact sur l'activité et la distribution cellulaire et tissulaire de ce canal.

Outre son rôle fondamental dans le recrutement de $Na_v1.5$ à la membrane, l' α -actinine-2 peut également servir d'adaptateur entre le canal $Na_v1.5$ et le cytosquelette. En effet il a été montré que la dépolymérisation du réseau de filaments d'actine réduit l'excitabilité cellulaire suite à une altération des cinétiques d'ouverture et de fermeture de $Na_v1.5$ (Maltsev & Undrovinas, 1997; Undrovinas et al., 1995). Cette hypothèse est appuyée par des observations récentes qui ont montré que la régulation de l'expression à la surface cellulaire du récepteur métabotrophique par l' α -actinine est étroitement dépendante de l'interaction de cette dernière avec les filaments d'actine (Cabello et al., 2007). Mais la plus intéressante des propriétés de l' α -actinine-2 est qu'elle permet de relier directement ou indirectement les canaux ioniques non seulement à des protéines d'échafaudage mais aussi à un système de transduction (Bouhamdan et al., 2006; Merrill et al., 2007; Robison et al., 2005; Wyszynski et al., 1997). En effet, l' α -actinine-2 forme un complexe multi-protéique avec une protéine adaptatrice, la dystrophine et les filaments d'actine. Ce complexe est impliqué dans la structure et la signalisation cellulaire (Hance et al., 1999). De même, la dystrophine se lie à la syntrophine, constituant, dans le muscle cardiaque un des points d'ancrage de $Na_v1.5$ au cytosquelette (Gee et al., 1998; Gavillet et al., 2006; Castello et al., 1996). La proximité de ces protéines soulève la question du rôle de ce partenariat moléculaire privilégié dans le fonctionnement de $Na_v1.5$. Un scénario intéressant pourrait reposer sur la stabilisation de l'interaction entre $Na_v1.5$ et ces partenaires par l' α -actinine-2. Ce qui permet l'immobilisation du canal à travers son association indirecte au cytosquelette. D'une manière intéressante, l'absence de la dystrophine réduit significativement l'expression protéique de $Na_v1.5$ et de la syntrophine chez les souris transgéniques (Gavillet et al., 2006; Williams & Bloch, 1999). En revanche, aucune variation dans l'expression protéique de l' α -actinine-2 n'a été observée dans notre étude. L'ensemble de ces observations positionne l' α -actinine-2 comme une protéine importante de la machinerie d'adressage et d'ancrage de $Na_v1.5$ et renforce l'intérêt de l' α -actinine-2 comme substitut de la dystrophine. La mutation un

distribution tissulaire et/ou le fonctionnement de $\text{Na}_v1.5$ et vis versa dans les conditions physiologiques et pathologiques. L'utilisation d'ARN interférents ou l'élaboration de souris transgéniques invalidées pour le gène α -actinine-2 apportera plus de précision sur l'importance fonctionnelle de l'interaction α -actinine-2/ $\text{Na}_v1.5$ et son impact sur l'activité et la distribution cellulaire et tissulaire de ce canal.

Outre son rôle fondamental dans le recrutement de $\text{Na}_v1.5$ à la membrane, l' α -actinine-2 peut également servir d'adaptateur entre le canal $\text{Na}_v1.5$ et le cytosquelette. En effet il a été montré que la dépolymérisation du réseau de filaments d'actine réduit l'excitabilité cellulaire suite à une altération des cinétiques d'ouverture et de fermeture de $\text{Na}_v1.5$ (Maltsev & Undrovinas, 1997b; Undrovinas et al., 1995). Cette hypothèse est appuyée par des observations récentes qui ont montré que la régulation de l'expression à la surface cellulaire du récepteur métabotrophique par l' α -actinine est étroitement dépendante de l'interaction de cette dernière avec les filaments d'actine (Cabello et al., 2007a). Mais la plus intéressante des propriétés de l' α -actinine-2 est qu'elle permet de relier directement ou indirectement les canaux ioniques non seulement à des protéines d'échafaudage mais aussi à un système de transduction (Bouhamdan et al., 2006a; Merrill et al., 2007; Robison et al., 2005b; Wyszynski et al., 1997). En effet, l' α -actinine-2 forme un complexe multi-protéique avec une protéine adaptatrice, la dystrophine et les filaments d'actine. Ce complexe est impliqué dans la structure et la signalisation cellulaire (Hance et al., 1999c). De même, la dystrophine se lie à la syntrophine, constituant, dans le muscle cardiaque un des points d'ancrage de $\text{Na}_v1.5$ au cytosquelette (Gee et al., 1998a; Gavillet et al., 2006e; Castello et al., 1996c). La proximité de ces protéines soulève la question du rôle de ce partenariat moléculaire privilégié dans le fonctionnement de $\text{Na}_v1.5$. Un scénario intéressant pourrait reposer sur la stabilisation de l'interaction entre $\text{Na}_v1.5$ et ces partenaires par l' α -actinine-2. Ce qui permet l'immobilisation du canal à travers son association indirecte au cytosquelette. D'une manière intéressante, l'absence de la dystrophine réduit significativement l'expression protéique de $\text{Na}_v1.5$ et de la syntrophine chez les souris transgéniques (Gavillet et al., 2006f; Williams & Bloch, 1999c). En revanche, aucune variation dans l'expression protéique de l' α -actinine-2 n'a été observée dans notre étude. L'ensemble de ces observations positionne l' α -actinine-2 comme une protéine importante de la machinerie d'adressage et d'ancrage de $\text{Na}_v1.5$ et renforce l'intérêt de l' α -actinine-2 comme substitut de la

dystrophine. La mutation un à un, et de façon ciblée des différents partenaires protéiques contribuera à déterminer leur rôle et leur participation dans le fonctionnement global de l'ensemble. Il sera ainsi très pertinent d'évaluer si les changements génétiques ou acquis de l' α -actinine-2 peuvent avoir des conséquences fonctionnelles sur le statut électrophysiologique et/ou morphologique des cardiomyocytes, comme de l'organe entier.

Concernant le second partenaire de $Na_v1.5$, la troponine I cardiaque, deux résultats importants ressortent de cette étude:

1. Les régions cytoplasmiques (507-560a.a et/ou 634-711a.a) de la boucle I-II sont indispensables à liaison de la TnIc avec $Na_v1.5$. En plus, la présence de motif de rétention dans le réticulum endoplasmique (ER) et de sites de phosphorylation par la PKA dans ces régions d'intérêt est à notre avis révélatrice de l'importance fonctionnelle de cette interaction. De même, des mutations dans ces deux régions d'interaction sont à l'origine de diverses pathologies cardiaques. D'où, l'étude des répercussions de la phosphorylation de la boucle I-II et/ou la mutation des sites (ER) sur l'interaction $Na_v1.5$ -TnIc constitue une perspective majeure dans l'avenir. Ainsi que les effets de la mutation des régions au niveau des sites d'interaction de la TnIc à la boucle I-II sur l'activité de $Na_v1.5$.

2. La TnIc en interagissant avec la boucle I-II de $Na_v1.5$ via sa région C-terminale module certaines propriétés biophysiques de ce canal. Dans un système hétérologue, nous avons montré que la troponine I déplace significativement la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. Cet effet rend le canal moins disponible pour le potentiel d'action cardiaque mais n'altère pas son expression à la membrane. De plus, l'action de la troponine I sur $Na_v1.5$ est abolie en présence de la sous-unité β_1 de ce canal. A date, les mécanismes régulant les interactions entre les sous-unités β_1 et α de $Na_v1.5$ restent peu connus. Une hypothèse repose sur l'existence d'une compétition entre la troponine I et la sous-unité β_1 sur un même site d'interaction au niveau de la boucle I-II et la présence de la sous-unité β_1 perturberait l'interaction de la troponine I à ce site. En parallèle, nous pouvons également envisager que la liaison de la sous-unité β_1 à la sous-unité α de $Na_v1.5$ entraîne un changement conformationnelle de cette dernière rendant ainsi inaccessible les sites d'interaction de la

troponine I à la boucle I-II. Une voie d'approche de ces hypothèses repose sur des expériences de surexpression et d'inhibition de l'expression de la troponine I par transfection, associées à des immunomarquages de Na_v1.5, la troponine I et la sous-unité β_1 et des enregistrements de l'activité fonctionnelle de Na_v1.5 *in vivo*.

En conclusion, l'ensemble des données ci-dessus témoigne d'une part de l'intérêt d'une étude approfondie de la structure, de la régulation et des interactions du canal sodique cardiaque (Na_v1.5) et d'autre part de la complexité des mécanismes régulant l'activité de ce canal. Cette complexité devra être prise en considération pour la compréhension de la physiopathologie des arythmies cardiaques et les moyens à mettre en œuvre pour le traitement de ces maladies héréditaires.

VII. Bibliographie

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, & Goldstein SA (1999). MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**, 175-187.

Abriel H, Kamynina E, Horisberger JD, & Staub O (2000). Regulation of the cardiac voltage-gated Na^+ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett* **466**, 377-380.

Abriel H & Kass RS (2005). Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends Cardiovasc Med* **15**, 35-40.

Adams ME, Butler MH, Dwyer TM, Peters MF, Murnane AA, & Froehner SC (1993). Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* **11**, 531-540.

Adler E & Fuster V (2005). SCN5A--a mechanistic link between inherited cardiomyopathies and a predisposition to arrhythmias? *J Am Med Assoc* **293**, 491-493.

Ahern CA, Zhang JF, Wookalis MJ, & Horn R (2005a). Modulation of the cardiac sodium channel NaV1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Circ Res* **96**, 991-998.

Ahn AH, Freener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, & Kunkel LM (1996). The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* **271**, 2724-2730.

Albrecht DE & Froehner SC (2002). Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals* **11**, 123-129.

Allouis M, Le BF, Wilders R, Peroz D, Schott JJ, Noireaud J, Le MH, Merot J, Escande D, & Baro I (2006). 14-3-3 is a regulator of the cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5. *Circ Res* **98**, 1538-1546.

Amin AS, Verkerk AO, Bhuiyan ZA, Wilde AAM, & Tan HL (2005). Novel Brugada syndrome-causing mutation in ion-conducting pore of cardiac Na⁺ channel does not affect ion selectivity properties. *Acta Physiol Scand* **185**, 291-301.

An RH, Wang XL, Kerem B, Benhorin J, Medina A, Goldmit M, & Kass RS (1998). Novel LQT-3 mutation affects Na⁺ channel activity through interactions between α and β 1-subunits. *Circ Res* **83**, 141-146.

Antzelevitch C (2001). The Brugada syndrome: ionic basis and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* **12**, 268-272.

Antzelevitch C (2006). Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* **29**, 1130-1159.

Armstrong CM (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev* **61**, 644-683.

Attali B, Lesage F, Ziliani P, Guillemare E, Honoré E, Waldmann R, Hugnot JP, Mattéi M-G, Lazdunski M, & Barhanin J (1993). Multiple mRNA isoforms encoding the mouse cardiac Kv1-5 delayed rectifier K⁺ channel. *J Biol Chem* **268**, 24283-24289.

Baba S, Dun W, & Boyden PA (2004). Can PKA activators rescue Na⁺ channel function in epicardial border zone cells that survive in the infarcted canine heart? *Cardiovasc Res* **64**, 260-267.

Baba S, Dun W, Cabo C, & Boyden PA (2005). Remodeling in cells from different regions of the reentrant circuit during ventricular tachycardia. *Circulation* **112**, 2386-2396.

Backx PH, Yue DT, Lawrence JH, Marban E, & Tomaselli GF (1992). Molecular localization of an ion-binding site within the pore of mammalian sodium channels. *Science* **257**, 248-251.

Baroudi G, Napolitano C, Priori SG, Del Bufalo A, & Chahine M (2004). Loss of function associated with novel mutations of the SCN5A gene in patients with Brugada syndrome. *Can J Cardiol* **20**, 425-430.

Baroudi G, Pouliot V, Denjoy I, Guicheney P, Shrier A, & Chahine M (2001). Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ Res* **88**, E78-E83.

Barrallo-Gimeno A & Nieto MA (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* **132**, 3151-3161.

Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, & Kunkel LM (1992). Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem* **267**, 9281-9288.

Bennett V & Baines AJ (2001). Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* **81**, 1353-1392.

Benson DW, Wang DW, Dymont M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, & George AL, Jr. (2003). Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (*SCN5A*). *J Clin Invest* **112**, 1019-1028.

Bertinchant JP & Polge A (1999). [Troponins: new biochemical markers of myocardial damage. Structure, immunoassay and clinical application]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **92**, 1773-1779.

Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MTE, van Der Hout AH, Mannens MMAM, & Wilde AAM (1999). A single Na⁺ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ Res* **85**, 1206-1213.

Bleier J, Vorderwinkler KP, Falkensammer J, Mair P, Dapunt O, Puschendorf B, & Mair J (1998). Different intracellular compartmentations of cardiac troponins and myosin heavy chains: a causal connection to their different early release after myocardial damage. *Clin Chem* **44**, 1912-1918.

Bonnefoy E, Godon P, Kirkorian G, Fatemi M, Chevalier P, & Touboul P (2000). Serum cardiac troponin I and ST-segment elevation in patients with acute pericarditis. *Eur Heart J* **21**, 832-836.

Bouhamdan M, Yan HD, Yan XH, Bannon MJ, & Andrade R (2006b). Brain-specific regulator of G-protein signaling 9-2 selectively interacts with alpha-actinin-2 to regulate calcium-dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci* **26**, 2522-2530.

Bouzidi M, Tricaud N, Giraud P, Kordeli E, Caillol G, Deleuze C, Couraud F, & Alcaraz G (2002). Interaction of the Nav1.2a Subunit of the Voltage-dependent Sodium Channel with Nodal Ankyrin_G. *J Biol Chem* **277**, 28996-29004.

- Breitwieser GE** (1991). G protein-mediated ion channel activation. *Hypertension* **17**, 684-692.
- Broderick MJ & Winder SJ** (2005). Spectrin, alpha-actinin, and dystrophin. *Adv Protein Chem* **70**, 203-246.
- Brugada J, Brugada R, & Brugada P** (1998). Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V₁ through V₃: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. *Circulation* **97**, 457-460.
- Brugada P & Brugada J** (1992). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. *J Am Coll Cardiol* **20**, 1391-1396.
- Brugada P, Brugada R, Antzelevitch C, & Brugada J** (2005). The Brugada Syndrome. *Arch Mal Coeur Vaiss* **98**, 115-122.
- Cabello N, Remelli R, Canela L, Soriguera A, Mallol J, Canela EI, Robbins MJ, Lluís C, Franco R, McIlhinney J, & Ciruela F** (2007). Actin-binding protein α -actinin-1 interacts with the metabotropic glutamate receptor type 5b and modulates the cell surface expression and function of the receptor. *J Biol Chem* **282**, 12143-12153.
- Caldwell JH & Milton RL** (1988). Sodium channel distribution in normal and denervated rodent and snake skeletal muscle. *J Physiol* **401**, 145-161.
- Cantrell AR, Tibbs VC, Yu FH, Murphy BJ, Sharp EM, Qu Y, Catterall WA, & Scheuer T** (2002). Molecular mechanism of convergent regulation of brain Na⁺ channels by protein kinase C and protein kinase A anchored to AKAP-15. *Mol Cell Neurosci* **21**, 63-80.
- Castello A, Brocheriou V, Chafey P, Kahn A, & Gilgenkrantz H** (1996a). Characterization of the dystrophin-syntrophin interaction using the two-hybrid system in yeast. *FEBS Lett* **383**, 124-128.
- Cestele S, Yarov-Yarovoy V, Qu Y, Sampieri F, Scheuer T, & Catterall WA** (2006). Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *J Biol Chem* **281**, 21332-21344.

Chahine M, Deschênes I, Trottier E, Chen LQ, & Kallen RG (1997). Restoration of fast inactivation in an inactivation-defective human heart sodium channel by the cysteine modifying reagent benzyl-MTS: analysis of IFM-ICM mutation. *Biochem Biophys Res Commun* **233**, 606-610.

Chahine M, Pilote S, Pouliot V, Takami H, & Sato C (2004). Role of arginine residues on the S4 segment of the *Bacillus halodurans* Na⁺ channel in voltage-sensing. *J Membr Biol* **201**, 9-24.

Chan YM, Tong HQ, Beggs AH, & Kunkel LM (1998). Human skeletal muscle-specific α -actinin-2 and -3 isoforms form homodimers and heterodimers *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 134-139.

Chauhan VS, Tuvia S, Buhusi M, Bennett V, & Grant AO (2000). Abnormal cardiac Na⁺ channel properties and QT heart rate adaptation in neonatal ankyrin(B) knockout mice. *Circ Res* **86**, 441-447.

Chiamvimonvat N, Pérez-garcía MT, Ranjan R, Marban E, & Tomaselli GF (1996). Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na⁺ channel revealed by cysteine mutagenesis. *Neuron* **16**, 1037-1047.

Cohen SA (1996). Immunocytochemical localization of rH1 sodium channel in adult rat heart atria and ventricle. Presence in terminal intercalated disks. *Circulation* **94**, 3083-3086.

Cormier JW. C-terminal helical structures in the carboxy (C-) terminus of the human heart Na⁺ channel α subunit (SCN5A) modulate inactivation. *Biophysical Journal* 82[1], 91a. 2002. Ref Type: Abstract

Coronel R, Casini S, Koopmann TT, Wilms-Schopman FJ, Verkerk AO, de G, Jr., Bhuiyan Z, Bezzina CR, Veldkamp MW, Linnenbank AC, van der Wal AC, Tan HL, Brugada P, Wilde AA, & de Bakker JM (2005). Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation* **112**, 2769-2777.

Corrado D, Basso C, & Thiene G (2001). Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc Res* **50**, 399-408.

Cronk LB, Ye B, Kaku T, Tester DJ, Vatta M, Makielski JC, & Ackerman MJ (2007). Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm* **4**, 161-166.

Cukovic D, Lu GWK, Wible B, Steele DF, & Fedida D (2001). A discrete amino terminal domain of Kv1.5 and Kv1.4 potassium channels interacts with the spectrin repeats of α -actinin-2. *FEBS Lett* **498**, 87-92.

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, & Keating MT (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: *HERG* mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**, 795-803.

Deschênes I, Neyroud N, DiSilvestre D, Marbán E, Yue DT, & Tomaselli GF (2002). Isoform-specific modulation of voltage-gated Na⁺ channels by calmodulin. *Circ Res* **90**, E49-E57.

Deschênes I, Trottier E, & Chahine M (2001). Implication of the C-terminal region of the α -subunit of voltage-gated sodium channels in fast inactivation. *J Membr Biol* **183**, 103-114.

Djinovic-Carugo K, Gautel M, Ylanne J, & Young P (2002). The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett* **513**, 119-123.

Dumaine R, Wang Q, Keating MT, Hartmann HA, Schwartz PJ, Brown AM, & Kirsch GE (1996). Multiple mechanisms of Na⁺ channel-linked long-QT syndrome. *Circulation Research* **78**, 916-924.

Eholtz G, Scheuer T, & Catterall WA (1994). Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* **12**, 1041-1048.

Fahmi AI, Patel M, Stevens EB, Fowden AL, John JE, III, Lee K, Pinnock R, Morgan K, Jackson AP, & Vandenberg JI (2001). The sodium channel β -subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *J Physiol* **537**, 693-700.

Farah CS & Reinach FC (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J* **9**, 755-767.

Filatov GN & Rich MM (2004). Hyperpolarized shifts in the voltage dependence of fast inactivation of Nav1.4 and Nav1.5 in a rat model of critical illness myopathy. *J Physiol* **559**, 813-820.

Finsterer J & Stollberger C (2003). The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology* **99**, 1-19.

Fitzgerald EM, Okuse K, Wood JN, Dolphin AC, & Moss SJ (1999). cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J Physiol* **516**, 433-446.

Frohnwieser B, Chen LQ, Schreibmayer W, & Kallen RG (1997). Modulation of the human cardiac sodium channel alpha-subunit by cAMP-dependent protein kinase and the responsible sequence domain. *J Physiol* **498**, 309-318.

Frohnwieser B, Weigl L, & Schreibmayer W (1995). Modulation of cardiac sodium channel isoform by cyclic AMP dependent protein kinase does not depend on phosphorylation of serine 1504 in the cytosolic loop interconnecting transmembrane domains III and IV. *Pflügers Arch* **430**, 751-753.

Frustaci A, Priori SG, Pieroni M, Chimenti C, Napolitano C, Rivolta I, Sanna T, Bellocci F, & Russo MA (2005). Cardiac histological substrate in patients with clinical phenotype of Brugada syndrome. *Circulation* **112**, 3680-3687.

Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr HA, Pedrazzini T, & Abriel H (2006). Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res* **99**, 407-414.

Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, & Froehner SC (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci* **18**, 128-137.

Gellens ME, George AL, Jr., Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, & Kallen RG (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 554-558.

George AL, Jr. (2005b). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* **115**, 1990-1999.

George AL, Jr. (2005f). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* **115**, 1990-1999.

George AL, Jr., Varkony TA, Drabkin HA, Han J, Knops JF, Finley WH, Brown GB, Ward DC, & Haas M (1995). Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel α -subunit gene (SCN5A) to band 3p21. *Cytogenet Cell Genet* **68**, 67-70.

Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, & Levine JD (1996). Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 1108-1112.

Goldin AL (1999). Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann N Y Acad Sci* **868**, 38-50.

Gomes AV & Potter JD (2004). Cellular and molecular aspects of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin I gene. *Mol Cell Biochem* **263**, 99-114.

Grissmer S & Cahalan MD (1989). Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *J Gen Physiol* **93**, 609-630.

Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JPP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongsma HJ, & Wilde AAM (2003). A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res* **92**, 14-22.

Groenewegen WA & Wilde AA (2005). Letter regarding article by McNair et al, "SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia". *Circulation* **112**, e9-e10.

Guy HR & Seetharamulu P (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 508-512.

Hallaq H, Yang Z, Viswanathan PC, Fukuda K, Shen W, Wang DW, Wells KS, Zhou J, Yi J, & Murray KT (2006). Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc Res* **72**, 250-261.

Hance JE, Fu SY, Watkins SC, Beggs AH, & Michalak M (1999). α -actinin-2 is a new component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Arch Biochem Biophys* **365**, 216-222.

Hartmann HA, Colom LV, Sutherland ML, & Noebels JL (1999). Selective localization of cardiac SCN5A sodium channels in limbic regions of rat brain. *Nat Neurosci* **2**, 593-595.

Haufe V, Camacho JA, Dumaine R, Gunther B, Bollensdorff C, von Banchet GS, Benndorf K, & Zimmer T (2005). Expression pattern of neuronal and skeletal muscle voltage-gated Na⁺ channels in the developing mouse heart. *J Physiol* **564**, 683-696.

Herfst LJ, Potet F, Bezzina CR, Groenewegen WA, Le Marec H, Hoorntje TM, Demolombe S, Baró II, Escande D, Jongasma HJ, Wilde AAM, & Rook MB (2003). Na⁺ channel mutation leading to loss of function and non-progressive cardiac conduction defects. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 549-557.

Hesse M, Kondo CS, Clark RB, Su L, Allen FL, Geary-Joo CT, Kunnathu S, Severson DL, Nygren A, Giles WR, & Cross JC (2007). Dilated cardiomyopathy is associated with reduced expression of the cardiac sodium channel Scn5a. *Cardiovasc Res* **75**, 498-509.

Hicke L & Dunn R (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-172.

Hilber K, Sandtner W, Zarrabi T, Zebedin E, Kudlacek O, Fozzard HA, & Todt H (2005). Selectivity filter residues contribute unequally to pore stabilization in voltage-gated sodium channels. *Biochemistry* **44**, 13874-13882.

Hille B (1992). G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* **9**, 187-195.

Hunkeler NM, Kullman J, & Murphy AM (1991). Troponin I isoform expression in human heart. *Circ Res* **69**, 1409-1414.

Isom LL (2001). Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* **7**, 42-54.

Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL, & Catterall WA (1992). Primary structure and functional expression of the β_1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* **256**, 839-842.

Jespersen T, Gavillet B, van Bemmelen MX, Cordonier S, Thomas MA, Staub O, & Abriel H (2006). Cardiac sodium channel Nav1.5 interacts with and is regulated by the protein tyrosine phosphatase PTPH1. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 1455-1462.

Kallen RG, Sheng ZH, Yang J, Chen LQ, Rogart RB, & Barchi RL (1990). Primary structure and expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *Neuron* **4**, 233-242.

Kazen-Gillespie KA, Ragsdale DS, D'Andrea MR, Mattei LN, Rogers KE, & Isom LL (2000). Cloning, localization, and functional expression of sodium channel β 1A subunits. *J Biol Chem* **275**, 1079-1088.

Keller DI, Huang H, Zhao J, Frank R, Suarez V, Delacretaz E, Brink M, Osswald S, Schwick N, & Chahine M (2006). A novel SCN5A mutation, F1344S, identified in a patient with Brugada syndrome and fever-induced ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res* **70**, 521-529.

Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass RS, & Pitt GS (2004). Calmodulin mediates Ca^{2+} sensitivity of sodium channels. *J Biol Chem* **279**, 45004-45012.

Kimura A, Harada H, Park JE, Nishi H, Satoh M, Takahashi M, Hiroi S, Sasaoka T, Ohbuchi N, Nakamura T, Koyanagi T, Hwang TH, Choo JA, Chung KS, Hasegawa A, Nagai R, Okazaki O, Nakamura H, Matsuzaki M, Sakamoto T, Toshima H, Koga Y, Imaizumi T, & Sasazuki T (1997). Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **16**, 379-382.

Ko SH, Lenkowski PW, Lee HC, Mounsey JP, & Patel MK (2005). Modulation of Na(v)1.5 by β 1- and β 3-subunit co-expression in mammalian cells. *Pflügers Arch* **449**, 403-412.

Kucera JP, Rohr S, & Rudy Y (2002). Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ Res* **91**, 1176-1182.

Kurachi Y (1994). G-protein control of cardiac potassium channels. *Trends Cardiovasc Med* **4**, 64-69.

Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, & Le Marec H (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* **104**, 3081-3086.

Laird JMA, Souslova V, Wood JN, & Cervero F (2002). Deficits in visceral pain and referred hyperalgesia in Nav1.8 (SNS/PN3)-null mice. *J Neurosci* **22**, 8352-8356.

Laitinen-Forsblom PJ, Makynen P, Makynen H, Yli-Mayry S, Virtanen V, Kontula K, & alto-Setala K (2006). SCN5A mutation associated with cardiac conduction defect and atrial arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* **17**, 480-485.

Lemaillet G, Walker B, & Lambert S (2003). Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel α subunits. *J Biol Chem* **278**, 27333-27339.

Levy F, Muehlethaler K, Salvi S, Peitrequin AL, Lindholm CK, Cerottini JC, & Rimoldi D (2005). Ubiquitylation of a melanosomal protein by HECT-E3 ligases serves as sorting signal for lysosomal degradation. *Mol Biol Cell* **16**, 1777-1787.

Li MX, Spyrapoulos L, & Sykes BD (1999). Binding of cardiac troponin-I147-163 induces a structural opening in human cardiac troponin-C. *Biochemistry* **38**, 8289-8298.

Li Q, Liu Y, Shen PY, Dai XQ, Wang S, Smillie LB, Sandford R, & Chen XZ (2003). Troponin I binds polycystin-L and inhibits its calcium-induced channel activation. *Biochemistry* **42**, 7618-7625.

Li Q, Montalbetti N, Shen PY, Dai XQ, Cheeseman CI, Karpinski E, Wu G, Cantiello HF, & Chen XZ (2005). Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity. *Hum Mol Genet* **14**, 1587-1603.

Liu CJ, Dib-Hajj SD, Renganathan M, Cummins TR, & Waxman SG (2003). Modulation of the cardiac sodium channel Nav1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J Biol Chem* **278**, 1029-1036.

Lo-A-Njoe SM, Wilde AA, van Erven L, & Blom NA (2005). Syndactyly and long QT syndrome (CaV1.2 missense mutation G406R) is associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Rhythm* **2**, 1365-1368.

Lopez-Santiago LF, Meadows LS, Ernst SJ, Chen C, Malhotra JD, McEwen DP, Speelman A, Noebels JL, Maier SK, Lopatin AN, & Isom LL (2007). Sodium channel Scn1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J Mol Cell Cardiol*.

Lu L, Zhang Q, Timofeyev V, Zhang Z, Young JN, Shin HS, Knowlton AA, & Chiamvimonvat N (2007). Molecular Coupling of a Ca²⁺-Activated K⁺ Channel to L-type Ca²⁺ Channels via α -Actinin2. *Circ Res* **100**, 112-120.

Lu T, Lee HC, Kabat JA, & Shibata EF (1999). Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein α subunit. *J Physiol* **518**, 371-384.

Maier LS & Bers DM (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 919-939.

Maier SKG, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, & Catterall WA (2004c). Distinct subcellular localization of different sodium channel α and β subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* **109**, 1421-1427.

Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, Pagel MD, Pu J, Tester DJ, & Ackerman MJ (2003). A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res* **93**, 821-828.

Makita N, Bennett PB, Jr., & George AL, Jr. (1994). Voltage-gated Na⁺ channel β 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J Biol Chem* **269**, 7571-7578.

Malhotra JD, Chen C, Rivolta I, Abriel H, Malhotra R, Mattei LN, Brosius FC, Kass RS, & Isom LL (2001). Characterization of sodium channel α - and β -Subunits in rat and mouse cardiac myocytes. *Circulation* **103**, 1303-1310.

Maltsev VA & Undrovinas AI (1997). Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac sodium channel. *Am J Physiol* **273**, H1832-H1840.

Manavalan P, Dearborn DG, McPherson JM, & Smith AE (1995). Sequence homologies between nucleotide binding regions of CFTR and G-proteins suggest structural and functional similarities. *FEBS Lett* **366**, 87-91.

Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA, & Scheuer T (2001). Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 15348-15353.

Margolskee RF, McHendry-Rinde B, & Horn R (1993b). Panning transfected cells for electrophysiological studies. *Biotechniques* **15**, 906-911.

Maruoka ND, Steele DF, Au BP, Dan P, Zhang X, Moore ED, & Fedida D (2000). α -actinin-2 couples to cardiac Kv1.5 channels, regulating current density and channel localization in HEK cells. *FEBS Lett* **473**, 188-194.

Mason HS, Latten MJ, Godoy LD, Horowitz B, & Kenyon JL (2002). Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. *Mol Pharmacol* **61**, 285-293.

Matsuda JJ, Lee H, & Shibata EF (1992). Enhancement of rabbit cardiac sodium channels by beta-adrenergic stimulation. *Circ Res* **70**, 199-207.

McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T, & Catterall WA (1998). Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the β 1 subunit. *J Biol Chem* **273**, 3954-3962.

McEwen DP, Meadows LS, Chen C, Thyagarajan V, & Isom LL (2004). Sodium channel β 1 subunit-mediated modulation of Nav1.2 currents and cell surface density is dependent on interactions with contactin and ankyrin. *J Biol Chem* **279**, 16044-16049.

McNair WP, Ku L, Taylor MR, Fain PR, Dao D, Wolfel E, & Mestroni L (2004). SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation* **110**, 2163-2167.

Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT, Makielski JC, & Ackerman MJ (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **116**, 134-142.

Merrill MA, Malik Z, Akyol Z, Bartos JA, Leonard AS, Hudmon A, Shea MA, & Hell JW (2007). Displacement of alpha-actinin from the NMDA receptor NR1 C0 domain By Ca²⁺/calmodulin promotes CaMKII binding. *Biochemistry* **46**, 8485-8497.

Mills M, Yang N, Weinberger R, Vander Woude DL, Beggs AH, Eastel S, & North K (2001). Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet* **10**, 1335-1346.

Mogensen J, Bahl A, & McKenna WJ (2003). Hypertrophic cardiomyopathy-the clinical challenge of managing a hereditary heart condition. *Eur Heart J* **24**, 496-498.

Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, Bowles KR, Coveler KJ, Marx JG, Chrisco MA, Murphy RT, Lurie PR, Schwartz RJ, Elliott PM, Vatta M, McKenna W, Towbin JA, & Bowles NE (2003). Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab* **80**, 207-215.

Mohler PJ, Gramolini AO, & Bennett V (2002). The ankyrin-B C-terminal domain determines activity of ankyrin-B/G chimeras in rescue of abnormal inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptor distribution in ankyrin-B (-/-) neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* **277**, 10599-10607.

Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, Lemaillet G, Lambert S, Priori SG, & Bennett V (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17533-17538.

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, DuBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Marec HL, & Bennett V (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**, 634-639.

Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, Priori SG, Keating MT, & Bennett V (2004). A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9137-9142.

Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, & Jackson AP (2000). $\beta 3$: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2308-2313.

Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang ASY, Tateyama M, & Kass RS (2004). The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* **123**, 155-165.

Murphy BJ, Rogers J, Perdichizzi AP, Colvin AA, & Catterall WA (1996). cAMP-dependent phosphorylation of two sites in the α subunit of the cardiac sodium channel. *J Biol Chem* **271**, 28837-28843.

Murray KT, Hu NN, Daw JR, Shin HG, Watson MT, Mashburn AB, & George AL, Jr. (1997). Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na⁺ channel. *Circ Res* **80**, 370-376.

Nuss HB, Chiamvimonvat N, Pérez-garcía MT, Tomaselli GF, & Marbán E (1995). Functional association of the β 1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle (μ 1) sodium channel α subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* **106**, 1171-1191.

Okuse K, Malik-Hall M, Baker MD, Poon WYL, Kong H, Chao MV, & Wood JN (2002). Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* **417**, 653-656.

Olson TM, Michels VV, Ballew JD, Reyna SP, Karst ML, Herron KJ, Horton SC, Rodeheffer RJ, & Anderson JL (2005). Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation. *J Am Med Assoc* **293**, 447-454.

Otey CA & Carpen O (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 104-111.

Ou Y, Strege P, Miller SM, Makielski J, Ackerman M, Gibbons SJ, & Farrugia G (2003). Syntrophin γ 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem* **278**, 1915-1923.

Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AEO, Huang CLH, Vandenberg JI, Colledge WH, & Grace AA (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 6210-6215.

Parmacek MS & Solaro RJ (2004). Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Prog Cardiovasc Dis* **47**, 159-176.

Perry SV (1979). The regulation of contractile activity in muscle. *Biochem Soc Trans* **7**, 593-617.

Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, & Le MH (2006). Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol* **17**, 270-275.

Qu Y, Isom LL, Westenbroek RE, Rogers JC, Tanada TN, McCormick KA, Scheuer T, & Catterall WA (1995). Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in *Xenopus* oocytes by β 1 subunits. *J Biol Chem* **270**, 25696-25701.

Ribaux P, Bleicher F, Couble ML, Amsellem J, Cohen SA, Berthier C, & Blaineau S (2001). Voltage-gated sodium channel (SkM1) content in dystrophin-deficient muscle. *Pflügers Arch* **441**, 746-755.

Rich MM, Kraner SD, & Barchi RL (1999). Altered gene expression in steroid-treated denervated muscle. *Neurobiol Dis* **6**, 515-522.

Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaïche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, & Komajda M (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* **107**, 2227-2232.

Robison AJ, Bass MA, Jiao Y, MacMillan LB, Carmody LC, Bartlett RK, & Colbran RJ (2005). Multivalent interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic density proteins NR2B, densin-180, and alpha-actinin-2. *J Biol Chem* **280**, 35329-35336.

Rohl CA, Boeckman FA, Baker C, Scheuer T, Catterall WA, & Klevit RE (1999). Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* **38**, 855-861.

Rotin D, Staub O, & Haguenaer-Tsapis R (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* **176**, 1-17.

Rougier JS, van Bemmelen MX, Bruce MC, Jespersen T, Gavillet B, Apothéloz F, Cordonier S, Staub O, Rotin D, & Abriel H (2005). Molecular Determinants of Voltage-Gated Sodium Channel Regulation by the Nedd4/Nedd4-like Proteins. *Am J Physiol* **288**, C692-C701.

Royer A, van Veen TA, Le BS, Marionneau C, Griol-Charhbili V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, & Charpentier F (2005). Mouse model of SCN5A-linked hereditary Lenegre's disease: age-related conduction slowing and myocardial fibrosis. *Circulation* **111**, 1738-1746.

Rycroft BK & Gibb AJ (2004). Regulation of single NMDA receptor channel activity by alpha-actinin and calmodulin in rat hippocampal granule cells. *J Physiol* **557**, 795-808.

Sadeghi A, Doyle AD, & Johnson BD (2002). Regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel by the actin-binding proteins alpha-actinin and dystrophin. *Am J Physiol* **282**, C1502-C1511.

Saimi Y & Kung C (2002). Calmodulin as an ion channel subunit. *Annu Rev Physiol* **64**, 289-311.

Sampo B, Tricaud N, Leveque C, Seagar M, Couraud F, & Dargent B (2000). Direct interaction between synaptotagmin and the intracellular loop I-II of neuronal voltage-sensitive sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3666-3671.

Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AAM, Escande D, Mannens MMAM, & Le Marec H (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in *SCN5A*. *Nat Genet* **23**, 20-21.

Schreibmayer W, Dessauer CW, Vorobiov D, Gilman AG, Lester HA, Davidson N, & Dascal N (1996). Inhibition of an inwardly rectifying K⁺ channel by G-protein alpha-subunits. *Nature* **380**, 624-627.

Schultz J, Hoffmuller U, Krause G, Ashurst J, Macias MJ, Schmieder P, Schneider-Mergener J, & Oschkinat H (1998). Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol* **5**, 19-24.

Shibata EF, Brown TL, Washburn ZW, Bai J, Revak TJ, & Butters CA (2006). Autonomic regulation of voltage-gated cardiac ion channels. *J Cardiovasc Electrophysiol* **17 Suppl 1**, S34-S42.

Shin HG & Murray KT (2001). Conventional protein kinase C isoforms and cross-activation of protein kinase A regulate cardiac Na⁺ current. *FEBS Lett* **495**, 154-158.

Shirao T & Sekino Y (2001). Clustering and anchoring mechanisms of molecular constituents of postsynaptic scaffolds in dendritic spines. *Neurosci Res* **40**, 1-7.

Siegelbaum SA (1994). Channel regulation. Ion channel control by tyrosine phosphorylation. *Curr Biol* **4**, 242-245.

Smith MR & Goldin AL (1997). Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophys J* **73**, 1885-1895.

Smits JPP, Koopmann TT, Wilders R, Veldkamp MW, Opthof T, Bhuiyan ZA, Mannens MMAM, Balsler JR, Tan HL, Bezzina CR, & Wilde AAM (2005). A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 969-981.

Solaro RJ (1999). Troponin I, stunning, hypertrophy, and failure of the heart. *Circ Res* **84**, 122-124.

Sorimachi H, Freiburg A, Kolmerer B, Ishiura S, Stier G, Gregorio CC, Labeit D, Linke WA, Suzuki K, & Labeit S (1997). Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol* **270**, 688-695.

Spampanato J, Kearney JA, de Haan G, McEwen DP, Escayg A, Aradi I, MacDonald BT, Levin SI, Soltesz I, Benna P, Montalenti E, Isom LL, Goldin AL, & Meisler MH (2004). A novel epilepsy mutation in the sodium channel *SCN1A* identifies a cytoplasmic domain for β subunit interaction. *J Neurosci* **24**, 10022-10034.

Splawski I, Timothy KW, Tateyama M, Clancy CE, Malhotra A, Beggs AH, Cappuccio FP, Sagnella GA, Kass RS, & Keating MT (2002). Variant of *SCN5A* sodium channel implicated in risk of cardiac arrhythmia. *Science* **297**, 1333-1336.

Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, & Rotin D (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na^+ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J* **15**, 2371-2380.

Strege PR, Holm AN, Rich A, Miller SM, Ou Y, Sarr MG, & Farrugia G (2003). Cytoskeletal modulation of sodium current in human jejunal circular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **284**, C60-C66.

Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, & Numa S (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**, 597-603.

Takada F & Beggs AH (2002). α -Actinins. In *Encyclopedia of Molecular Medicine*, ed. Creighton TE, pp. 122-127. J Wiley & Sons, Inc., New York.

Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van Den Berg MP, Wilde AA, & Balseer JR (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* **409**, 1043-1047.

Tibbs VC, Gray PC, Catterall WA, & Murphy BJ (1998). AKAP15 anchors cAMP-dependent protein kinase to brain sodium channels. *J Biol Chem* **273**, 25783-25788.

Tokuue Y, Goto S, Imamura M, Obinata T, Masaki T, & Endo T (1991). Transfection of chicken skeletal muscle alpha-actinin cDNA into nonmuscle and myogenic cells: dimerization is not essential for alpha-actinin to bind to microfilaments. *Exp Cell Res* **197**, 158-167.

Toyofuku T, Akamatsu Y, Zhang H, Kuzuya T, Tada M, & Hori M (2001). c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **276**, 1780-1788.

Trimmer JS, Cooperman SS, Agnew WS, & Mandel G (1990). Regulation of muscle sodium channel transcripts during development and in response to denervation. *Dev Biol* **142**, 360-367.

Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ, & Tawil R (2002). Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* **110**, 381-388.

Undrovinas AI, Shander GS, & Makielski JC (1995). Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am J Physiol* **269**, H203-H214.

Vallins WJ, Brand NJ, Dabhade N, Butler-Browne G, Yacoub MH, & Barton PJ (1990). Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction. *FEBS Lett* **270**, 57-61.

van Bemmelen MX, Rougier JS, Gavillet B, Apothéloz F, Daidié D, Tateyama M, Rivolta I, Thomas MA, Kass RS, Staub O, & Abriel H (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ Res* **95**, 284-291.

Varsanyi M, Sarkozi S, Szegedi C, Herzog A, & Jona I (2002). Troponin I converts the skeletal muscle ryanodine receptor into a rectifying calcium release channel. *FEBS Lett* **515**, 155-158.

Vassilev P, Scheuer T, & Catterall WA (1989). Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 8147-8151.

Virel A & Backman L (2004). Molecular evolution and structure of alpha-actinin. *Mol Biol Evol* **21**, 1024-1031.

Viswanathan PC, Benson DW, & Balsler JR (2003). A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J Clin Invest* **111**, 341-346.

Walker BD, Krahn AD, Klein GJ, Skanes AC, Wang J, Hegele RA, & Yee R (2003). Congenital and acquired long QT syndromes. *Can J Cardiol* **19**, 76-87.

Wang DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL, Jr., & Benson DW (2002b). Clinical, genetic, and biophysical characterization of *SCN5A* mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation* **105**, 341-346.

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, Vanraay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, De Jager T, Schwartz PJ, Towbin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, & Keating MT (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* **12**, 17-23.

Wang Q, Li Z, Shen J, & Keating MT (1996b). Genomic organization of the human *SCN5A* gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* **34**, 9-16.

Wang Q, Shen J, Li Z, Timothy K, Vincent GM, Priori SG, Schwartz PJ, & Keating MT. Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *American Journal of Human Genetics* 57[4], 1340. 1995a.
Ref Type: Abstract

Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, & Keating MT (1995b). *SCN5A* mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**, 805-811.

Wehrens XHT, Abriel H, Cabo C, Benhorin J, & Kass RS (2000). Arrhythmogenic mechanism of an LQT-3 mutation of the human heart Na⁺ channel α -subunit: A computational analysis. *Circulation* **102**, 584-590.

Weiss LA, Escayg A, Kearney JA, Trudeau M, MacDonald BT, Mori M, Reichert J, Buxbaum JD, & Meisler MH (2003). Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism. *Mol Psychiatry* **8**, 186-194.

West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL, & Catterall WA (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 10910-10914.

Williams MW & Bloch RJ (1999). Extensive but coordinated reorganization of the membrane skeleton in myofibers of dystrophic (mdx) mice. *J Cell Biol* **144**, 1259-1270.

Wingo TL, Shah VN, Anderson ME, Lybrand TP, Chazin WJ, & Balse JR (2004). An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac excitability. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 219-225.

Wittmack EK, Rush AM, Hudmon A, Waxman SG, & Dib-Hajj SD (2005). Voltage-gated sodium channel Nav1.6 is modulated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* **25**, 6621-6630.

Wu X, Davis GE, Meininger GA, Wilson E, & Davis MJ (2001). Regulation of the L-type calcium channel by α 5 β 1 integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J Biol Chem* **276**, 30285-30292.

Wyszynski M, Kharazia V, Shanghvi R, Rao A, Beggs AH, Craig AM, Weinberg R, & Sheng M (1998). Differential regional expression and ultrastructural localization of α -actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain. *J Neurosci* **18**, 1383-1392.

Wyszynski M, Lin J, Rao A, Nigh E, Beggs AH, Craig AM, & Sheng M (1997). Competitive binding of α -actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* **385**, 439-442.

Yamagishi T, Janecki M, Marban E, & Tomaselli GF (1997). Topology of the P segments in the sodium channel pore revealed by cysteine mutagenesis. *Biophys J* **73**, 195-204.

Yang B, Jung D, Rafael JA, Chamberlain JS, & Campbell KP (1995). Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem* **270**, 4975-4978.

Yang JS, Bennett PB, Makita N, George AL, & Barchi RL (1993). Expression of the sodium channel β_1 subunit in rat skeletal muscle is selectively associated with the tetrodotoxin-sensitive α subunit isoform. *Neuron* **11**, 915-922.

Yang JSJ, Sladky JT, Kallen RG, & Barchi RL (1991). TTX-sensitive and TTX-insensitive sodium channel mRNA transcripts are independently regulated in adult skeletal muscle after denervation. *Neuron* **7**, 421-427.

Yang N, Ji S, Zhou M, Ptáček LJ, Barchi RL, Horn R, & George AL, Jr. (1994). Sodium channel mutations in paramyotonia congenita exhibit similar biophysical phenotypes *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12785-12789.

Yarbrough TL, Lu T, Lee HC, & Shibata EF (2002). Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res* **90**, 443-449.

Ylanne J, Scheffzek K, Young P, & Saraste M (2001). Crystal Structure of the alpha-Actinin Rod: Four Spectrin Repeats Forming a Thigh Dimer. *Cell Mol Biol Lett* **6**, 234.

Yu FH & Catterall WA (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* **4**, 207.

Zhou J, Shin HG, Yi J, Shen W, Williams CP, & Murray KT (2002). Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ Res* **91**, 540-546.

Zhou J, Yi J, Hu NN, George AL, Jr., & Murray KT (2000). Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circ Res* **87**, 33-38.

Zimmer T, Biskup C, Bollensdorff C, & Benndorf K (2002). The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol* **186**, 13-21.

Zimmer T, Biskup C, Bollensdorff C, & Benndorf K (2002a). The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol* **186**, 13-21.

Annexe I

Regulation of Na_v channels in sensory neurons

Mohamed Chahine¹, Rahima Ziane¹, Kausalia Vijayaragavan¹ and Yasushi Okamura²

¹Laval Hospital, Research Centre, Sainte-Foy, Quebec G1V 4G5, Canada, and Department of Medicine, Laval University, Sainte-Foy, Quebec G1K 7P4, Canada

²Department of Developmental Neurophysiology, Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Okazaki, Japan

Voltage-gated Na⁺ channels have an essential role in the biophysical properties of nociceptive neurons. Factors that regulate Na⁺ channel function are of interest from both pathophysiological and therapeutic perspectives. Increasing evidence indicates that changes in expression or inappropriate modulation of these channels leads to electrical instability of the cell membrane and the inappropriate spontaneous activity that is observed following nerve injury, and that this might contribute to neuropathic pain. The role of Na_v channels in nociception depends on modulation by factors such as auxiliary β-subunits, cytoskeletal proteins and the phosphorylation state of neurons. In this review we describe the modulation of Na_v channels on sensory neurons by auxiliary β-subunits, protein kinases and cytoskeletal proteins.

Physiology and molecular biology of Na⁺ channels

Voltage-gated Na⁺ channels transmit electrical signals through action-potential (AP) generation and propagation from sensory neurons to the CNS. They have important roles in modulating the resting membrane potential and subthreshold oscillations, and in the generation and conduction of APs.

Sensory neurons express several Na⁺ channel isoforms. The situation is made more complex because these channels complex with one or more auxiliary β-subunits to create further diversity in the behaviour of these Na⁺ channels and, thus, the physiology of the specific neuron. In addition to the heterogeneity caused by association

with auxiliary β-subunits, Na⁺ channels are also modulated by isoforms of protein kinase C (PKC) and PKA, G proteins, receptors, cytoskeletal elements, and adaptor proteins such as ankyrins.

Initial influx of Na⁺ causes subthreshold depolarization of the membrane through a rapid, transient increase in Na⁺ conductance to a level that equals the K⁺ conductance (which is responsible for the resting membrane potential). Subthreshold responses vary in sensory neurons but seem to be modulated by the presence of persistent currents in C-fibres [1]. AP thresholds also differ: C-fibres have a high voltage threshold for AP activation (41 ± 5 mV), whereas A-fibres have a lower threshold (30 ± 4 mV), probably because of differences in the Na⁺ channel isoforms and their densities in these neurons. α/β- and Aδ-fibres conduct predominantly low-threshold, fast-inactivating, tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) currents that contribute to the AP with a rising time of 200–300 dV dt⁻¹, whereas C-fibres conduct high-threshold, slow-inactivating, TTX-resistant (TTX-R) currents that contribute to the AP with a rising time of 170 dV dt⁻¹ [2]. Ten isoforms of voltage-gated Na⁺ channels have been cloned from various tissues [3]; these channels differ in primary structure, and pharmacological and biophysical properties (Table 1). Voltage-gated Na⁺ channels are heteromultimeric complexes that are composed of one 260-kDa α-subunit and either one or more auxiliary β-subunits (β₁–β₄) (Figure 1). The isoforms of the α-subunits are classified as either sensitive or insensitive to TTX. To date, at least seven of the mammalian

Table 1. Diversity and properties of Na_v channels^a

Channel name	Gene name	Human chromosome location	TTX sensitivity	Tissue localization	Expression in sensory neurons ^b
Na _v 1.1	SCN1A	2q2a	Sensitive	CNS, PNS, heart	+++
Na _v 1.2	SCN2A	2q23–24	Sensitive	CNS	+
Na _v 1.3	SCN3A	2q24	Sensitive	CNS, heart	Expression after axotomy
Na _v 1.4	SCN4A	17q23–25	Sensitive	Skeletal muscle	–
Na _v 1.5	SCN5A	3p21	Resistant	Heart, CNS	–
Na _v 1.6	SCN8A	12q13	Sensitive	CNS, PNS, heart, glia, nodes of Ranvier	+++
Na _v 1.7	SCN9A	2q24	Sensitive	PNS, Schwann cells	+++
Na _v 1.8	SCN10A	3p22–24	Resistant	PNS	+++
Na _v 1.9	SCN11A	3p21–24	Resistant	PNS	+++

^aReviewed in [3].

^b+++ , abundant; + , present; – , no expression.

Corresponding author: Chahine, M. (mohamed.chahine@phc.ulaval.ca).

Available online 25 August 2005

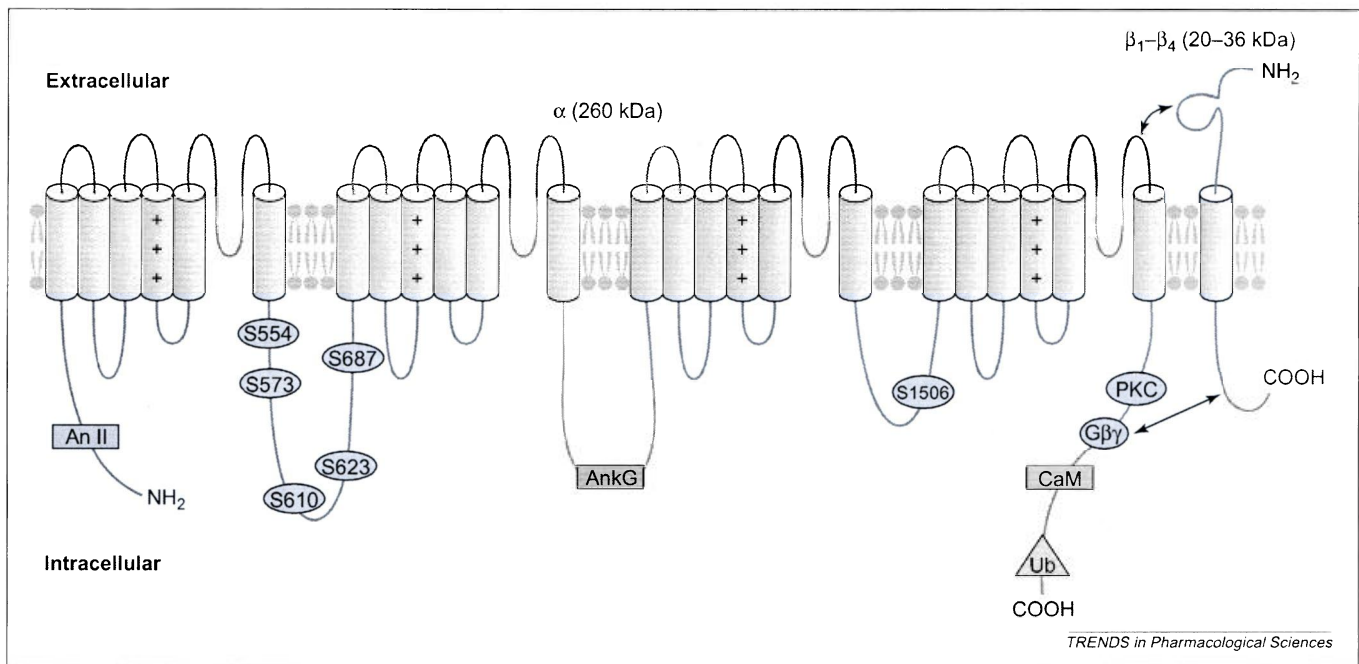


Figure 1. α - and β -subunits of Na_v channels. Sites at which Na_v channels are regulated are highlighted. S554, S573, S610, S623, S687 and S1506 residues within Na_v channels are phosphorylated by either protein kinase A (PKA) or PKC or both (see main text for further information). The arrows indicate possible interactions of different regions of the β -subunit with the α -subunit. Abbreviations: An II, annexin II; AnKG, ankyrin G; CaM, calmodulin; $\text{G}\beta\gamma$, G-protein β - γ complex; Ub, ubiquitin.

α -subunit isoforms are known to be expressed in the nervous system: $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ and $\text{Na}_v1.6$ predominantly in the CNS, and $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ and $\text{Na}_v1.9$ principally in the PNS (Table 2) [4]. Two Na^+ channels, a fast-inactivating TTX-S channel ($\text{Na}_v1.7$) and a slow-inactivating TTX-R channel ($\text{Na}_v1.8$), predominate in small nociceptive sensory neurons. Recent studies have identified $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.3$ and $\text{Na}_v1.6$ in the heart [5] and $\text{Na}_v1.5$ in the CNS [6].

The α -subunit is composed of four homologous domains (DI–DIV), each with six α -helical transmembrane-spanning segments (S1–S6) (Figure 1). The S4 segments of each domain form part of the voltage sensors, and the short linkers that connect S5 and S6 form the external mouth of the pore and the selectivity filter. The cytoplasmic linker between DIII and DIV homologous domains acts as a ‘hinged lid’ that occludes the internal side of the permeation pathway during inactivation. Residues of the S6 segments in each domain (DIS6–DIVS6) line the internal vestibule and contribute to the binding site for local anaesthetics. Mutations within DIVS6 weaken the inhibition produced by the amide-type anaesthetic etidocaine [7].

Role of the auxiliary β -subunits

Auxiliary β -subunits, which are expressed widely in neuronal and muscle tissues, interact with the α -subunit

to modulate the biophysical properties of Na^+ channels, including channel gating and cellular localization. The first β -subunit to be cloned in 1992 was from rat brain [8]. To date, at least five isoforms of auxiliary β -subunits have been identified, termed β_1 – β_4 -subunits and the β_{1A} -subunit (which is a splice variant of the β_1 -subunit) (Table 2) (reviewed in [9]).

In general, the auxiliary β -subunits are 22–36-kDa proteins with a single transmembrane segment, a long, heavily glycosylated extracellular N-terminal (36% of the protein mass) that has an immunoglobulin-like structure with homology to cell-adhesion molecules (CAMs), and a short, intracellular C-terminal tail (Figure 1). The β_2 -subunit is homologous to contactin and interacts with tenascin-C and tenascin-R. Contactin is a glycosyl-phosphatidylinositol cell-adhesion protein that is expressed in neurons and interacts with membrane glycoproteins such as NrCAM, neurofascin and Caspr, which are present at nodes of Ranvier and are involved in Na^+ channel clustering [10]; tenascin-C and tenascin-R are extracellular matrix proteins. The β_1 - and β_3 -subunits associate non-covalently with the Na^+ channel whereas the β_2 - and β_4 -subunits bind covalently to the channel through a cysteine residue on the extracellular loop [11–13]. Co-immunoprecipitation studies have shown that contactin interacts specifically with the β_1 -subunit [14]. In addition,

Table 2. β -subunit isoforms of Na_v channels^a

Subunit	Apparent M_r (kDa)	Tissue expression	Human chromosomal location	Refs
β_1	36	Heart, skeletal muscle, CNS, glial cells, PNS (large, medium and small DRG)	19q13	[8]
β_{1A}	45	Heart, skeletal muscle, adrenal gland, PNS	19q13	[16]
β_2	33	CNS, PNS (large, medium and small DRG), heart	11q22	[76,77]
β_3	–	CNS, adrenal gland, kidney, PNS (medium and small DRG)	11q23.3	[18]
β_4	38	Heart, skeletal muscle, CNS, PNS (large DRG)	–	[12]

^aAbbreviation: DRG, dorsal root ganglia.

the β_1 -subunit is tyrosine-phosphorylated, and the phosphorylated and non-phosphorylated forms might be located in different areas of the heart [15]. The association of Na^+ channels with β -subunits is important for promoting and stabilizing the density of channels in the plasma membrane [16,17], and in the translocation and/or clustering of neuronal Na^+ channels to specific, distinct domains in the neuron such as the initial axonal segments of nodes of Ranvier. *In situ* hybridization and immunocytochemistry shows that small-diameter and large-diameter fibres of the PNS and dorsal root ganglia (DRG) contain three isoforms of β -subunit, namely the β_1 -, β_2 - and β_3 -subunits [18,19].

Modulation of sensory Na^+ channels

In many excitable cells, Na^+ channels are regulated by signal transduction cascades. For example, the activation of PKCs (Ca^{2+} -dependent) (Figure 2) and PKA (cAMP-dependent) (Figure 3) affects the biophysical properties of Na_v channels and regulates their surface density by modulating their trafficking.

Modulation by PKC

Activation of PKC by phorbol esters causes a marked reduction in peak currents in several cloned Na^+ channel isoforms, including $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.7$ and $\text{Na}_v1.8$, expressed in *Xenopus* oocytes [20–23]. Similar reductions in macroscopic currents are observed in Chinese hamster ovary (CHO), Chinese hamster lung 1610 and neuroblastoma cells treated with PKC activators. Inhibition of channel activity has been attributed to a slowed time constant of inactivation ($\text{Na}_v1.2$ in CHO, *Xenopus* oocytes and neuroblastoma) and/or a reduced availability of channels in the closed state caused by negative shifts in steady-state inactivation. Phosphopeptide analysis has revealed that the PKC-induced reduction in $\text{Na}_v1.2$ currents requires phosphorylation of serine residues in the cytoplasmic linker between DIII and DIV (S1506) and between DI and DII (S554 and S573)

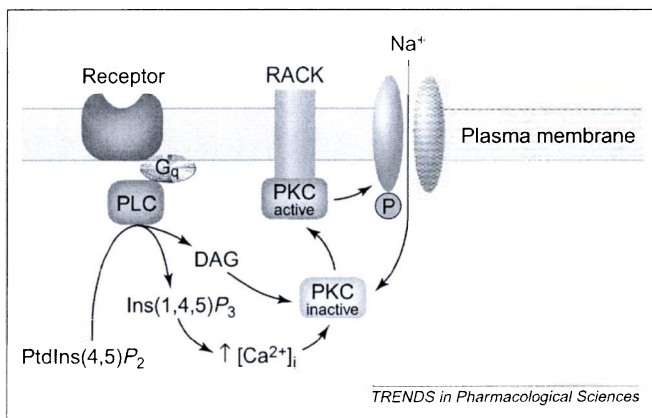


Figure 2. A physiological response that results from the association of an activated protein kinase C (PKC) isozyme with its RACK (receptor for activated C kinase) and the phosphorylation of a nearby Na_v channel. Activation of a G-protein-coupled receptor leads to activation of phospholipase C (PLC) and the production of inositol (1,4,5)-trisphosphate [$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$] and diacylglycerol (DAG). $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ triggers the release of Ca^{2+} from internal stores, and DAG and Ca^{2+} can both activate isoforms of PKC and enable their translocation to the membrane and subsequent phosphorylation and regulation of Na^+ channels. Abbreviation: $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate.

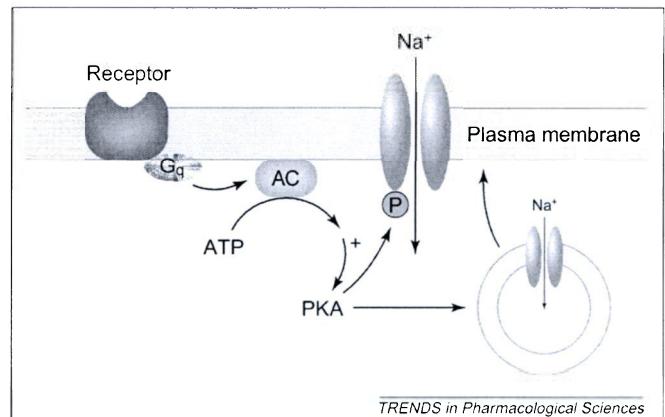


Figure 3. Regulation of Na_v channels by protein kinase A (PKA). Activation of a G_q -coupled receptor by, for example, bradykinin leads to the stimulation of adenylyl cyclase (AC). In turn, this activates PKA, which phosphorylates Na_v channels and promotes Na_v channel trafficking (see text for further information).

(Figure 1) [24]. Because these sites are highly conserved in Na^+ channels, a similar mechanism might be involved in PKC-induced reduction of current. Furthermore, a similar reduction of peak Na^+ currents is also observed in Na^+ channels from embryonic brain in culture, and hippocampal, pyramidal, medium spiny and cortical neurons following stimulation of muscarinic acetylcholine receptors, which activate PKC [25,26] (Figure 2).

However, different results are observed when PKC activators are used on isolated sensory neurons from rat DRG, where phorbol-based activators of PKC (12-myristate, 13-acetate and phorbol, 12,13-dibutyrate) cause a dose-dependent increase in the amplitude of TTX-R Na^+ currents [27,28]. These effects are inhibited by staurosporine and PKC19–36 peptide, which are specific inhibitors of PKC. The rise in amplitude is attributed to increased conductance, a slight hyperpolarized shift in steady-state availability, and increased rates of inactivation. Because DRG neurons express at least two types of TTX-R channel ($\text{Na}_v1.8$ and $\text{Na}_v1.9$) [29], the specific Na^+ channel that is modulated is unknown.

PKCs belong to a family of 12 isozymes, which are divided into conventional, novel and atypical groups (Table 3) [30,31]. Specific PKC isoforms of the conventional and novel families are involved in hyperexcitability of nociceptive neurons [32–35]. For example, in many inflammatory-pain models in rats, increased activity of nPKC ϵ and cPKC β II isozymes contribute to acute and

Table 3. Isozymes of PKC in mammals^{a,b}

PKC types	PKC activators	PKC isoenzyme	Tissue expression
Conventional	Ca^{2+} , PS, DAG	α , β , β II	Widespread
		γ	CNS, spinal cord
Novel	PS, DAG	δ	Widespread
		ϵ	CNS
		η	Heart, lung
		θ	CNS, skeletal muscle
Atypical	PS, $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$	ζ	Widespread
		ι/λ	CNS, kidney, lung

^aReviewed in [31].

^bAbbreviations: DAG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C; PS, phosphatidylserine; $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate.

prolonged hyperalgesia [32–35]. A recent study shows that downregulation of $\text{Na}_v1.7$ currents is caused by the $\text{nPKC}\epsilon$ and $\text{cPKC}\beta\text{II}$ isozymes whereas $\text{nPKC}\epsilon$ contributes to reduced $\text{Na}_v1.8$ currents [20]. These results are in contrast to the effects of PKC activation in native DRGs. This might be because there are at least two types of TTX-R channels ($\text{Na}_v1.8$ and $\text{Na}_v1.9$) in DRG neurons, which are modulated differentially by PKC [29], and that the modulation might differ depending on the expression system.

Modulation by PKA

In sensory neurons, activation of PKA by pro-inflammatory hyperalgesic agents such as 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E_2 results in a dose-dependent increase in TTX-R currents [27,28,36].

In *Xenopus* oocytes and transfected CHO cells, activation of PKA by forskolin or 8-bromo cAMP reduces the peak current levels of $\text{Na}_v1.2$ without changing significantly the steady-state properties [37,38]. Single-channel recording and analysis indicates that the PKA-induced reduction of peak Na^+ currents is caused by a decreased probability of opening during depolarization, which shifts the channels to a null-gating mode [38]. A similar reduction following activation of PKA, which is repressed by peptide inhibitors of PKA, is observed with $\text{Na}_v1.1$ channels in the brain [39].

The rise in current following PKA activation is accompanied by a shift to more hyperpolarized voltages in the voltage-dependence of activation and an increase in the rates of activation, deactivation and inactivation [27,28,36]. Similar effects are observed when cloned $\text{Na}_v1.5$ and $\text{Na}_v1.8$ (TTX-R) channels expressed in oocytes and COS-7 cells are stimulated by PKA activators such as forskolin [20,40]. Although the potentiation is inhibited by chloroquine, which blocks Golgi-aparatus function [41], it is not prevented by deleting postulated PKA-phosphorylation sites on the $\text{Na}_v1.2$ channel [42].

Smith and Goldin [42] have observed that the length of the DI–DII linker upstream of the conserved PKA-phosphorylation sites is an important determinant of the potentiation of the $\text{Na}_v1.2$ current. Interestingly, Sampo *et al.* [43] have reported that this upstream segment of the DI–DII region binds to synaptotagmin, a synaptic protein that might regulate PKA-induced potentiation of Na^+ currents. In the axons of *Aplysia* bag cells, activation of PKA enhances by 2–3-fold the rate of organelle transport along the microtubule track [44]. Signalling by cAMP might modulate accessory proteins that associate preferentially with some Na^+ channel isoforms and target these channels for transport to the membrane. Differences in trafficking might explain why activation of PKA potentiates the currents of some Na^+ channel isoforms ($\text{Na}_v1.5$ and $\text{Na}_v1.8$, which are TTX-R) but not others ($\text{Na}_v1.2$ and $\text{Na}_v1.7$, which are TTX-S).

Sites of modulation and convergence of PKC and PKA

Mutational analyses show that PKC phosphorylates the $\text{Na}_v1.2$ channel at several sites. One of the key sites in $\text{Na}_v1.2$ that is associated with reduced rates of inactivation involves PKC phosphorylation of the serine

residue at position 1506 on the DIII–DIV linker [KLGS(P)KKPQ] [45]. PKC also phosphorylates several other sites on this channel, including serine residues in the DI–DII linker (S554, S573 and S576). Cantrell *et al.* [46] have shown that maximum reduction in peak conductance of $\text{Na}_v1.2$ requires PKC phosphorylation on the DIII–DIV (S1506) and DI–DII linkers (S554 and S573). Phosphorylation of S576 and S1506 residues by PKC is believed to facilitate phosphorylation of the DI–DII loop by PKA at S573, S610, S623 and S687. Replacing S1506 of $\text{Na}_v1.2$ with a negatively charged residue mimics partially phosphorylation at this site and promotes PKA-dependent phosphorylation [46,47].

The co-involvement of S573 and S610 in the PKC–PKA-mediated reduction in peak $\text{Na}_v1.2$ currents raises the possibility of dual kinase regulation at a single site and convergent regulation of this channel by these two kinases [47]. Hyperpolarizing potentials of -110 mV promote PKC-dependent phosphorylation of $\text{Na}_v1.2$ by PKA. However, at depolarizing membrane potentials (-75 mV), the prerequisite for PKC-mediated activation is reduced gradually and significant modulation by PKA occurs without PKC activation [46,48].

Increased PKA-mediated phosphorylation of the channel might involve several processes. First, depolarization itself might cause a conformational change of the channel, which makes it more susceptible to regulation by PKA [48]. Second, depolarization might increase PKC-mediated phosphorylation of the channel and, thus, promote recruitment of PKA [49].

Phosphoprotein phosphatases such as calcineurin, phosphatase 1 and phosphatase 2A also have important roles in regulating Na^+ channels. The Ca^{2+} -regulated phosphatase calcineurin dephosphorylates S623 and S573, whereas phosphatase 2A selectively dephosphorylates S610 of the $\text{Na}_v1.2$ channel [47,50].

In addition to PKC, PKA and phosphatases, other proteins such as Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase, growth-factor-dependent receptor tyrosine kinases, extracellular signal-regulated kinases and heterotrimeric G proteins also modulate Na^+ channels [51–53]. More recently, it has been reported that activation of G proteins by $\text{GTP}\gamma\text{S}$ increases $\text{Na}_v1.8$ Na^+ currents [54].

Role of the DII–DIII linker in regulating Na^+ channels

Ankyrins are modular proteins that bind to actin-based cytoskeletons and numerous types of membrane proteins that lack significant homology [55]. Ankyrin-G-knockout mice have loss of voltage-gated Na^+ channels in myelinated axons and neurological defects. Targeting voltage-gated Na^+ channels in myelinated axons depends on the direct binding of ankyrin G to intracellular regions of voltage-gated Na^+ channel α -subunits and a crucial region that is responsible for binding to ankyrin G has been identified in the DII–DIII linker {V/A}P{I/L}AxxE{S/D}D (Figure 1). This consensus sequence is conserved in all mammalian voltage-gated Na^+ channels, which indicates that ankyrin G binds to all such channels. In this regard, $\text{Na}_v1.5$, the TTX-R Na^+ channel, colocalizes with ankyrin G at intercalated discs and T-tubule membranes in cardiomyocytes. Recently, mutation of one residue

(E1053K) in this consensus sequence in Na_v1.5 has been reported in Brugada syndrome [56]. The ability to bind to ankyrin G is lost in the mutant Na_v1.5 channel and it is not targeted fully to the cell surface in cardiomyocytes. The gating kinetics of this mutant Na_v1.5 is also altered. It remains to be determined whether ankyrin G regulates the targeting of voltage-gated channels in addition to their kinetics, and whether the E1053K mutation affects channel kinetics [57].

Role of the C-terminus in regulating Na⁺ channels

Na⁺ channels have a cytoplasmic C-terminal tail of 240 amino acids. The proximal half of the C-terminus is acidic (glutamic-acid rich) and is highly conserved between Na⁺ channels, whereas the distal half has little conservation. Homology modelling and circular-dichroism analysis predicts that the C-terminus is highly flexible, the first 100 amino acids form several α -helical structures (H1–H6), and the distal half is unstructured [58]. Although the C-terminus has a putative PKC-phosphorylation site (TKR), the role of this in regulating Na⁺ channels remains to be elucidated. The C-terminus possesses a G-protein-binding motif {QMEE[K/R]}, a calmodulin-binding Baa (basic amphipathic α -helix) or IQ motif (IQxxxRGxxxR) [51,59], and a ubiquitin-ligase-binding site (PPSY) (Figure 1). In this regard, it has been shown that Na_v1.5 levels are reduced by ubiquitination and subsequent endocytosis [60], and several studies suggest that this has a role in fast inactivation [61].

Yeast two-hybrid studies show that the C-termini of Na⁺ channel isoforms associate with several proteins. For example, a member of the cytoplasmic fibroblast growth factor family (FHF1B) binds selectively to the proximal 69–138 amino acids of the C-termini of Na_v1.9 and Na_v1.5 (amino acids 1588–1726 and 1773–1832, respectively) but not to other channel isoforms [62,63]. This interaction causes a hyperpolarizing shift in voltage-dependent inactivation in Na_v1.5 and, thus, decreases channel availability before depolarization [62,63], but the consequence of the association between FHF1B and Na_v1.9 is unknown. The shift in voltage-dependence might not be caused by FHF1B itself but might result from phosphorylation by unknown kinases that are thought to be recruited by FHF1B [63,64]. FHF1B interacts with scaffold proteins with different specificities for mitogen-activated protein kinase [64].

The C-termini of Na⁺ channels interact directly with several cytoskeletal and adaptor proteins such as contactin (Na_v1.9 and Na_v1.2), and dynein intermediate chain, α -tubulin, β -actin and moesin (Na_v1.8) [14,65,66]. Furthermore, cotransfection of contactin and Na_v1.2 in heterologous expression systems increases the surface expression of functional channels [14]. It is believed that the association of Na⁺ channels with a heavily glycosylated form of contactin might be important in modulating the targeting, density and clustering of channels at a distinct domain at nodes of Ranvier in DRG neurons, thus regulating glial–neuron communications in ion channel organization [14,67,68]. A mutation of a consensus aspartate at position 1861 of Na_v1.1 causes epilepsy and

disrupts interactions between the α -subunit and the β -subunit interactions [69].

The C-terminus of Na_v1.5 also binds to syntrophin γ 2, which consists of two tandem spectrin-homology domains at the N-terminus, a PDZ domain, and a unique, highly conserved C-terminus. The PDZ domains of syntrophin α , syntrophin β 1, syntrophin β 2 and syntrophin γ 2 interact with Na_v1.5 and Na_v1.4 via the C-terminal sequence motif {E[S/T]XV} [70]. It is suggested that syntrophins localize Na⁺ channels to the dystrophin network through the PDZ domain in skeletal muscle [71]. Cotransfection of syntrophin γ 2 and Na_v1.5 in HEK cells markedly shifts activation and reduces the availability of Na⁺ currents that are dependent on interactions between the C-terminus of Na_v1.5 and the PDZ domain of syntrophin γ 2 [72].

Role of the N-terminus in regulating Na⁺ channels

Little is known about the regulatory role of the N-terminus of Na_v channels. However, the N-terminus of Na_v1.8 binds to the light chain of annexin II (p11) (Figure 1), which is a cytoskeletal (F-actin) binding protein that associates with the plasma membrane in a Ca²⁺-dependent manner [73]. The association of annexin II with Na_v1.8 seems to promote the translocation of Na⁺ channels to the cell membrane of small DRG neurons where it is highly expressed [74]. Interestingly, a recent report showed that the N-terminus of rat Na_v1.4 also interacts with the C-terminal H5–H6 α -helical segment [75].

Concluding remarks

The release of hyperalgesic pro-inflammatory agents can result in changes in either expression or inappropriate regulation of sensory Na_v channels. In turn, this might lead to electrical instability of neurons and the inappropriate spontaneous activity that is observed following nerve injury, which might contribute to neuropathic pain. We have highlighted the fundamental regulatory mechanisms of: (i) several auxiliary β -subunits; (ii) phosphorylation by several kinases; and (iii) several cytoskeletal and adaptor proteins. Because Na_v channels in sensory neurons are promising targets for treating pain disorders, targeting any of these regulating factors might lead to better treatments.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge funding from the Heart and Stroke Foundation of Québec (HSFQ) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant MT-13181) for M.C. and Grants-in-Aid for Scientific Research (JSPS) support for Y.O. M.C. is an Edwards Senior Investigator (Joseph C. Edwards Foundation).

References

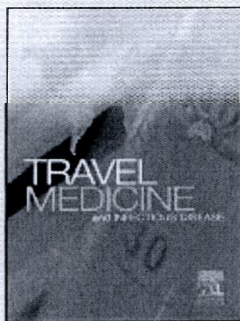
- Herzog, R.I. *et al.* (2001) Persistent TTX-resistant Na⁺ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 86, 1351–1364
- Villière, V. and McLachlan, E.M. (1996) Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *J. Neurophysiol.* 76, 1924–1941
- Goldin, A.L. (2001) Resurgence of sodium channel research. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 871–894

- 4 Ogata, N. and Ohishi, Y. (2002) Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn. J. Pharmacol.* 88, 365–377
- 5 Maier, S.K.G. *et al.* (2004) Distinct subcellular localization of different sodium channel α and β subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* 109, 1421–1427
- 6 Hartmann, H.A. *et al.* (1999) Selective localization of cardiac SCN5A sodium channels in limbic regions of rat brain. *Nat. Neurosci.* 2, 593–595
- 7 Ragsdale, D.S. *et al.* (1994) Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724–1728
- 8 Isom, L.L. *et al.* (1992) Primary structure and functional expression of the β_1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256, 839–842
- 9 Isom, L.L. (2001) Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 7, 42–54
- 10 Lustig, M. *et al.* (2001) Nr-CAM and neurofascin interactions regulate ankyrin G and sodium channel clustering at the node of Ranvier. *Curr. Biol.* 11, 1864–1869
- 11 Isom, L.L. (2002) The role of sodium channels in cell adhesion. *Front. Biosci.* 7, 12–23
- 12 Yu, F.H. *et al.* (2003) Sodium channel β_4 , a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to β_2 . *J. Neurosci.* 23, 7577–7585
- 13 Blackburn-Munro, G. and Fleetwood-Walker, S.M. (1999) The sodium channel auxiliary subunits β_1 and β_2 are differentially expressed in the spinal cord of neuropathic rats. *Neuroscience* 90, 153–164
- 14 Kazarinova-Noyes, K. *et al.* (2001) Contactin associates with Na⁺ channels and increases their functional expression. *J. Neurosci.* 21, 7517–7525
- 15 Malhotra, J.D. *et al.* (2004) Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel β_1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 40748–40754
- 16 Kazen-Gillespie, K.A. *et al.* (2000) Cloning, localization, and functional expression of sodium channel β_1A subunits. *J. Biol. Chem.* 275, 1079–1088
- 17 Vijayaragavan, K. *et al.* (2001) Gating properties of Na_v1.7 and Na_v1.8 peripheral nerve sodium channels. *J. Neurosci.* 21, 7909–7918
- 18 Morgan, K. *et al.* (2000) β_3 : an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2308–2313
- 19 Coward, K. *et al.* (2001) Sodium channel β_1 and β_2 subunits parallel SNS/PN3 α -subunit changes in injured human sensory neurons. *Neuroreport* 12, 483–488
- 20 Vijayaragavan, K. *et al.* (2004) Modulation of nav1.7 and nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase a and protein kinase C. *J. Neurophysiol.* 91, 1556–1569
- 21 Schreimbayer, W. *et al.* (1991) Molecular mechanism of protein kinase C modulation of sodium channel α -subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 291, 341–344
- 22 Murray, K.T. *et al.* (1997) Functional effects of protein kinase C activation on the human cardiac Na⁺ channel. *Circ. Res.* 80, 370–376
- 23 Bendahhou, S. *et al.* (1995) Serine-1321-independent regulation of the μ_1 adult skeletal muscle Na⁺ channel by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12003–12007
- 24 Cantrell, A.R. *et al.* (2002) Molecular mechanism of convergent regulation of brain Na⁺ channels by protein kinase C and protein kinase A anchored to AKAP-15. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 63–80
- 25 Mittmann, T. and Alzheimer, C. (1998) Muscarinic inhibition of persistent Na⁺ current in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 79, 1579–1582
- 26 Cantrell, A.R. *et al.* (1996) Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron* 16, 1019–1026
- 27 Gold, M.S. *et al.* (1996) Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1108–1112
- 28 Gold, M.S. *et al.* (1998) Modulation of TTX-R I_{Na} by PKC and PKA and their role in PGE₂-induced sensitization of rat sensory neurons *in vitro*. *J. Neurosci.* 18, 10345–10355
- 29 Amaya, F. *et al.* (2000) Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. *Mol. Cell. Neurosci.* 15, 331–342
- 30 Dempsey, E.C. *et al.* (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279, L429–L438
- 31 Battaini, F. (2001) Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol. Res.* 44, 353–361
- 32 Aley, K.O. *et al.* (2000) Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J. Neurosci.* 20, 4680–4685
- 33 Igwe, O.J. and Chronwall, B.M. (2001) Hyperalgesia induced by peripheral inflammation is mediated by protein kinase C β II isozyme in the rat spinal cord. *Neuroscience* 104, 875–890
- 34 Martin, W.J. (1999) Inflammation-induced up-regulation of protein kinase C γ immunoreactivity in rat spinal cord correlates with enhanced nociceptive processing. *Neuroscience* 88, 1267–1274
- 35 Khasar, S.G. *et al.* (1999) A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C ϵ mutant mice. *Neuron* 24, 253–260
- 36 England, S. *et al.* (1996) PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol.* 495, 429–440
- 37 Smith, R.D. and Goldin, A.L. (1996) Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 16, 1965–1974
- 38 Li, M. *et al.* (1992) Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* 8, 1151–1159
- 39 Smith, R.D. and Goldin, A.L. (1998) Functional analysis of the rat I sodium channel in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 18, 811–820
- 40 Fitzgerald, E.M. *et al.* (1999) cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J. Physiol.* 516, 433–446
- 41 Zhou, J. *et al.* (2000) Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circ. Res.* 87, 33–38
- 42 Smith, R.D. and Goldin, A.L. (2000) Potentiation of rat brain sodium channel currents by PKA in *Xenopus* oocytes involves the I-II linker. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C638–C645
- 43 Sampo, B. *et al.* (2000) Direct interaction between synaptotagmin and the intracellular loop I-II of neuronal voltage-sensitive sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3666–3671
- 44 Azhderian, E.M. *et al.* (1994) Cyclic AMP modulates fast axonal transport in Aplysia bag cell neurons by increasing the probability of single organelle movement. *Neuron* 12, 1223–1233
- 45 West, J.W. *et al.* (1991) A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science* 254, 866–868
- 46 Cantrell, A.R. *et al.* (2002) Molecular mechanisms underlying convergent regulation of brain Na⁺ channels by protein kinase A and protein kinase C. *J. Neurosci.* 22, 713.17 (Abstract)
- 47 Murphy, B.J. *et al.* (1993) Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na⁺ channel α subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 268, 27355–27362
- 48 Cantrell, A.R. *et al.* (1999) Voltage-dependent neuromodulation of Na⁺ channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 5301–5310
- 49 Kondratyuk, T. and Rossie, S. (1997) Depolarization of rat brain synaptosomes increases phosphorylation of voltage-sensitive sodium channels. *J. Biol. Chem.* 272, 16978–16983
- 50 Chen, T.C. *et al.* (1995) Identification of soluble protein phosphatases that dephosphorylate voltage-sensitive sodium channels in rat brain. *J. Biol. Chem.* 270, 7750–7756
- 51 Deschênes, I. *et al.* (2002) Isoform-specific modulation of voltage-gated Na⁺ channels by calmodulin. *Circ. Res.* 90, E49–E57
- 52 Aley, K.O. *et al.* (2001) Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J. Neurosci.* 21, 6933–6939
- 53 Lu, T. *et al.* (1999) Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein α subunit. *J. Physiol.* 518, 371–384
- 54 Saab, C.Y. *et al.* (2003) GTP gamma S increases Nav1.8 current in small-diameter dorsal root ganglia neurons. *Exp. Brain Res.* 152, 415–419
- 55 Bennett, V. and Chen, L. (2001) Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 61–67
- 56 Mohler, P.J. *et al.* (2004) Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada

- syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17533–17538
- 57 Mohler, P.J. *et al.* (2004) Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17533–17538
- 58 Cormier, J.W. *et al.* (2002) Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J. Biol. Chem.* 277, 9233–9241
- 59 Mori, M. *et al.* (2000) Novel interaction of the voltage-dependent sodium channel (VDSC) with calmodulin: does VDSC acquire calmodulin-mediated Ca²⁺-sensitivity? *Biochemistry* 39, 1316–1323
- 60 Van Bemmelen, M.X. *et al.* (2004) Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ. Res.* 95, 284–291
- 61 Deschênes, I. *et al.* (2001) Implication of the C-terminal region of the α -subunit of voltage-gated sodium channels in fast inactivation. *J. Membr. Biol.* 183, 103–114
- 62 Liu, C.J. *et al.* (2001) Fibroblast growth factor homologous factor 1B binds to the C terminus of the tetrodotoxin-resistant sodium channel rNa_v1.9a (NaN). *J. Biol. Chem.* 276, 18925–18933
- 63 Liu, C.J. *et al.* (2003) Modulation of the cardiac sodium channel Na_v1.5 by fibroblast growth factor homologous factor 1B. *J. Biol. Chem.* 278, 1029–1036
- 64 Schoorlemmer, J. and Goldfarb, M. (2001) Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr. Biol.* 11, 793–797
- 65 Liu, C.C. *et al.* (2001) Direct interaction with contactin targets voltage-gated sodium channel Nav1.9/NaN to the cell membrane. *J. Biol. Chem.* 276, 46553–46561
- 66 Malik-Hall, M. *et al.* (2003) Sensory neuron proteins interact with the intracellular domains of sodium channel Na_v1.8. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 110, 298–304
- 67 Rios, J.C. *et al.* (2000) Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J. Neurosci.* 20, 8354–8364
- 68 Peles, E. and Salzer, J.L. (2000) Molecular domains of myelinated axons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 558–565
- 69 Spampinato, J. *et al.* (2004) A novel epilepsy mutation in the sodium channel *SCN1A* identifies a cytoplasmic domain for β subunit interaction. *J. Neurosci.* 24, 10022–10034
- 70 Schultz, J. *et al.* (1998) Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat. Struct. Biol.* 5, 19–24
- 71 Schultz, J. *et al.* (1998) Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat. Struct. Biol.* 5, 19–24
- 72 Ou, Y. *et al.* (2003) Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J. Biol. Chem.* 278, 1915–1923
- 73 Gerke, V. and Moss, S.E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 82, 331–371
- 74 Okuse, K. *et al.* (2002) Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* 417, 653–656
- 75 Zhang, H. *et al.* (2000) A carboxy-terminal α -helical segment in the rat skeletal muscle voltage-dependent Na⁺ channel is responsible for its interaction with the amino-terminus. *Biochim. Biophys. Acta* 1467, 406–418
- 76 Wollner, D.A. *et al.* (1987) β 2 subunits of sodium channels from vertebrate brain. Studies with subunit-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 262, 14709–14715
- 77 Isom, L.L. *et al.* (1995) Structure and function of the β 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83, 433–442

Register now for the 1st International Conference of the Journal of *Travel Medicine and Infectious Disease*

10–11 November 2005, Royal College of Surgeons, London



This two-day conference will bring together leading experts for a comprehensive and topical programme focusing on the latest research and policy in travel medicine and infectious disease.

Topics that will be discussed include the recent advances in the prevention of infectious disease, vaccine-preventable diseases, malaria prophylaxis, treatment of the unwell returning traveller, migrant medicine, and respiratory-borne diseases and travel. The conference also aims to highlight the growing importance of travel medicine and will provide up-to-date information and reports of new developments in this continually evolving speciality.

This conference is intended for all those who practise or are interested in the discipline of travel medicine: in particular, travel medicine health-care practitioners, medical practitioners, nurses, pharmacists and students who practise travel medicine within the fields of primary care, occupational medicine, infectious disease and tropical medicine, emergency medicine and public health medicine.

This conference has been accredited for CPD by the Royal College of Pathologists.

For more information, visit <http://www.travelmedicine.elsevier.com>

Lidocaine Promotes the Trafficking and Functional Expression of Na_v1.8 Sodium Channels in Mammalian Cells

Juan Zhao,¹ Rahima Ziane,¹ Aurélien Chatelier,¹ Michael E. O'Leary,² and Mohamed Chahine¹

¹Le Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard and Department of Medicine, Laval University, Quebec, Quebec, Canada; and ²Jefferson Medical College, Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania

Submitted 2 February 2007; accepted in final form 9 May 2007

Zhao J, Ziane R, Chatelier A, O'Leary ME, Chahine M. Lidocaine promotes the trafficking and functional expression of Na_v1.8 sodium channels in mammalian cells. *J Neurophysiol* 98: 467–477, 2007. First published May 16, 2007; doi: 10.1152/jn.00117.2007. Nociceptive neurons of the dorsal root ganglion (DRG) express a combination of rapidly gating TTX-sensitive and slowly gating TTX-resistant Na currents, and the channels that produce these currents have been cloned. The Na_v1.7 and Na_v1.8 channels encode for the rapidly inactivating TTX-sensitive and slowly inactivating TTX-resistant Na currents, respectively. Although the Na_v1.7 channel expresses well in cultured mammalian cell lines, attempts to express the Na_v1.8 channel using similar approaches has been met with limited success. The inability to heterologously express Na_v1.8 has hampered detailed characterization of the biophysical properties and pharmacology of these channels. In this study, we investigated the determinants of Na_v1.8 expression in tsA201 cells, a transformed variant of HEK293 cells, using a combination of biochemistry, immunocytochemistry, and electrophysiology. Our data indicate that the unusually low expression levels of Na_v1.8 in tsA201 cells results from a trafficking defect that traps the channel protein in the endoplasmic reticulum. Incubating the cultured cells with the local anesthetic lidocaine dramatically enhanced the cell surface expression of functional Na_v1.8 channels. The biophysical properties of the heterologously expressed Na_v1.8 channel are similar but not identical to those of the TTX-resistant Na current of native DRG neurons, recorded under similar conditions. Our data indicate that the lidocaine acts as a molecular chaperone that promotes efficient trafficking and increased cell surface expression of Na_v1.8 channels.

INTRODUCTION

Voltage-gated Na channels are membrane proteins that play an important role in the rapid electrical signaling in nerve fibers (Hille 2001). The nociceptive neurons of the dorsal root ganglia (DRG) express a unique combination of tetrodotoxin (TTX)-sensitive and -resistant Na channels that play a key role in the physiology and pathophysiology of pain (Waxman et al. 2000). Several Na channels have been cloned from peripheral nerve; Na_v1.7 (PN1 for peripheral nerve Na channel 1) encodes for a rapidly gating TTX-sensitive Na channel that is broadly expressed in both large and small DRG neurons (Sangameswaran et al. 1997). Na_v1.8 (PN3) encodes for a slowly gating TTX-resistant Na channel that is highly localized within the small nociceptive neurons of the DRG neurons (Sangameswaran et al. 1996). Differences in the biophysical properties and the pharmacology of these Na channels contribute to the unique electrical properties of sensory nerve fibers.

Several distinct components of TTX-R Na current have been observed in DRG sensory neurons (Elliott and Elliott 1993; Kostyuk et al. 1981; Ogata and Tatebayashi 1993; Roy and Narahashi 1992; Rush et al. 1998; Scholz et al. 1998). One component displays a low threshold for activation and rapid kinetics and is believed to be produced by the Na_v1.5 channel, which is highly expressed in embryonic sensory neurons and at a lower level in adult neurons (Renganathan et al. 2002). A second component of TTX-R current activates at relatively depolarized voltages, has comparatively slow gating kinetics, and rapidly recovers at hyperpolarized voltages (Elliott and Elliott 1993; Kostyuk et al. 1981; Ogata and Tatebayashi 1993; Roy and Narahashi 1992; Rush et al. 1998). These properties are similar to what has been described for the Na_v1.8 channel (Akopian et al. 1999). A third component of TTX-R current has a relatively hyperpolarized threshold for activation (approximately equal to -80 mV) and displays little inactivation (Cummins et al. 1999). The Na_v1.9 channel appears to underlie this component of DRG Na current (Cummins et al. 1999; Fjell et al. 2000).

The presence of multiple overlapping components of TTX-R Na current in small DRG neurons has complicated the detailed biophysical characterization of the underlying Na channels. The cloning of the Na_v1.8 channel raised the prospect of its *in vitro* expression that would permit detailed electrophysiological characterization of the isolated channels (Akopian et al. 1996; Sangameswaran et al. 1996). The Na_v1.8 channel has been expressed in *Xenopus* oocytes, and the properties of the heterologously expressed channels are in good agreement with those of the native TTX-R Na current of DRG neurons (Akopian et al. 1996; Sangameswaran et al. 1996; Vijayaragavan et al. 2001). By contrast, attempts to heterologously express the Na_v1.8 channel in cultured mammalian cells have been met with limited success (John et al. 2004; Vijayaragavan et al. 2004). Although the reasons for the poor expression of the Na_v1.8 channels in cultured cells are not known, it is generally believed to result from a trafficking defect that reduces the cell surface expression of functional channels (Okuse et al. 2002).

A number of factors appear to regulate the expression of Na_v1.8 channel in mammalian cell lines. Interaction of Na_v1.8 with accessory proteins appears to either promote the translocation to the plasma membrane or stabilize channels within the plasma membrane. Annexin II light chain (p11) enhances Na_v1.8 expression by directly interacting with the cytoplasmic N terminus of the channel protein resulting in translocation to

Address for reprint requests and other correspondence: M. Chahine, Le Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard, 2601 Chemin de la Canadière, Québec, Québec G1J 2G3, Canada (E-mail: mohamed.chahine@phc.ulaval.ca).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

the plasma membrane (Okuse et al. 2002). Co-expression of the accessory β_3 subunit, annexin II light chain (p11), and clatherin-associated protein-1A (CAP-1A) appear to be important regulators of $\text{Na}_v1.8$ expression (John et al. 2004; Liu et al. 2005; Okuse et al. 2002). Whereas β_3 and p11 were reported to enhance cell surface expression, CAP-1A reduces the density of the expressed $\text{Na}_v1.8$.

Despite the enhanced trafficking produced by accessory proteins (β_3 and p11), the current density of the heterologously expressed $\text{Na}_v1.8$ channel remains relatively low by comparison to the native TTX-R current of DRG neurons and the $\text{Na}_v1.7$ channel expressed under similar conditions (Vijayaragavan et al. 2004). As-yet-unidentified factors or regulatory mechanisms appear to contribute to the efficient trafficking and cell surface expression of the $\text{Na}_v1.8$ channel. Increases in nociceptor excitability and changes in the level and distribution of $\text{Na}_v1.8$ expression were associated with acute nerve injury and inflammatory reactions (McCleskey and Gold 1999). Understanding the mechanisms governing $\text{Na}_v1.8$ trafficking therefore has important implications for the peripheral sensitization to painful stimuli linked to tissue damage and nerve injury.

Recently it has been shown that in several channelopathies, mutations in channel proteins that induce misfolding and therefore the retention of the channel in the ER can be rescued by chemical chaperones or pharmacological ligands (Morello et al. 2000). This is the case for mutations that cause the Brugada syndrome an inherent cardiac disorder and that the defect of the misfolding was rescued by the antiarrhythmic drug mexiletine (Valdivia et al. 2002).

Chemical chaperones are small molecules that assist folding and restore the trafficking of receptors and channels (Morello et al. 2000). In this study, we investigated the effects of the local anesthetic lidocaine on the expression of the $\text{Na}_v1.8$ channel in tsA201 cells, a transformed variant of the HEK293 cell line. Our data indicate that lidocaine acts as a chemical chaperon that promotes $\text{Na}_v1.8$ trafficking to the plasma membrane. The biophysical properties of the heterologously expressed $\text{Na}_v1.8$ channels are similar to but not identical to those of the TTX-resistant Na current recorded under identical conditions from DRG neurons.

METHODS

Heterologous expression of Nav1.8 in tsA201 cells

The tsA201 cell line is a mammalian cell line derived from human embryonic kidney HEK 293 cells by stable transfection with SV40 large T antigen (Margolske et al. 1993). Cells were grown in high glucose DMEM supplemented with FBS (10%), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (10 mg/ml) (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Cells were incubated in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Transfections of tsA201 cells were carried out using the calcium phosphate method as previously described (Margolske et al. 1993).

The β_1 subunit was co-expressed with $\text{Na}_v1.8$. The human Na^+ channel β_1 -subunit and CD8 were constructed in the piRES vector (piERS/CD8/ β_1) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Transfected cells were briefly (<5 min) preincubated with CD8 antibody-coated beads prior to recording (Dynabeads M-450 CD8-a). Cells expressing the piRES/CD8/ β_1 bicistronic vector were decorated with CD8 beads, which were used to identify cells for patch-clamp analysis (Margolske et al. 1993). Transfected tsA201 cells were then pre-

treated for 24 h with 1 mM lidocaine. The cells were subsequently incubated for 3–4 h in lidocaine-free media immediately prior to electrophysiological recordings.

Isolation of dorsal root ganglion neurons

Seven-day-old rat pups are anesthetized with isoflurane before decapitation and the dorsal root ganglia from all accessible levels of the spinal cord harvested. Excess connective tissues were removed and the ganglion placed in 3 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco) supplemented with 10 mM HEPES. The ganglia were incubated for 30 min at 37°C in 2 ml of HBSS/HEPES containing 1.5 mg/ml collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The ganglia were washed with HBSS/HEPES before adding 1 mg/ml trypsin (Sigma-Aldrich) and incubating an additional 30 min at 37°C. Trypsin was removed and the ganglia were transferred to L-15 Leibovitz media (Gibco) supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 2 mM glutamine, 24 mM NaHCO_3 , 38 mM glucose, 2% penicillin-streptomycin (Gibco), and 50 ng/ml nerve growth factor (Sigma-Aldrich). The ganglia were dissociated by gentle titration using fire-polished Pasteur pipettes, and the dissociated neurons were plated onto 35 mm dishes containing 2 ml of the supplemented Leibovitz media. Dissociated neurons ($\leq 20 \mu\text{m}$, 8–12 pF of capacitance) were suitable for patch-clamp studies 1–2 h after plating. Neonatal rats were killed in accordance with the animal welfare protocols of our institution.

Electrophysiology

Macroscopic Na currents from tsA201 transfected cells were recorded using the whole cell configuration of the patch-clamp technique (Chahine et al. 2004). Command pulses were generated and current recorded using pCLAMP software v8.0 and an Axopatch 200 amplifier (Molecular Devices, Union City, CA). Patch electrodes were fashioned from borosilicate glass (Corning 8161) and coated with silicone elastomer (Sylgard, Dow-Corning, Midland, MI) to minimize stray capacitance. Current recordings were made using low-resistance electrodes ($< 1 \text{M}\Omega$), and the series resistance was compensated at values $\geq 80\%$, to minimize voltage-clamp errors. Whole cell currents were filtered at 5 kHz, digitized at 10 kHz, and stored on a micro-computer equipped with an AD converter (Digidata 1300, Molecular Devices). Data analysis was performed using a combination of pCLAMP software v9.0 (Molecular Devices), Microsoft Excel and SigmaPlot for Windows version 8.0 (SPSS, Chicago, IL). The current signal was low-pass filtered at 2 kHz and digitalized at a sampling rate of 100 μs during acquisition. Traces shown were low-pass filtered at 1.5 kHz using a digital filter of Clampfit software.

Solutions and reagents

For whole cell recordings, the patch pipette contained (in mM) 5 NaCl, 135 CsF, 10 EGTA, and 10 Cs-HEPES. The pH was adjusted to 7.4 using 1 N CsOH. The bath solution contained (in mM) 150 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glucose, and 10 Na-HEPES. The pH was adjusted to 7.4 with 1 N NaOH. For Na current recording from DRG neurons, the extracellular solution contained instead 140 mM NaCl and the intracellular solution contained 35 mM NaCl. A correction for the liquid junction potential between the patch pipette and the bath solutions (-7mV) was applied to the command pulses. The recordings were made 10 min after obtaining the whole cell configuration to allow the current to stabilize and to fully dialyze the cell with pipette solution. The $\text{Na}_v1.8$ α -subunit and the β_1 auxiliary subunit were cloned in our laboratory as described previously (Vijayaragavan et al. 2001).

For single-channel recording, 3–5 $\text{M}\Omega$ patch electrodes were used. Patch electrodes were coated with Sylgard to reduce their capacitance and lower noise emission. The bath solution contained a high con-

centration of potassium composed of (in mM) 100 K-aspartate, 50 KCl, 1.5 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 glucose, and 10 K-HEPES (pH = 7.4). This solution was used to depolarize the cell, thereby making the applied command potential approximately equal to the voltage across the membrane patch. The patch pipette solution contained (in mM) 150 NaCl, 10 TEA-Cl, (to block endogenous potassium channels), 2 KCl, 1.5 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 glucose, and 10 Na-HEPES (pH = 7.4). Single-channel currents were recorded using an Axopatch 200B amplifier, a Digidata 1200 acquisition system, and pCLAMP v9 (Molecular Devices). Single-channel currents were filtered at 2 kHz and sampled at 100 kHz. Single-channel currents were recorded at room temperature (22–23°C).

Immunocytochemistry

Transfected tsA201 cells were permeabilized using 0.1% Triton in 1 mM PBS-0.5% BSA solution before incubation with antibodies. Cells were fixed using a 1:3 acetone/methanol solution for 20 min. The mouse anti- $Na_v1.8$ primary antibody (1:100) was used against the $Na_v1.8$ alpha-subunit (Alomone, Jerusalem). The secondary antibody was a conjugated AffiniPure goat anti-mouse (1:400) (Molecular Probes). Rabbit Anti-Calnexin polyclonal antibody (1:4,000) was used for endoplasmic reticulum (ER) labeling, and was obtained from StressGen Biotechnologies (Victoria, British Columbia, Canada).

Confocal microscopy

Fluorescent probe-labeled tsA201 cells were examined on a BioRad MRC-1024 confocal imaging system equipped with a krypton-argon laser beam mounted on a Zeiss microscope. A $\times 360$ oil objective with a 1.4 numerical aperture was used. Confocal settings were as follows: 1-mw laser power, 1.2 zoom, 1 s per scan, Kalman filter, and 4 frames per image. The photomultiplier gain was adjusted and the aperture adjusted for maximum resolution.

Biotinylation of cell surface proteins

tsA201 cells were cultured in 100-mm dishes and transiently transfected with 5 μg of $Na_v1.8$ and 5 μg of β_1 . After transfection (24 h), the cells were treated with 1 mM lidocaine or without (control). After the transfection (48 h), cells were subjected to cell surface biotinylation. Recovery of plasma membrane proteins were carried out using the Pierce cell-surface protein biotinylation and purification kit according to the manufacturer's protocol (Pierce, Rockford, IL). Samples were analyzed by immunoblotting using rabbit anti- $Na_v1.8$ antibody (Alomone) at 1:200 dilution.

Western blot analysis

tsA201 cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and solubilized in 1 ml of STEN buffer consisting of: 0.2% NP40, 1% Triton X-100 and protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Insoluble debris were removed by centrifugation at 13,000 rpm for 30 min. Equivalent amounts of proteins were applied to an SDS-10% PAGE electrophoresis gel, and the separated proteins were transferred to a Hybond P membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). After protein transfer, the membrane was blocked for 1 h at room temperature in 5% nonfat milk in PBS-T (0.1% tween –20 in PBS, pH 7.4). The membranes were probed with anti- $Na_v1.8$ antibody (1/200 dilution; Alomone), followed by horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1/10,000 dilution; Amersham Pharmacia Biotech) and ECL detection (Amersham Pharmacia Biotech).

RESULTS

Lidocaine enhances the cell surface expression of the $Na_v1.8$ channel

Since the cloning of $Na_v1.8$ in 1996 (Sangameswaran et al. 1996), the heterologous expression of this Na channel in mammalian cells has proved to be problematic, often resulting in little or no expression of Na current (Okuse et al. 2002; Vijayaragavan et al. 2004). This has complicated efforts to study the biophysical properties of the heterologously expressed channel. The poor expression of $Na_v1.8$ in cultured cell lines is generally believed to result from a trafficking defect that prevents the channel protein from reaching the plasma membrane (Okuse et al. 2002). To further investigate the underlying mechanism, we used immunohistochemistry and confocal imaging to study the subcellular localization of the $Na_v1.8$ channel heterologously expressed in tsA201 cells. Immunofluorescence revealed a significant accumulation of $Na_v1.8$ in perinuclear regions (Fig. 1A, green staining) that displayed significant overlap with the immunostaining for calnexin, a specific marker of the endoplasmic reticulum (ER; Fig. 1B, red staining). The overlap of the $Na_v1.8$ and calnexin (Fig. 1C, yellow staining) suggests that the majority of the channel protein is localized within intracellular organelles with little distribution to the plasma membrane.

We found that preincubating $Na_v1.8$ -transfected tsA201 cells with lidocaine (1 mM) for 24 h prior to immunohistochemical examination dramatically altered the subcellular distribution of the $Na_v1.8$ channel. Lidocaine substantially reduced the $Na_v1.8$ immunofluorescence of the perinuclear region (Fig. 1D) and reduced the overlap with calnexin (Fig. 1E). Preincubating the cells with lidocaine shifted $Na_v1.8$ staining away from the intracellular compartment and toward the cell periphery (Fig. 1F).

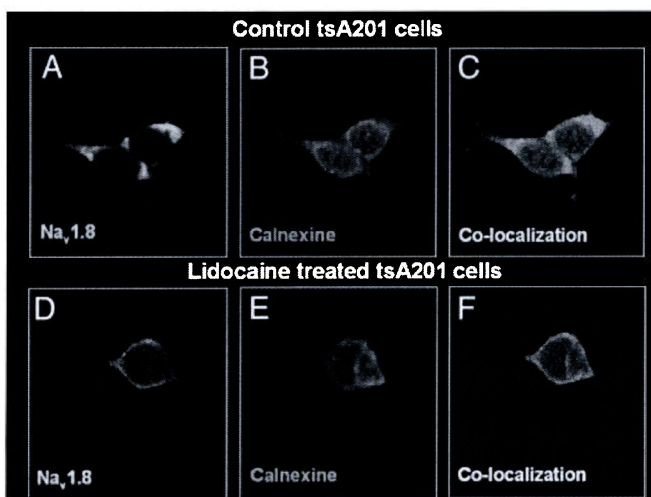


FIG. 1. Subcellular localization the $Na_v1.8$ channel. tsA201 cells were co-transfected with $Na_v1.8$ and the β_1 subunit and the subcellular localization of channel protein determined using antibody labeling and confocal microscopy. A: $Na_v1.8$ immunostaining showing perinuclear localization (Green staining). B: immunofluorescence of the same cells as in A showing the distribution of calnexin (red staining), a protein expressed in endoplasmic reticulum. C: superimposition of $Na_v1.8$ (A) and calnexin (B) staining (orange/yellow). D: pattern of $Na_v1.8$ immunofluorescence (green) after incubating the cells for 24 h with 1 mM lidocaine. E: same cell as in D showing that the subcellular localization of calnexin was not altered by lidocaine preincubation. F: superimposition of $Na_v1.8$ (D) and calnexin (E) staining of lidocaine-treated cells.

The immunohistochemistry suggests that lidocaine may act by enhancing the trafficking of the $\text{Na}_v1.8$ channels from the ER to the plasma membrane. Alternatively, the observed changes in $\text{Na}_v1.8$ distribution could have resulted from the synthesis of new channel protein that was specifically targeted to the cell periphery. To distinguish between these alternatives, we used Western blot analysis to investigate the effects of lidocaine on the expression of $\text{Na}_v1.8$ channel protein. Figure 2A shows the Western blot of the $\text{Na}_v1.8$ channel expressed in tsA201 cells preincubated under control conditions or after 24-h incubation with lidocaine (1 mM). The expression levels of the $\text{Na}_v1.8$ channels were similar under both conditions, suggesting that the increase in peripheral $\text{Na}_v1.8$ immunostaining induced by lidocaine (Fig. 1F) does not result from the synthesis of new channel protein.

The underlying mechanism was further investigated by specifically labeling the $\text{Na}_v1.8$ channels expressed on the cell surface of transfected tsA201 cells with biotin. The labeled cells were then lysed, and the biotinylated proteins were purified by NeutrAvidin gel filtration. Figure 2B shows the Western analysis of the biotinylated $\text{Na}_v1.8$ channels obtained from control and lidocaine-treated cells. Lidocaine increased the level of $\text{Na}_v1.8$ biotinylation by comparison to the drug-

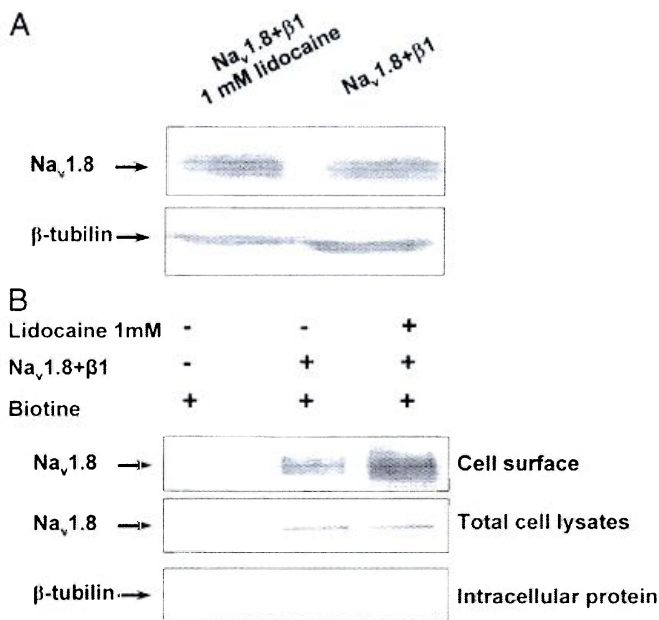


FIG. 2. Effects of lidocaine on $\text{Na}_v1.8$ expression and membrane localization. *A*: tsA201 cells were co-transfected with $\text{Na}_v1.8$ and the β_1 subunit. *B*: total cell extracts were prepared and the expression of $\text{Na}_v1.8$ protein evaluated using Western blots. First lane: 10 μg of protein extracted from $\text{Na}_v1.8/\beta_1$ -transfected tsA201 cells nontreated; second lane: equal amount of protein (10 μg) extracted from $\text{Na}_v1.8/\beta_1$ transfected cells preincubated for 24 h with 1 mM lidocaine. *Bottom*: Western blot of the same protein extract, probed with β -tubulin specific antibody and used for band quantification. Densitometry analysis showed no difference between nontreated and treated cells. *B*: $\text{Na}_v1.8$ expression at the plasma membrane determined by a combination of biotinylation of cell-surface proteins, isolation of biotinylated proteins on biotin binding columns, and Western blotting (see METHODS). *Top*: Western blot of nontransfected tsA201 cells, $\text{Na}_v1.8/\beta_1$ transfected cells, and $\text{Na}_v1.8/\beta_1$ transfected cells after 24 h preincubation with lidocaine. *Middle*: Western blots of total cell lysate of nontransfected cells, $\text{Na}_v1.8/\beta_1$ transfected drug-free controls, and $\text{Na}_v1.8/\beta_1$ transfected cells after preincubation with lidocaine. *Bottom*: Western blot of biotinylated proteins identified using an antibody directed at an intracellular protein (β -tubulin).

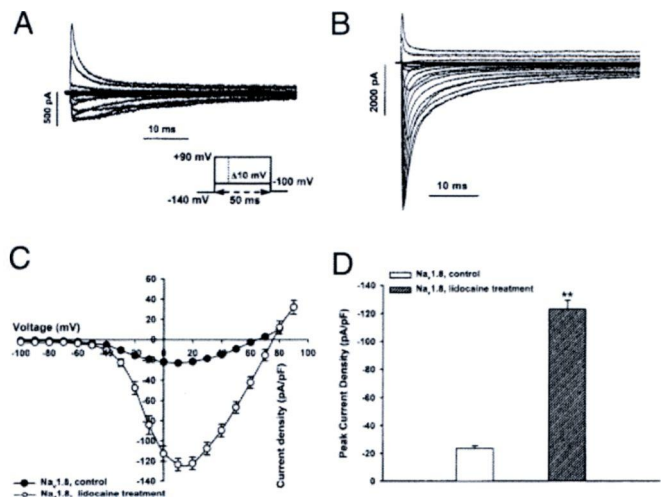


FIG. 3. Lidocaine increased the Na current density of $\text{Na}_v1.8$ -transfected cells. $\text{Na}_v1.8$ and β_1 subunits were co-expressed in tsA201 cells. *A* and *B*: whole cell Na currents of a drug-free control (*A*) and after 24 h incubation with 1 mM lidocaine (*B*). Currents were elicited by depolarizing steps between -100 and $+90$ mV in 10-mV increments from a holding potential of -140 mV. *C*: peak Na current at each voltage was normalized to the whole cell capacitance and the current density (pA/pf) plotted vs. the test voltage (control, $n = 9$; lidocaine treated, $n = 12$). *D*: at $+20$ mV, preincubating with lidocaine produced a significant sixfold increase in the Na current density (-123.3 ± 6.1 pA/pf, $n = 12$) by comparison to the drug-free controls (-23.3 ± 1.6 pA/pf, $n = 9$, *t*-test: $P < 0.01$).

free controls. Also shown is the $\text{Na}_v1.8$ expression of the total cell lysate, which was not different for control and drug-treated cells. This is in good agreement with standard Western blotting (Fig. 2A) and indicates that lidocaine does not act by nonspecifically increasing the overall expression of $\text{Na}_v1.8$ channels. Translation of channel protein does not appear to play an important role in lidocaine-induced appearance of $\text{Na}_v1.8$ channels on the cell surface. Rather the increase in $\text{Na}_v1.8$ biotinylation and peripheral immunofluorescence (Fig. 1F) supports the proposal that pretreating tsA201 cells with lidocaine promotes the trafficking of existing $\text{Na}_v1.8$ channels from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane.

Lidocaine enhances the expression of functional $\text{Na}_v1.8$ channels in the plasma membrane

Immunohistochemistry indicates that preincubating transfected cells with lidocaine increased the cell surface expression of $\text{Na}_v1.8$ channel protein. If these channels are both functional and associated with the plasma membrane, then these findings predict an increase in the Na current amplitude of cells pretreated with the drug. Figure 3 compares the current-voltage relationships of transfected tsA201 cells measured under control conditions and after preincubation with lidocaine. Lidocaine dramatically increased the peak Na current amplitude (Fig. 3B) by comparison to drug-free controls (Fig. 3A). To quantitate these findings, the peak Na current amplitudes were normalized to the whole cell capacitance of individual cells (Fig. 3, C or D). Preincubating with lidocaine induced a significant sixfold increase in the Na current density (-123.3 ± 6.1 pA/pF, $n = 12$) by comparison to drug-free controls (-23.3 ± 1.6 pA/pF, $n = 9$, *t*-test, $P < 0.05$). The increase in $\text{Na}_v1.8$ immunostaining along the cell periphery

(Fig. 1) and the parallel increase in Na current density are consistent with our working hypothesis that preincubating cells with lidocaine promotes the re-distribution of functional $Na_v1.8$ channels from intracellular compartments to the plasma membrane.

To test if the expressed $Na_v1.8$ current was resistant to block by TTX, we tested the effect of $10 \mu M$ TTX on our Na currents, a concentration that is known to significantly block the TTX-sensitive channels. A concentration of TTX of $10 \mu M$ resulted in only 16% reduction of Na current (Fig. 4), suggesting that the expressed channels are TTX resistant.

Activation and inactivation of the heterologously expressed $Na_v1.8$ channel

We took advantage of the enhanced expression of $Na_v1.8$ afforded by lidocaine treatment to further characterize the biophysical properties of the heterologously expressed channel. The time course of the current decay elicited at depolarized voltages was fitted with the sum of two exponentials and the resulting time constants plotted versus voltage (Fig. 5A). The fast and slow time constants progressively decrease with depolarization, with the fast component accounting for 60–80% of the current decay for voltages between -40 and $+70$ mV (Fig. 5A, inset). At depolarized voltages where $Na_v1.8$ channels predominately inactivate from the open state (>0 mV), both fast and slow inactivation significantly contribute to the time course of the current decay, similarly to what has been previously described for the native TTX-R current of DRG sensory neurons (Elliott and Elliott 1993).

The voltage-dependent activation of $Na_v1.8$ was assessed from the peak Na conductance and plotted versus test voltage (Fig. 5B). The smooth curve is a fit to a Boltzmann function with midpoint and slope factor of -0.6 ± 1.9 and 13.6 ± 1.0 mV, respectively (Table 1). Also plotted is the steady-state inactivation determined by applying 500-ms prepulses to voltages between -140 and $+10$ mV. The availability determined from the peak current amplitudes of standard test pulses was normalized and plotted versus voltage (Fig. 5B). The smooth curve is a fit to a double Boltzmann function with midpoints of -75.1 ± 1.4 and -34.4 ± 3.3 mV, respectively, with the majority of the reduction in availability (76%) being associated with the more hyperpolarized component ($n = 9$, $A_H = 0.76 \pm 0.03$ mV, Table 1). Relatively small but statistically not sig-

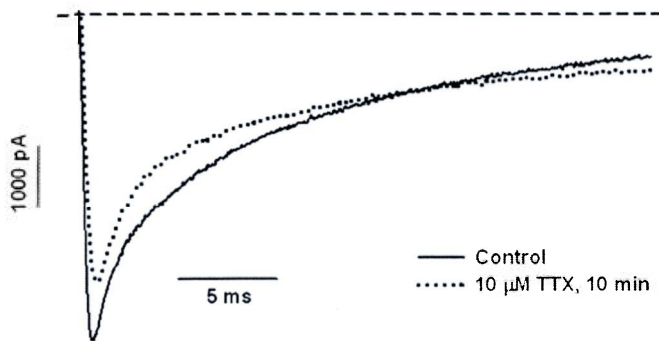


FIG. 4. The effect of $10 \mu M$ TTX on $Na_v1.8$ currents. Whole cell $Na_v1.8$ currents were evoked every 4 s by 50-ms pulses from -100 to $+95$ mV in 5-mV increments. The holding potential is -140 mV. —, control current. ···, current in the presence of $10 \mu M$ TTX for 10 min, the peak current amplitude were inhibited by $16.02 \pm 2.6\%$ ($n = 7$). ---, 0 current.

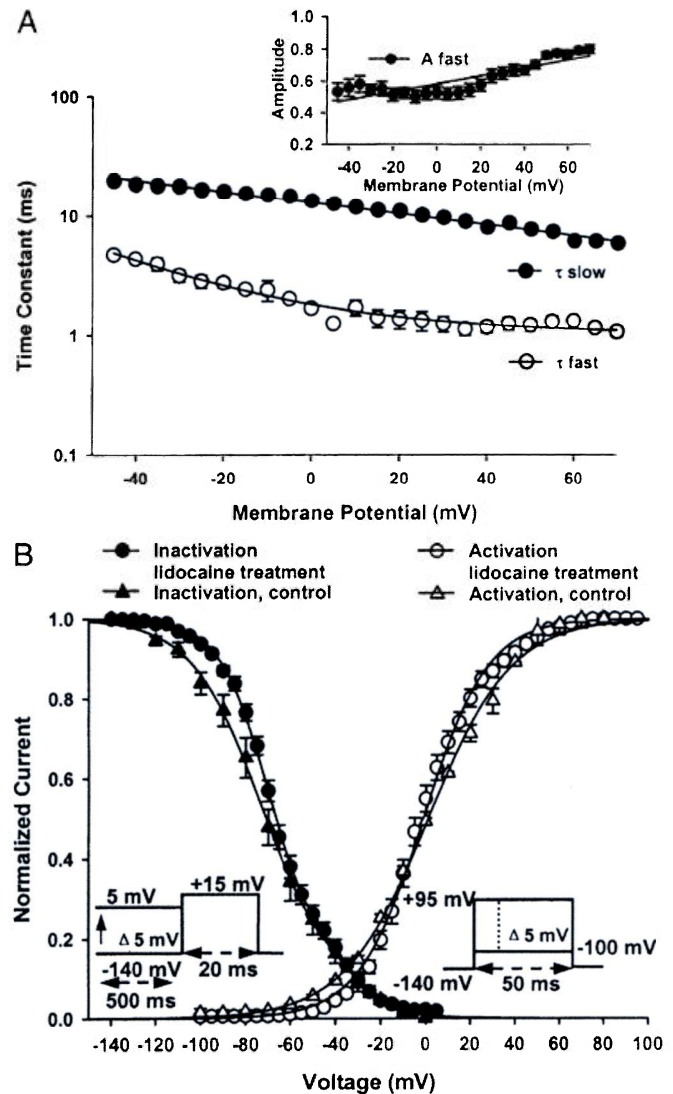


FIG. 5. Properties of the heterologously expressed $Na_v1.8$ channels. $Na_v1.8$ and β_1 subunits were co-expressed in tsA201 cells and preincubated 24 h with lidocaine prior to recording Na current. Test pulses were applied to voltages between -50 and $+70$ mV and time course of the current decay with a sum of 2 exponential components. A: plot of the fast (τ_{fast}) and slow (τ_{slow}) time constants of current decay ($n = 8$). Inset: relative amplitude of the fast component (A_{fast}) as a function of test potential. B: comparison of the steady-state activation and inactivation of controls and after 24-h preincubation with lidocaine. The Na conductance was calculated from the peak Na current measured over a range of potentials, normalized to the conductance at $+95$ mV, and plotted vs. the test voltage. The smooth curves are fits to a Boltzmann function with midpoints and slope factors ($V_{1/2}/k_s$) of 1.5 ± 2.3 mV/ 17.5 ± 0.9 mV for the $Nav1.8/\beta_1$ transfected controls ($n = 9$) and -0.6 ± 1.9 mV/ 13.6 ± 1.0 mV for cells preincubated with lidocaine ($n = 12$). Steady-state inactivation was determined using 500-ms prepulses to voltages between -140 and $+5$ mV. Steady-state availability was assayed using a standard test pulse (15 mV/20 ms). The test current amplitudes were normalized to the test currents measured after prepulses to -140 mV (I_{max}) and plotted vs. voltage. The smooth curves are fits to a double Boltzmann function $\{I_{max} = a^* / [1 + \exp((V - V_{1/2})/k_s)]\} + [(1 - a^*) / (1 + \exp((V - V_{1/2})/k_s))]$ with midpoints and slope factors ($V_{1/2}/k_s$) of -71.6 ± 1.2 mV/ 9.4 ± 0.7 mV for the more hyperpolarized component and -32.9 ± 1.8 mV/ 9.4 ± 1.0 mV for depolarized component ($n = 14$). Also plotted is the steady-state availability of the drug-free controls, which had a midpoints and slope factors of -73.4 ± 2.8 mV/ 10.8 ± 1.3 mV for the more hyperpolarized component and -31.3 ± 3.4 mV/ 11.5 ± 1.9 mV for the depolarized component ($n = 7$).

TABLE 1. Biophysical properties of Na_v1.8 currents in tsA201 cells after 1 mM lidocaine treatment and TTX-R currents in DRG neurons

Current	Activation		Prepulse, ms	Steady-State Inactivation				Recovery From Inactivation			
	V _{1/2} , mV	k _v , mV		V _{1/2} ¹ , mV	V _{1/2} ² , mV	k _v ¹ , mV	k _v ² , mV	a	V _{REC} , mV	τ _{fast} , ms	τ _{slow} , ms
TTX-R DRG	-13.8 ± 1.7 (11)	-6.0 ± 0.6 (11)	500	-77.1 ± 4.0 (8)	-31.6 ± 1.5 (8)	16.0 ± 0.5 (8)	4.1 ± 0.2 (8)	0.12 ± 0.02 (8)	-120	0.9 ± 0.4 (3)	74.5 ± 12.1 (3)
Na _v 1.8 tsA201	-0.6 ± 1.9 (12)	-13.6 ± 1.0 (12)	500	-75.1 ± 1.4 (9)	-34.4 ± 3.3 (9)	9.8 ± 1.0 (9)	9.3 ± 1.9 (9)	0.76 ± 0.03 (9)	-120	1.8 ± 0.3 (9)	12.7 ± 3.4 (9)
			100	-75.0 ± 1.2 (7)	-31.5 ± 4.0 (7)	9.1 ± 0.9 (7)	13.3 ± 2.1 (7)	0.67 ± 0.03 (7)	-110	2.2 ± 0.4 (9)	20.6 ± 4.3 (9)
			50	-75.3 ± 1.8 (7)	-33.6 ± 4.3 (7)	7.8 ± 1.13 (7)	14.4 ± 2.2 (7)	0.53 ± 0.03 (7)	-100	2.7 ± 0.5 (9)	29.8 ± 6.1 (9)
			500 ms prepulse and 10 ms interpulse	-71.6 ± 1.8 (12)		11.8 ± 1.0 (12)					

n values in parentheses. V_{1/2}, the voltage at which the channels are half-maximal activated or inactivated; V_{REC}, recovery potential; K_v = slope factor, τ = time constant; a, the fraction of the total current represented by the first component (v_{1/2}¹ and k_v¹) of inactivation.

nificant differences in the steady-state activation and inactivation of lidocaine-treated and drug-free controls were observed (Fig. 5B).

The biphasic steady-state inactivation (Fig. 5B) suggests that more than one gating process may contribute to the inactivation of Na_v1.8 over a hyperpolarized range of voltages. To further investigate the underlying mechanism(s), we varied the duration of the depolarizing conditioning pulses used to induce steady-state inactivation. Figure 6A plots the normalized test currents versus the voltage for conditioning durations of 50, 100, and 500 ms. The smooth curves are double Boltzmann fits with midpoints of -75.1 and -34.4 mV for the 500-ms prepulses (A_H = 0.76), -75.0 and -31.5 mV for the 100-ms prepulses (A_H = 0.67), and -75.2 and -33.6 mV for the 50-ms prepulses (A_H = 0.53). Shortening the duration of the prepulses had no effect on the midpoints of inactivation but significantly reduced the relative amplitude (A_H) of the more hyperpolarized component (*t*-test, *P* < 0.05). These findings indicate that the longer prepulses (>50 ms) promoted the entry of Na_v1.8 channels into a slow inactivated state that inactivated over a more hyperpolarized range of voltages.

To directly investigate the contribution of slow inactivation to the steady-state availability, a triple pulse protocol was employed consisting of a 500-ms conditioning pulse to induce inactivation followed by a short hyperpolarization (-140 mV/10 ms) to permit the recovery from fast inactivation. A standard test pulse was then applied to assay availability. The relative amplitude of the test pulses decreases with depolarization, consistent with a progressive increase in slow inactivation (Fig. 6B). The smooth curve is a fit to a Boltzmann function with midpoint (V_{1/2}) of -71.6 ± 1.8 mV and relative amplitude of 0.39 ± 0.01 (*n* = 12). The midpoint of steady-state slow inactivation and amplitude are similar to the hyperpolarized component of availability (V_{1/2} = -71.6, A_H = 0.51) obtained using conventional steady-state inactivation protocols (Table 1). The kinetics of closed-state inactivation at hyperpolarized voltages was also investigated (Fig. 7A). The closed-state inactivation time course was biexponential with fast and slow time constants. For example the time constants at -70 mV are 15.2 ± 1.7 and 211.1 ± 22.2 ms, respectively (*n* = 18). The amplitude of the fast time constant represents 31%. These data further support the conclusion that Na_v1.8 channels readily

enter into slow inactivated states at hyperpolarized voltages where the channels do not open.

The time course of recovery from inactivation was investigated using a double-pulse protocol consisting of a depolarizing prepulse (+15 mV/20 ms) to inactivate the channels, a variable duration recovery pulse to voltages between -120 and -90 mV, and a standard test pulse. The amplitudes of the test currents were normalized and plotted versus the recovery interval (Fig. 7B). The normalized test currents progressively increase with the duration of the recovery interval consistent with the rapid recovery from inactivation. At -120 mV, the recovery time course was biexponential with fast and slow time constants of 1.8 ± 0.3 and 12.7 ± 3.4 ms, respectively (*n* = 11, A_r = 0.53).

The biexponential kinetics of closed-state inactivation (Fig. 7A), the recovery (Fig. 7B), and the biphasic Boltzmann relationship (Fig. 6A) indicate that both fast and slow inactivation are important determinants of the steady-state availability of the Na_v1.8 channel.

Na_v1.8 single-channel currents

Figure 8, A and B, shows single-channel recordings of the Na_v1.8 channel heterologously expressed in tsA201 cells. At -10 mV, the channels rapidly open near the beginning of the voltage pulses and appear to close and repeatedly re-open during the 160-ms depolarization. Figure 8C shows the ensemble average reconstructed from the single-channel openings at -10 mV, which displayed a typical slow inactivation time course similar to what was observed for the macroscopic Na_v1.8 current (Fig. 3B). Repeated opening and comparatively long open times accounts for the slow time-dependent current decay and may underlie the persistent component of Na_v1.8 current observed at depolarized voltages (Fig. 3A). This contrasts with test pulses to -30 mV, which are near the foot of the conductance-voltage relationship (Fig. 5B). Consequently the channels tend to open later during the voltage pulse, the first latency at -10 mV, was estimated to 6.4 ± 1.0 ms, and have shorter open times (0.50 ± 0.01 ms), presumably due to rapid closing at the more hyperpolarized potential.

Figure 8D shows the all-points histogram of the Na_v1.8 channel at -10 mV, which indicates single-channel current

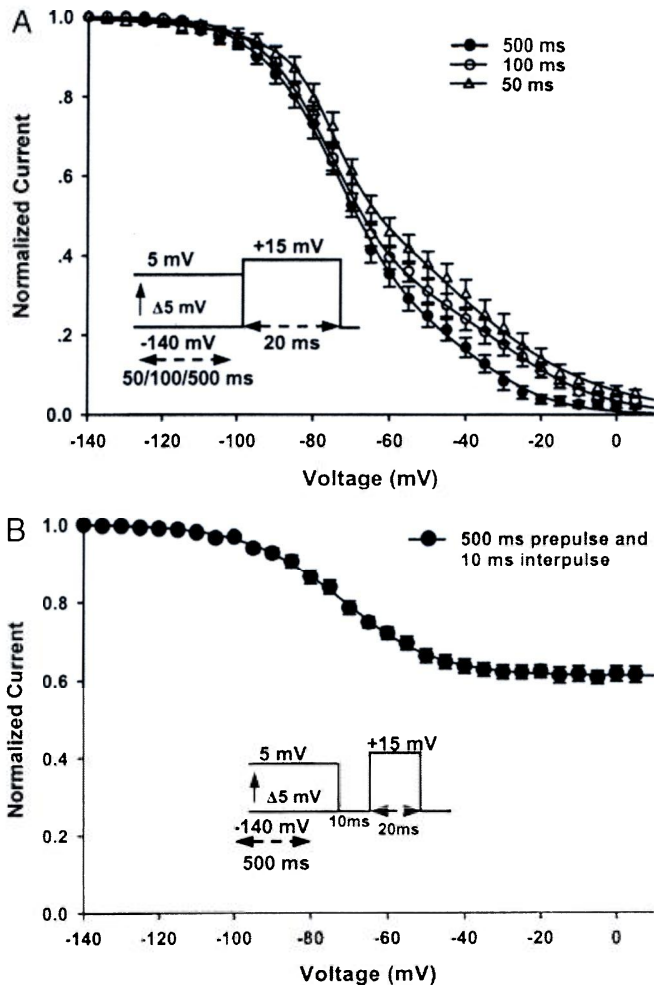


FIG. 6. Slow inactivation is an important determinant of steady-state availability. $Na_v1.8$ and β_1 subunits were expressed in tsA201 cells and exposed to 1 mM lidocaine for 24 h prior to recording. The steady-state availability was determined by applying prepulses of variable duration (50, 100, or 500 ms) to voltages between -140 and $+5$ mV. A standard test pulse (20 mv/20 ms) was then used to assay availability. The test currents were normalized and plotted vs. the prepulse voltage. *A*: steady-state availability was determined using the 50-, 100-, and 500-ms prepulse durations. The smooth curves are fits to a double Boltzmann function with the parameters listed in Table 1. *B*: steady-state slow inactivation was determined by applying 500 ms to voltages between -140 and $+5$ mV. A short hyperpolarizing pulse (10 ms/ -140 mV) was applied to permit recovery from fast inactivation and standard test pulse used to assay availability ($+15$ mV/20 ms). The test currents were normalized and plotted vs. voltage. The smooth curve is a fit to a Boltzmann function $[I/I_{max} = ((1 - A)\{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_s]\} + A)]$ with midpoint ($V_{1/2}$), slope factor (k_s) and steady-state availability (A) of -71.6 ± 1.8 mV, 11.8 ± 1.0 mV, and 0.61 ± 0.02 , respectively ($n = 12$).

amplitude of 0.75 pA. The single-channel current amplitudes were measured over a range of voltages and plotted versus the test voltage (Fig. 8E). The data were well fitted with a straight line yielding a single-channel conductance of 11 ± 0.4 pS.

Properties of the TTX-resistant Na current of DRG neurons

Preincubating with lidocaine increased the cell surface expression (Fig. 1) and Na current density (Fig. 3) of tsA201 cells transiently transfected with the $Na_v1.8$ channel. Although these

data are consistent with an increase in the expression of functional $Na_v1.8$ channels in the plasma membrane, it is important to ascertain that the resulting Na currents have properties that are similar to the native TTX-R current of DRG neurons. We therefore directly compared the properties of the heterologously expressed $Na_v1.8$ and native DRG Na current. Figure 9 shows whole cell Na current recordings from a dissociated DRG neuron before and after external application

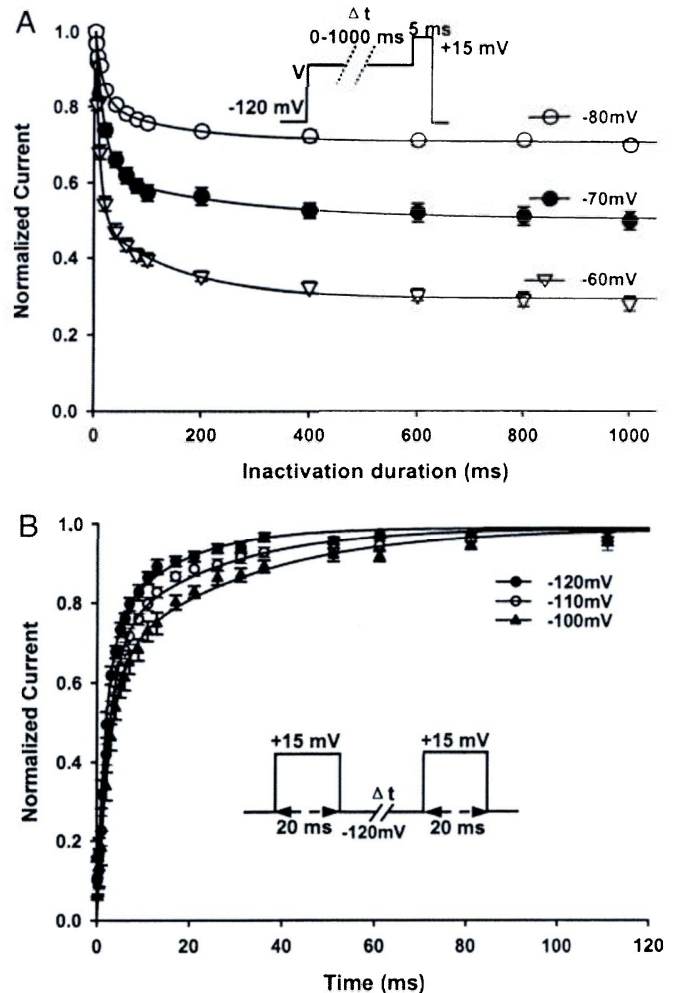


FIG. 7. Time course of $Na_v1.8$ closed-state inactivation and recovery. *A*: development of closed-state inactivation was determined by depolarizing to voltages between -80 and -60 mV for variable intervals (1 s) from a holding potential of -120 mV. The fractional inactivation was assessed by applying a standard test pulse ($+15$ mV/20 ms), and the normalized test currents plotted vs. the prepulse duration. The smooth curves are the sum of 2 exponential components with fast and slow time constants of 16.4 ± 2.2 ms and 188.1 ± 19.8 at -80 mV ($n = 19$) with the amplitude of the fast components, $A_f = 0.21 \pm 0.01$; 15.2 ± 1.7 ms and 211.1 ± 22.2 ms at -70 mV ($n = 18$), $A_f = 0.31 \pm 0.03$; and 11.0 ± 0.8 ms 161.2 ± 22.7 ms at -60 mV ($n = 20$), $A_f = 0.24 \pm 0.04$. *B*: time course of recovery from inactivation was determined by first applying depolarizing prepulses ($+15$ mV/20 ms) before returning to a hyperpolarized potential ($V_{rec} = -120, -110, -100$ mV) for a variable interval (1 ms–1 s) to promote recovery. The fractional recovery at each time point was assessed with a standard test pulse ($+15$ mV/20 ms). The test current amplitudes were normalized and plotted versus the recovery interval. The smooth curves fits to the data to the sum of 2 exponential components with fast and slow time constants of: 1.8 ± 0.3 and 12.7 ± 3.4 ms at -120 mV ($A_f = 0.53$, $n = 11$), 2.2 ± 0.3 ms and 20.6 ± 4.3 at -110 mV ($A_f = 0.6$, $n = 11$), and 2.7 ± 0.5 ms and 29.8 ± 6.1 ms at -100 mV ($A_f = 0.6$, $n = 11$).

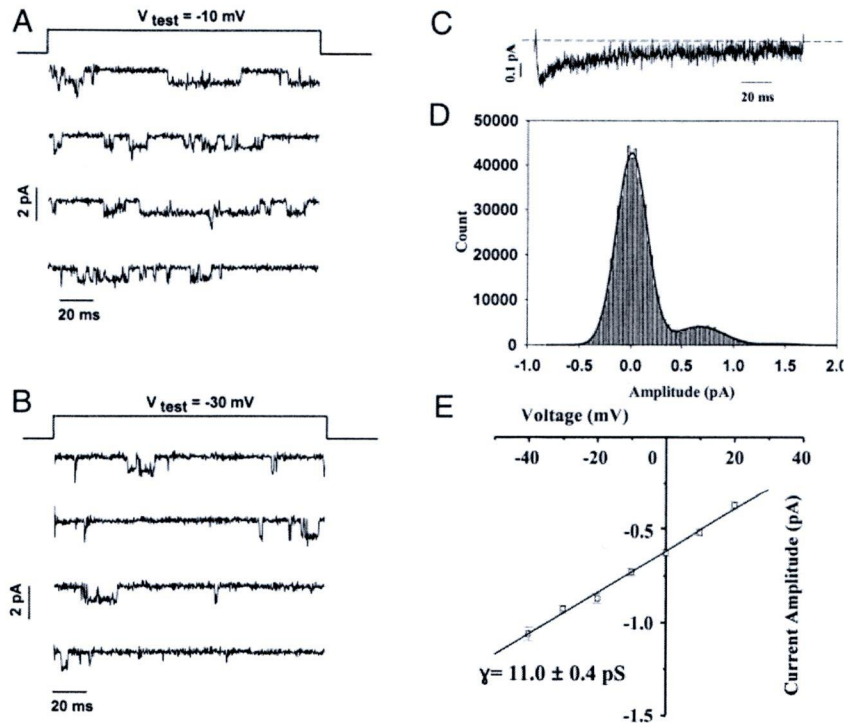


FIG. 8. Single-channel properties of heterologously expressed Nav1.8. $\text{Na}_v1.8$ and β_1 subunit were co-expressed in tsA201 cells and exposed to 1 mM lidocaine for 24 h prior to recording. *A* and *B*: representative single-channel currents recorded in cell-attached configuration at -10 mV (*A*) and -30 mV (*B*). Currents were elicited from a holding potential of -120 mV. *C*: ensemble average of the single-channel openings measured at -10 mV. *D*: all-points histogram of the single-channel current amplitudes at -10 mV. The smooth curve is a Gaussian fit with amplitude peaks at 0.75 and -10 mV. *E*: plot of the current-voltage relationship. The straight line is a linear regression yielding a unitary conductance of 11.0 ± 0.4 pS. Data represents mean amplitudes obtained from 9 to 14 individual patches.

of TTX (Fig. 9). TTX reduced the peak current amplitude and slowed the kinetics of current decay, consistent with the selective inhibition of the rapidly gating TTX-S Na current expressed in these neurons. Figure 9D shows the current-voltage relationships of these Na currents. Consistent with what has been previously reported, the TTX-R current of DRG neurons activates at more depolarized voltages and displays slow gating kinetics by comparison to the TTX-S current (Elliott and Elliott 1993).

Figure 10A shows the normalized conductance and steady-state availability of the TTX-R Na current of DRG neurons. The voltage-dependent activation of the TTX-R current was fitted by a Boltzmann function with a midpoint of -13.8 ± 1.7 mV ($n = 11$). Also plotted is the steady-state inactivation obtained using 500-ms prepulses to voltages between -120 and 0 mV. The data were best fitted by the sum of two Boltzmann functions with midpoints of -77 ± 4 and -32 ± 2 mV ($n = 8$), respectively, and are in good agreement with those determined

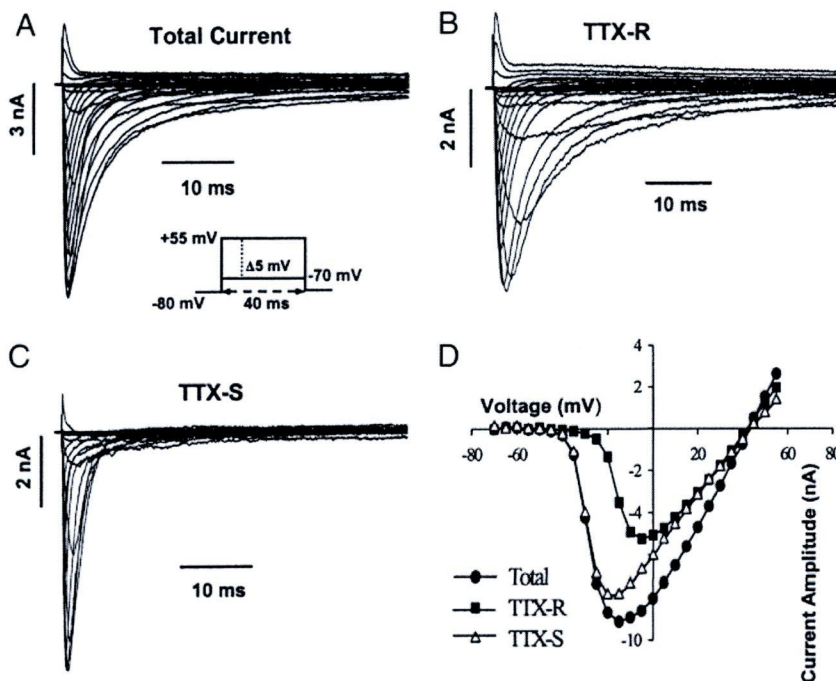


FIG. 9. TTX-resistant Na current of dorsal root ganglion (DRG) neurons. Neurons were isolated from the rat DRG. *A*: whole cell Na current of a small (17 pF) DRG neuron elicited by depolarizing pulses between -70 and $+55$ mV in 5-mV increments from a holding potential of -80 mV. *B*: TTX-resistant (TTX-R) current measured after the bath application of 300 nM TTX. *C*: TTX-sensitive (TTX-S) current obtained by subtracting the TTX-R component from the total current. *D*: current-voltage relationships of the Total, TTX-R and TTX-S components of DRG Na current ($n = 11$).

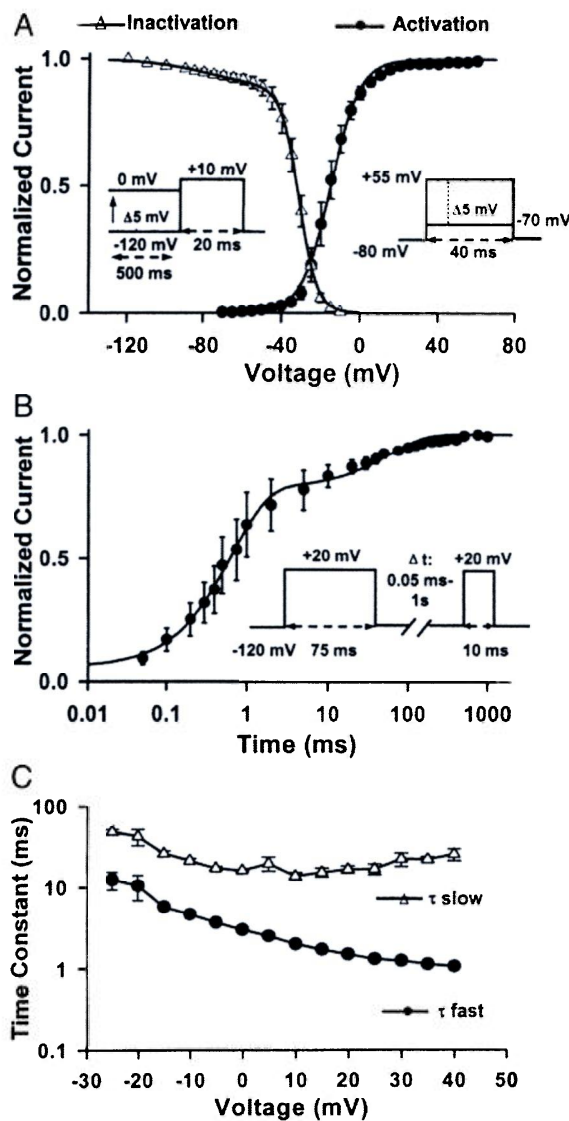


FIG. 10. Voltage-dependent gating of the TTX-R Na current of DRG neurons. *A*: conductance [$G = I/(V - V_r)$] was determined from the peak Na current (I) at each test voltage (V) and the reversal potential (V_r) determined from the current-voltage relationships (Fig. 9*D*). The conductance was normalized to that determined at +60 mV and plotted vs. voltage. The smooth curve is a fit to the data to a Boltzmann function with midpoint ($V_{1/2}$) and slope factor (k_v) of -13.8 ± 1.7 and 6.0 ± 0.6 mV, respectively ($n = 11$). Steady-state inactivation was determined using 500-ms prepulses to the indicated voltages. The smooth curve is a fit of the data to a double Boltzmann function with $V_{1/2}$ and k_v of -77.13 ± 4.0 and 16.0 ± 0.51 mV for the hyperpolarized component ($A_H = 0.12 \pm 0.02$) and -31.6 ± 1.5 and 4.1 ± 0.2 mV for the more depolarized component ($n = 8$). Parameters are listed in Table 1. *B*: time course of recovery from inactivation. Depolarizing prepulses (20 mV/75 ms) were applied before returning to a holding potential of -120 mV for a variable interval (0.05–1 s). The fractional recovery was determined using a standard test pulse (20 mV/10 ms). The test currents were normalized to the current measured after >1 s at -120 mV and plotted vs. recovery interval. The smooth curve is a fit to the sum of 2 exponentials with fast and slow time constants (τ) of 0.9 ± 0.38 and 74.5 ± 12.1 ms ($A_T = 0.74 \pm 0.05$, $n = 3$). *C*: time course of rapid inactivation. The decay phase of the TTX-R current measured at voltages more depolarized than -25 mV was fitted with the sum of 2 exponential components and the resulting fast (τ_{fast}) and slow (τ_{slow}) time constants plotted vs. voltage ($n = 8$).

for the heterologously expressed Na_v1.8 channel (Table 1). The time course of recovery from inactivation was bi-exponential with fast (τ_f) and slow (τ_s) time constants of 0.9 ± 0.4 and 74.5 ± 12.0 ms ($A_T = 0.74$, $n = 3$), respectively (Fig. 10*B*). By comparison to heterologously expressed Na_v1.8, fewer of the endogenous TTX-R channels recovered with the slower time constant (53% for TTX-R vs. 75% for Na_v1.8). This is consistent with measurements of steady-state inactivation where the relative fraction of native TTX-R channels inactivating at the more hyperpolarized voltage ($A_H = 0.12 \pm 0.02$, $n = 8$) was small by comparison to what was observed for the heterologously expressed Na_v1.8 channels ($A_H = 0.76 \pm 0.03$, $n = 9$). In addition, the endogenous TTX-R channels that entered into the slow inactivated state recovered slowly ($\tau_s = 74.6$ ms) by comparison to the heterologously expressed channels ($\tau_s = 12.7$ ms). These data suggest significant differences in the slow inactivation of the endogenous and heterologously expressed Na_v1.8 channels.

Figure 10*C* shows the time constants of current decay at depolarized voltages where Na_v1.8 channel open before inactivating. The current decay is biexponential with the rapid accounting for the majority (75–99%) of the current decay at voltages between 0 and +35 mV. The time constants and relative amplitudes of the fast and slow components are similar to what was observed for the heterologously expressed Na_v1.8 channel (Fig. 5*A*).

DISCUSSION

The Na_v1.8 channel is preferentially expressed in unmyelinated (C-type) and thinly myelinated (A δ) fibers of peripheral nerve and significantly contributes to the rapid upstroke and conduction of nociceptor action potentials (Renganathan et al. 2001). Insights into the biophysical properties of the Na_v1.8 channel have been largely obtained from studies of the endogenous TTX-R Na current of small cell bodies isolated from the DRG (Elliott and Elliott 1993). Unfortunately, DRG sensory neurons express multiple components of TTX-R Na currents that complicate the detailed characterization of voltage dependence and kinetics of the individual currents (Renganathan et al. 2001). Establishing an approach for heterologously expressing Na_v1.8 in cells that are devoid of endogenous Na current would enable a more-detailed characterization of the channel. Unfortunately, the heterologously expression of the cloned Na_v1.8 channel in mammalian cell lines has proved to be problematic (Choi et al. 2004; Fitzgerald et al. 1999; John et al. 2004; Okuse et al. 2002; Zhou et al. 2003; Vijayaragavan et al. 2001; Vijayaragavan et al. 2004). Na_v1.8 transfection of cultured cell lines often results in peak Na currents (<1 nA) that are considerably smaller than the endogenous TTX-R current of isolated DRG sensory neurons (>10 nA). Although the reason for this low level of expression is not known, it may be caused by a trafficking defect that prevents the incorporation of Na_v1.8 channels into the plasma membrane (Okuse et al. 2002). Co-expression of accessory proteins have been shown to increase heterologously expressed Na_v1.8 currents (John et al. 2004; Vijayaragavan et al. 2001); however, the mechanisms that govern the cell surface expression of these channels remains poorly understood.

In this study, we found that preincubating Na_v1.8-transfected tsA201 cells with lidocaine produced a sixfold increase

in the amplitude of the TTX-R Na current. To further investigate the underlying mechanism, we directly compared the biophysical properties of the TTX-R currents of lidocaine-treated tsA201 cells with the native TTX-R Na current of dissociated rat DRG neurons. Both the $\text{Na}_v1.8$ and native TTX-R Na currents activated at voltages around -50 mV. The time constants of current decay were similar for both Na currents indicating that the underlying channels slowly inactivate at depolarized voltages where the channels were predominantly open (Figs. 5C and 10, A and B). Single-channel recordings of the heterologously expressed channel displayed repetitive opening during sustained depolarization that appears to account for the slow time course of inactivation and the small persistent currents observed in macroscopic recordings (Fig. 3B). The single conductance of heterologously expressed $\text{Na}_v1.8$ was 11 ± 1.0 pS (Fig. 8D) and is in good agreement with that previously reported for the endogenous TTX-resistant Na current of DRG neurons (Rush et al. 1998).

The activation of the heterologously expressed $\text{Na}_v1.8$ and native TTX-R Na currents had midpoints ($V_{1/2}$) of -0.6 and -13.8 mV, respectively (Table 1). The relatively hyperpolarized midpoint of activation observed for the endogenous TTX-R current is similar to what has been previously reported (Akiba et al. 2003; Liu et al. 2006). We speculate that the difference in the activation of the heterologously expressed and endogenous Na currents may be related to the expression of additional components of TTX-R current ($\text{Na}_v1.5$ and $\text{Na}_v1.9$) in DRG neurons but not tsA201 cells (Fang et al. 2002; Renganathan et al. 2002). Alternatively, DRG neurons may express additional subunits or accessory proteins that regulate the gating of the $\text{Na}_v1.8$ channel.

The steady-state inactivation of heterologously expressed $\text{Na}_v1.8$ obtained using 500-ms prepulses was fitted by a double Boltzmann function with midpoints of -75.1 ± 1.4 and -34.4 ± 3.3 mV, indicating that two distinct components of inactivation contribute to the availability of the heterologously expressed channels (Table 1). We found that shortening the depolarizing prepulses from 500 to 50 ms had no effect on the midpoints ($V_{1/2}$) of inactivation but significantly reduced the relative amplitude of the more hyperpolarized component (Fig. 6A). The data suggested that the longer prepulses recruited channels into slow inactivated states that inactivated over a more hyperpolarized range of voltages. To test this mechanism, we directly measured the steady-state slow inactivation of $\text{Na}_v1.8$ channels (Fig. 6B), which had a midpoint ($V_{1/2} = -71.6 \pm 1.8$ mV) that was nearly identical to the more hyperpolarized component of inactivation ($V_{1/2} = -75.1 \pm 1.4$ mV) obtained using the conventional protocols for measuring steady-state availability (Fig. 5D). The data indicate that $\text{Na}_v1.8$ channels rapidly enter into slow inactivated states at hyperpolarized voltages and that both fast and slow inactivation are important determinants of the steady-state availability of $\text{Na}_v1.8$ channels. Consistent with this hypothesis is the time course of the development of inactivation at hyperpolarized voltages where $\text{Na}_v1.8$ channels do not open before inactivating, which was found to be biexponential (Fig. 5A). The time constant of the slow component was in a range of 161–211 ms and appears to be associated with the entry of $\text{Na}_v1.8$ channels into a slow inactivated state. The hallmark of $\text{Na}_v1.8$ is its insensitivity to TTX, still our data

show that the expressed Na channels were resistant to block by TTX (Fig. 4).

The steady-state availability of the endogenous TTX-R current of DRG neurons was fitted by a double Boltzmann with midpoints of -77.1 and -31.6 mV, similar to what was observed for the heterologously expressed channels (Fig. 10). Although the midpoints of fast and slow inactivation of the $\text{Na}_v1.8$ and TTX-R currents were similar, the relative contributions of these components to the steady-state availability substantially differed. When applying 500-ms depolarizing prepulses the majority (88%) of the native TTX-R current was associated with the more depolarized component (Fig. 10A) versus only 24% for heterologously expressed $\text{Na}_v1.8$ (Fig. 6A). By comparison to the heterologously expressed channels, the endogenous TTX-R channel of DRG neurons appeared to be more resistant to entry into the slow inactivated state. We speculate that this may result from differential regulation of the expressed and endogenous channels by accessory subunits or intracellular signaling pathways that are unique to DRG neurons.

Overall, the slow open-state inactivation (Fig. 5A), the relatively depolarized midpoints of activation and inactivation (Fig. 5B), and the rapid recovery from inactivation (Fig. 7B) are similar for the heterologous expressed $\text{Na}_v1.8$ and native TTX-R Na currents. These data indicate that preincubating tsA201 cells with lidocaine selectively increased the cell surface expression of $\text{Na}_v1.8$ channels but did not significantly alter their biophysical properties. The activation and steady-state inactivation of the $\text{Na}_v1.8$ channel considerably overlap between -60 and 0 mV suggesting that depolarizing window currents may contribute to the resting membrane potential of DRG neurons expressing this channel.

The increase in $\text{Na}_v1.8$ current density produced by lidocaine suggested that preincubating with the drug promoted the translocation of $\text{Na}_v1.8$ channels to the plasma membrane. To further investigate the underlying mechanism, we examined the subcellular distribution of the heterologously expressed $\text{Na}_v1.8$ channels using confocal fluorescent imaging. In control experiments, the $\text{Na}_v1.8$ immunostaining largely overlapped with that of calnexin, a specific marker of endoplasmic reticulum (Fig. 1). When expressed in tsA201 cells the majority of the $\text{Na}_v1.8$ channel protein appears to be trapped within the endoplasmic reticulum, which would account for the relatively low Na current density of the transfected cells (Fig. 3A). Preincubating the transfected cells with lidocaine resulted in a substantial shift of $\text{Na}_v1.8$ immunofluorescence from the cytoplasm to the cell membrane that correlated with an increase in the Na current density (Fig. 3D). Western blot analysis indicated that the increase in cell surface immunostaining and Na current density induced by lidocaine was not associated with a parallel increase in the expression of the $\text{Na}_v1.8$ channel protein (Fig. 2). Rather these findings indicate that the increase in functional Na channels results from the redistribution of preexisting $\text{Na}_v1.8$ channels from the cytoplasmic compartment to the plasma membrane. These data suggest that the overall poor expression of the $\text{Na}_v1.8$ in tsA201 cells, and possibly other mammalian cell lines (Fitzgerald et al. 1999; Okuse et al. 2002), results from a trafficking defect that causes channel protein to become trapped in the endoplasmic reticulum. The local anesthetic lidocaine is a potent inhibitor of the $\text{Na}_v1.8$ channel that is known to act by

stabilizing Na channels in nonconducting inactivated states (Chevrier et al. 2004). However, we cannot rule out the possibility that lidocaine can interact with other proteins such as GPCRs (Hollmann et al. 2001). Although the state of Na channel in the ER is not known, we speculate that the lidocaine-modified $Na_v1.8$ channels are stabilized in a conformational state that facilitates the trafficking of the channels to the plasma membrane.

GRANTS

The study was supported by the Heart and Stroke Foundation of Québec, Canadian Institutes of Health Research Grant MT-13181. Dr. M. Chahine is an Edwards Senior Investigator (Joseph C. Edwards Foundation).

REFERENCES

- Akiba I, Seki T, Mori M, Iizuka M, Nishimura S, Sasaki S, Imoto K, Barsoumian EL. Stable expression and characterization of human PN1 and PN3 sodium channels. *Receptors Channels* 9: 291–299, 2003.
- Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379: 257–262, 1996.
- Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr BJ, McMahon SB, Boyce S, Hill R, Stanfa LC, Dickenson AH, Wood JN. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* 2: 541–548, 1999.
- Chahine M, Pilote S, Pouliot V, Takami H, Sato C. Role of arginine residues on the S4 segment of the *Bacillus halodurans* Na^+ channel in voltage-sensing. *J Membr Biol* 201: 9–24, 2004.
- Chevrier P, Vijayaragavan K, Chahine M. Differential modulation of $Nav1.7$ and $Nav1.8$ peripheral nerve sodium channels by the local anesthetic lidocaine. *Br J Pharmacol* 142: 576–584, 2004.
- Choi JS, Tyrrell L, Waxman SG, Dib-Hajj SD. Functional role of the C-terminus of voltage-gated sodium channel $Na(v)1.8$. *FEBS Lett* 572: 256–260, 2004.
- Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Akopian AN, Wood JN, Waxman SG. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J Neurosci* 19: RC43, 1999.
- Elliott AA, Elliott JR. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol* 463: 39–56, 1993.
- Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Lawson SN. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel $Na_{v1.9}$ (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* 22: 7425–7433, 2002.
- Fitzgerald EM, Okuse K, Wood JN, Dolphin AC, Moss SJ. cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J Physiol* 516: 433–446, 1999.
- Fjell J, Hjelmstrom P, Hormuzdiar W, Milenkovic M, Aglieco F, Tyrrell L, Dib-Hajj S, Waxman SG, Black JA. Localization of the tetrodotoxin-resistant sodium channel NaN in nociceptors. *Neuroreport* 11: 199–202, 2000.
- Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer, 2001.
- Hollmann MW, Difazio CA, Durieux ME. Ca-signaling G-protein-coupled receptors: a new site of local anesthetic action? *Reg Anesth Pain Med* 26: 565–571, 2001.
- John VH, Main MJ, Powell AJ, Gladwell ZM, Hick C, Sidhu HS, Clare JJ, Tate S, Trezise DJ. Heterologous expression and functional analysis of rat $Nav1.8$ (SNS) voltage-gated sodium channels in the dorsal root ganglion neuroblastoma cell line ND7-23. *Neuropharmacology* 46: 425–438, 2004.
- Kostyuk PG, Veselovsky NS, Tsyndrenko AY. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons. I. Sodium currents. *Neuroscience* 6: 2423–2430, 1981.
- Liu C, Cummins TR, Tyrrell L, Black JA, Waxman SG, Dib-Hajj SD. CAP-1A is a novel linker that binds clathrin and the voltage-gated sodium channel $Na(v)1.8$. *Mol Cell Neurosci* 28: 636–649, 2005.
- Liu CJ, Priest BT, Bugianesi RM, Dulski PM, Felix JP, Dick IE, Brochu RM, Knaus HG, Middleton RE, Kaczorowski GJ, Slaughter RS, Garcia ML, Kohler MG. A high-capacity membrane potential FRET-based assay for $Nav1.8$ channels. *Assay Drug Dev Technol* 4: 37–48, 2006.
- Margolske RF, McHendry-Rinde B, Horn R. Panning transfected cells for electrophysiological studies. *Biotechniques* 15: 906–911, 1993.
- McCleskey EW, Gold MS. Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 61: 835–856, 1999.
- Morello JP, Petäjä-Repo UE, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol Sci* 21: 466–469, 2000.
- Ogata N, Tatebayashi H. Kinetic analysis of two types of Na^+ channels in rat dorsal root ganglia. *J Physiol* 466: 9–37, 1993.
- Okuse K, Malik-Hall M, Baker MD, Poon WYL, Kong H, Chao MV, Wood JN. Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* 417: 653–656, 2002.
- Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Contribution of $Na_v1.8$ sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol* 86: 629–640, 2001.
- Renganathan M, Dib-Hajj S, Waxman SG. $Na(v)1.5$ underlies the 'third TTX-R sodium current' in rat small DRG neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 106: 70–82, 2002.
- Roy ML, Narahashi T. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 12: 2104–2111, 1992.
- Rush AM, Bräu ME, Elliott AA, Elliott JR. Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol* 511: 771–789, 1998.
- Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglén RM, Herman RC. Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem* 271: 5953–5956, 1996.
- Sangameswaran L, Fish LM, Koch BD, Rabert DK, Delgado SG, Ilnicka M, Jakeman LB, Novakovic S, Wong K, Sze P, Tzoumaka E, Stewart GR, Herman RC, Chan H, Eglén RM, Hunter JC. A novel tetrodotoxin-sensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia. *J Biol Chem* 272: 14805–14809, 1997.
- Scholz A, Kuboyama N, Hempelmann G, Vogel W. Complex blockade of TTX-resistant Na^+ currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons. *J Neurophysiol* 79: 1746–1754, 1998.
- Valdivia CR, Ackerman MJ, Tester DJ, Wada T, McCormack J, Ye B, Makielski JC. A novel *SCN5A* arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine. *Cardiovasc Res* 55: 279–289, 2002.
- Vijayaragavan K, Acharfi S, and Chahine M. The C-terminal region as a modulator of r $Na_v1.7$ and r $Na_v1.8$ expression levels. *FEBS Lett* 559: 39–44, 2004.
- Vijayaragavan K, O'Leary ME, Chahine M. Gating properties of $Na_v1.7$ and $Na_v1.8$ peripheral nerve sodium channels. *J Neurosci* 21: 7909–7918, 2001.
- Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA. Voltage-gated sodium channels and the molecular pathogenesis of pain: a review. *J Rehabil Res Dev* 37: 517–528, 2000.
- Zhou X, Dong XW, Crona J, Maguire M, Priestley T. Vinpocetine is a potent blocker of rat $Na_{v1.8}$ tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 498–504, 2003.