

n° d'ordre : 3179

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

École Doctorale "Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de
l'Environnement"

SPÉCIALITÉ : **Sciences des Aliments et Nutrition**

par

Frédéric Boal

La Cysteine-string protein : étude de ses interactions protéiques dans la sécrétion d'insuline

Soutenue le : 15 Juin 2006

Après avis de :

Mme Agnès HEMAR, Chargée de recherche CNRS
M Michael SEAGAR, Directeur de recherche CNRS

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

M Paul HIGUERET, Professeur Université Bordeaux 1
Mme Agnès HEMAR, Chargée de recherche CNRS
M Michael SEAGAR, Directeur de recherche CNRS
Mme Elisabeth GENOT, Chargée de recherche INSERM
Mme Nadine THEZE, Professeur Université Bordeaux 2
M Jochen LANG, Professeur Université Bordeaux 1

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de thèse

« Ce qui est simple est faux; ce qui est compliqué est inutilisable »

Paul Valéry

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Dynamique Moléculaire et Protéomique Fonctionnelle des Cellules Sécétraires, à l'Institut Européen de Chimie et Biologie de Bordeaux.

Je voudrais remercier en premier lieu Jochen Lang, qui en m'accueillant dans son laboratoire m'a permis de réaliser cette thèse.

Je remercie Agnès Hémar et Michael Seagar d'avoir accepté de juger mon travail, et Elisabeth Génot, Nadine Thézé ainsi que Paul Higuieret d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je ne serais bien-sûr pas ici aujourd'hui sans Pier Scotti, qui a porté avec moi ce sujet de recherche qu'est la Csp pendant ces quatre années.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de Marie-Noëlle Benassy qui en plus des nombreuses tâches communes qu'elle prend en charge au laboratoire, est toujours disponible pour son aide expérimentale. Je voudrais également remercier Alexandra Milochau sans qui le laboratoire ne pourrait tout simplement pas tourner plus de deux mois !

Je remercie aussi Valérie Lagrée-Bringtown, qui entre deux organisations de TP, ou la préparation de deux cours est toujours disponible pour des discussions autour d'un café, Benoît Roger, également pour les discussions caféinées et pour la relecture attentive de ce manuscrit. Je souhaite aussi beaucoup de courage à Florence Grise pour qui la fin va bientôt arriver (2B or not 2B ?). Je remercie également Mathilde Dubois pour sa bonne humeur contagieuse.

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier tout particulièrement l'épi de maïs (ils se reconnaîtront) : le vieux maïs, le maïs clown, le maïs grincheux, le maïs pylône, le super-mini-maïs, le maïs bulle, le maïs petit-lapin, et bien-sûr le maïs jedi (ha non, pas lui !). Je souhaite également remercier Claude-Charles sur qui j'ai toujours pu compter.

Un merci tout particulier à mes parents et ma sœur, et à Sophie à qui il faudrait décerner une médaille pour m'avoir supporté ces derniers temps !

Sommaire

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	5
I - PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SECRETION D'INSULINE	7
I.1 - Homéostasie du glucose	7
I.2 - Régulation endocrine de la glycémie	7
I.3 - Pancréas : structure/fonction	9
I.4 - La sécrétion d'insuline : régulation par le glucose	12
I.4.1 - Transport et catabolisme du glucose par la cellule β	12
I.4.2 - Les flux ioniques et la sécrétion d'insuline	14
I.4.3 - La sécrétion biphasique d'insuline	16
I.5 - Autres systèmes régulateurs de la sécrétion d'insuline	19
I.5.1 - Signaux neuronaux	19
I.5.2 - Signaux hormonaux et cascades d'activation	21
I.6 - Dérégulation de l'homéostasie du glucose : diabète de type 2	23
II - « ASPECTS MOLECULAIRES DE LA SECRETION »	24
II.1 - Synthèse et maturation de l'insuline	24
II.2 - Les voies de transport et la sécrétion de l'insuline	27
II.2.1 - Les différents types de vésicules	27
II.2.1.1 - Les vésicules de type synaptique (SLMVs)	27
II.2.1.2 - Les granules sécrétoires (LDCV)	27
II.2.1.3 - Vésicules de transport et sécrétion constitutive	28
II.2.1.4 - Vésicules d'endocytose	28
II.2.2 - Les étapes menant à la fusion	29
II.2.2.1 - Accrochage des vésicules (tethering)	31
II.2.2.2 - Amarrage des vésicules (docking)	32
II.2.2.3 - « Priming »	33
II.2.3 - La fusion des granules avec la membrane plasmique	34
II.2.3.1 - Fusion complète vs. transitoire (kiss and run)	34
II.2.3.2 - Le pore de fusion : lipidique ou protéique ?	37
II.3 - Les acteurs moléculaires de la fusion membranaire	38
II.3.1 - Le complexe SNARE	38
II.3.2 - Les régulateurs du complexe SNARE	46
II.3.2.1 - La Complexine	46
II.3.2.2 - Munc-18	47
II.3.2.3 - Les protéines Rab	48

II.3.2.4 - Le NSF et α SNAP _____	49
II.3.2.5 - Les protéines kinases _____	49
II.3.3 - Le calcium et les Synaptotagmines _____	50
III - LES CHAPERONNES _____	56
III.1 - Aspects structuraux _____	57
III.1.1 - Les chaperonnes DnaK ou Hsp70 _____	57
III.1.2 - Les chaperonnes Hsp90 _____	60
III.1.3 - Les co-chaperonnes DnaJ/Hsp40 et à domaines TPR _____	62
III.1.3.1 - Les co-chaperonnes de Hsp70 : DnaJ/Hsp40 _____	62
III.1.3.2 - Les co-chaperonnes de Hsp90 à domaine TPR _____	64
III.2 - Aspects fonctionnels _____	64
III.2.1 - Prise en charge des peptides en cours de traduction dans le cytosol _____	64
III.2.2 - Tri et adressage des protéines : _____	66
III.2.3 - Protéasome, voie dépendante de l'ubiquitine _____	67
III.2.4 - Transduction de signaux _____	67
III.2.5 - Cytosquelette _____	68
III.2.6 - Désassemblage de la clathrine _____	68
IV - LA « CYSTEINE-STRING PROTEIN » _____	69
IV.1 - Découverte de la Csp _____	69
IV.2 - Structure générale _____	71
IV.3 - Expression tissulaire et localisations cellulaires des Csp _____	75
IV.4 - Fonctions des Csp _____	76
IV.4.1 - Effets de la Csp α sur différentes étapes de l'exocytose _____	76
IV.4.1.1 - Synthèse des neurotransmetteurs et remplissage des vésicules synaptiques _____	76
IV.4.1.2 - Accrochage des vésicules _____	79
IV.4.1.3 - Recyclage des vésicules _____	80
IV.4.1.4 - Régulation des canaux calciques _____	80
IV.4.1.5 - Implication directe dans la fusion _____	84
IV.4.2 - Neurodégénérescence et développement _____	86
OBJECTIFS DU TRAVAIL _____	89
RESULTATS - Partie I _____	91
RESULTATS - Partie II _____	109
RESULTATS - Partie III _____	147
RESULTATS - Partie IV _____	181

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES	197
MATERIEL ET METHODES	209
I - MATERIEL BIOLOGIQUE	210
I.1 - Souches de bactéries	210
I.2 - Lignées cellulaires	210
I.3 - Vecteurs de clonage	211
II - MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE	211
II.1 - Milieu pour bactéries	211
II.2 - Conditions de culture et de conservation des bactéries	211
II.3 - Milieux pour cellules de mammifères	212
II.4 - Conditions de culture et de conservation des cellules de mammifères	212
III - BIOLOGIE MOLECULAIRE	213
III.1 - Sous-clonage	213
III.1.1 - Digestion de l'ADN	213
III.1.2 - Ligature de l'ADN	213
III.2 - Séparation et purification des acides nucléiques par électrophorèse	214
III.2.1 - Migration des acides nucléiques	214
III.2.2 - Purification des acides nucléiques à partir de gel d'agarose	214
III.3 - Extraction d'acides nucléiques	214
III.3.1 - ADN plasmidique	214
III.3.2 - ARN totaux de cerveaux ou de cellules de mammifères	215
III.4 - Amplification d'un fragment d'acides nucléiques	215
III.5 - Mutagenèse dirigée	216
III.6 - Transcription inverse des ARN messagers	216
III.7 - Précipitation de l'ADN	217
III.8 - Séquençage d'ADN	217
III.9 - Transformation des bactéries <i>E. coli</i> compétentes	217
III.9.1 - Préparation de bactéries chimio-compétentes	217

III.9.2 - Transformation de bactéries	218
III.10 - Techniques particulières à l'ARN interférence	218
IV - BIOCHIMIE	219
IV.1 - Expression de protéines recombinantes	219
IV.2 - Extraction et purification des protéines recombinantes	220
IV.2.1 - Extraction et purification des protéines en fusion avec l'étiquette GST	220
IV.2.2 - Extraction et purification des protéines en fusion avec l'étiquette 6xHis	221
IV.3 - Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	221
IV.3.1 - Migration des protéines sur gels Glycine	221
IV.3.2 - Migration des protéines sur gels Tricine	222
IV.3.3 - Coloration des gels et quantification des protéines recombinantes	222
IV.4 - Electrotransfert sur membrane PVDF ou nitrocellulose et immunodétection	222
IV.4.1 - Electrotransfert semi-sec des gels d'acrylamide	222
IV.4.2 - Immunodétection après transfert	223
IV.5 - Dosage des protéines	224
IV.6 - Recherche de partenaires protéiques	224
IV.6.1 - Préparation d'homogénat de cellules	224
IV.6.2 - Co-précipitation à la GST ou " <i>GST pull-down</i> "	224
IV.6.3 - Réticulation covalente ou « <i>cross-linking</i> » dans les cellules HIT-	225
IV.7 - Interactions entre protéines recombinantes	226
IV.7.1 - Interactions directes sur billes de glutathion	226
IV.7.2 - Far Western-blot	227
IV.7.3 - Dot-blot	227
V - BIOLOGIE CELLULAIRE	228
V.1 - Transfection des cellules de mammifères en plaque 24 puits	228
V.2 - Immunocytochimie indirecte	229
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	241

Abréviations

AC: Adénylate cyclase
Ach : Acétylcholine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : Adénosine triphosphate
BMH : Bismaleimidohexane
Bot- : Neurotoxines botuliques
BS3 : Bis-sulfosuccinimidylsuberate
BSA : Albumine sérique bovine
CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
CHIP: *carboxyl terminus of Hsp70 interacting protein*
Csp : *Cysteine-string protein*
DAG : Diacylglycérol
DEPC : Diethylpyrocarbonate
DHP : dihydropyridines
DMSO : Diméthylsulfoxyde
dNTPs : Désoxy-nucléotide tri-phosphate
ddNTPs : Didésoxy-nucléotide tri-phosphate
DO : Densité optique
DSP : Dithiobis-succinimidylpropionate
DSS : Disuccinimidyl suberate
EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique
EGF: *Epidermal growth factor*
FITC : Fluoresceine isothiocyanate
G6P: Glucose-6-phosphate
GABA : Acide γ aminobutyrique
GAD: *L-glutamic acid decarboxylase*
GAP : *GTPase-activating protein*
GEF: *Guanine-nucleotide exchange factor*
GDI: *GDP-dissociation inhibitor*
GDP: Guanosine diphosphate
GFP: *Green fluorescent protein*
GLP-1: *glucagon-like peptide*

GLUT : *Glucose transporter*
GPCR : récepteur couplé aux protéines G (*G-proteins coupled receptors*)
GST : Glutathion-S-transférase
GTP : Guanosine triphosphate
Hsc: *Heat shock cognate protein*
Hsp: *Heat shock protein*
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic
HOP : *Hsp-organizing protein*
IBMX: Isobuthyl-méthylxanthine
IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*
IP₃ : inositol-(1,4,5)-triphosphate
IPTG : Isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside
ISG: Granules sécrétoires immatures
K_{ATP}: Canaux potassium ATP-dépendants
kDa : kilo-Dalton
K_M: Constante de Michaelis
KRB : *Krebs-Ringer-HEPES buffer*
LB : Luria Bertani
LDCV : Vésicule large à corps dense (*large dense core vesicle*)
Mito : Mitochondrie
MP : Membrane plasmique
MODY: *Maturity-onset diabetes of the young*
m/v : Masse/volume
NEM : *N-ethylmaleimide-sensitive factor*
NIDDM : *Non insulino-dependant diabetes mellitus*
NSF : *NEM-sensitive factor*
PC : *proinsulin conversion endoprotease*
PCR : Réaction de polymérase en chaîne (*polymerase chain reaction*)
PBS : Tampon phosphate salin
PDGF : Platelet-derived growth factor
PFA : Paraformaldéhyde
PH : *pleckstrin homology*
PI(4,5)P₂: phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate
PI(3,4,5)P₃: phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PI3K: phosphatidylinositol-3-phosphate kinase
PKA : Protéine kinase AMP cyclique-dépendante
PKC : Protéine kinase calcium-dépendante

PLC : Phospholipase C
PMA : Phorbol-myristate-acetate
PPI : pré-proinsuline
PVDF : *Polyvinylidene difluoride*
RE : Réticulum endoplasmique
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RP: *reserve pool*
RRP : *readily releasable pool*
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SGT : *small-glutamine-rich TPR-containing protein*
SiRNA : *small interfering RNA*
SLMV: Microvésicules de type synaptique (*synaptic-like microvesicles*)
SNAP : *Soluble NSF-attachment protein*
SNARE : *Soluble NSF-attachment protein receptor*
SNAP-25 : *Synaptosomal-associated protein of 25 kDa*
Syt: Synaptotagmine
TAE : TRIS, Acetate, EDTA
TBE : TRIS, Borate, EDTA
TBS-T : *Tris buffered saline Tween*
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; N,N,N',N'-Di-(diméthylamino)ethane;
N,N,N',N'-Tetraméthyl-1-,2-diaminométhane
Tet-X : Toxine tétanique
TGN : Réseau trans-golgien (*trans golgi network*)
TI-VAMP: VAMP insensible aux neurotoxines clostridiales
TOM: *translocase of the outer mitochondrial membrane*
TPR : *Tetratricopeptide repeat*
TRIS : Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
TRITC : Tétraméthylrhodamine
VAMP : *Vesicle-associated membrane protein*
VDCC : Canaux calciques voltage-dépendants, *Voltage-dependant calcium channels*
VGAT : *Vesicular GABA transporter*
v/v : Volume/volume

Introduction

L'exocytose constitue le processus par lequel une vésicule va libérer son contenu à l'extérieur de la cellule par fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique. Les molécules devant être exportées sont chargées dans des vésicules qui peuvent avoir des tailles et des formes diverses. La vésicule est amenée à la membrane plasmique grâce au cytosquelette de la cellule. On distingue plusieurs modalités d'exocytose : soit la vésicule est stockée en attendant un stimulus déclencheur - on parle alors de sécrétion régulée -, soit la vésicule fusionne avec la membrane plasmique et déverse son contenu dans le milieu extérieur sans élément déclencheur strictement défini - on parle alors de sécrétion constitutive. Cette dernière existe dans toutes les cellules eucaryotes. Elle permet, par exemple, de sécréter des protéines de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance ou encore d'amener des protéines à la membrane plasmique. L'exocytose régulée est réalisée principalement par les neurones pour la libération des neuromédiateurs, par les cellules neuroendocrines (comme les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale) et par les cellules endocrines (comme les cellules β -pancréatiques). Néanmoins, on retrouve des phénomènes d'exocytose régulée dans la plupart des types cellulaires, par exemple l'exocytose des lysosomes ou encore celle des granules à messagers inflammatoires des mastocytes.

La sécrétion de l'hormone peptidique insuline par les cellules β -pancréatiques constitue un modèle de choix pour étudier les mécanismes moléculaires de l'exocytose régulée. De plus, ces études trouvent un fondement biomédical car des troubles dans la sécrétion de l'insuline sont impliqués dans le diabète de type 2.

Mon travail de thèse porte sur la *Cysteine string protein* (Csp), une protéine vésiculaire appartenant à la famille des co-chaperonnes de type DnaJ, et sur son implication dans la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques.

Nous allons dans la partie introductive de ce mémoire détailler dans un premier temps le modèle cellulaire utilisé au cours de ce travail en présentant l'aspect physiologique de la sécrétion de l'insuline puis l'aspect moléculaire de la sécrétion régulée. Dans un deuxième temps nous allons détailler les différents systèmes de chaperons cellulaires, leur structure ainsi que leurs fonctions multiples dans la cellule. Finalement, nous allons dresser un bilan des connaissances actuelles sur la protéine Csp et principalement son implication dans la régulation de l'exocytose régulée.

I - Physiopathologie de la sécrétion d'insuline

I.1 - Homéostasie du glucose

Le glucose est utilisé par tous les organismes comme source d'énergie. Il est apporté principalement par l'alimentation. Ces apports sont donc discontinus, et ne correspondent pas forcément aux besoins énergétiques. Néanmoins, la glycémie, c'est à dire le taux de glucose circulant dans le sang, est très peu variable au cours de la journée. Des chutes importantes de la glycémie (hypoglycémies) mais aussi des hausses (hyperglycémies) auraient des conséquences néfastes sur l'organisme. Cela implique donc une régulation très fine de la glycémie, principalement une régulation au niveau du stockage du glucose, mais aussi au niveau de sa mobilisation en cas de besoin.

I.2 - Régulation endocrine de la glycémie

La glycémie est majoritairement régulée par un couple d'hormones sécrétées par le pancréas endocrine : le glucagon, ayant un effet hyperglycémiant, et l'insuline, ayant un effet hypoglycémiant. Alors qu'il existe d'autres effecteurs que le glucagon pour augmenter la glycémie (comme par exemple l'adrénaline), l'insuline est la seule hormone hypoglycémiant de l'organisme. Elle est le seul moyen pour l'organisme de prévenir une hyperglycémie prolongée, qui s'avèrerait dangereuse. Elle agit sur ses cibles via un récepteur à activité tyrosine-kinase exprimé de manière quasiment ubiquitaire dans l'organisme, mais à des taux variables (Cheatham and Kahn, 1995). Les organes ou tissus cibles principaux de l'insuline sont le foie, les muscles, le tissu adipeux et le pancréas lui-même (fig. i-1).

La fixation de l'insuline sur son récepteur a pour effet d'augmenter l'entrée du glucose dans les cellules cibles, de manière à diminuer la glycémie. Cette hormone induit pour cela le recrutement par exocytose du transporteur du glucose (dont l'isoforme est spécifique du tissu cible). L'insuline permet aussi d'activer l'expression de gènes codant pour les enzymes de la voie anabolique afin de stocker le glucose en surplus sous forme de glycogène (dans le foie et les muscles) ou de triglycérides (dans les adipocytes) (Wilson et al., 1998). Parallèlement, elle a aussi pour effet d'inhiber les voies de la néoglucogenèse.

L'insuline a aussi une action autocrine au niveau du pancréas car elle est capable de stimuler sa propre sécrétion (Borge et al., 2002). Par ailleurs, elle active une voie de transduction qui conduit, par l'intermédiaire de facteurs de transcription, à augmenter le

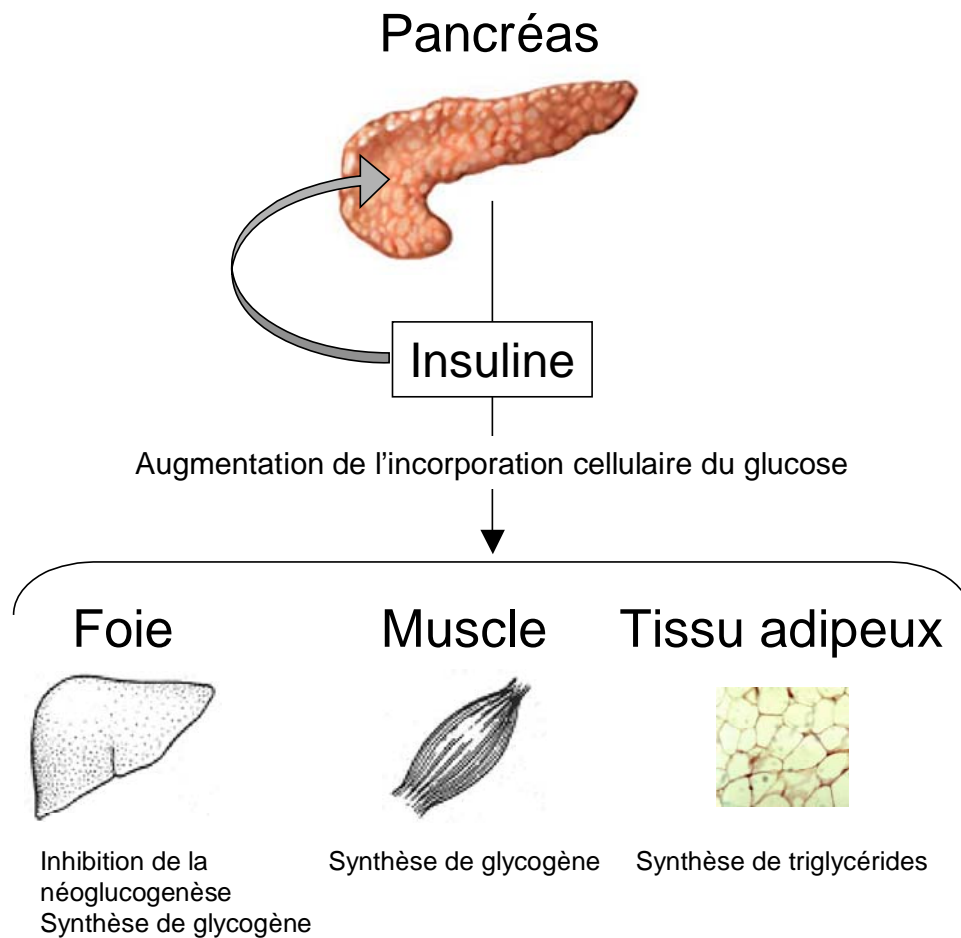


Figure i-1 : Les organes cibles de l'insuline.

Les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas endocrine sécrètent l'insuline qui agit sur le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux pour activer les voies de l'anabolisme et inhiber celles du catabolisme. Cela se traduit par une augmentation de l'entrée du glucose dans la cellule et par son stockage sous forme de glycogène ou triglycérides. L'insuline agit également sur les cellules β et stimule sa propre sécrétion.

stock d'ARNm codant pour l'insuline, de manière à préparer le renouvellement du stock de réserve (Schuit et al., 2002).

I.3 - Pancréas : structure/fonction

L'insuline est fabriquée et libérée par des cellules spécialisées dans le pancréas. Néanmoins, le pancréas est un organe complexe qui possède des fonctions exocrine et endocrine. La fonction exocrine consiste en l'excrétion dans le duodénum d'enzymes digestives (comme la trypsine et la chymotrypsine) contenues dans un fluide alcalin qui a pour but de neutraliser l'acidité du bol alimentaire en sortie de l'estomac. La fonction endocrine du pancréas est assurée par différentes cellules regroupées au sein de micro-organes, les îlots de Langerhans (fig. i-2). L'ensemble des îlots de Langerhans, qui sont dispersés dans le pancréas, ne constitue que de 1 à 3% de la masse totale du pancréas (In't Veld et al., 1990).

On distingue quatre types cellulaires différents qui composent ce micro-organe, chaque type cellulaire étant hautement spécialisé :

- les cellules α synthétisent, stockent et sécrètent le glucagon, hormone hyperglycémiant. Ces cellules représentent 15 à 20% des cellules d'un îlot.
- les cellules δ synthétisent, stockent et sécrètent la somatostatine, qui possède notamment une action inhibitrice sur la sécrétion d'insuline. Elles représentent 5% des cellules d'un îlot.
- les cellules PP synthétisent, stockent et sécrètent le peptide pancréatique. Le rôle physiologique de ce peptide est encore très peu connu. Ce type cellulaire est très minoritaire au sein d'un îlot (moins de 1%).
- enfin, les cellules β synthétisent, stockent et sécrètent l'insuline. Elles représentent 60 à 80% des cellules d'un îlot. En plus de l'insuline, les cellules β synthétisent et sécrètent d'autres hormones. C'est par exemple le cas du peptide VGF, initialement décrit dans les cellules chromaffines PC12 (Levi et al., 1985). Ce peptide est également localisé dans les vésicules contenant l'insuline des cellules β (Possenti et al., 1999; Snyder et al., 2003). Il semble être impliqué dans les phénomènes de régulation de la balance énergétique de l'organisme (Salton et al., 2000).

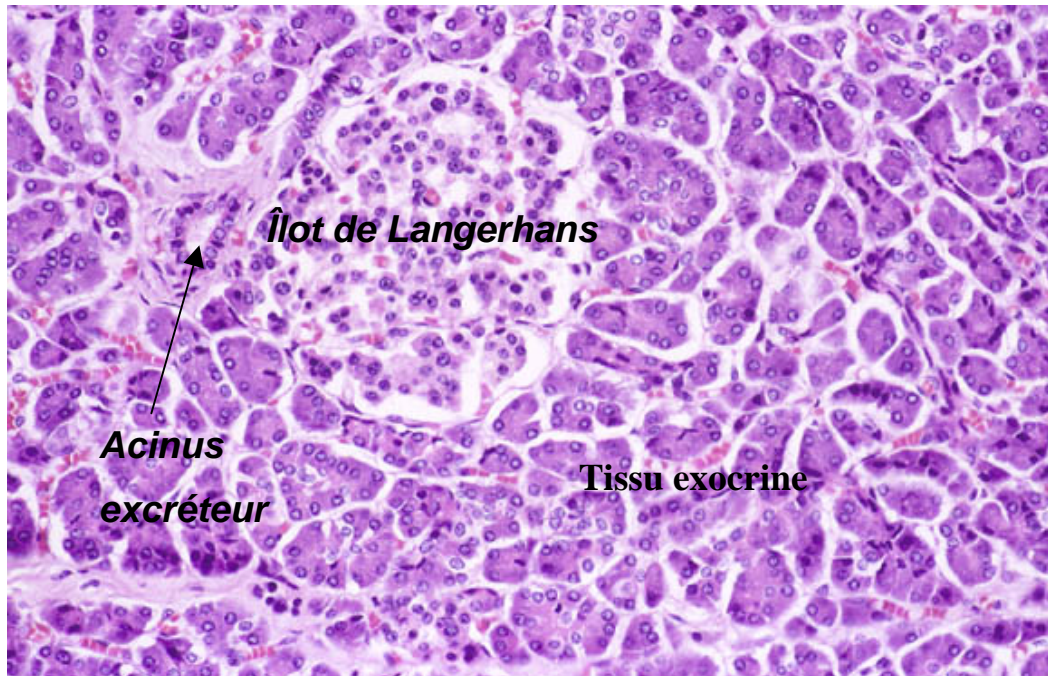


Figure i-2 : Coupe histologique de pancréas (x66).

Sur cette coupe colorée de pancréas on peut observer un îlot de Langerhans noyé dans le tissu exocrine. Un acinus exocrine est visible sur la gauche de l'îlot, entouré de tissu conjonctif.

(source : Université de Duke, *Introduction to Systemic Histology*, Hale L.P.)

L'îlot de Langerhans est une structure parcourue de capillaires sanguins, ce qui permet une libération immédiate des hormones sécrétées dans la circulation sanguine. Ces îlots sont également fortement innervés.

Vue la nature très dispersée des îlots de Langerhans et leur hétérogénéité en terme de types cellulaires, l'isolement des cellules β -pancréatiques primaires est une opération techniquement délicate. Les techniques d'isolement de pancréas et de séparation des cellules β -pancréatiques ont été développées dans le cadre de la recherche fondamentale sur les cellules β et des études visant à réaliser des greffes de cellules, principalement pour traiter le diabète de type 1 qui se caractérise par une destruction des îlots de Langerhans (Lakey et al., 2003). Une des principales limites de ces techniques est la contamination fréquente des préparations par des cellules de nature exocrine. Il en résulte la présence d'enzymes digestives qui peuvent perturber les études ultérieures. De plus, même si la purification des îlots de Langerhans est possible, ces préparations contiennent les différents types de cellules endocrines, et pas uniquement des cellules β . Enfin, les études biochimiques classiques nécessitent de grandes quantités de cellules, ce qui est incompatible avec l'utilisation de cellules primaires, qui ne prolifèrent pas ou peu en culture. Pour l'ensemble de ces raisons, les chercheurs utilisent le plus souvent des lignées cellulaires établies. Les avantages sont nombreux : facilité de culture, stabilité des cellules dans le temps, prolifération importante, etc. Nous disposons à l'heure actuelle de plusieurs lignées cellulaires issues de cellules β -pancréatiques qui conservent de nombreuses caractéristiques des cellules primaires (Poitout et al., 1996). La lignée HIT-T15 est une lignée déposée à l'ATCC (CRL-1777). Elle est dérivée d'une culture primaire de cellules β de hamster syrien transformées par l'antigène T du virus SV40. Ces cellules ont la particularité de posséder un taux de multiplication élevé, et sont faciles à transfecter avec les agents lipofectants. Néanmoins, elles possèdent plusieurs altérations dans la glycolyse, et leur sécrétion d'insuline ne peut être stimulée par le glucose. De plus, le rapport volume du noyau sur volume du cytosol est élevé, ce qui rend les études de localisation par immunofluorescence des protéines délicates. Enfin, le génome du hamster n'est pas complètement séquencé. La lignée de cellules MIN6 est issue de cellules primaires de souris. Le clone m9 utilisé dans cette étude répond à une gamme physiologique de glucose mais cette caractéristique est perdue au cours des différents passages (Minami et al., 2000). Ces cellules sont adaptées aux études de localisation de protéines car elles sont bien

différenciées et le rapport noyau/cytoplasme est plus faible. De plus, le génome de la souris est entièrement séquencé. La lignée de cellules INS-1E est dérivée d'un insulinome de rat. Ces cellules répondent de manière stable à des concentrations physiologiques de glucose, et sont également particulièrement adaptées aux études de localisations protéiques (Merglen et al., 2004). Néanmoins, ces cellules se divisent plus lentement que les précédentes lignées.

I.4 - La sécrétion d'insuline : régulation par le glucose

I.4.1 - Transport et catabolisme du glucose par la cellule β

Le principal régulateur de la sécrétion d'insuline est le taux de glucose sanguin. Le glucose est transporté à l'intérieur de la cellule β par un transporteur spécifique, GLUT (*glucose transporter*). Il existe plusieurs isoformes connues présentant des profils d'expression différents. Les isoformes principales sont GLUT1, exprimé dans les érythrocytes et le cerveau, GLUT2, exprimé dans le foie et les cellules β -pancréatiques, et GLUT4, exprimé dans les muscles squelettiques, le cœur et le tissu adipeux (Joost et al., 2002). Une fois dans le cytosol, le glucose est métabolisé par la glycolyse dont la première étape est sa transformation en glucose-6-phosphate (G6P), réaction catalysée par l'hexokinase. Dans les cellules β -pancréatiques, l'hexokinase responsable de cette réaction est la glucokinase (Tiedge and Lenzen, 1991). Cette enzyme possède un K_M élevé, elle est donc capable de métaboliser rapidement le glucose. Cette étape n'est donc pas limitante et la concentration cytosolique en G6P reflète la glycémie. Pour cette raison, la glucokinase est souvent qualifiée de « senseur du glucose » (Matschinsky, 1990). Les réactions enzymatiques successives de la glycolyse aboutissent à la formation de pyruvate, converti en acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs et dans les phosphorylations oxydatives dans la mitochondrie. L'ensemble de ces réactions entraîne une augmentation du rapport ATP/ADP mitochondrial et par transport de ces adénines nucléotides phosphate une augmentation de ce rapport dans le cytosol (fig. i-3).

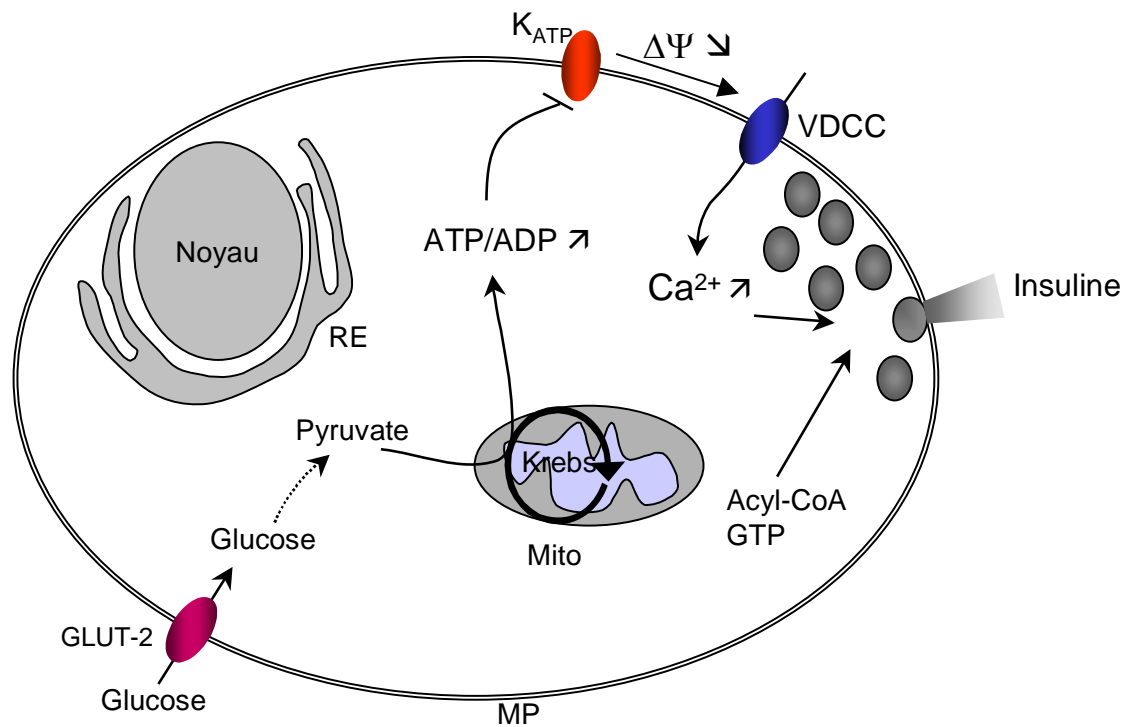


Figure i-3 : Couplage entre métabolisme du glucose et sécrétion d'insuline.

Le glucose est transporté à l'intérieur de la cellule β , métabolisé par la glycolyse puis le cycle de Krebs. L'augmentation du rapport ATP/ADP conséquente provoque la fermeture du canal K_{ATP} , ce qui conduit à la dépolarisation la membrane plasmique. Cette dépolarisation entraîne l'ouverture des VDCC, l'entrée de calcium qui déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline. D'autres facteurs de couplage comme les acyl-CoA ou le GTP sont impliqués.

RE : réticulum endoplasmique, Mito : mitochondrie, MP : membrane plasmique.

Il existe également d'autres facteurs de couplage entre le métabolisme et la sécrétion d'insuline. Les acides gras à longue chaîne par exemple peuvent stimuler l'exocytose des granules à condition d'être métabolisés sous forme acyl-CoA (fig. i-3). Il semble que les acyl-CoA jouent principalement un rôle dans la formation des vésicules en sortie de l'appareil de Golgi (Pfanner et al., 1989). Le GTP (guanosine triphosphate) est aussi impliqué dans le couplage entre le métabolisme et la sécrétion (fig. i-3). En effet, le GTP (ainsi que l'analogue non hydrolysable, le GTP γ S) stimule la sécrétion d'insuline par une voie indépendante du calcium (Vallar et al., 1987; Proks et al., 1996). Il a été proposé que ce nucléotide agit sur l'exocytose à des étapes tardives, via une activation des protéines G hétérotrimériques ou des protéines Rab (Cheviet et al., 2005).

I.4.2 - Les flux ioniques et la sécrétion d'insuline

L'augmentation du rapport ATP/ADP induit par le catabolisme du glucose a pour conséquence directe la fermeture de canaux K⁺ ATP-dépendant (K_{ATP}) (fig. i-3) (Ashcroft et al., 1984). Au repos la cellule β -pancréatique maintient de part et d'autre de sa membrane plasmique une différence de potentiel électrique constante, de l'ordre de -70 mV. Le canal K_{ATP} étant ouvert à l'état basal, ce potentiel membranaire induit une sortie continue d'ions K⁺. A l'inverse, la Na-K ATPase maintient le potentiel de membrane grâce à son activité ATPasique en refluant des ions Na⁺ vers l'extérieur et en concentrant les ions K⁺ à l'intérieur de la cellule. Le canal K_{ATP} est constitué de plusieurs sous-unités Kir et SUR. Quatre sous-unités Kir forment le pore du canal, et quatre sous-unités SUR fixent l'ATP et permettent ainsi la régulation ATP-dépendante de l'ouverture du canal (Bataille, 2002). La sous-unité Kir exprimée dans les cellules β -pancréatiques est de type Kir6.2 et la sous-unité SUR est de type SUR1 (Bataille, 2002).

La fermeture du canal K_{ATP} entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique de la cellule β (fig. i-3) (Ashcroft et al., 1984) qui va à son tour entraîner l'ouverture de canaux calciques voltages-dépendants (*voltage-dependant calcium channel* -VDCC) (fig. i-3) (Arkhammar et al., 1987). Il existe de nombreuses isoformes de VDCC présentant des profils d'expression différents et reflétant des fonctions différentes (Fisher and Bourque, 2001). Les VDCC sont composés d'une sous-unité α 1 qui forme le pore sensible au voltage et qui varie d'un canal à l'autre, et de plusieurs autres sous-unités qui peuvent être

régulatrices de l'activité du canal, ou encore déterminer la localisation sous-cellulaire du canal. La sous-unité $\alpha 1$ du canal est composé de quatre domaines homologues (I-IV) constitués chacun de six hélices transmembranaires (Seagar et al., 1999).

Les trois types principaux de VDCC sont les canaux de type P/Q, de type N et de type L, qui peuvent se distinguer par leurs propriétés pharmacologiques et qui possèdent chacun des signatures électrophysiologiques propres. Ces trois types de canaux sont exprimés dans des systèmes neuronaux, neuroendocriniens et endocriniens (Seagar et al., 1999; Fisher and Bourque, 2001). Le canal de type P/Q est sensible à la drogue ω -Agatoxine IVA, tandis que le canal de type N est sensible à la ω -Conotoxine GVIA. Le canal de type P/Q est principalement responsable de la neuroexocytose, bien que le canal de type N semble être aussi impliqué (Fisher and Bourque, 2001). Le canal de type L est sensible aux dihydropyridines (DHP). Les données électrophysiologiques et pharmacologiques tendent à montrer que le canal de type L est le canal majoritairement fonctionnel dans la sécrétion de l'insuline des cellules β -pancréatiques. En effet, les DHP bloquent 80% de la réponse au glucose des îlots humains (Davalli et al., 1996). Néanmoins, dans des îlots de rats, il existe une composante sensible à la ω -Agatoxine IVA, ce qui suggère une contribution (non majoritaire mais non négligeable) des canaux de types P/Q (Ligon et al., 1998). Ainsi, il apparaît que la réponse au glucose des cellules β -pancréatiques fait appel à différents types de VDCC. Enfin, il existe différentes sous-classes de canaux calciques qui semblent être impliqués différemment dans la première et la seconde phase de réponse au glucose (Jing et al., 2005).

L'ouverture des VDCC entraîne l'entrée de calcium selon son gradient électrochimique. L'augmentation de la concentration en calcium libre dans le cytosol va être l'élément déclencheur de l'exocytose des vésicules d'insuline (fig. i-3 et partie II.3.3).

Il est à noter que la sécrétion d'insuline peut être stimulée de manière directe par application d'une solution concentrée de KCl (classiquement 50 mM). Cela a pour effet de dépolariser la membrane plasmique induisant un influx calcique et ainsi déclenche la sécrétion d'insuline (Henquin, 2000). La mesure de l'exocytose stimulée par dépolarisation induite par le KCl permet de n'étudier que l'influence des étapes finales. En effet, la réponse à court terme induite par le KCl n'a aucun lien avec le métabolisme du glucose et ne met en jeu que les étapes finales de la sécrétion (Kennedy et al., 1998).

I.4.3 - La sécrétion biphasique d'insuline

L'ouverture des VDCC entraîne l'entrée massive d'ions calcium à l'intérieur de la cellule ce qui a pour effet direct de déclencher l'exocytose des vésicules et la libération de l'insuline. Cette sécrétion peut être mesurée à partir d'un pancréas isolé perfusé de façon constante par une solution physiologique. En prélevant régulièrement des aliquotes du milieu de perfusion, on peut doser la quantité d'insuline libérée par le pancréas, au cours du temps, en fonction de différents sécrétagogues appliqués dans la solution. Ces expériences, appelées « incubations dynamiques », ont permis de mettre en évidence que la sécrétion d'insuline d'un pancréas isolé en réponse au glucose est biphasique, c'est à dire qu'elle se fait en deux temps distincts (Rorsman et al., 2000; Rorsman and Renstrom, 2003) (fig. i-4A). Les différents délais mis en jeu peuvent être variables d'une espèce à l'autre, et nous nous baserons ici sur la cinétique de réponse d'îlots pancréatiques isolés de souris (Rorsman and Renstrom, 2003) (fig. i-4A).

La première phase de réponse au glucose correspond à une augmentation rapide et importante de la sécrétion d'insuline, dès la première minute après l'ajout de glucose. Cette phase dure environ 5 minutes, puis la sécrétion d'insuline diminue considérablement durant la deuxième phase de réponse. Cette phase se poursuit jusqu'à l'arrêt de la stimulation (fig. i-4A). La deuxième phase est observée après stimulation par le glucose ou par un autre nutriment, mais pas après stimulation par du KCl (fig. i-4A) (Rorsman et al., 2000; Rorsman and Renstrom, 2003).

Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer la sécrétion biphasique en réponse au glucose. La plus souvent reprise dans la littérature est l'hypothèse qui implique des pools différents de vésicules (Rorsman et al., 2000; Barg, 2003; Rorsman and Renstrom, 2003). Cette hypothèse a été élaborée à partir de mesures électrophysiologiques basées sur la mesure de la capacitance membranaire. Le principe de cette technique est basée sur le fait que, lorsqu'une vésicule fusionne avec la membrane plasmique, la surface totale de la membrane est augmentée par l'apport de la surface de la vésicule. Cela résulte en l'augmentation de la capacitance de la membrane, qui peut être mesurée avec une précision temporelle de l'ordre de la milliseconde (Neher and Marty, 1982). On peut ainsi mesurer en temps réel la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (Angleton and Betz, 1997). Il a été proposé que la première phase de réponse au glucose correspond à la libération d'un pool de vésicules rapidement libérables (*readily releasable pool* - RRP), et que la deuxième phase correspond à la libération d'un pool de réserve (*reserve pool* - RP)

(fig. i-4B). On estime qu'une seule vésicule contient environ $1,6 \cdot 10^{-18}$ mol d'insuline (soit environ 2 fg). Par ailleurs, des études morphométriques sur les cellules β primaires ont montré qu'une cellule contient environ 10 000 granules (Dean, 1973; Olofsson et al., 2002; Rorsman and Renstrom, 2003). En mesurant la quantité d'insuline libérée au cours de la première phase et en combinant ces données, il a été estimé que la cellule β possède un RRP d'environ 40 granules sécrétoires et que ces granules sont rapidement mobilisables en réponse au glucose (Eliasson et al., 1997). L'épuisement rapide du RRP expliquerait la diminution de la sécrétion après la première phase (fig. i-4A) (Rorsman and Renstrom, 2003). Le RP dont la libération correspondrait à la deuxième phase de réponse ne pourrait être mobilisable que dans une échelle de temps plus longue, et de manière couplée au métabolisme car elle nécessite de l'ATP (fig. i-4B) (Rorsman and Renstrom, 2003). Nous discuterons plus loin des différences morphologiques et moléculaires qui sous-tendent l'existence de ces deux pools.

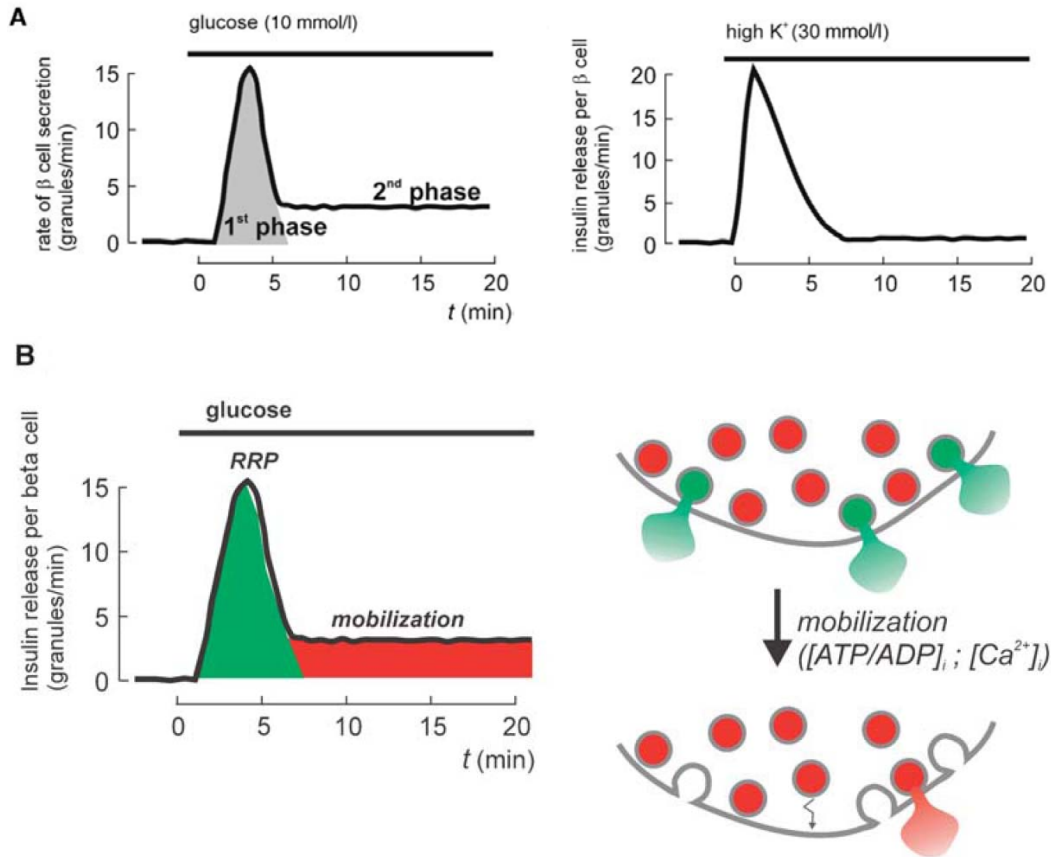


Figure i-4 : La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est biphasique.

A : La sécrétion d'insuline est mesurée par perfusion d'îlots de Langerhans de souris stimulés par le glucose (10 mM, panneau de gauche), ou par une solution concentrée en KCl (30 mM, panneau de droite). Le nombre de granules sécrétés par minute est estimé par la quantité moyenne d'insuline contenue dans un granule ($1,6 \cdot 10^{-18}$ mol) et en considérant qu'un îlot moyen contient 1000 cellules β . Le glucose induit une réponse biphasique légèrement retardée tandis que le KCl induit une réponse immédiate mais uniphasique.

B : La sécrétion biphasique de l'insuline en réponse au glucose peut s'expliquer par l'existence de différents pools de vésicules. Le pool rapidement relargable est tout d'abord libéré (RRP, en vert), tandis que la mobilisation du pool de réserve (RP, en rouge), nécessite des modifications biochimiques (rôle de l'ATP et du calcium).

Adapté de (Rorsman and Renstrom, 2003)

I.5 - Autres systèmes régulateurs de la sécrétion d'insuline

Il existe également d'autres facteurs régulateurs de la sécrétion d'insuline. On peut distinguer majoritairement des signaux de nature neuronale et hormonale. Ces signaux régulateurs sont impliqués dans le contrôle physiologique global de la sécrétion d'insuline. En effet, à l'échelle de l'organisme, de nombreux paramètres agissent sur le pancréas endocrine, soit pour préparer une prochaine sécrétion d'insuline, soit pour l'empêcher. Nous nous concentrerons ici sur les régulateurs principaux de la sécrétion d'insuline, et détaillerons plus précisément les voies de transduction mises en jeu dans la cellule β .

I.5.1 - Signaux neuronaux

Les îlots de Langerhans sont des structures innervées par des neurones à acétylcholine (ACh). L'ACh est un neurotransmetteur capable d'activer la sécrétion d'insuline et plus précisément de potentialiser l'effet activateur du glucose (Gilon and Henquin, 2001). Elle agit en se fixant sur des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (*G-proteins coupled receptors* –GPCR). Ces récepteurs activent une protéine G de type G_q qui active la phospholipase C (PLC). La PLC catalyse la coupure du lipide phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂) en diacylglycérol (DAG) et en inositol-(1,4,5)-triphosphate (IP₃). L'IP₃ soluble se lie à son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique (RE), ce qui induit la libération du stock calcique du RE dans le cytosol (fig. i-5). Le calcium ainsi libéré active la protéine kinase calcium-dépendante (PKC) qui subit alors une translocation du compartiment cytosolique vers la membrane plasmique. Elle se lie au DAG, et phosphoryle ensuite des cibles moléculaires sur des résidus sérine et/ou thréonine (Gilon and Henquin, 2001). Ceci a pour effet global d'activer la sécrétion d'insuline (fig. i-5). De nombreuses isoformes de PKC sont connues, mais il n'est pas clair quelle isoforme est fonctionnellement importante dans la sécrétion d'insuline (Nesher and Cerasi, 2002).

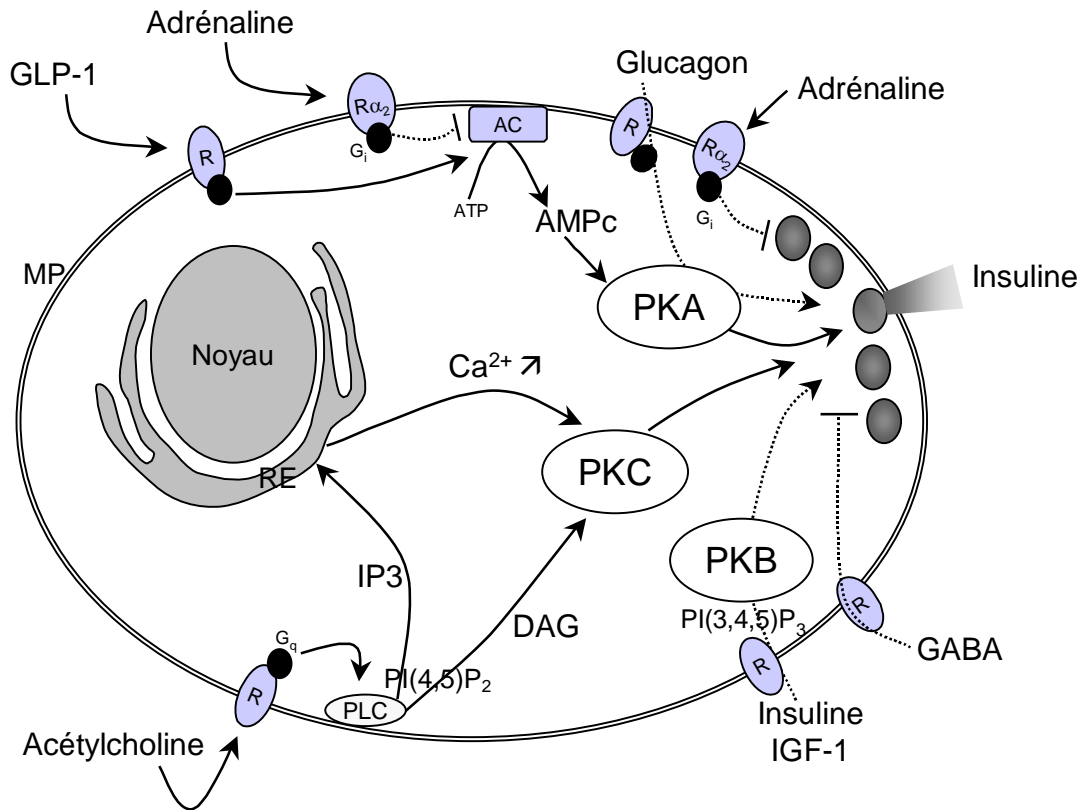


Figure i-5 : Régulateurs neuronaux et hormonaux de la sécrétion d'insuline.

La sécrétion d'insuline est régulée par différents signaux hormonaux et neuronaux. Le GLP-1 induit une activation de la PKA via l'AC, tandis que l'adrénaline inhibe cette voie. L'acétylcholine induit le recrutement des stocks calciques intracellulaires du RE via la PLC. La PKC ainsi activée déclenche l'exocytose. Le GABA inhibe la sécrétion par une voie encore mal connue. Le glucagon agit via la PKA pour préparer une prochaine sécrétion d'insuline. L'insuline a une action autocrine/paracrine via la PKB.

Le GABA (acide γ aminobutyrique) joue un rôle négatif sur la sécrétion d'insuline. Le GABA et l'enzyme responsable de sa synthèse, la L-glutamate décarboxylase (GAD), sont exprimés dans l'îlot de Langerhans à des taux comparables à ceux trouvés dans le cerveau (Taniguchi et al., 1977). La signalisation induite par le GABA sur les cellules β -pancréatiques est peu connue (Braun et al., 2004). Il s'agit d'une régulation autocrine/paracrine de la sécrétion d'insuline. Des souris surexprimant l'enzyme GAD (donc montrant une surproduction de GABA) présentent des réponses au glucose perturbées (Shi et al., 2000). Il est à noter aussi que près de 80% des diabétiques de type I (caractérisé par une destruction auto-immune des îlots de Langerhans) possèdent un auto-anticorps dirigé contre GAD (Braun et al., 2004).

I.5.2 - Signaux hormonaux et cascades d'activation

Des signaux hormonaux sont aussi impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'insuline.

Au cours de la digestion du bol alimentaire, les cellules de type L de l'intestin sont capables d'émettre un signal hormonal en direction des cellules β pour préparer la sécrétion d'insuline post-prandiale. Le messenger hormonal mis en jeu est un peptide qui ressemble à l'hormone hyperglycémiant glucagon. Il s'agit du GLP-1 (*glucagon-like peptide*) qui permet d'amplifier la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Il agit en se liant à ses récepteurs qui appartiennent à la famille des GPCR (fig. i-5). La liaison du GLP-1 à son récepteur induit l'activation de l'adénylate-cyclase (AC) qui catalyse la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), qui active à son tour la protéine kinase AMPC-dépendante (PKA) (Gromada et al., 1998). Le glucagon, hormone hyperglycémiant, agit aussi sur les cellules β en vue de préparer à une future sécrétion d'insuline. Cela permet un meilleur contrôle de la glycémie à moyen terme. Son action sur les cellules β se traduit par une activation de la PKA (Huypens et al., 2000; Dalle et al., 2004). La PKA est une sérine/thréonine kinase dont de nombreux substrats sont des composants clés de la machinerie de sécrétion (voir plus loin). L'activation de la PKA conduit à une stimulation de la sécrétion d'insuline (Nesher et al., 2002) (fig. i-5).

L'adrénaline est une hormone libérée en cas de stress ou d'effort physique intense. Dans ces conditions, il apparaît évident que l'organisme a besoin de glucose circulant pour

faire face à la situation. Il semble ainsi logique que l'adrénaline ait un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline. L'adrénaline se lie à son récepteur α_2 sur les cellules β -pancréatiques. Ce récepteur est couplé à la protéine G_i qui induit une inhibition de l'AC, d'où une chute de l'AMPc d'où une hypoactivation de la PKA qui résulte en une inhibition de la sécrétion (fig. i-5) (Debuysse et al., 1991). Néanmoins, la seule contribution de cette voie ne peut expliquer l'effet inhibiteur important de l'adrénaline et il a été proposé qu'elle active une voie dépendante du GTP, impliquant les protéines G hétérotrimériques (Ullrich and Wollheim, 1988). Il a été montré grâce à un modèle de cellules β perméabilisées que la protéine G_i est principalement impliquée dans cette inhibition, et selon un effet direct sur l'exocytose, sans implication d'autres seconds messagers (fig. i-5) (Lang et al., 1995).

L'insuline possède une action autocrine/paracrine sur les cellules β (Elghazi et al., 2006). Elle induit par exemple en se fixant sur son récepteur une signalisation qui active la protéine kinase B (PKB/Akt) (Elghazi et al., 2006). La PKB est une sérine/thréonine kinase qui est au centre de nombreuses voies de signalisation impliquant des signaux de différenciation cellulaire, de survie cellulaire, de régulation de la masse cellulaire ainsi que des signaux mitotiques (Brazil and Hemmings, 2001; Dickson and Rhodes, 2004). Elle est activée par les voies de transduction des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase. La liaison d'un facteur de croissance (EGF, PDGF, insuline par exemple) à leurs récepteurs entraîne l'activation de ces derniers par autophosphorylation. Cela a pour conséquence de recruter la phosphatidylinositol-3-phosphate kinase (PI3K) qui catalyse la synthèse du lipide phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P₃). La PKB possède une affinité importante pour le PI(3,4,5)P₃ par son domaine PH (*pleckstrin homology*) et donc est recrutée au niveau de la membrane plasmique. Ainsi relocalisée, la PKB est phosphorylée sur un résidu sérine et sur un résidu thréonine. Cela entraîne un changement de conformation qui permet son activation (Brazil and Hemmings, 2001). Dans les cellules β , elle peut être activée par le glucose et par l'IGF-1 (*insulin-growth factor 1*) (Dickson et al., 2001), ou encore par le GLP-1 (Elghazi et al., 2006). Il a été montré récemment que des souris mutantes pour PKB/Akt présentent un risque accru de développement d'un diabète de type 2, suggérant un rôle important de cette kinase dans le déclenchement de la maladie (Bernal-Mizrachi et al., 2004). Les auteurs ont montré que les souris mutées pour PKB/Akt présentent des troubles dans la sécrétion d'insuline et non pas dans la

signalisation du glucose. Cette étude suggère un rôle direct de la PKB dans la sécrétion de l'insuline (fig. i-5).

I.6 - Dérégulation de l'homéostasie du glucose : diabète de type 2

Le diabète sucré de type 2, ou diabète non-insulino-dépendant (NIDDM), constitue un problème de santé publique en France et dans le monde, car il touche un nombre de plus en plus important de personnes. On estime à 150 millions le nombre de personnes souffrant de ce type de diabète à travers le monde en 2000, et ce chiffre est en constante progression (van Tilburg et al., 2001; Zimmet et al., 2001). On compte actuellement en France plus de 2 millions de diabétiques de type 2, chiffre auquel il faut ajouter environ 800 000 diabétiques méconnus et non traités. Le montant des dépenses liées au diabète s'élevait en 2000 à près de 5 milliards d'euros en soins médicaux et ambulatoires (source : « Association de langue française pour l'étude du diabète et des maladies métaboliques » – ALFEDIAM).

Le diabète de type 2 se caractérise par des défauts de sécrétion de l'insuline et par des défauts de l'activité de l'hormone sur les tissus cibles. On parle dans ce dernier cas d'insulino-résistance. Cette maladie apparaît comme étant multifactorielle, aggravée par des facteurs de risques comme l'obésité ou simplement la surcharge pondérale (Zimmet et al., 2001). A ce jour, peu de gènes uniques ont été montrés comme étant impliqués dans le déclenchement du diabète de type 2 (Ashcroft and Rorsman, 2004). Ces diabètes d'origine génétique touchent de 1 à 5% des diabétiques, et on appelle ce syndrome MODY, pour *maturity-onset diabetes of the young*. Le gène muté le plus couramment est le gène codant pour la glucokinase, l'enzyme clé de la glycolyse, qui sert dans la cellules β de « senseur du glucose » (voir paragraphe I.4.1). De nombreuses études tendent à montrer que des défauts dans la sécrétion de l'insuline peuvent apparaître précocement dans le développement du diabète, favorisant son installation et son évolution (Pratley and Weyer, 2001; Gerich, 2002).

Les défauts dans la réponse à l'insuline et/ou dans sa sécrétion conduisent à une hyperglycémie chronique, qui est rapidement dangereuse pour l'organisme. En effet, des taux élevés de glucose dans le sang vont conduire à un développement d'athérosclérose qui augmente les risques d'attaques cardiaques (Mankovsky and Ziegler, 2004), ou encore à des rétinopathies ou des néphropathies plus ou moins sévères dues à des lésions des vaisseaux capillaires.

Il n'existe que quelques traitements efficaces pour lutter contre le diabète de type 2. Les sulfonylurées permettent d'améliorer la sécrétion d'insuline. Ils agissent en se fixant sur les sous-unités SUR (*sulfonylurea receptor*) des canaux K^+ ATP-dépendant, ce qui a pour effet d'induire leur fermeture et donc la dépolarisation de la membrane plasmique. Les thiazolidinediolines sensibilisent les tissus cibles à l'action de l'insuline. D'autres médicaments limitent l'absorption du glucose au niveau intestinal, et donc l'hyperglycémie post-prandiale.

La recherche de nouveaux traitements plus efficaces se poursuit dans différentes voies. Certaines équipes se proposent de développer des techniques de greffe de pancréas, voire de recourir à l'utilisation de pancréas artificiels pour pallier aux défauts de sécrétion précoces dans la maladie. Cette approche lourde est terriblement compliquée par les réactions immunitaires conséquentes à la greffe et ne se justifie actuellement que pour peu de cas cliniques. La construction de pancréas endocrines artificiels est à l'étude depuis 15 ans mais se heurte encore à des problèmes techniques majeurs. Il est par ailleurs indéniable qu'une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la sécrétion d'insuline et sa régulation permettra d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques (Bailey, 2000; Moller, 2001).

II - « Aspects moléculaires de la sécrétion »

II.1 - Synthèse et maturation de l'insuline

L'insuline est une protéine uniquement exprimée dans les cellules β -pancréatiques. Elle est le produit d'un gène unique chez l'homme, porté par le chromosome 11. De nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation du taux d'expression du gène codant pour l'insuline, tels que le glucose ou d'autres nutriments (Welsh et al., 1986; Philippe et al., 1994; Melloul et al., 2002). Cette régulation permet à la cellule de renouveler son stock d'insuline entre les phases de sécrétion intenses (soit en post-prandial). L'insuline est initialement produite sous la forme d'un précurseur, la pré-proinsuline (PPI). L'ARNm codant pour la PPI est stabilisé dans le cytosol, pour constituer une réserve en cas de besoin important (fig. i-6A)(Welsh et al., 1986).

La PPI est traduite au niveau des ribosomes fixés sur le RE. Comme elle possède un peptide signal, elle est transloquée de manière co-translationnelle dans la lumière du RE pour être exportée. Rapidement, le peptide signal est clivé et la proinsuline transite à

travers le RE jusqu'à l'appareil de Golgi (fig. i-6A). Elle s'associe alors en structures hexamériques et il y a formation de ponts disulfures intramoléculaires (Huang and Arvan, 1995). Au niveau du réseau trans-golgien (TGN), des granules immatures (ISG, *immature secretory granules*) se forment. Ces granules sont recouverts d'un manteau de clathrine (Molinete et al., 2000). La maturation de ces granules nécessitent plusieurs évènements concomitants :

(i) la pompe à proton H^+ -ATPase de type vésiculaire permet l'acidification progressive de l'intérieur des granules

(ii) cette acidification a pour effet d'activer l'enzyme de conversion PC (*proinsulin conversion endoprotease*) qui clive le peptide C de la proinsuline et la convertit en insuline mature (Molinete et al., 2000)

(iii) le granule perd son manteau de clathrine

(iiii) l'insuline mature forme alors de véritable structures cristallines, stabilisées par des ions Zn^{2+} (Dodson and Steiner, 1998).

Les granules matures sont alors appelés « Vésicules larges à cœur dense » (LDVC, *large dense-core vesicles*) (fig. i-6B) (Orci et al., 1973).

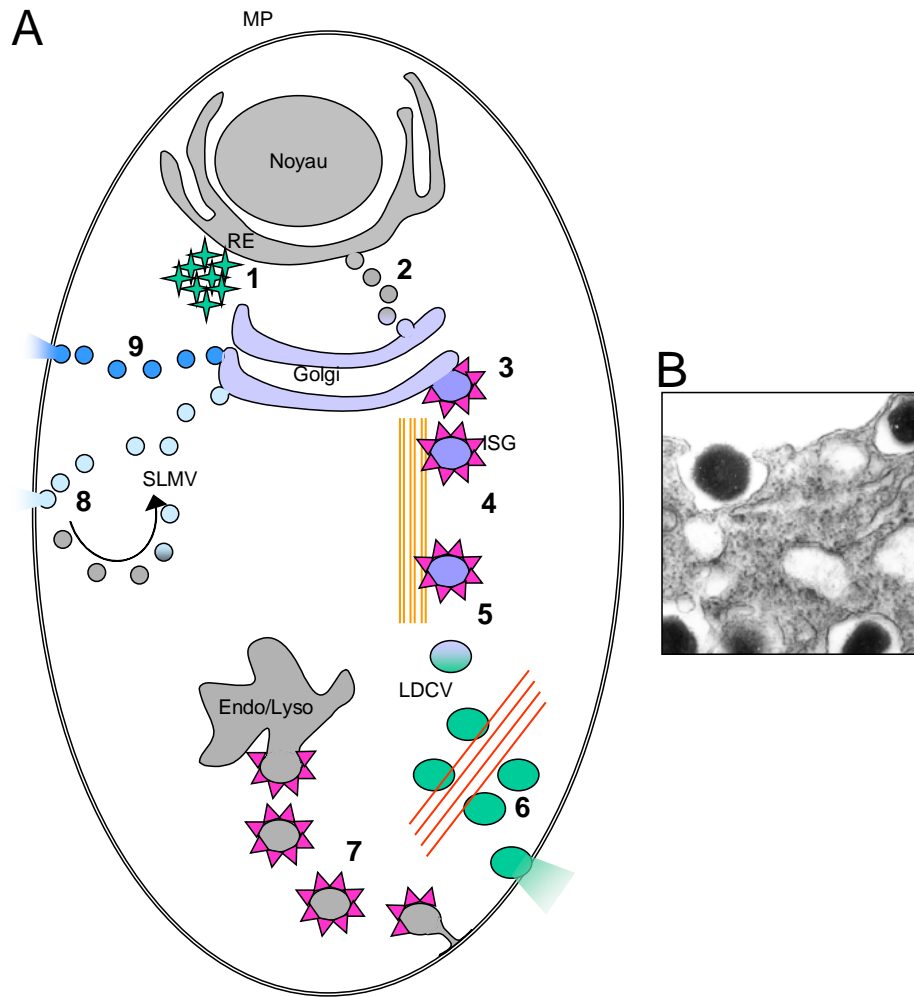


Figure i-6 : Voie de synthèse, de maturation et de transport de l'insuline et autres voies de transport.

A : Le stock cytosolique d'ARNm codant pour la pré-proinsuline (PPI) est traduit (1) et la PPI est transloquée dans le RE, où elle est convertie en proinsuline (PI). Elle transite dans le Golgi (2), où elle est modifiée. La PI est stockée dans des granules immatures (ISG) qui bourgeonnent à partir du Golgi et sont recouverts de clathrine (3). Les ISG transitent grâce aux microtubules (4) et sont modifiés progressivement. Ils sont convertis en LDCV matures (5), stockés à proximité de la membrane plasmique (MP) par le réseau sous-cortical d'actine (6). La sécrétion régulée d'insuline est suivie d'une endocytose via les puits recouverts de clathrine (7). Les vésicules de type synaptique (SLMV) bourgeonnent à partir du Golgi, subissent l'exocytose régulée et peuvent être recyclées indépendamment de l'appareil de Golgi (8). Le trafic constitutif permet par exemple de renouveler les lipides membranaires (9).

B : Photo de microscopie électronique montrant l'insuline cristallisée dans les LDCV ainsi qu'un événement d'exocytose supposé.

Source : (Orci et al., 1973)

II.2 - Les voies de transport et la sécrétion de l'insuline

II.2.1 - Les différents types de vésicules

Il existe différents types de vésicules dans la cellule β : les vésicules de type synaptiques qui contiennent certaines catécholamines, les granules sécrétoires qui contiennent entre autres l'insuline, des vésicules de transport constitutif et des vésicules d'endocytose.

II.2.1.1 - Les vésicules de type synaptique (SLMVs)

Les microvésicules de type synaptiques (SLMV, *synaptic-like microvesicles*) sont des petites vésicules qui ressemblent, comme leur nom l'indique, aux vésicules synaptiques des neurones (fig. i-6). Elles ont un diamètre de 50-100nm selon les sources (Braun et al., 2004) et portent de nombreuses protéines de type neuronal, comme la synaptophysine/SVP38, qui constitue un marqueur de ce compartiment (Thomas-Reetz and De Camilli, 1994). Observées en microscopie électronique, elles apparaissent transparentes (Braun et al., 2004). Dans les cellules β -pancréatiques, elles contiennent majoritairement du GABA, qui possède une action autocrine/paracrine inhibitrice de la sécrétion d'insuline (Shi et al., 2000) (partie I.5.1). Le remplissage de la vésicule par le GABA se fait de manière concomitante à sa synthèse par la GAD grâce au transporteur vésiculaire VGAT (*vesicular GABA transporter*) (McIntire et al., 1997). La sécrétion des SLMV se fait de manière régulée par un influx de calcium (Braun et al., 2004). Elles peuvent être recyclées de manière indépendante de l'appareil de Golgi (Mundigl et al., 1993).

II.2.1.2 - Les granules sécrétoires (LDCV)

Les granules sécrétoires ou LDCV contiennent l'insuline cristallisée (fig. i-6B). Elles transitent sur le réseau de microtubules à travers la cellule grâce à la protéine motrice kinésine (Donelan et al., 2002). Elles sont stockées à proximité de la membrane plasmique sur le réseau sous-cortical d'actine (fig. i-6). Elles ont un diamètre plus important que les SLMV, environ 300nm (Olofsson et al., 2002). On peut compter en moyenne 10 000 vésicules par cellule β , et une vésicule contient environ $1,6 \cdot 10^{-18}$ mol d'insuline.

II.2.1.3 - Vésicules de transport et sécrétion constitutive

Certaines vésicules ne sont pas soumises à une sécrétion régulée. On parle alors de sécrétion constitutive (fig. i-6). Cette voie de trafic sert classiquement à renouveler les lipides de la membrane plasmique, sécréter des protéines de la matrice extracellulaire, insérer des protéines dans la membrane plasmique, etc. (Kelly, 1985). Peu de données sont disponibles à ce sujet dans la littérature.

Dans les cellules β , il apparaît que environ 1% des LDCV sont sécrétées en l'absence de stimulus déclencheur identifiable (Bataille, 2002). Cela permettrait de maintenir un taux basal d'insuline circulante, mais cette hypothèse est controversée. En effet, la mesure de la concentration calcique intracellulaire sur des lignées de cellules β a montré que la plupart des cellules présente au repos des oscillations spontanées de calcium (Lajus et al., 2005). Ces oscillations peuvent expliquer la sécrétion basale d'insuline qui ne correspondraient pas ainsi à une sécrétion constitutive, mais plutôt à une sécrétion basale régulée.

II.2.1.4 - Vésicules d'endocytose

L'exocytose est souvent couplée à des phénomènes d'endocytose (fig. i-6). En effet, la cellule doit régulièrement récupérer le matériel lipidique et protéique amené par exocytose (Jarousse and Kelly, 2001). La voie la plus répandue et la plus étudiée est la voie dépendante de la clathrine, dite des « puits recouverts de clathrine » (Mousavi et al., 2004). La clathrine a une structure particulière en triskèle. Elle est capable de s'oligomériser pour former des structures dites en « ballon de basket ». Le recrutement des unités de clathrine au niveau d'une zone d'endocytose nécessite la présence d'adaptateurs, dont AP-2 est le plus courant (Mousavi et al., 2004). Le matériel à internaliser est concentré au niveau d'une zone précise de la membrane plasmique, où les adaptateurs se fixent par reconnaissance de substrats spécifiques. Les unités de clathrine sont recrutées et une cage commence à se former autour d'une vésicule naissante. L'élongation du puits nécessite plusieurs facteurs, parmi lesquels la courbure de la membrane qui peut être influencée par sa composition lipidique. En effet, la proportion relative entre la tête hydrophile et la partie hydrophobe d'un lipide peut induire une courbure de la membrane, facilitant ainsi la formation du puits (Takei and Haucke, 2001). De plus, la dynamine est une GTPase de haut poids moléculaire qui est capable de resserrer le puits de clathrine (Mousavi et al., 2004). L'ensemble de ces mécanismes conduisent à une vésicule libre d'endocytose

recouverte de clathrine. Rapidement, le manteau de clathrine est détaché de la vésicule grâce à l'action combinée de la chaperonne ubiquitaire Hsc70 et de la co-chaperonne Auxiline (Takei and Haucke, 2001; Heymann et al., 2005) (partie III.2.6). Classiquement, la vésicule est dirigée vers l'appareil endo-lysosomal. Une partie des constitutants peut être recyclé vers l'appareil de Golgi (fig. i-6) (Takei and Haucke, 2001).

Une autre voie d'endocytose qui reste peu étudiée est la voie des caveolae (Hommelgaard et al., 2005). Il s'agit d'une voie indépendante de la clathrine, mais il n'est pas établi si les caveolae sont des voies d'endocytose ou simplement des microdomaines d'organisation de la membrane plasmique. Par exemple, il a été montré dans les adipocytes que GLUT4 est stabilisé à la membrane plasmique grâce à des structures qui ressemblent à des caveolae, sans qu'un lien marqué n'ait pu être fait avec l'endocytose du transporteur (Shigematsu et al., 2003).

II.2.2 - Les étapes menant à la fusion

La fusion d'un granule sécrétoire avec la membrane plasmique nécessite plusieurs étapes préparatoires. De nombreuses études basées sur des techniques morphologiques, électrophysiologiques et biochimiques ont permis de définir plusieurs étapes (fig. i-7). Toutefois, les bases moléculaires de ces étapes ne sont que partiellement élucidées. De grandes avancées ont été réalisées grâce à l'utilisation de cellules perméabilisées. La streptolysine-O est une toxine produite par *Streptococcus pyogenes* qui s'insère dans la membrane plasmique, s'associe en complexe et forme des pores de grande taille (~30nm de diamètre), ce qui permet de diluer le cytosol et ainsi de contrôler sa composition (ATP, Ca^{2+} , etc.) (Lang et al., 1997a). Une autre technique souvent utilisée est la perméabilisation par stress mécanique des cellules (Balch and Rothman, 1985; Martin, 1989; Martin and Walent, 1989).

Une grande confusion règne dans la littérature quant à la dénomination des différentes étapes de l'exocytose. Différents auteurs n'utilisent pas les mêmes termes pour définir la même étape ou utilisent le même terme pour des étapes différentes (Burgoyne and Morgan, 2003). Nous allons tenter ici de préciser le plus rigoureusement possible les caractéristiques morphologiques et/ou moléculaires inhérentes à chaque étape.

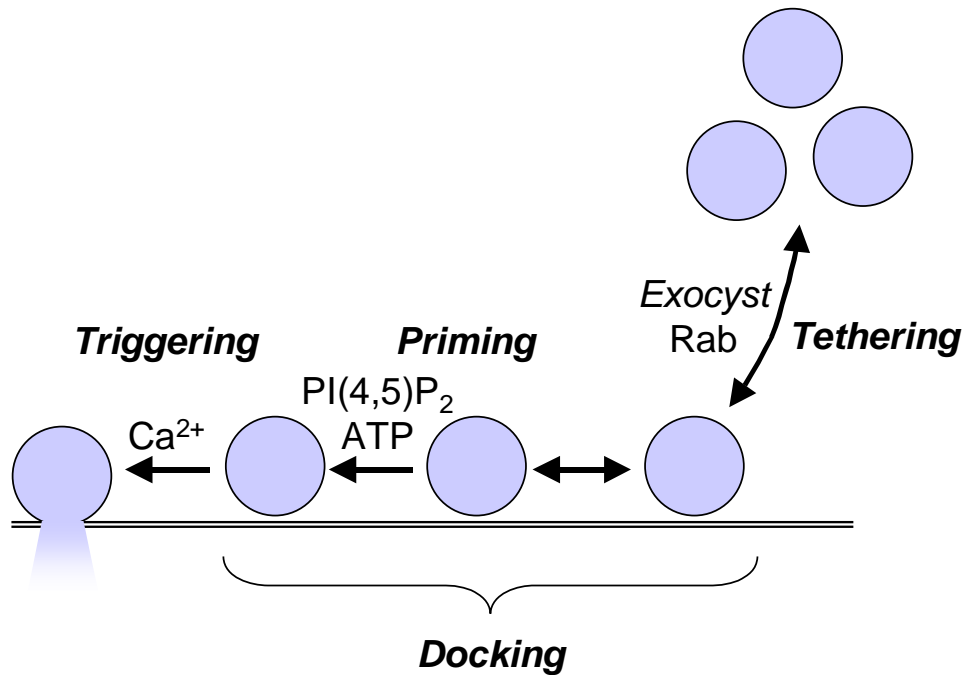


Figure i-7 : Les étapes menant à la fusion.

L'étape de *tethering* permet la reconnaissance de la membrane cible. Cette étape réversible est dépendante du complexe *Exocyst* et des protéines *Rab*. Les vésicules sont amarrées à une distance proche de la membrane plasmique (étape de *docking*). Plusieurs événements dépendants de l'*ATP* et de la génération de *PI(4,5)P₂* constituent l'étape de *priming*. Cette étape aboutit à une association irréversible des vésicules avec la membrane plasmique. Le calcium est l'événement déclencheur de la fusion membranaire (*triggering*).

II.2.2.1 - Accrochage des vésicules (*tethering*)

La notion de *tethering* est issue des études des mécanismes moléculaires de la fusion membranaire dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Waters and Hughson, 2000). Il s'agit d'une étape réversible qui conduirait à amener la vésicule sur le site d'exocytose (fig. i-7). La vésicule est ainsi attachée physiquement à la membrane cible (Waters and Hughson, 2000).

Il a été envisagé que cette étape de *tethering* serait due à la formation du complexe SNARE entre la vésicule et la membrane plasmique (Waters and Hughson, 2000). Cependant, plusieurs études ont montré que les SNARE ne sont pas impliquées dans cette étape, et la plus élégante est basée sur l'utilisation de mutant de la drosophile. L'analyse morphologique des boutons synaptiques de neurones de drosophiles mutantes pour la Syntaxine ou pour VAMP montre que les vésicules synaptiques sont correctement amarrées à la membrane plasmique (Broadie et al., 1995). La présence de vésicules amarrées montre que les protéines SNARE Syntaxine et VAMP ne sont pas impliquées dans le *tethering*. La structure et le rôle des protéines SNARE seront détaillés plus loin.

Le complexe *exocyst* (ou complexe sec6/8) est important à cette étape de *tethering*. L'*exocyst* est un complexe multimérique d'environ 730 kDa, initialement mis en évidence chez la levure comme étant nécessaire au transport des vésicules en sortie de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (Hsu et al., 1999). De nombreuses protéines composant ce complexe sont des protéines sec, isolées à partir de mutants de levure déficients pour la voie sécrétoire. L'*exocyst* est un complexe cytosolique, qui est recruté par des protéines membranaires à des sites particuliers pour exercer sa fonction. Il est aussi retrouvé dans les cellules de mammifères. Il est exprimé de manière ubiquitaire et des souris mutantes pour le gène codant pour sec8 - protéine faisant partie de l'*exocyst* - meurent durant l'embryogenèse précoce (Hsu et al., 1999). Cela suggère que l'*exocyst* est un complexe universellement impliqué dans les mécanismes d'exocytose, vraisemblablement aussi dans le trafic constitutif. Ce complexe est aussi retrouvé dans les neurones, ancré à la membrane plasmique, où il est important pour la neuroexocytose et pour l'expansion du cône de croissance (Hsu et al., 1996). Récemment, il a été montré dans les cellules β -pancréatiques que les différents composants du complexe sont localisés sur les LDCV ou sur la membrane plasmique, et que des constructions tronquées inhibent la sécrétion d'insuline

(Tsuboi et al., 2005). Cela suggère que l'*exocyst* joue aussi un rôle dans le *tethering* des LDCV des cellules β -pancréatiques.

Les petites GTPases Rab (de la famille des Ras) pourraient être également impliquées dans le *tethering*. Les protéines Rab permettraient la reconnaissance entre la membrane vésiculaire et la membrane plasmique cible (Schimmoller et al., 1998). Le mode d'action de ces protéines sera détaillé plus loin (voir partie II.3.2.3). Dans les neurones, l'isoforme Rab3 semble principalement impliquée, tandis que Rab27a est nécessaire au recrutement des granules d'insuline dans les cellules β .

Cette étape de *tethering* permet d'amener la vésicule à proximité de la membrane cible, et aboutit à des vésicules accrochées physiquement mais de manière réversible à la membrane plasmique. Ces vésicules ne sont toutefois pas fonctionnellement compétentes pour la fusion.

II.2.2.2 - Amarrage des vésicules (*docking*)

Les études morphologiques réalisées sur des cellules β ont mis en évidence une population de vésicules très proches de la membrane plasmique, soit à une distance inférieure au diamètre de la vésicule (Olofsson et al., 2002)(fig. i-7). Ces vésicules sont dites amarrées (*docked vesicles*). Sur environ 10 000 granules sécrétoires que compte une cellule β , environ 600 seulement sont morphologiquement amarrés (Olofsson et al., 2002). Le *docking* est une étape irréversible. Ainsi, dans les cellules chromaffines PC12, une large fraction des vésicules amarrées morphologiquement demeure associée à la fraction membranaire des cellules après fractionnement (Martin and Kowalchyk, 1997). Cette définition morphologique trouve une base fonctionnelle car quand on stimule les cellules par une solution de KCl, il apparaît que cette population est réduite de 30% (Olofsson et al., 2002). La stimulation des cellules par le KCl induit un influx calcique qui déclenche l'exocytose des vésicules déjà compétentes pour la fusion. Ainsi, il est tentant de postuler que cette population de vésicules amarrées correspond aux vésicules rapidement libérées par une stimulation, soit au pool RRP décrit plus haut (première phase de sécrétion, voir partie I.4.3). Néanmoins, des données complémentaires montrent que la situation est plus complexe. En effet, une fois ce stock de vésicules épuisé (par une stimulation courte par du KCl), seule une stimulation par le glucose peut permettre de le renouveler (Olofsson et al., 2002). Il apparaît ainsi que le RRP n'est qu'un sous-ensemble de ce pool de vésicules

amarrées (Barg et al., 2002; Olofsson et al., 2002). Le fait que le couplage métabolisme/sécrétion soit nécessaire au remplissage de ce pool suggère la nécessité de modifications chimiques des granules induites par le glucose, vraisemblablement par l'ATP produit par son métabolisme.

II.2.2.3 - « Priming »

L'utilisation de cellules perméabilisées par la digitonine a permis de mettre en évidence une étape ATP-dépendante, définie comme étant le *priming* (Holz et al., 1989) (fig. i-7). L'équipe de W.E. Balch a développé un système de perméabilisation par stress mécanique des cellules (Balch and Rothman, 1985). Brièvement, les cellules sont passées à travers un tube d'acier très fin dans lequel une bille réduit encore le diamètre. L'accélération produite par le passage des cellules à travers ce tube étroit a pour effet de créer des déchirements importants de la membrane plasmique. L'ultrastructure cellulaire est conservée intacte par ce traitement. Ce procédé permet de contrôler avec précision la composition du cytosol (Ca^{2+} , ATP, etc.), et permet la diffusion de certaines protéines cytosoliques (Martin, 1989; Martin and Walent, 1989). En utilisant cette technique, les auteurs ont analysé la dépendance à l'ATP, au calcium et au cytosol de la sécrétion (Hay and Martin, 1992). Ils ont ainsi pu caractériser deux étapes successives, l'une ATP-dépendante (le *priming*) et l'autre calcium-dépendante (le *triggering*) (fig. i-7). Il apparaît que le *priming* est une étape réversible, thermosensible et qu'elle nécessite des facteurs cytosoliques. Ces facteurs moléculaires restent peu caractérisés, mais l'implication de plusieurs protéines a été montrée (Klenchin and Martin, 2000).

Les phosphatidylinositols phosphates (PIP) ont été identifiés depuis plus de quinze ans comme étant impliqués dans le *priming* des LDCV (Eberhard et al., 1990) (voir pour revue (Lang, 2003). Les PIP sont des lipides possédant deux chaînes aliphatiques, un glycérol et le sucre inositol. L'inositol peut être phosphorylé sur plusieurs positions. La phosphatidylinositol 4 kinase ajoute un phosphate sur la position 4, pour donner le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P). La phosphatidylinositol-4-phosphate 5 kinase ajoute un phosphate au PI(4)P sur la position 5, pour donner le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂). Chaque classe de PIP kinase contient différentes isoenzymes avec des localisations sous-cellulaires différentes. Dans les cellules chromaffines perméabilisées, les PIP sont nécessaires à la sécrétion, et ce de manière indépendante de la

synthèse des seconds messagers IP_3 et DAG via la PLC (voir partie I.5.1) (Eberhard et al., 1990). De plus, il a été montré que la PI(4)P kinase est un facteur cytosolique nécessaire au *priming* des LDCV des cellules chromaffines (Hay et al., 1995; Wiedemann et al., 1996), et plus récemment des cellules β -pancréatiques (Olsen et al., 2003). Le rôle précis des PI(4,5) P_2 dans le *priming* n'est pas parfaitement compris. Plusieurs protéines liant le PI(4,5) P_2 jouent un rôle important dans l'exocytose, comme par exemple la Synaptotagmine, qui sera décrite plus loin.

L'ensemble de ces étapes permet d'obtenir des vésicules pleinement amarrées à la membrane plasmique, de manière irréversible, et pleinement compétentes pour la fusion, en attente du stimulus déclencheur, soit un influx massif de calcium (*triggering*).

II.2.3 - La fusion des granules avec la membrane plasmique

II.2.3.1 - Fusion complète vs. transitoire (*kiss and run*)

La fusion régulée des granules sécrétoires avec la membrane plasmique peut se faire selon deux modalités : par fusion complète ou transitoire.

Le modèle de fusion complète est le plus ancien et le plus repris dans la littérature (fig. i-8A et voir fig. i-6B). Selon ce modèle, une vésicule pleinement amarrée va fusionner totalement avec la membrane plasmique, en libérant l'intégralité de son contenu. L'apport de membrane supplémentaire sera compensé par endocytose via la voie clathrine-dépendante (fig. i-6A) (Burgoyne and Morgan, 2003; Rorsman and Renstrom, 2003). De tels évènements peuvent être mesurés par la mesure de la capacitance membranaire. Un événement de fusion complète de la vésicule se traduit par un saut de la capacitance (Angleon and Betz, 1997).

Le développement de techniques combinées permettant de mesurer la conductance du pore de fusion (technique du patch-clamp), ainsi que la libération des catécholamines sécrétées (technique d'ampérométrie) a permis de caractériser un autre modèle : le *kiss-and-run*. La première mise en évidence morphologique de ce phénomène est issue d'études de la jonction neuromusculaire de la grenouille (Ceccarelli et al., 1973). La première caractérisation fonctionnelle de cette modalité d'exocytose a été faite dans les mastocytes (Alvarez de Toledo et al., 1993). Les auteurs ont montré que certains évènements d'exocytose ne procèdent pas par fusion complète de la vésicule avec la membrane

plasmique. Cette modalité d'exocytose est aussi retrouvée dans les cellules chromaffines (Albillos et al., 1997). Dans ce modèle, la vésicule fusionne partiellement avec la membrane plasmique, permettant la libération d'une partie seulement du contenu par un pore de fusion étroit et labile (Lindau and Alvarez de Toledo, 2003; Rorsman and Renstrom, 2003). Cela se traduit par un saut de capacitance non régulier, ou *flickering*. Une vésicule subirait successivement plusieurs cycles avant de vider totalement son contenu.

Dans les cellules β -pancréatiques, considérant la nature cristalline de l'insuline dans les LDCV et vues les observations en microscopie électronique (fig. i-6B), il semble difficile d'envisager cette modalité de fusion partielle. L'équipe de P. Rorsman a proposé un modèle intermédiaire, basé sur la mesure combinée du suivi du cargo fluorescent des LDCV et des mesures électrophysiologiques (Barg et al., 2002). Ce modèle correspond à l'ouverture d'un pore de fusion étroit (<1nm), permettant de libérer les petites molécules sans pour autant permettre la sortie du contenu cristallin de la vésicule. Dans un deuxième temps, le pore de fusion s'agrandit (>12nm) et le contenu cristallin peut être libéré (fig. i-8B). Cette équipe considère que 90% des événements de fusion se font selon ce mode (Rorsman and Renstrom, 2003). Néanmoins, les paramètres cinétiques de sécrétion de cargos fluorescents mesurés dans les cellules β dépendent des protéines fluorescentes utilisées (Michael et al., 2004). Des précautions doivent donc être prises sur l'interprétation de ces mesures.

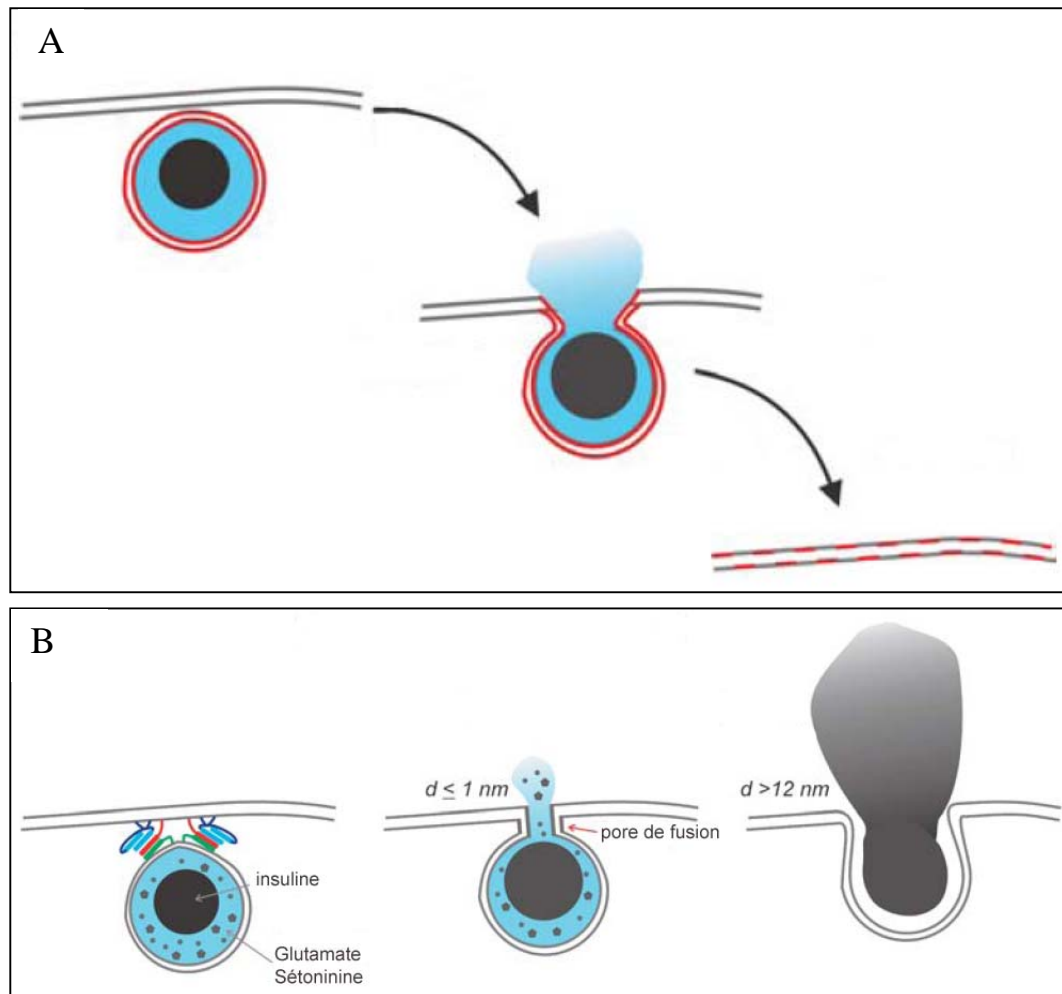


Figure i-8 : Les différents modèles de fusion vésiculaire.

A : Modèle de fusion complète des LDCV avec la membrane plasmique. Le contenu de la vésicule est libéré totalement par un large pore de fusion.

B : Modèle intermédiaire de P. Rorsman. Les petites molécules (glutamate, sérotonine) sont tout d'abord libérées par un pore de fusion de faible diamètre, qui s'élargit pour permettre la libération de l'insuline.

Adapté de (Rorsman and Renstrom, 2003)

II.2.3.2 - Le pore de fusion : lipidique ou protéique ?

La fusion de la vésicule avec la membrane plasmique et la libération du contenu vésiculaire nécessitent la formation d'un pore de fusion. Cette structure doit s'ouvrir en créant un pont aqueux entre les membranes vésiculaire et plasmique, et s'agrandir pour finalement libérer le contenu de la vésicule (Lindau and Alvarez de Toledo, 2003). La nature biophysique exacte du pore de fusion n'est pas clairement établie et peut varier.

D'un point de vue physico-chimique, la fusion de bicouches lipidiques dans un environnement aqueux doit se faire en deux étapes. Tout d'abord, les membranes sont mises en contact proche. Pour cela, les forces électrostatiques de répulsion doivent être vaincues. Ensuite, les zones hydrophobes des bicouches doivent être déstabilisées, et le point final de cette déstabilisation est l'ouverture d'un pont aqueux entre la lumière de la vésicule et le milieu extracellulaire. Ce modèle purement lipidique de formation du pore de fusion est appelé « l'hypothèse de la tige » (*stalk hypothesis* – fig. i-9A). Dans ce modèle, le rapprochement des bicouches induit la fusion des deux couches proximales de phospholipides (stade d'hémifusion). Les deux couches distales fusionnent alors pour ouvrir le pore aqueux (fig. i-9A). Un tel pore de fusion est caractérisé par une conductance faible, et oscille constamment entre un état fermé et ouvert (Jahn et al., 2003). De telles fluctuations peuvent être mesurées dans un modèle *in vitro* de fusion entre une vésicule lipidique et une membrane plane lipidique (Chanturiya et al., 1997).

Les premières mesures de la conductance du pore de fusion *in vivo* ont été réalisées dans les mastocytes, car ces cellules possèdent des vésicules très grandes et arborent des pores de fusion de très grande conductance. Ces paramètres sont en accord avec un pore de fusion de nature protéique (fig. i-9B) (Lindau and Alvarez de Toledo, 2003), mais peuvent également correspondre à une structure purement lipidique (Chanturiya et al., 1997). Chez la levure, la sous-unité V_o de l'ATPase vacuolaire à proton a été proposée comme pouvant faire partie d'un pore protéique de fusion (Peters et al., 2001). Il a été montré par la même équipe qu'il se forme un complexe en trans de sous-unités V_o , qui pourraient s'associer pour former un pore protéique au cours de la fusion vacuolaire de la levure (Bayer et al., 2003). Il a été également proposé que les protéines SNARE participent à la formation du pore de fusion par leur enroulement en super-hélice (Mayer, 2001) (voir plus loin).

Il n'est donc pas encore établi si le pore de fusion est de nature lipidique, protéique ou un mélange protéolipidique (Jahn et al., 2003). La mesure simultanée des paramètres électrophysiologiques du pore de fusion ainsi que de la libération de différents cargos (insuline, neurotransmetteurs, etc.) a permis de montrer que le pore de fusion peut passer successivement par plusieurs états (Jahn et al., 2003). En effet, après stimulation de l'exocytose, le pore de fusion s'ouvre suffisamment pour permettre la détection de l'augmentation de la capacitance, sans pour autant libérer de contenu (<20ms). Puis, le pore de fusion se dilate et de petites molécules peuvent s'échapper de la vésicule (0,2s). Dans un troisième temps (1s), le pore de fusion est suffisamment ouvert pour permettre la libération de peptides plus larges (Jahn et al., 2003).

Quelque soit sa nature biophysique, il est établi que de nombreux facteurs influencent l'ouverture du pore de fusion, comme de nombreux régulateurs des protéines SNARE (complexine, Munc-18, Synaptotagmines), ainsi que la Csp (ces aspects seront développés plus loin).

II.3 - Les acteurs moléculaires de la fusion membranaire

II.3.1 - Le complexe SNARE

Dans les années 70, les premières études destinées à cerner les mécanismes moléculaires de l'exocytose portaient sur l'étude de mutants thermosensibles de la levure *Saccharomyces cerevisiae* incapables de sécréter. Ces études ont conduit à l'identification du premier gène impliqué dans le trafic post-golgien et l'exocytose, le gène *sec-1* (Novick and Schekman, 1979). Par la suite, le criblage de clones a permis d'identifier 23 gènes *sec* impliqués dans ce processus (Novick et al., 1980).

Parallèlement, des études biochimiques basées sur l'inhibition du trafic golgien par le NEM (N-ethylmaleimide) ont mis en évidence le rôle de l'ATPase cytosolique NSF (*NEM-sensitive fusion protein*) dans ce trafic (Block et al., 1988). Par la suite, des adaptateurs cytosoliques du NSF ont été caractérisés, les protéines SNAP (*soluble NSF-attachment protein*) (Clary et al., 1990). Les auteurs ont montré que le phénotype mutant des levures *sec-17* peut être récupéré par addition de la protéine SNAP purifiée à partir du cerveau de bœuf. Ces résultats montrent que ces protéines impliquées dans le trafic golgien et post-golgien sont très conservées au cours de l'évolution (Clary et al., 1990).

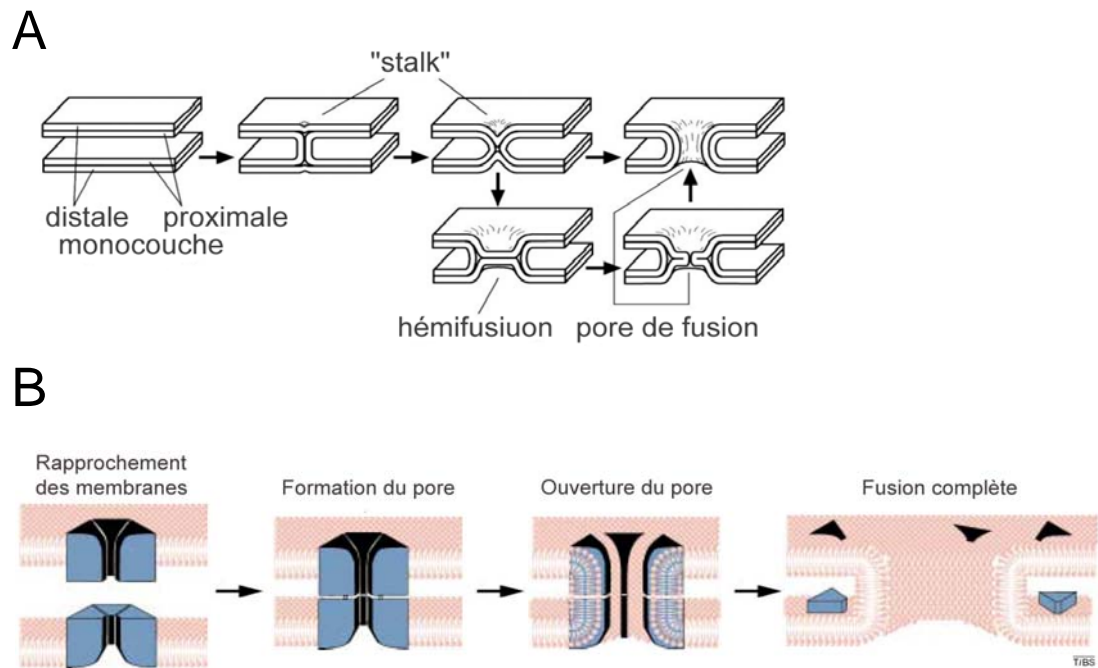


Figure i-9 : Les différents modèles de pore de fusion.

A : Modèle de pore de fusion lipidique (« stalk hypothesis »). Le rapprochement des bicouches proximales induit leur fusion partielle (« stalk »), puis leur fusion plus avancée (stade d'hémifusion). La fusion des bicouches distales permet l'ouverture du pore de fusion.

Adapté de (Jahn et al., 2003)

B : Modèle de pore de fusion entièrement protéique. Une structure protéique permettrait l'association des deux membranes. Après l'ouverture du pore de fusion, cette structure pourrait se disperser dans les membranes.

Adapté de (Mayer, 2001)

Étant donné que l'ensemble de ces protéines sont des protéines cytosoliques, il paraît évident que ce complexe NSF/SNAP nécessite un récepteur membranaire pour jouer un rôle dans la fusion des membranes golgiennes. Ces récepteurs membranaires ont été caractérisés peu de temps après grâce à des chromatographies d'affinité pour le NSF (Sollner et al., 1993b). Ces protéines ont été appelées protéines SNARE (*SNAP receptors*).

Les protéines SNARE sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution et constituent le cœur de la machinerie de fusion (Burgoyne and Morgan, 2003; Duman and Forte, 2003; Fasshauer, 2003; Jahn et al., 2003). Elles font partie d'une famille comportant 24 membres chez la levure et 35 chez les mammifères (Bock et al., 2001). Les différentes SNARE portent un domaine conservé de 60 acides aminés appelé le motif SNARE et qui peut former une hélice α . Quatre motifs SNARE peuvent s'associer et former une structure sur-enroulée dite en super-hélice et la structure des parties cytosoliques de ce complexe trimérique a été résolue par cristallographie et diffraction des rayons X (fig. i-10A) (Sutton et al., 1998) ainsi qu'en solution par RMN (résonance magnétique nucléaire) (Fiebig et al., 1999). Le complexe SNARE formé est une structure extrêmement stable. En effet, il est résistant au détergent anionique dénaturant SDS et partiellement résistant à la chaleur (80°C) (Hayashi et al., 1994; Fasshauer et al., 1997; Fasshauer et al., 1998a). On distingue les v-SNARE (*vesicular-SNARE*) portées par la membrane de la vésicule, et les t-SNARE (*target-SNARE*) portées par la membrane cible (par exemple la membrane plasmique dans le cas des granules sécrétoires). Les v-SNARE et les t-SNARE apportent ensemble les 4 hélices α nécessaires à la formation du complexe trimérique SNARE. La connaissance de la structure tridimensionnelle du complexe SNARE a permis de proposer une nouvelle classification qui prend mieux en compte les variations entre les différentes protéines SNARE. Il s'agit de la classification des Q- et R-SNARE (Fasshauer et al., 1998b). L'organisation des trois protéines SNARE en super-hélice se fait selon des couches (*layer*) successives. La couche centrale est appelée la couche 0, ou *0 layer*, et on distingue 7 couches en amont (-1 à -7) et 8 couches en aval (+1 à +8) (fig. i-10B). La majorité des t-SNAREs contiennent au niveau de la couche 0 un résidu Glutamine, d'où la nomenclature Q-SNARE, tandis que les v-SNARE contiennent majoritairement une Arginine (R-SNARE). Ces résidus clé sont importants pour assurer la stabilité du complexe SNARE (Fasshauer et al., 1998b).

Etant donnée la multitude d'isoformes décrites, les t- et v-SNARE pourraient permettre la reconnaissance des membranes des deux compartiments qui doivent fusionner (Gerst, 2003).

Les 3 protéines SNARE impliquées dans l'exocytose des vésicules synaptiques ou des LDVC sont les protéines Syntaxine et SNAP25 (*Synaptosomal-associated protein of 25 kDa*) qui sont portées par la membrane plasmique et la protéine VAMP2/Synaptobrevine (*Vesicle-associated membrane protein*) portée par la vésicule. Dans les cellules β -pancréatiques, plusieurs isoformes de ces protéines sont exprimées (Wheeler et al., 1996) :

(i) Les Syntaxines -1, -2, -3, -4 et -6. La Syntaxine-1 est l'isoforme majoritairement impliquée dans l'exocytose des LDVC (Lang et al., 1997c; Kang et al., 2002). La

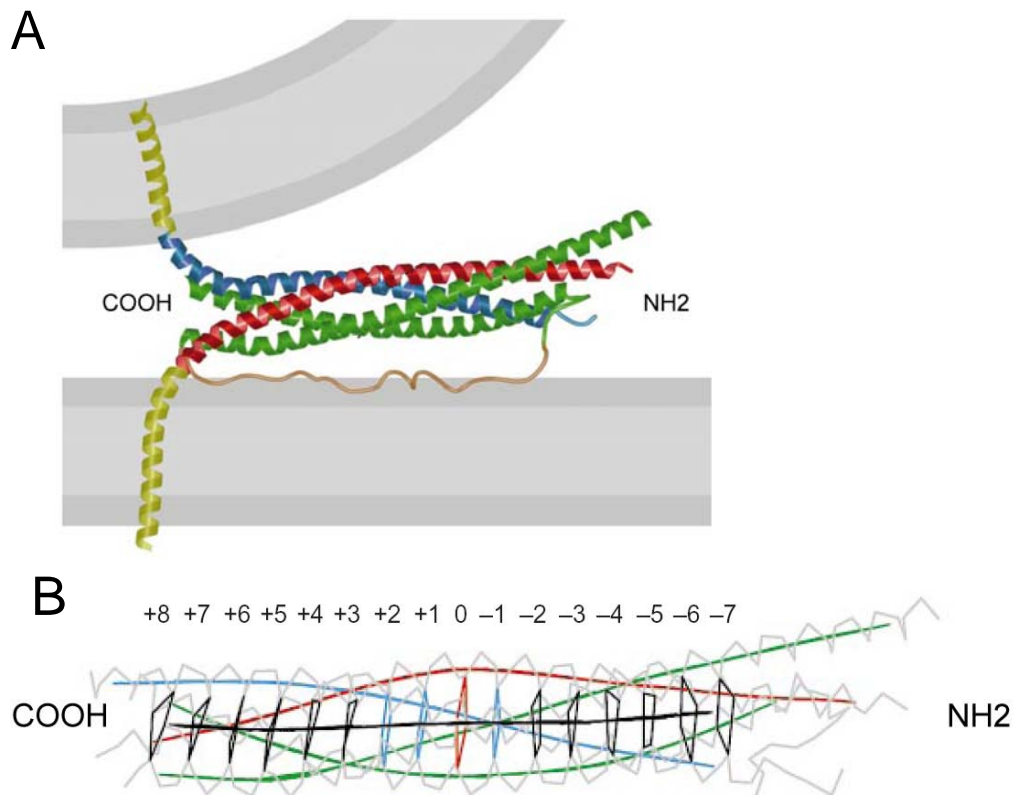


Figure i-10 : La structure du complexe SNARE.

A : Structure des parties solubles cristallisées du complexe SNARE. VAMP2 est représentée en bleu, Syntaxine 1 en rouge et SNAP25 en vert. Les parties transmembranaires des protéines VAMP2 et Syntaxine 1 sont modélisées car aucune donnée structurale n'est connue sur ces domaines. Les extrémités N- et C-terminales des protéines sont indiquées.

B : Organisation du complexe SNARE en couches successives. Syntaxine 1, VAMP2 et SNAP25 sont schématisées en rouge, bleu et vert respectivement. Le squelette carboné est représenté en gris, l'axe central de la super-hélice en noir. La couche centrale est numérotée 0, les couches en amont de +1 à +8, et les couches en aval de -1 à -7.

Adapté de (Sutton et al., 1998)

Syntaxine-3 semble être également impliquée dans l'exocytose mais sa localisation exacte demeure controversée (Kang et al., 2002). La Syntaxine-4 n'est pas impliquée dans l'exocytose et reste peu étudiée (Kang et al., 2002). La Syntaxine-6 est localisée au niveau du TGN et sur les granules immatures et pourrait ainsi participer au trafic golgien ou post-golgien des granules sécrétoires (Kuliawat et al., 2004).

(ii) Les SNAP25 et SNAP23. Seule l'isoforme SNAP25 est impliquée dans la sécrétion de l'insuline (Sadoul et al., 1995; Gonelle-Gispert et al., 1999) et elle est localisée sur la membrane plasmique. Cependant, une étude récente a montré que l'expression hétérologue de SNAP23 dans des cellules de la glande pituitaire a pour effet d'augmenter la sécrétion basale de ces cellules (Chieragatti et al., 2004). Ces auteurs suggèrent que le rapport entre le taux d'expression de SNAP25 et de SNAP23 régulerait la balance sécrétion régulée / sécrétion constitutive.

(iii) Les protéines VAMP-2, -3 et -7. Seules VAMP-2 et VAMP-3/Cellubrevin sont portées par les LDCV et les SLMV (Regazzi et al., 1995). VAMP-7/TI-VAMP est localisée dans les cellules épithéliales sur des vésicules apicales (Galli et al., 1998) et dans les cellules β elle est retrouvée au niveau du compartiment endo-lysosomal (Monterrat et al., 2006). L'isoforme VAMP-1 est exprimée sur les vésicules synaptiques des neurones (Elferink et al., 1989).

Alors que les protéines Syntaxine 1 et VAMP2 possèdent un domaine transmembranaire C-terminal qui permet leur ancrage dans les membranes plasmique ou vésiculaire, la protéine SNAP25 est ancrée à la membrane plasmique via des modifications post-traductionnelles. En effet, SNAP25 possède 4 résidus cystéines qui sont modifiés par des palmitates greffés grâce à des liaisons thio-esters. La contribution de ces palmitoylations dans l'adressage et/ou l'ancrage de la protéine n'est pas complètement établie. Très tôt après leur synthèse dans le cytosol, Syntaxine et SNAP25 s'associent et sont adressées à la membrane plasmique de manière concomitante (Vogel et al., 2000). De plus, l'association de SNAP25 avec la Syntaxine favorise la palmitoylation *in vitro* de SNAP25, et vraisemblablement son ancrage stable dans la membrane (Veit, 2000). Néanmoins, il a été montré par mutagenèse que les résidus cystéines de SNAP25 ne sont pas importants pour son adressage mais pour la dissociation du complexe SNARE ternaire (Washbourne et al., 2001). Cette étude renforce aussi l'idée que SNAP25 est adressée à la membrane plasmique grâce à son interaction avec Syntaxine. Une étude élégante utilisant des protéines en fusion avec la GFP (*green fluorescent protein*) a permis de mettre en

évidence l'existence d'un domaine minimal d'adressage de SNAP25 (Gonzalo et al., 1999). Ce domaine minimal permet non seulement l'adressage à la membrane plasmique de SNAP25 mais aussi favorise la palmitoylation des cystéines. Les auteurs suggèrent l'existence d'un partenaire protéique qui régulerait ces phénomènes, qui pourrait être la Syntaxine.

L'étude des protéines SNARE a grandement avancé grâce à l'utilisation des neurotoxines clostridiales. Le tétanos et le botulisme sont des maladies bactériennes graves qui se caractérisent par un blocage synaptique total au niveau des jonctions neuromusculaires. Le botulisme induit un blocage des synapses activatrices à acétylcholine, donc une paralysie flasque. Le tétanos au contraire, induit un blocage des synapses inhibitrices (à GABA principalement), donc une paralysie spasmodique (Humeau et al., 2000).

Ces toxines agissent en plusieurs temps (Humeau et al., 2000; Poulain and Humeau, 2003). Elles se lient tout d'abord grâce à leur chaîne lourde à des protéines-récepteurs au niveau de la membrane plasmique des cellules cibles (les neurones). Dans un deuxième temps, elles sont internalisées par endocytose. Une partie de la chaîne lourde de ces toxines est capable de former des pores dans les membranes lipidiques. La toxine pourrait quitter selon ce processus la vésicule d'endocytose pour gagner le cytosol (étape de translocation). Finalement, la toxine activée dans le cytosol reconnaît son substrat et le clive grâce à l'activité catalytique de la chaîne légère. La cible moléculaire de ces toxines a été identifiée comme étant les protéines SNARE (fig. i-11). La neurotoxine tétanique (Tet-X) est responsable du clivage spécifique de VAMP2 (Link et al., 1992), tandis que les neurotoxines botuliques (Bot) présentent une spécificité plus vaste selon leur sérotype : Bot-C clive spécifiquement Syntaxine 1 (Schiavo et al., 1995), Bot-A et Bot-E coupent SNAP25 sur des sites distincts (Vaidyanathan et al., 1999). La coupure des protéines SNARE par ces toxines induit l'inhibition de la neuroexocytose (Schiavo et al., 1992), mais aussi de l'exocytose dans des modèles endocriniens comme les cellules β (Regazzi et al., 1995; Sadoul et al., 1995; Lang et al., 1997c).

La coupure sélective de SNAP25 par Bot-E ou par Bot-A a permis de mieux cerner le rôle de cette protéine. Il a été montré que l'effet inhibiteur de Bot-A sur la sécrétion n'est pas irréversible. En effet, la coupure de SNAP25 par Bot-A, mais pas par Bot-E, résulte en une diminution de la sensibilité au calcium. Ainsi, l'exocytose peut avoir lieu à des concentrations plus élevées en calcium (Gerona et al., 2000; Huang et al., 2001).

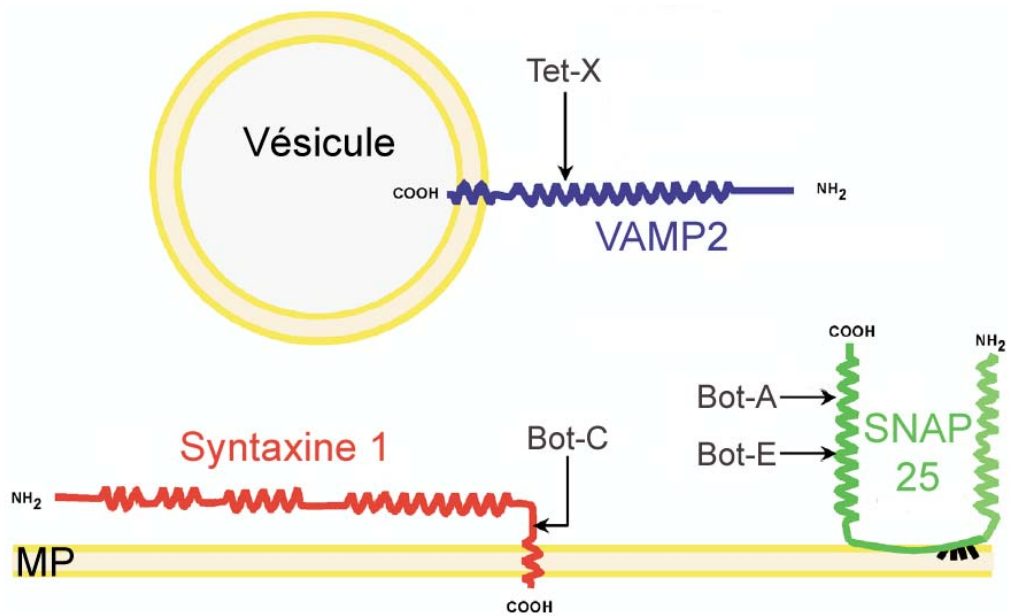


Figure i-11 : Clivage du complexe SNARE par les neurotoxines clostridiales.

Les sites de coupures des toxines clostridiales sont indiqués sur chaque protéine SNARE. Tet-X clive VAMP2, Bot-C Syntaxine 1, et Bot-A et Bot-E clivent SNAP25.

Adapté de (Humeau et al., 2000)

Cela suggère que le domaine C-terminal de SNAP25 coupé par Bot-E et laissé intact par Bot-A est impliqué dans la régulation de l'exocytose dépendante du calcium (fig. i-11).

Néanmoins, l'utilisation des neurotoxines clostridiales pleinement actives peut poser des problèmes de sécurité, principalement en ce qui concerne les toxines botuliques. C'est pour cette raison que nous utilisons au laboratoire des constructions plasmidiques qui permettent d'exprimer transitoirement dans les cellules la chaîne légère de la toxine, qui correspond au domaine catalytique. Ces toxines tronquées ne comportent pas la chaîne lourde, ce qui évite une contamination accidentelle (Lang et al., 1997c).

II.3.2 - Les régulateurs du complexe SNARE

Le complexe SNARE, en tant que complexe minimal de fusion, nécessite de nombreux partenaires pour sa régulation : la formation initiale du complexe, la fermeture du complexe, et enfin sa dissociation pour recyclage. De nombreuses protéines partenaires ont été identifiées, grâce à des techniques comme la co-immunoprécipitation, le *pull-down* à la GST, la réticulation covalente (*crosslinking*) ou encore par des évidences génétiques (principalement chez la Drosophile). Il existe de nombreux partenaires connus, et nous nous focaliserons ici sur les mieux caractérisés.

II.3.2.1 - La Complexine

La complexine est une protéine cytosolique de faible poids moléculaire (18 kDa) qui régule la formation du complexe SNARE. Elle est exprimée de manière ubiquitaire à un faible taux, mais plus fortement dans le cerveau (McMahon et al., 1995). Elle a été caractérisée par une approche de co-immunoprécipitation avec les complexes SNARE à partir de neurones (McMahon et al., 1995). Elle n'interagit pas avec les protéines SNARE monomériques VAMP2 et SNAP25, mais faiblement avec la Syntaxine. Par contre, elle se lie de manière stable au complexe SNARE ternaire dans les neurones et *in vitro* (McMahon et al., 1995). D'autres auteurs ont proposé que la complexine se lie préférentiellement aux domaines transmembranaires des protéines SNARE, mais leur étude étant basée sur des expériences *in vitro* de retard sur gel, des précautions doivent être prises quant à l'interprétation de ces résultats (Hu et al., 2002). En effet, l'utilisation de protéines comportant des domaines transmembranaires nécessite l'emploi de détergent pour les maintenir en solution, ce qui peut interférer avec les expériences d'interaction. De plus, les

domaines hydrophobes transmembranaires sont par nature « collants » et l'interprétation de résultats obtenus avec de telles protéines est difficile. Il apparaît aussi que ces données ne sont pas complètement en accord avec d'autres études qui ont montré que la complexine n'interagit pas avec VAMP2 ni avec SNAP25 (McMahon et al., 1995; Pabst et al., 2002).

La complexine est aussi exprimée dans les cellules β et elle régule la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et au KCl, suggérant un rôle dans les étapes tardives de l'exocytose (Abderrahmani et al., 2004). Dans les cellules chromaffines, il a été montré par ampérométrie que la complexine régule la fermeture du pore de fusion, et que cet effet passe par son interaction avec le complexe SNARE trimérique (Archer et al., 2002). Il est proposé que la complexine stabiliserait un intermédiaire structural du complexe SNARE pour favoriser l'exocytose de type *kiss-and-run* (Archer et al., 2002). Néanmoins, ce modèle étant discuté dans le cas des cellules endocrines, il est difficile de préciser plus en détail le rôle exact de la complexine sur l'exocytose des LDCV.

II.3.2.2 - *Munc-18*

La protéine Munc-18 est l'homologue mammalien du premier mutant de la voie sécrétoire caractérisée chez la levure, *sec-1*. Cette protéine fortement exprimée dans le cerveau interagit avec la Syntaxine (Hata et al., 1993). Munc-18 est aussi exprimée dans les cellules β -pancréatiques et régule l'exocytose des LDCV. En effet, l'ajout d'un peptide ou d'un anticorps bloquant induit une augmentation de la sécrétion d'insuline (Zhang et al., 2000). Cela suggère que Munc-18 joue un rôle négatif sur l'exocytose, vraisemblablement via son interaction avec la Syntaxine. Des études biochimiques (Hata et al., 1993) ainsi que l'élucidation récente de la structure du complexe Munc-18/Syntaxine (Misura et al., 2000) montrent que Munc-18 lie la Syntaxine sur son domaine N-terminal, tandis que la formation du complexe SNARE implique surtout le domaine C-terminal de la Syntaxine. Il a été proposé que l'interaction de Munc-18 avec la Syntaxine empêcherait la formation trop précoce du complexe SNARE. La Syntaxine complexée avec Munc-18 est dite en conformation fermée. Le relargage de Munc-18 libère le motif SNARE de la Syntaxine, (elle est dite en conformation ouverte) et elle peut s'engager dans le complexe SNARE trimérique.

II.3.2.3 - Les protéines Rab

Les protéines Rab sont des GTPases monomériques de la famille des protéines Ras. On compte au moins 60 isoformes chez les mammifères (Pereira-Leal and Seabra, 2000). Ce sont des protéines cytosoliques qui sont modifiées post-traductionnellement par des groupements géranyl. Elles oscillent entre un état inactif lié au GDP, et un état activé lié au GTP. Dans leur état inactif, elles sont maintenues cytosoliques grâce à un adaptateur GDI (*GDP-dissociation inhibitor*). La protéine Rab est recrutée sur la membrane cible grâce à une protéine GEF (*Guanine-nucleotide exchange factor*), qui catalyse l'échange du GDP en GTP et ainsi la dissociation du GDI. La protéine Rab liée au GTP change alors de conformation, et présente ses groupements géranyl. Cela a pour effet de la fixer sur la membrane cible. L'hydrolyse du GTP en GDP qui peut être stimulée par une protéine GAP (*GTPase-activating protein*) permet de réguler des effecteurs spécifiques de la membrane. Considérant la multitude d'isoformes connues, ainsi que les différents régulateurs GDI/GEF et les effecteurs en aval, on considère que les protéines Rab constituent le cœur du mécanisme de reconnaissance des membranes qui doivent fusionner (Schimmoller et al., 1998; Burgoyne and Morgan, 2003; Jahn et al., 2003).

L'isoforme Rab3 est présente chez les mammifères sous 4 isoformes A-D et est la protéine Rab majoritairement impliquée dans l'exocytose régulée. En effet, la surexpression de Rab3A a pour effet d'inhiber l'exocytose dans de nombreux modèles sécrétoires, comme les neurones et les cellules endocrines (Burgoyne and Morgan, 2003). Rab3A se localise sur les vésicules synaptiques des neurones et bien qu'elle n'apparaisse pas essentielle à la neuroexocytose comme montré dans des souris mutantes, elle pourrait réguler le recrutement des vésicules synaptiques (voir partie II.2.2.1) (Geppert et al., 1994). Dans les cellules β -pancréatiques, la contribution relative de chaque isoforme est moins claire car il semble que les 4 isoformes de Rab3 jouent un rôle régulateur de la sécrétion d'insuline (Iezzi et al., 1999).

De plus, il existe une évidence génétique de l'importance de l'isoforme Rab27A dans la sécrétion d'insuline, car des souris KO pour le gène codant pour cette protéine présentent une réponse perturbée au glucose (Kasai et al., 2005). Néanmoins, la sécrétion stimulée par le KCl n'est pas perturbée, ce qui suggère que les étapes tardives ne sont pas altérées. De plus, l'étude morphométrique des îlots de ces souris montrent une altération

dans le recrutement des LDCV. Il semble ainsi que Rab27A soit impliquée dans l'accrochage des LDCV (voir partie II.2.2.1).

II.3.2.4 - *Le NSF et α SNAP*

La découverte des protéines NSF et α SNAP a permis la caractérisation du complexe SNARE. Ces protéines ont par la suite été très étudiées et il ressort plusieurs constats.

Le NSF est une ATPase cytosolique qui interagit fortement avec le complexe SNARE. Alors que certains auteurs proposent un rôle précoce dans l'exocytose pour NSF (Morgan and Burgoyne, 1995), la plupart des études montre que le NSF agit de concert avec α SNAP pour catalyser la dissociation du complexe SNARE après la fusion des membranes (Sollner et al., 1993a; Burgoyne and Morgan, 2003; Jahn et al., 2003). Cette idée est renforcée par le fait que α SNAP interagit fortement avec le complexe SNARE trimérique (Syntaxine + SNAP25 + VAMP2) mais très faiblement avec les trois SNARE monomériques (McMahon and Sudhof, 1995). Chez la drosophile, l'analyse de plusieurs mutants de NSF (*comatose*) a mis en évidence qu'il agit principalement pour dissocier le complexe SNARE dans l'intervalle de temps entre la fusion de la vésicule et l'endocytose (Littleton et al., 2001). Des études récentes ont montré qu'il existe une variation dans les modifications post-traductionnelles du NSF, et il apparaît que ces changements peuvent agir sur le processus de fusion en modulant l'activité de cette protéine (Morgan and Burgoyne, 2004).

II.3.2.5 - *Les protéines kinases*

Comme il a déjà été évoqué plus haut, certaines protéines kinases régulent l'exocytose. Les protéines kinases sont activées par un stimulus spécifique, ce qui entraîne la phosphorylation de substrats définis et ainsi leur activation ou leur inhibition. Les protéines kinases majoritairement impliquées dans l'exocytose sont les protéines kinases AMPc-dépendante (PKA) et calcium-dépendante (PKC).

Ainsi, la protéine Munc-18, associée à la Syntaxine pour limiter la formation du complexe SNARE, est un substrat de la PKC (Barclay et al., 2003). Il a été montré dans cette étude que la phosphorylation de Munc-18 sur deux résidus sérine diminue son

interaction avec la Syntaxine, et que des mutants qui imitent la phosphorylation de Munc-18 (mutation de la sérine en glutamate) changent de manière fine les paramètres cinétiques de l'exocytose mesurés par ampérométrie.

La protéine SNARE SNAP25 est aussi un substrat fonctionnellement important des protéines kinases. Il a été initialement montré qu'elle était phosphorylée par la PKC dans les cellules chromaffines PC12 (Shimazaki et al., 1996). Les auteurs ont observé que cette phosphorylation diminue l'interaction de SNAP25 avec la Syntaxine, suggérant un rôle important de la PKC dans la formation du complexe SNARE. De plus, SNAP25 est phosphorylée différemment par la PKA et par la PKC (Hepp et al., 2002). La PKA phosphoryle SNAP25 sur le résidu thréonine 138 et la PKC à la fois sur la thréonine 138 et sur la sérine 187. Néanmoins, cette étude n'a pu montrer aucun effet régulateur de ces phosphorylations sur l'exocytose des cellules chromaffines mesurée de manière globale, mais les auteurs n'ont pas regardé l'effet éventuel sur les différents pools de vésicules. Cette absence d'effet de la phosphorylation a aussi été observée dans les cellules β (Gonelle-Gispert et al., 2002).

Une étude récente a proposé que, dans les neurones, la PKA permet de maintenir un pool important de vésicules à l'état de *priming* (Nagy et al., 2004). Bien que cet effet régulateur soit dépendant de la phosphorylation de SNAP25, il apparaît que cette phosphorylation par la PKA ne soit pas impliquée dans l'exocytose même.

Enfin, la protéine Csp est aussi un substrat pour ces kinases, et ces phosphorylations influent sur certaines interactions l'impliquant (voir plus loin).

II.3.3 - Le calcium et les Synaptotagmines

Le calcium est l'élément déclencheur de l'exocytose (voir fig. i-7, *triggering*). La concentration de calcium libre dans le cytosol est maintenue au repos à environ 0,1 μM (Burgoyne and Morgan, 2003). La dépolarisation de la membrane plasmique, due à la fermeture des canaux K_{ATP} dans les cellules β , induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, donc une entrée massive d'ions calcium dans la cellule selon son gradient électrochimique. Des modélisations informatiques, ainsi que des données expérimentales utilisant des chélateurs fluorescents du calcium, ont permis de déterminer que la concentration maximale de calcium atteinte localement dans le cytosol au cours de la neuroexocytose est de 100 μM (Yamada and Zucker, 1992). Cependant, la concentration

moyenne permettant de déclencher l'exocytose se situerait entre 10 et 20 μM (Bollmann et al., 2000; Schneggenburger and Neher, 2000). La sensibilité de l'exocytose au calcium implique la présence d'une protéine senseur du calcium. Deux candidats majoritaires sont étudiés dans la littérature : la calmoduline et les synaptotagmines.

La calmoduline possède quatre domaines de liaison au calcium de type main EF. Ce motif est une structure de type hélice-boucle-hélice capable de lier un ion Ca^{2+} (Yap et al., 1999). La calmoduline peut également lier les phospholipides acides, ainsi que VAMP2 (De Haro et al., 2003). Il a été mis en évidence qu'elle est impliquée dans différents phénomènes de fusion intracellulaire. En effet, elle régule la fusion vacuolaire de la levure et participe au transport intra-golgien (Peters and Mayer, 1998; Mayer, 2001). De plus, la liaison des phospholipides et de VAMP2 par la calmoduline régule l'exocytose calcium-dépendante dans les cellules PC12 (Quetglas et al., 2000; Quetglas et al., 2002).

Le deuxième candidat au rôle de senseur calcique de l'exocytose est la Synaptotagmine (Syt). En 1981, un anticorps monoclonal dirigé contre des complexes synaptiques a montré la présence d'un antigène de 65 kDa qui se localise sur les vésicules synaptiques (Matthew et al., 1981) mais également sur les LDCV (Walch-Solimena et al., 1993). La nature exacte de cette protéine, nommée alors p65, est restée obscure jusqu'à ce que Perrin et coll. clonent son gène et analysent sa structure (Perin et al., 1991). p65 est une protéine transmembranaire, ancrée dans la membrane vésiculaire et possédant un court domaine N-terminal intravésiculaire (fig. i-12). La partie cytosolique C-terminale est composée de deux domaines homologues aux domaines C2 de la PKC, et sont capables de lier le calcium. Le premier est appelé domaine C2A, le second C2B. Considérant sa capacité à lier le calcium via ses domaines C2 et sa localisation vésiculaire, il a été proposé qu'elle pouvait servir de senseur calcique pour l'exocytose neuronale. Elle a donc été renommée Synaptotagmine (Syt). Depuis ce premier clonage, 13 isoformes ont été identifiées, et au moins six séquences partielles sont annotées dans les bases de données (Chapman, 2002). Les parties les plus conservées entre ces isoformes sont les domaines C2, tandis que les zones variables se trouvent dans la région charnière qui relie le domaine transmembranaire aux domaines C2. Le domaine C2A de Syt1 a été le premier domaine C2 cristallisé (Sutton et al., 1995). Il est composé de huit feuillets β compacts organisés de façon antiparallèle (fig. i-12). L'analyse détaillée de cette structure a montré que la coordination du calcium par le domaine C2A est réalisée par des résidus aspartate exposés

et chargés négativement à pH physiologique. Selon le modèle couramment accepté, le domaine C2A fixe trois ions Ca^{2+} tandis que le domaine C2B n'en fixe que deux (Fernandez et al., 2001). La structure cristallisée des deux domaines C2 de Syt3 a été résolue, et montre une grande homologie avec les domaines C2A et C2B de Syt1 (Sutton et al., 1999).

La liaison de Syt1 aux phospholipides anioniques a été mise en évidence par des études *in vitro* de sédimentation, utilisant le fragment cytosolique de Syt1 purifié à partir du cerveau ou encore des protéines recombinantes. Ainsi, la partie C-terminale de Syt1 sédimente avec les vésicules synaptiques en présence de 3 μM de calcium (Chapman and Jahn, 1994). Le domaine C2A recombinant en fusion avec la GST (*gluthatione-S-sepharose*) s'associe à des liposomes contenant au moins 25% de phosphatidylsérine (phospholipide anionique) avec une EC_{50} de 5 μM de calcium (Davletov and Sudhof, 1993). La présence de lipides anioniques est indispensable car aucune liaison n'est observée sur des liposomes composés uniquement de phosphatidylcholine (phospholipide neutre) (Davletov and Sudhof, 1993). Le modèle proposé pour expliquer cette liaison calcium-dépendante aux phospho-lipides est basé sur l'étude du potentiel de surface de la protéine. Les résidus aspartate portés par les domaines C2 sont chargés négativement à pH physiologique, ce qui permet de lier les ions Ca^{2+} . La liaison du calcium par Syt1 n'entraîne pas de changement de conformation, contrairement à la PKC, mais un changement de potentiel électrostatique de surface (Zhang et al., 1998b). Comme la coordination des ions calcium n'est pas complète, le potentiel électrostatique de surface de la protéine devient positif. La neutralisation de ce potentiel positif est obtenue par la liaison des phospholipides anioniques membranaires. Dans la cellule, Syt1 se lie préférentiellement aux phospholipides de type $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$. Ces lipides sont importants dans la régulation de l'exocytose, et plus précisément dans la régulation du *priming* des LDCV (voir partie II.2.2.3). Ils sont aussi les précurseurs de l' IP_3 et du DAG, impliqués dans la signalisation de signaux via la PKC (voir fig. i-5 et partie I.5.1). Un modèle fonctionnel propose que les $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ serviraient à positionner correctement Syt1 au niveau de la membrane plasmique (soit une liaison en *trans*) à proximité des autres protéines de l'exocytose, pour coordonner spatialement son déroulement (Bai et al., 2004a).

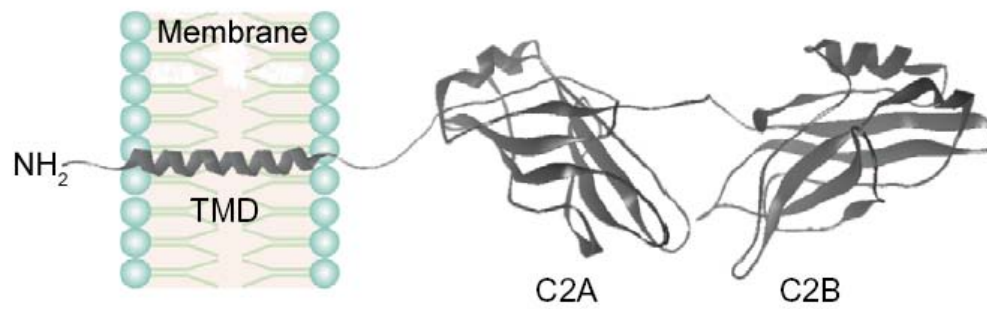


Figure i-12 : Structure des Synaptotagmines.

Le domaine unique transmembranaire (TMD) proche de l'extrémité N-terminale (NH₂) permet l'ancrage de la protéine dans la membrane. Les domaines cytosoliques C2A et C2B sont indiqués. Leur structure est adaptée de celle de Syt3 (Sutton et al., 1999)

Adapté de (Bai and Chapman, 2004)

Syt1 est aussi connue pour interagir avec les protéines SNARE et cela renforce l'hypothèse selon laquelle elle est le senseur calcique de l'exocytose. Le domaine cytosolique de Syt1 est capable de lier la Syntaxine de manière calcium-dépendante (Chapman et al., 1995; Wang et al., 2003), ainsi que SNAP25 (Wang et al., 2003). Ces interactions existent en absence de calcium mais sont fortement augmentées en présence de calcium. Aucune liaison directe n'a été montrée à ce jour entre VAMP2 et Syt1.

Cependant, d'autres études, sans remettre en cause ces travaux, décrivent une association de Syt1 avec le complexe SNARE dimérique Syntaxine 1 / SNAP25 (Rickman and Davletov, 2003). Contrairement aux interactions avec les protéines SNARE monomériques, il semble que celle-ci soit inhibée par le calcium (Mehta et al., 1996). L'étude la plus concluante à ce sujet a montré de manière claire que Syt1 interagit avec le complexe SNARE trimérique résistant au SDS et que cette liaison est inhibée par le calcium (Leveque et al., 2000). Les auteurs suggèrent un rôle différentiel du calcium sur Syt1 selon l'étape concernée de l'exocytose. Syt1 jouerait un rôle positif dans l'amarrage des vésicules et la formation du complexe SNARE par son interaction directe avec la Syntaxine et SNAP25, tandis qu'elle jouerait un rôle négatif en empêchant la formation trop précoce du complexe SNARE trimérique. L'influx de calcium permettrait ainsi, en déplaçant Syt1 du complexe SNARE, le déclenchement de l'exocytose.

Depuis sa caractérisation, de nombreuses études fonctionnelles ont été réalisées dans le but de montrer avec certitude que Syt1 est le senseur calcique de l'exocytose. De nombreux mutants déficients pour Syt1 ont été réalisés, chez la drosophile, chez *C. elegans* ou encore chez la souris. La plupart de ces mutants ne sont pas viables et meurent avant la naissance ou peu de temps après. Globalement, la dysfonction du gène *syt1* entraîne des troubles dans la transmission synaptique sans perturber ni le nombre de vésicules synaptiques, ni les étapes de *docking*. Il semble ainsi que Syt1 soit impliquée dans les étapes finales de l'exocytose, a priori après l'influx de calcium déclenchant l'exocytose (Chapman, 2002).

D'un point de vue cellulaire, l'application de peptides correspondant à la séquence cytosolique de Syt1 ou d'anticorps bloquants à l'intérieur des cellules a pour effet d'inhiber de manière drastique la sécrétion des neurotransmetteurs (Bommert et al., 1993), des catécholamines dans la lignée PC12 (Elferink et al., 1993) ou encore la sécrétion d'insuline dans des lignées insulino-sécrétoires (Lang et al., 1997b). Récemment, il a été

proposé que la surexpression de Syt1 dans la lignée PC12 augmente le temps d'ouverture du pore de fusion (Wang et al., 2001). De plus, des mesures de FRET (*fluorescence resonance energy transfert*) indiquent que l'interaction entre Syt1 et SNAP25 a lieu très rapidement après le flash de calcium qui déclenche l'exocytose (Bai et al., 2004b), et que cette interaction est liée à la régulation de l'ouverture du pore de fusion. En effet, plus on perturbe cette interaction (en augmentant la longueur de la région charnière entre les domaines C2A et C2B de Syt1), plus on réduit la stabilité du pore de fusion (Bai et al., 2004b).

L'ensemble de ces données suggère très fortement que Syt1 est bien le senseur calcique de l'exocytose dans les neurones et qu'elle joue un rôle aussi dans les cellules neuroendocrines et endocrines. Néanmoins, en raison de la grande homologie entre les différentes isoformes, il est envisageable, en fonction des systèmes modèles, que d'autres Syt soient impliquées dans le contrôle de l'exocytose. Ainsi, Syt1 qui est exprimée dans certaines lignées dérivées, ne l'est pas dans les cellules β -pancréatiques primaires (Jacobsson et al., 1994). L'utilisation de peptides bloquants et de siRNA a montré que plusieurs autres isoformes de Syt sont impliquées dans la sécrétion d'insuline : Syt5 et 9 (Gut et al., 2001; Iezzi et al., 2004). La technique de l'ARN interférence (*RNAi*) repose sur l'utilisation de siRNA (*small-interfering RNA*) de 19-21 nucléotides capables de s'hybrider sur les ARNm à éteindre (*silencing*). Cette reconnaissance très spécifique permet de n'altérer l'expression que d'une seule isoforme. Cette technique a été initialement développée chez *C. elegans* (Fire et al., 1998). L'utilisation de vecteurs plasmidiques basés sur un promoteur H1 (contrôlant dans la cellule la transcription des ARNt par l'ARN polymérase III) a permis de généraliser son utilisation aux cellules de mammifères (Brummelkamp et al., 2002).

Il a été montré grâce à des anticorps spécifiques que Syt9 est colocalisée avec Syt1 dans les cellules chromaffines PC12 sur les LDCV mais aussi sur les SLMV (Fukuda, 2004), tandis que dans la lignée insulino-sécrétoire INS-1E, elle ne se retrouve que sur les LDCV (Iezzi et al., 2004). Cette dernière étude a montré également que Syt5 se localise également sur les LDCV. Dans les cellules PC12, le *silencing* de Syt9, mais pas de Syt1, inhibe la sécrétion en réponse à une dépolarisation par le KCl, ce qui suggère que Syt9 est le senseur calcique de l'exocytose dans ces cellules (Fukuda, 2004). Dans les cellules INS-1E, la situation est moins tranchée. En effet, les isoformes 5 et 9 sont impliquées dans l'exocytose car le *silencing* de ces deux isoformes induit une inhibition de la libération

d'insuline stimulée par le glucose (Iezzi et al., 2004). Néanmoins, Syt5 n'est pas exprimée dans les cellules β primaires, et cela suggère donc que l'isoforme Syt9 est le senseur calcique de l'exocytose des LDCV.

L'analyse comparée des domaines C2 des différentes Syt montre que la plupart est capable d'interagir avec le complexe dimérique Syntaxine 1 / SNAP25 et avec les phospholipides anioniques de manière calcium-dépendante (Rickman et al., 2004). Cela suggère un rôle important de chaque isoforme Syt à chaque étape du trafic et des phénomènes de fusion membranaire dépendante du calcium. Il est, en effet, proposé que les multiples isoformes de Syt agiraient à des étapes différentes tout au long du trafic des vésicules, ou dans des phénomènes de fusion membranaires distincts de l'exocytose proprement-dite (Rickman et al., 2004). Néanmoins, très peu d'éléments sont connus sur les autres isoformes des Syt. La localisation précise des différentes isoformes n'est pas encore achevée en raison de la difficulté d'obtenir des anticorps spécifiques.

III - Les chaperonnes

Ce travail de thèse porte sur la CSP, une protéine vésiculaire appartenant à la famille des co-chaperonnes de type DnaJ, et sur son implication dans la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques. Avant d'avancer dans cette étude, il convient d'introduire plus en détail la famille complexe des chaperonnes moléculaires et des co-chaperonnes associées.

Les chaperonnes moléculaires sont des protéines à activité ATPasique qui sont capables de reconnaître des substrats protéiques définis et de modifier leur conformation spatiale. L'importance des chaperonnes dans la maintenance de la conformation native des protéines est soulignée par les conséquences toxiques de l'agrégation aspécifique de protéines mal conformées. Dans plusieurs maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson ou de Huntington, l'accumulation d'agrégats protéiques accompagne la mort neuronale dans certaines régions spécifiques du cerveau, ce qui conduit aux symptômes neurologiques irréversibles de ces maladies (Young et al., 2004).

Les systèmes chaperons sont très conservés au cours de l'évolution, de la bactérie aux eucaryotes supérieurs. On peut distinguer différents systèmes :

- Les chaperonines de type GroEL/Hsp60 (*heat shock protein of 60 kDa*) qui sont des structures multimériques principalement impliquées dans la prise en charge des peptides en cours de traduction, dès leur sortie des ribosomes. Ce système ne sera pas traité ici.
- Les chaperonnes moléculaires monomériques de type Hsp70 et Hsp90, aidées de co-chaperonnes associées. Les co-chaperonnes permettent de diriger les chaperonnes, de les activer ou encore de les recycler. Ces chaperonnes sont impliquées dès la prise en charge des peptides néosynthétisés, au cours de la maturation des protéines, ou encore dans les processus de tri/adressage. Ces systèmes chaperons seront particulièrement décrits ici.

La difficulté d'étudier les systèmes chaperons tient au fait que, dans la cellule, différents systèmes agissent souvent en synergie ou en cascade pour assurer un même processus. De plus, la purification de protéines recombinantes à partir de la bactérie pour des études biochimiques doit se faire selon des protocoles rigoureux pour éviter toute contamination par des chaperonnes/co-chaperonnes bactériennes qui pourraient induire un biais dans les résultats (Nam and Walsh, 2002; Nicoll et al., 2006).

III.1 - Aspects structuraux

III.1.1 - Les chaperonnes DnaK ou Hsp70

La famille de chaperonnes historiquement la plus étudiée est la famille des Hsp70 (*heat shock protein of 70 kDa*). On parle couramment de Hsp70 ou de Hsc70 (*heat shock cognate protein of 70 kDa*), ces deux abréviations désignant la même molécule. Cette famille comprend de nombreux membres distincts par leur localisation et leur fonction (Fink, 1999) :

- cytosoliques : DnaK chez la bactérie, Hsp70 chez les eucaryotes
- lumière du RE : Bip, Calréticuline
- matrice mitochondriale : mHsp70.

La chaperonne cytosolique Hsp70 possède deux isoformes chez les mammifères. La forme constitutive Hsp72 et la forme inductible par le stress Hsp73. En effet, les cellules soumises à un choc thermique répondent en surexprimant Hsp73 (Ritossa, 1996).

Il apparaît qu'un choc thermique induit la relocalisation de manière différentielle les différentes Hsp70 dans la cellule, principalement dans le noyau et la mitochondrie (Ellis et al., 2000), ce qui suggère des fonctions différentes pour ces deux isoformes. DnaK est constituée schématiquement de deux « poches », l'une N-terminale qui lie l'ATP et porte l'activité ATPasique, l'autre C-terminale qui fixe le substrat et permet son repliement.

Il existe différents modèles concernant le cycle d'activation de DnaK. Le plus fréquemment repris dans la littérature est le suivant (fig. i-13) (Agashe and Hartl, 2000). DnaK lie l'ATP par son domaine N-terminal, ce qui a pour effet d'induire un changement de conformation du domaine C-terminal. La « poche » de liaison du substrat s'ouvre. Parallèlement, DnaJ, la co-chaperonne, reconnaît un substrat spécifique grâce à des séquences exposées à caractère hydrophobe. DnaJ possédant une affinité importante pour DnaK lié à l'ATP, il entre dans le cycle et présente le substrat à la chaperonne. DnaJ stimule l'activité ATPasique de DnaK, et l'hydrolyse de l'ATP en ADP induit un changement de conformation de la poche de liaison du substrat, ce qui permet de modifier sa conformation. Comme DnaJ possède une affinité réduite pour DnaK lié à l'ADP, il est libéré. L'échange de l'ADP en ATP est catalysé par le facteur d'échange GrpE. La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP induit l'ouverture de la poche C-terminale de DnaK, d'où la libération du substrat modifié. Un même substrat peut subir plusieurs cycles successifs si nécessaire, ou être dirigé vers le protéasome pour être dégradé en cas d'échec (voir partie III.2.3).

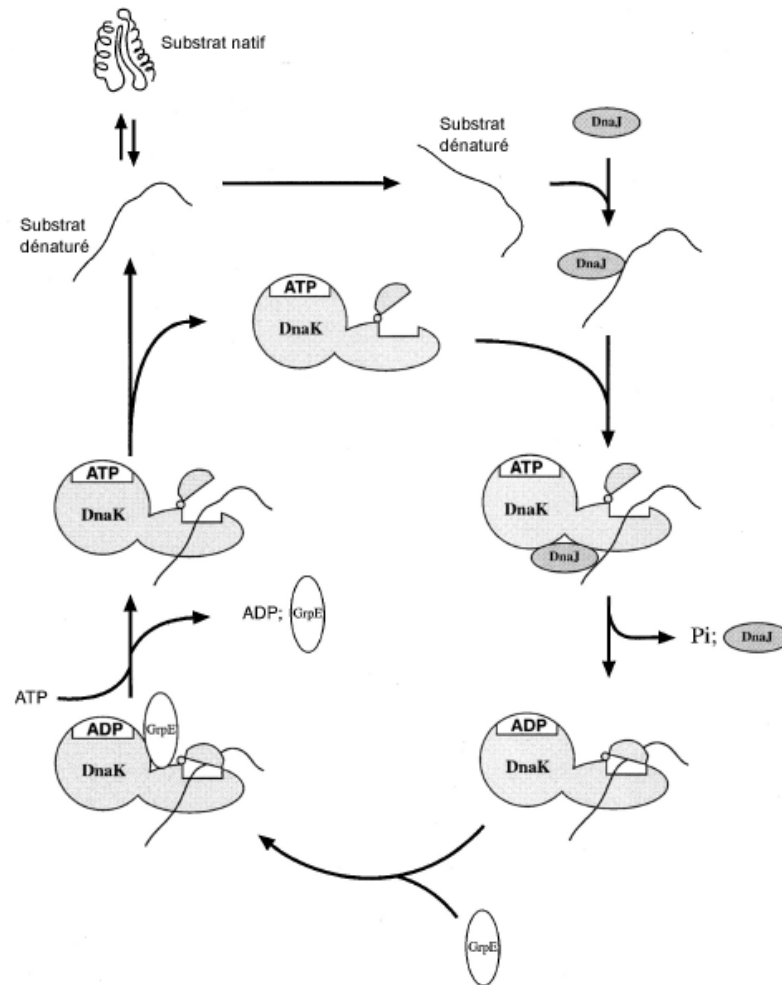


Figure i-13 : Cycle d'activation de Hsp70

DnaJ recrute un substrat dénaturé et le présente à la chaperonne liée à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP stimulée par DnaJ permet de changer la conformation du substrat. DnaJ est libérée. GrpE permet l'échange de l'ADP en ATP et le substrat est libéré. DnaK liée à l'ATP peut entamer un nouveau cycle avec le même substrat si nécessaire.

Adapté de (Agashe and Hartl, 2000)

III.1.2 - Les chaperonnes Hsp90

Comparativement aux chaperonnes Hsp70, les chaperonnes Hsp90 ne sont que peu étudiées. Il n'a été montré que récemment que la fonction ATPasique de Hsp90 est nécessaire à la fonction de chaperonne *in vivo* (Panaretou et al., 1998). L'élucidation récente de la structure de Hsp90 a permis de faire des avancées importantes dans la connaissance de cette chaperonne (Young et al., 2001). Hsp90 est spécifiquement inhibée par la drogue geldanamycine. Sa structure cristallisée, en présence de geldanamycine, montre que cette drogue occupe le domaine N-terminal de liaison de l'ATP (Young et al., 2001). Hsp90 possède un mode de fonctionnement particulier et différent de Hsp70. En effet, elle est retrouvée dans la cellule sous forme dimérique, et son domaine C-terminal est nécessaire à sa dimérisation (Young et al., 2001). Le cycle d'activation de Hsp90 est différent de celui de Hsp70 (fig. i-14). Un substrat est transféré à Hsp90 par l'intermédiaire d'une co-chaperonne spécialisée (voir plus loin) ou bien directement après un cycle d'activité de Hsp70. Hsp90 est alors non liée aux nucléotides. La liaison de l'ATP induit le rapprochement des deux domaines N-terminaux des monomères Hsp90. Le dimère peut être alors envisagé comme une « pince » qui se referme sur le substrat (fig. i-14). La co-chaperonne p23 qui possède une affinité importante pour Hsp90 liée à l'ATP entre alors dans le complexe. p23 est une co-chaperonne singulière qui stimule la libération du substrat après hydrolyse de l'ATP, sans jouer directement sur cette activité (Young et al., 2001). L'hydrolyse de l'ATP en ADP induit l'ouverture de cette « pince » puis un changement de conformation du substrat, sa libération ainsi que celle de p23. L'ADP est alors libéré et Hsp90 libre est alors disponible pour un nouveau cycle (fig. i-14).

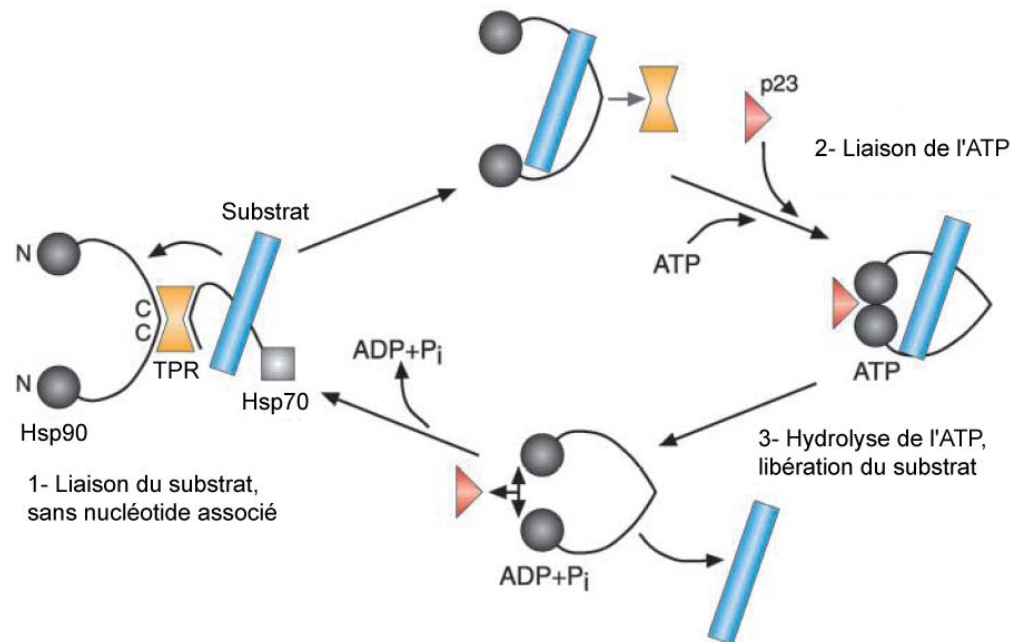


Figure i-14 : Structure et cycle d'activation de Hsp90

Un dimère de Hsp90 prend en charge un substrat via une co-chaperonne à domaine TPR, souvent après un cycle de Hsp70. La liaison de l'ATP permet le recrutement de p23 et le rapprochement des deux domaines N-terminaux des monomères Hsp90. L'hydrolyse de l'ATP induit le changement de conformation du substrat et p23 favorise sa libération.

Adapté de (Young et al., 2001)

III.1.3 - Les co-chaperonnes DnaJ/Hsp40 et à domaines TPR

Les chaperonnes moléculaires sont le plus souvent exprimées de manière universelle dans la cellule. Pour être dédiées à une fonction définie, à un substrat particulier, elles doivent être dirigées par des co-chaperonnes. Les systèmes co-chaperons les plus courants et les plus étudiés, à savoir les co-chaperonnes de type DnaJ/Hsp40 et à domaine TPR (*tetratricopeptide repeat*) vont être détaillés ici.

III.1.3.1 - Les co-chaperonnes de Hsp70 : DnaJ/Hsp40

Les co-chaperonnes de type DnaJ (chez la bactérie) ou Hsp40 (chez les eucaryotes) sont des co-chaperonnes spécifiques de Hsp70. Il s'agit d'une grande famille (plus de 100 membres sont caractérisés) et leur point commun est la présence du domaine J conservé, qui est le cœur de l'activité co-chaperonne (Fink, 1999). Au centre de ce domaine se trouve un motif consensus essentiel pour la fonction, formé par les trois acides aminés HPD (histidine, proline, aspartate) (Caplan et al., 1993). La structure du domaine J a été résolue par RMN (Hill et al., 1995). Elle est dominée par deux longues hélices α , avec un cœur hydrophobe constitué par les chaînes latérales des acides aminés les plus conservés (fig. i-15-A). L'effet majeur de DnaJ sur DnaK est la stimulation de son activité ATPasique, qui nécessite le domaine J et le motif HPD central. Néanmoins, DnaJ possède une activité de chaperonne par elle-même, car elle est capable de renaturer la luciférase dénaturée *in vitro* (Fink, 1999). Il a été montré par criblage peptidique que DnaJ est capable de fixer des peptides à tendance hydrophobe (Rudiger et al., 2001), vraisemblablement grâce au cœur hydrophobe conservé du domaine J. Il a été proposé que DnaJ serait un lecteur des zones hydrophobes des protéines (l'exposition de zones hydrophobes étant une marque potentielle de dénaturation), de manière à diriger DnaK spécifiquement sur ces zones (Fink, 1999; Rudiger et al., 2001; Young et al., 2003). On considère que les zones variables entre les différentes DnaJ pourrait conférer une spécificité de substrat.

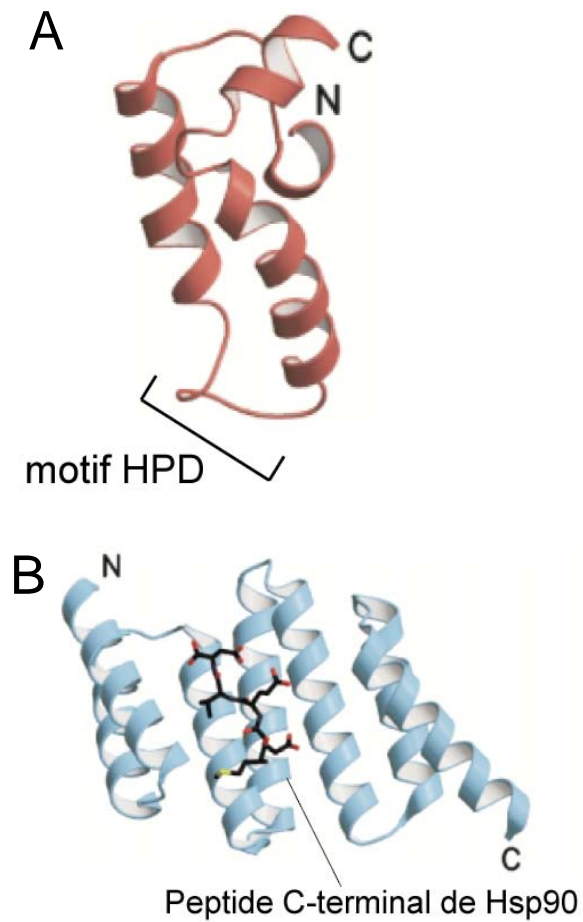


Figure i-15 : Structure des domaines J et TPR

A : Structure du domaine J de Hsp40 humaine résolue par RMN. La position du motif HPD nécessaire à la fonction des DnaJ est indiquée.

B : Structure cristallisée d'un domaine TPR de HOP en présence du peptide C-terminal de Hsp90. On voit ici une succession de trois motifs TPR avec une hélice supplémentaire, dite « hélice de solubilisation ».

Adapté de (Young et al., 2003)

III.1.3.2 - Les co-chaperonnes de Hsp90 à domaine TPR

Le domaine TPR est constitué d'une séquence conservée de 34 acides aminés, principalement de nature hydrophobe (Blatch and Lasse, 1999). L'étude structurale du motif TPR par cristallographie a montré qu'il est organisé en deux hélices α anti-parallèles (fig. i-15B) (Scheufler et al., 2000). On trouve généralement plusieurs domaines TPR successifs dans une protéine, organisés en tandems plus ou moins serrés. Les co-chaperonnes à domaine TPR recrutent généralement la chaperonne Hsp90. Le site de liaison des domaines TPR se trouve sur la partie C-terminale de Hsp90, soit la partie impliquée dans sa dimérisation (Young et al., 1998). La succession de plusieurs motifs TPR forme un sillon structural qui enserre le peptide C-terminal de Hsp90 (fig. i-15B) (D'Andrea and Regan, 2003)

III.2 - Aspects fonctionnels

Les différents systèmes chaperons sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Généralement, les chaperonnes Hsp70 ou Hsp90 ubiquitaires sont dirigées spécifiquement vers une cible donnée, sur une fonction précise par le biais des co-chaperonnes. Les aspects fonctionnels les mieux caractérisés impliquant les systèmes chaperons seront présentés ici.

III.2.1 - Prise en charge des peptides en cours de traduction dans le cytosol

L'information de structure est codée dans la séquence primaire de la protéine, c'est-à-dire dans la simple suite des acides aminés. L'information nécessaire pour constituer un domaine structural étant souvent portée par un nombre important d'acide aminés (100 à 300), les séquences polypeptidiques qui font partie d'un domaine structural ne peuvent pas être repliées correctement jusqu'à ce que l'intégralité du domaine n'ait été traduit et soit sorti du ribosome. La prise en charge des peptides néo-synthétisés est un bon exemple de collaboration des différents systèmes chaperons. En effet, dans un premier temps, les chaperonnes DnaK/Hsp70 aidées des co-chaperonnes de type DnaJ/Hsp40 sont capables de prendre en charge les peptides en cours de traduction. Ceci permet d'éviter d'une part leur agrégation aspécifique et d'autre part d'aider à leur repliement une fois le domaine

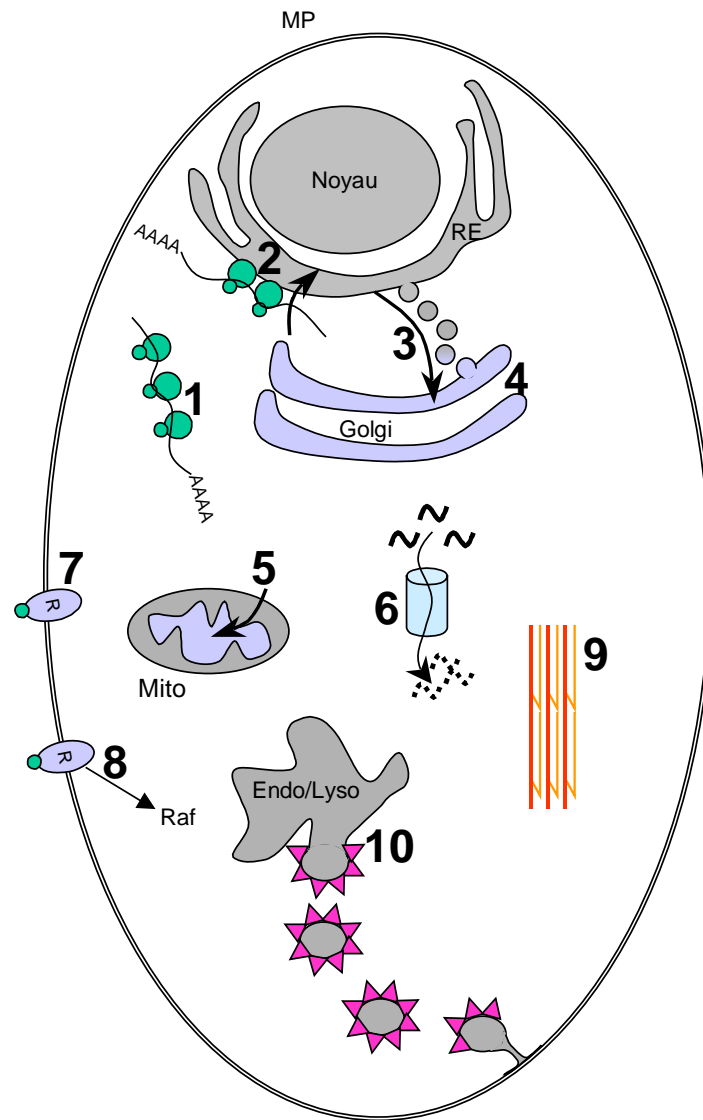


Figure i-16 : Implication des systèmes chaperons dans différents processus cellulaires

(1) Les chaperonnes Hsp70/Hsp40 prennent en charge les peptides néosynthétisés. (2) BiP apporte la force motrice pour la translocation des protéines en cours de traduction dans la lumière du RE. (3) La Calréticuline est impliquée dans le tri des protéines N-glycosylées. (4) Hsp70 et Hsp90 influent sur la maturation du canal chlore CFTR. (5) Les chaperons Hsp70-Hsp90/TOM et mHsp70/TIM permettent l'import de protéines cytosoliques dans la matrice de la mitochondrie. (6) Hsp70-Hsp90/CHIP dirigent les protéines vers le protéasome pour leur dégradation. (7) Hsp90 est impliquée dans l'activation des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. (8) Hsp90 régule les récepteurs à activité Tyrosine-kinase de l'insuline et de l'EGF, ainsi que l'activité de Ras en aval. (9) Hsp90/Unc-45 régule l'activité de la myosine au niveau du cytosquelette. (10) Hsp70/Auxilline désassemblent le manteau de clathrine des vésicules d'endocytose.

structural entièrement traduit (fig. i-16). Dans un deuxième temps, la co-chaperonne HOP (*Hsp-organizing protein*), à domaine TPR, peut faire le lien entre Hsp70 et Hsp90 pour poursuivre les modifications de conformation ou influencer sur l'adressage de la protéine (Young et al., 2004).

III.2.2 - Tri et adressage des protéines :

La situation est plus complexe dans le cas des protéines devant être exportées. Ces protéines sont traduites par les ribosomes fixés au RE, transloquées dans la lumière du RE de manière co-translationnelle, et rapidement prises en charge par les chaperonnes. Les deux chaperonnes majoritaires du RE sont Bip et la Calréticuline (fig. i-16). Bip est une chaperonne ATP-dépendante de type Hsp70. Elle serait principalement impliquée dans la prise en charge des protéines néo-synthétisées. La Calréticuline est une chaperonne Ca^{2+} -dépendante qui reconnaît les protéines nouvellement glycosylées. En effet, elle interagit avec les noyaux de glycosylation N-liés (Fink, 1999). Ainsi, elle serait plus impliquée dans les processus de tri/adressage des protéines vers la voie sécrétoire que dans des changements de conformation.

Le système chaperon Hsp70/Hsp90 est également impliqué dans la maturation du canal chlore CFTR (*cystic fibrosis conductance transmembrane regulator*) (fig. i-16). Des mutations du CFTR sont à l'origine de la mucoviscidose, ou fibrose kystique (Akabas, 2000). Le CFTR est une grande molécule possédant 12 domaines transmembranaires ainsi que de multiples domaines régulateurs, sites de phosphorylations et de glycosylations. Il possède une taille apparente sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes d'environ 200 kDa. Une telle protéine nécessite de nombreuses étapes de maturation et de contrôle de qualité au cours de la voie de transport. La maturation du CFTR implique les chaperonnes Hsp70 et Hsp90. Il a été montré que la forme mutante du CFTR responsable de la mucoviscidose est capable d'interagir plus fortement avec Hsp70 que la forme sauvage, et cela expliquerait que la forme mutante passe à travers le crible de qualité en sortie du RE (Bradbury, 2000). De plus, le fait de perturber l'interaction entre le CFTR et Hsp90 accélère sa dégradation via le protéasome. L'implication de la *Cysteine-string protein* dans la maturation du CFTR sera détaillé (voir partie IV.4.2).

La mitochondrie est une organelle à part chez les eucaryotes car elle est semi-autonome : elle possède son propre génome et certaines protéines sont traduites directement dans la matrice mitochondriale, sans passer dans le cytoplasme. Un tel procédé

nécessite des chaperonnes pour assurer la bonne conformation de ces protéines. La chaperonne mHsp70 est une chaperonne spécifique de la matrice de la mitochondrie et joue un rôle important dans la prise en charge des protéines mitochondriales néo-synthétisées (fig. i-16). De plus, certaines protéines sont importées depuis le cytosol vers la matrice mitochondriale, et des systèmes chaperons dédiés sont aussi impliqués. La machinerie d'import de protéines cytosoliques dans la mitochondrie est complexe (Young et al., 2004). Elle implique les chaperonnes cytosoliques Hsp70, Hsp90, ainsi que la co-chaperonne TOM (*translocase of the outer mitochondrial membrane*) à domaine TPR pour l'importation des protéines cytosoliques vers l'espace intermembranaire. L'import dans la matrice mitochondriale implique la co-chaperonne TIM (*translocase of the inner mitochondrial membrane*) qui recrute la chaperonne mHsp70 (Young et al., 2004).

III.2.3 - Protéasome, voie dépendante de l'ubiquitine

Alors que les systèmes chaperons agissent en premier lieu pour renaturer des substrats, ils peuvent aussi diriger des protéines vers la voie du protéasome. Ainsi la co-chaperonne CHIP (*carboxyl terminus of Hsp70 interacting protein*) à domaine TPR recrute Hsp70 ou Hsp90 et dirige le substrat vers la voie de dégradation ubiquitine-dépendante (fig. i-16) (Hohfeld et al., 2001). Il est intéressant de noter que l'inhibition de Hsp90 par la geldanamycine induit une augmentation de la dégradation de protéines par le protéasome. Cela suggère l'existence d'une balance entre les systèmes chaperons dédiés aux changements de conformation (Hsp70-Hsp40 et Hsp90-HOP) et les systèmes chaperons dédiés à la dégradation des protéines (Hsp70/Hsp90-CHIP) (Hohfeld et al., 2001).

III.2.4 - Transduction de signaux

Le meilleur exemple car le mieux caractérisé de l'implication des chaperonnes dans la transduction des signaux est le rôle de Hsp90 dans la signalisation des hormones stéroïdiennes (fig. i-16) (Young et al., 2001). En effet, Hsp90 est recrutée au niveau du récepteur des hormones stéroïdiennes puis induit une modification de conformation du domaine extracellulaire. Cette action est nécessaire pour que le récepteur puisse fixer le ligand.

Hsp90 est aussi un régulateur-clé de plusieurs kinases de type tyrosine ou sérine/thréonine (fig. i-16) (Richter and Buchner, 2001). Ainsi elle est impliquée dans la

signalisation de l'insuline via son récepteur à activité tyrosine-kinase, dans la signalisation de l'EGF (*epidermal growth factor*) via son récepteur. Elle assure aussi le recrutement en aval de Raf, une sérine/thréonine kinase de la famille de Ras. Hsp90 ne régule pas directement l'activité de Raf, mais est importante pour sa stabilisation. En effet, si l'interaction entre ces deux protéines est perturbée, Raf est dirigée vers le protéasome de manière importante.

Il a été montré que Hsp90 est aussi impliquée dans l'adressage de certaines protéines G hétérotrimériques (fig. i-16). Ainsi, une isoforme particulière ($G\alpha_{12}$) est dirigée sur les radeaux lipidiques membranaires (*lipid rafts*) grâce à Hsp90 (Waheed and Jones, 2002).

III.2.5 - Cytosquelette

Chez *C. elegans*, l'analyse d'un mutant présentant des troubles de la locomotion a permis de mettre en évidence le rôle de Hsp90 dans la contraction musculaire (Young et al., 2003) via la protéine Unc-45 (nommé ainsi pour le phénotype non-coordonné du ver mutant - *uncoordinated locomotion*). Unc-45 est nécessaire à l'assemblage correct des molécules de myosine pour constituer les filaments épais du sarcomère du muscle strié. Unc-45 recrute Hsp90 par ses domaines TPR, et la chaperonne exerce son action sur la tête de myosine (fig. i-16). Etant donné que l'expression de Unc-45 n'est pas restreinte aux seuls muscles squelettiques, il est possible qu'il puisse jouer un rôle plus large dans les fonctions du cytosquelette basées sur la myosine. Il est intéressant de noter que le recrutement des LDCV dans les cellules β -pancréatiques nécessite la myosine Va (voir partie II.2.2.1) (Varadi et al., 2005). Bien qu'aucune relation n'ait été faite à ce jour avec Hsp90/Unc-45, ce complexe chaperon pourrait jouer un rôle dans le transport et le recrutement des LDCV à proximité de la membrane plasmique.

III.2.6 - Désassemblage de la clathrine

La chaperonne Hsp70 est impliquée dans le désassemblage du manteau de clathrine des ISG (voir partie II.1 et fig. i-16) et des vésicules d'endocytose (voir partie II.2.1.4 et fig. i-16). Peu de choses sont connues au sujet de la maturation des ISG en LDCV, mais l'action de Hsp70 dans la voie d'endocytose clathrine-dépendante est bien caractérisée. La co-chaperonne Auxilline, à domaine J, fixe la clathrine quand elle est complexée en

triskèle, recrute Hsp70 à la surface de la vésicule et stimule son activité ATPasique. Hsp70, sous forme liée à l'ADP, lie fortement la clathrine, et il semble que cela ait pour effet de distordre la conformation de la clathrine et conduise à désassembler la cage de clathrine (Young et al., 2003).

IV - La « Cysteine-string protein »

Ce travail porte sur la protéine vésiculaire « *Cysteine-string protein* » (Csp). Cette protéine, initialement caractérisée comme un régulateur des canaux calciques neuronaux, est fortement impliquée dans la régulation de l'exocytose. Son importante fonctionnelle est mise en lumière par le phénotype létal de mutants KO chez la drosophile ou encore chez la souris. Cette protéine est ancrée sur la face cytoplasmique des vésicules par l'intermédiaire d'un domaine hydrophobe et/ou par de nombreuses palmitoylations. Elle est caractérisée par la présence d'un domaine central riche en résidus cystéine et d'un domaine homologue à la co-chaperonne bactérienne DnaJ. Plusieurs isoformes sont aujourd'hui connues chez les mammifères.

Ce chapitre permettra de regrouper les connaissances sur la Csp. Dans un premier temps, un historique de sa découverte sera réalisé. Ensuite, sa structure sera décrite et l'état des connaissances sur sa fonction sera dressé en détaillant ses partenaires protéiques connus et en faisant le bilan des études génétiques, biochimiques et fonctionnelles réalisées à ce jour.

IV.1 - Découverte de la Csp

La « *Cysteine-string protein* » (Csp) a été découverte chez la drosophile. En 1990, K. E. Zinsmaier et coll. ont identifié un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope spécifique des terminaisons nerveuses (Zinsmaier et al., 1990). Le clonage des ADNc correspondants a permis de révéler l'existence de deux ARNm dont l'expression est corrélée au profil obtenu avec cet anticorps. Ces deux ARNm codent pour deux protéines révélées à des tailles de 32 et 34 kDa qui présentent l'originalité d'avoir un cluster de 11 résidus cystéines dans leur domaine central. Cette particularité a donné leur nom à ces protéines.

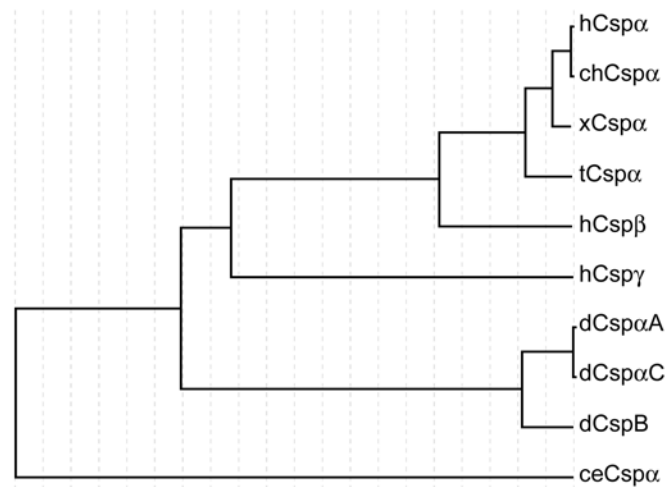
Parallèlement à cette étude, l'équipe de C. B. Gundersen et J. A. Umbach a identifié la Csp comme étant un régulateur du canal calcique neuronal de type N (Gundersen and Umbach, 1992). Ces auteurs ont observé que l'injection d'ARNm purifiés à partir de l'organe électrique de la torpille dans l'oocyte de xénope induit l'expression d'un canal calcique dont les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques l'identifie comme canal de type N (voir partie I.4.2). En fractionnant les ARNm, ils ont pu identifier un ADNc de 7,4 kpb suffisant pour induire l'expression du canal calcique dans l'oocyte. Cet ADNc code pour une protéine de 21,7 kDa qui est homologue aux clones Csp isolés deux ans auparavant chez la drosophile (Zinsmaier et al., 1990) (et voir ci-dessus). Il apparaît également dans cette étude que l'utilisation d'un ARNm antisens inhibe l'expression du canal calcique dans l'oocyte de xénope. La Csp a ensuite été clonée chez le rat (Mastrogiacomo and Gundersen, 1995), chez le xénope (Mastrogiacomo et al., 1998a) et elle est retrouvée chez *C. elegans* (numéro d'accèsion *GenBank* U40415) et chez le poulet (XM_417428). Trois variants d'épissage issus d'un gène unique sont connus chez la drosophile, un seul chez la torpille, le xénope, *C.elegans* et le poulet (Evans et al., 2003) (fig. i-17A). Chez les mammifères, deux isoformes de Csp ont été identifiées (Chamberlain and Burgoyne, 1996) : Csp1 est l'homologue de la protéine de la torpille, tandis que Csp2 est une forme tronquée au niveau du domaine C-terminal (fig. i-17B). Csp2 est générée par un épissage alternatif de l'ARNm codant pour Csp1. Plus récemment, deux nouvelles séquences ont été déposées dans la base de données *GenBank*, Csp β et Csp γ (fig. i-17A). Ces séquences ont été obtenues à partir d'ARNm de testicules humains (numéros d'accèsion *GenBank* pour Csp β et Csp γ respectivement : AF368276 et AF368277). Csp β est déposée comme séquence complète et est retrouvée également chez la souris (numéro d'accèsion : AK005749). La séquence déposée de Csp γ n'est qu'une séquence partielle, bien qu'une séquence prédite peut être retrouvée chez l'humain (AK097736) et chez la souris (NP_808345). L'émergence de ces nouvelles isoformes a conduit à une nouvelle nomenclature, proposée par Fernandez-Chacon et coll. (Fernandez-Chacon et al., 2004), qui sera utilisée dans cette étude. Ainsi, dans cette étude, la Csp α désignera la protéine homologue de la torpille. Nous parlerons de Csp α 1 ou Csp α 2 pour désigner les deux variants d'épissage chez les mammifères.

IV.2 - Structure générale

L'analyse de la séquence protéique des Csp révèle une organisation en différents domaines (fig. i-17B). La principale caractéristique des Csp est la présence du domaine central riche en résidus cystéine : pour la Csp α 1 de mammifère, sur 28 acides aminés composant ce domaine, 14 résidus sont des cystéines. La majorité de ces résidus est modifiée par des acylations post-traductionnelles. Cela est valable pour la drosophile (van de Goor and Kelly, 1996; Mastrogiacomo et al., 1998b), la torpille (Gundersen et al., 1994), le xénope (Mastrogiacomo et al., 1998a), et pour les mammifères (Chamberlain and Burgoyne, 1998a; Zhang et al., 1999; Chamberlain et al., 2001). Ces modifications ont été mises en évidence en mesurant l'incorporation de palmitate tritié dans la Csp α . L'incorporation de palmitate résulte en une augmentation du poids moléculaire apparent de la protéine sur gel dénaturant de polyacrylamide. Ainsi, la Csp α 1 de mammifère qui possède un poids théorique d'environ 25 kDa migre sur gel de polyacrylamide à une taille d'environ 35 kDa. Ces palmitates peuvent être clivés *in vitro* par un traitement au méthanol-KOH, ou à l'hydroxylamine (NH₂OH) (Gundersen et al., 1994; van de Goor and Kelly, 1996; Mastrogiacomo et al., 1998b; Zhang et al., 1999). Cette coupure peut être suivie par migration électrophorétique de la protéine. La présence de ces résidus palmitates confère au domaine riche en cystéines une hydrophobicité importante, qui a été proposée comme pouvant servir à l'ancrage de la protéine dans la membrane des vésicules (Gundersen et al., 1994).

Néanmoins, le clivage des palmitates par un traitement NH₂OH ne permet pas de décrocher la protéine de la membrane (van de Goor and Kelly, 1996; Chamberlain and Burgoyne, 1998a). Cela suggère que les palmitates en eux-mêmes ne sont pas impliqués dans l'ancrage stable de la protéine dans la membrane. Deux hypothèses peuvent alors être énoncées.

A



B

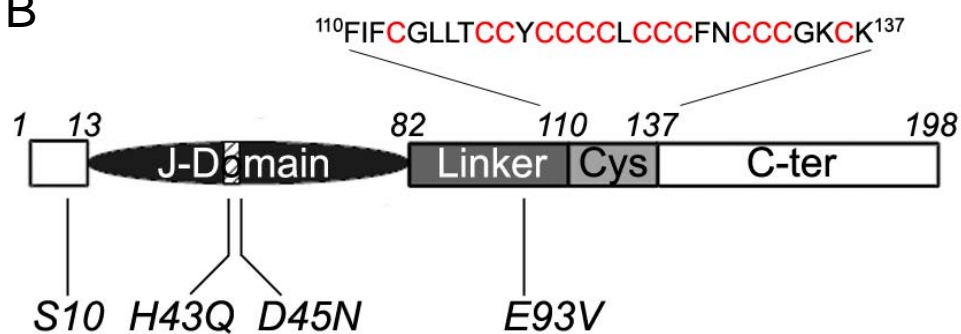


Figure i-17 : Arbre phylogénétique et organisation en domaines des Csp

A : Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques montrant les relations entre les Csp humaines (hCsp α - β - γ), de drosophile (dCspA-B-C), de torpille (tCsp α), de poulet (chCsp α), de xénope (xCsp α) et de *C.elegans* (ceCsp α).

B : Les Csp sont organisées en domaines distincts. Les positions d'acides aminés fonctionnellement importants pour Csp α 1 sont indiquées : le site de phosphorylation (S10), le motif HPD essentiel pour l'activation de Hsc70 et les deux mutations inhibant cette interaction (H43Q et D45N) et la mutation fonctionnelle dans la région charnière (*Linker*) (E93V). La séquence primaire est détaillée pour le domaine riche en cystéines.

Selon la première, la Csp α est considérée comme associée aux membranes par l'intermédiaire de partenaires protéiques ou par liaison aux phospholipides membranaires. Néanmoins, cette hypothèse est réfutée par deux études indépendantes qui ont montré qu'un traitement alcalin des membranes au carbonate de sodium (Na₂CO₃) ne permet pas de décrocher massivement la Csp α de drosophile des membranes (van de Goor and Kelly, 1996; Mastrogiacomo et al., 1998b). Un tel traitement permet de distinguer les protéines intrinsèques (qui ne sont pas décrochées) des protéines extrinsèques des membranes (Fujiki et al., 1982). Ainsi, la Csp α de drosophile peut être considérée comme une protéine intrinsèque de la membrane. Il est à noter que ces auteurs ont également observé que le traitement au carbonate possède un faible effet de solubilisation des membranes, qui se traduit par la libération de protéines transmembranaires.

D'après la seconde hypothèse, la Csp α serait ancrée dans la membrane par l'intermédiaire d'un domaine de nature hydrophobe, comprenant les acides aminés 108 à 134 de la Csp α de mammifère (domaine comprenant les cystéines – fig. i-17B). Ce domaine serait capable de pénétrer dans le feuillet externe de la bicouche lipidique (Gundersen et al., 1995). Cet ancrage se ferait de manière indépendante des palmitoylations et ne serait dû qu'à l'hydrophobicité importante de ce domaine.

Indépendamment de sa fonction probable d'ancrage dans la bicouche, la région riche en cystéines porte une information d'adressage pour la Csp α . En effet, L. H. Chamberlain et R. D. Burgoyne ont réalisé la mutation des résidus cystéine centraux en sérine, acide aminé hydrophile sur lequel ne peut pas être greffé de palmitate (Chamberlain and Burgoyne, 1998a). Cette construction, exprimée dans les cellules chromaffines PC12 ou dans les cellules HeLa, n'est effectivement pas modifiée (selon sa taille apparente sur gel de polyacrylamide), et n'est pas associée aux membranes. Il apparaît ainsi que les résidus cystéines porteraient en eux-mêmes une information d'adressage de la protéine vers les membranes.

Un autre domaine caractéristique des Csp est le domaine J (fig. i-17B). Ce domaine est hautement homologue au domaine J de la co-chaperonne bactérienne DnaJ, à hauteur de 50% d'identité (Chamberlain and Burgoyne, 2000; Evans et al., 2003). Le domaine J permet de manière globale à la co-chaperonne de recruter la chaperonne Hsc70 (voir partie III). On retrouve au centre de ce domaine le motif HPD nécessaire à la fonction des protéines de type DnaJ (fig. i-17B et voir partie III). Il a été montré que la Csp α est

capable d'interagir *in vitro* avec Hsc70 et de stimuler son activité ATPasique (Braun et al., 1996; Chamberlain and Burgoyne, 1997b; Zhang et al., 1999), et que cette activité nécessite le domaine J et le motif HPD (Chamberlain and Burgoyne, 1997a). Deux domaines distincts de Hsc70 sont impliqués dans l'interaction avec Csp α : le domaine à activité ATPasique ainsi que le domaine C-terminal régulateur (Stahl et al., 1999). Csp α peut être considérée comme étant une co-chaperonne spécifiquement dédiée aux chaperonnes de type DnaK, comme Hsc70, car elle est incapable de recruter la chaperonne NSF, impliquée dans la dissociation du complexe SNARE (Braun et al., 1996) (voir partie II.2.1.2). Enfin, il est à noter que la Csp α semble posséder une activité chaperonne par elle-même, car elle est capable de limiter l'agrégation de la luciférase *in vitro* induite par la chaleur (Chamberlain and Burgoyne, 1997a). Néanmoins, ces auteurs n'ont pas mis en évidence que la Csp α serait capable de renaturer la luciférase agrégée. Les implications fonctionnelles éventuelles de cette activité seront discutées plus loin.

La Csp α possède une région charnière (*linker region*) entre le domaine J et le domaine riche en cystéines (fig. i-17B). L'importance fonctionnelle de ce domaine a été mise en évidence par des études de mutagenèse dirigée. Alors que la surexpression dans les cellules β de la Csp α induit une inhibition de la sécrétion d'insuline (voir plus loin), l'introduction d'une mutation ponctuelle dans le domaine charnière (mutation du Glutamate 93 en Valine) permet de réverser l'effet inhibiteur de cette surexpression dans les cellules β (Zhang et al., 1999).

Le domaine C-terminal est le plus variable au sein des Csp. L'épissage alternatif des Csp α de mammifère conduit à deux ARNm, l'un codant pour la Csp α 1 et l'autre pour une forme tronquée pour les 30 derniers résidus, la Csp α 2. Le domaine C-terminal des Csp pourrait jouer un rôle important dans la fonction de co-chaperonne de la protéine, par analogie au mode d'action de DnaK/DnaJ (voir fig. i-13).

Enfin, le domaine N-terminal joue un rôle régulateur fin de la fonction de Csp α dans l'exocytose. En effet, la sérine 10 est phosphorylée *in vivo* par les protéines kinases PKA (Evans et al., 2001) et PKB (Evans et al., 2006). Cela influe sur la régulation de l'exocytose par la Csp α 1 ainsi que sur les interactions protéines-protéines. Ces implications fonctionnelles seront développées plus loin.

La topologie de la protéine a aussi été discutée. Malgré la présence d'un domaine fortement hydrophobe (acides aminés 108 à 134 de Csp α 1 – fig. i-17B), les prévisions *in silico* s'accordent à montrer que la Csp α ne possède pas de domaine transmembranaire. L'utilisation d'anticorps spécifiques de l'extrémité N- ou C-terminale a permis de résoudre cette question. En effet, il a été mis en évidence que des quantités équivalentes de vésicules synaptiques portant la Csp α peuvent être immunoprécipitées à partir de l'organe électrique de torpille à l'aide de ces deux anticorps (Mastrogiacomo et al., 1994). Il est aujourd'hui admis que la protéine Csp α est ancrée sur la face cytoplasmique des vésicules par son domaine central hydrophobe.

IV.3 - Expression tissulaire et localisations cellulaires des Csp

Les premiers travaux réalisés sur la Csp α ont suggéré qu'elle n'était exprimée que dans le cerveau et les tissus fortement innervés (Zinsmaier et al., 1990; Gundersen and Umbach, 1992). Néanmoins, il est établi maintenant qu'elle est aussi exprimée dans plusieurs types cellulaires non-neuronaux.

La Csp α est associée aux vésicules synaptiques dans les neurones, où elle représente environ 1% des protéines vésiculaires totales. Il a été estimé que sont présents environ 8 monomères de Csp α par vésicule (Mastrogiacomo et al., 1994). On la retrouve également sur les LDCV des cellules chromaffines (Kohan et al., 1995; Chamberlain et al., 1996), sur les vésicules contenant des neuropeptides dans les neurones de l'hypophyse de rat (Pupier et al., 1997), au niveau de la membrane plasmique des adipocytes (Chamberlain et al., 2001), sur les granules d'insuline (Brown et al., 1998; Zhang et al., 1998a) et dans le pancréas exocrine sur les granules de zymogènes (Braun and Scheller, 1995; Brown et al., 1998). Il est également établi qu'il existe une population de Csp α associée aux vésicules de type synaptique dans les neurones de l'hypophyse (Pupier et al., 1997) et dans les cellules β (Brown et al., 1998; Zhang et al., 1998a). La Csp α est également exprimée dans les cellules épithéliales (Gleave et al., 2001).

L'expression au niveau protéique de l'isoforme Csp α 2 est encore discutée. L'ARNm de cette isoforme est retrouvé dans plusieurs tissus ou types cellulaires : cellules chromaffines, foie, poumons, rein, cœur, rate, ainsi que dans les îlots de Langerhans et plusieurs lignées cellulaires dérivées (Chamberlain and Burgoyne, 1996; Brown et al., 1998; Zhang et al., 1998a). Néanmoins, un anticorps polyclonal dirigé contre Csp α 1

détecte une protéine pouvant correspondre en taille à Csp α 2 (27 kDa) uniquement dans des homogénats de rate (Chamberlain and Burgoyne, 1996). Brown et coll. ont détecté une protéine de 27 kDa dans une fraction enrichie en granules d'insuline en utilisant un anticorps polyclonal différent du précédent (Brown et al., 1998). Les auteurs ont conclu que Csp α 2 peut être exprimée faiblement et localisée sur les granules d'insuline. Néanmoins, cette même bande est détectée de manière étonnante dans la fraction cytosolique. Il n'est pas établi si cette bande correspond réellement à Csp α 2 ou à la reconnaissance non spécifique d'une autre protéine par l'anticorps utilisé.

Très peu de données sont disponibles au sujet des Csp β et Csp γ . Une seule étude menée à ce jour a montré par Northern-blot que les ARNm de ces deux isoformes ne se retrouvent que dans les testicules (Fernandez-Chacon et al., 2004).

IV.4 - Fonctions des Csp

De grandes avancées ont été réalisées dans la compréhension de la fonction de la Csp α grâce à l'étude de mutants KO chez la drosophile. De nombreuses études biochimiques ont caractérisé des interactions protéines-protéines permettant également de préciser sa fonction. Un bilan de l'ensemble des données connues à ce jour sera dressé, permettant de mieux cerner la ou les fonction(s) de la Csp α . Pour cela, dans un premier temps, les rôles de Csp α sur les différentes étapes de l'exocytose seront détaillés, que ce soit dans les systèmes neuronaux ou endocriniens. Puis dans un deuxième temps, l'implication de la Csp α dans des processus de développement embryonnaire et dans la survie neuronale sera développée.

IV.4.1 - Effets de la Csp α sur différentes étapes de l'exocytose

IV.4.1.1 - Synthèse des neurotransmetteurs et remplissage des vésicules synaptiques

La Csp α est impliquée dans la régulation de la synthèse de GABA dans les neurones (Hsu et al., 2000) (fig. i-18). Le GABA est synthétisé à partir du L-glutamate par l'enzyme GAD (*L-glutamic acid decarboxylase*). Cette enzyme est retrouvée sous forme soluble mais aussi associée aux membranes des vésicules synaptiques. La Csp α a été proposée comme étant impliquée dans l'accrochage de la GAD aux membranes des

vésicules synaptiques, car il semble qu'un complexe se forme entre la GAD, la Csp α et la chaperonne Hsc70 (Hsu et al., 2000). De plus, il existe un couplage mécanique entre la synthèse de GABA par l'enzyme GAD et le remplissage de la vésicule synaptique par le VGAT (*vesicular GABA transporter*) (Jin et al., 2003). La Csp α jouerait ainsi un rôle de co-chaperonne en recrutant Hsc70 à proximité du site de synthèse du GABA pour favoriser sa translocation dans la vésicule via VGAT. Néanmoins, il reste à démontrer l'existence d'une régulation de ce phénomène par Hsc70/Csp α .

Nous avons déjà vu que les cellules β -pancréatiques possèdent des SLMV contenant du GABA et les protéines GAD et VGAT sont aussi exprimées par ces cellules (voir partie II.2.1.1). De plus, la Csp α est également localisée sur ces vésicules (voir plus haut) et pourrait donc être impliquée dans la synthèse et/ou le remplissage des SLMV par le GABA dans les cellules β . Le GABA possédant une action inhibitrice sur la sécrétion d'insuline (voir partie I.5.1), il serait intéressant de vérifier l'effet régulateur éventuel de Csp α sur ce phénomène dans les cellules β -pancréatiques. Par exemple la présence d'un complexe synaptique entre la Csp α et les enzymes de synthèse du GABA et son transporteur pourrait être étudiée.

Récemment, un troisième membre du complexe Hsc70/Csp α a été identifié dans les neurones. Il s'agit de la protéine SGT (*small glutamine-rich TPR-containing protein*) (Tobaben et al., 2001). SGT contient trois motifs TPR répétés en tandem importants dans le recrutement des systèmes chaperons (voir partie III.1.3.2). Elle a été initialement décrite comme interagissant avec des protéines de l'enveloppe du parvovirus H-1 (Cziepluch et al., 1998). SGT est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, comme la division cellulaire (Winnefeld et al., 2004) et l'apoptose (Wang et al., 2005). Il a d'abord été montré par des études en double-hybride que SGT interagit avec Csp α (Tobaben et al., 2001) et que cette interaction est portée par la partie C-terminale de la Csp α (domaine riche en cystéine + domaine C-terminal). En utilisant des protéines recombinantes purifiées, les auteurs ont également décrit que les protéines SGT et Csp α stimulent de manière efficace l'activité ATPasique de Hsc70.

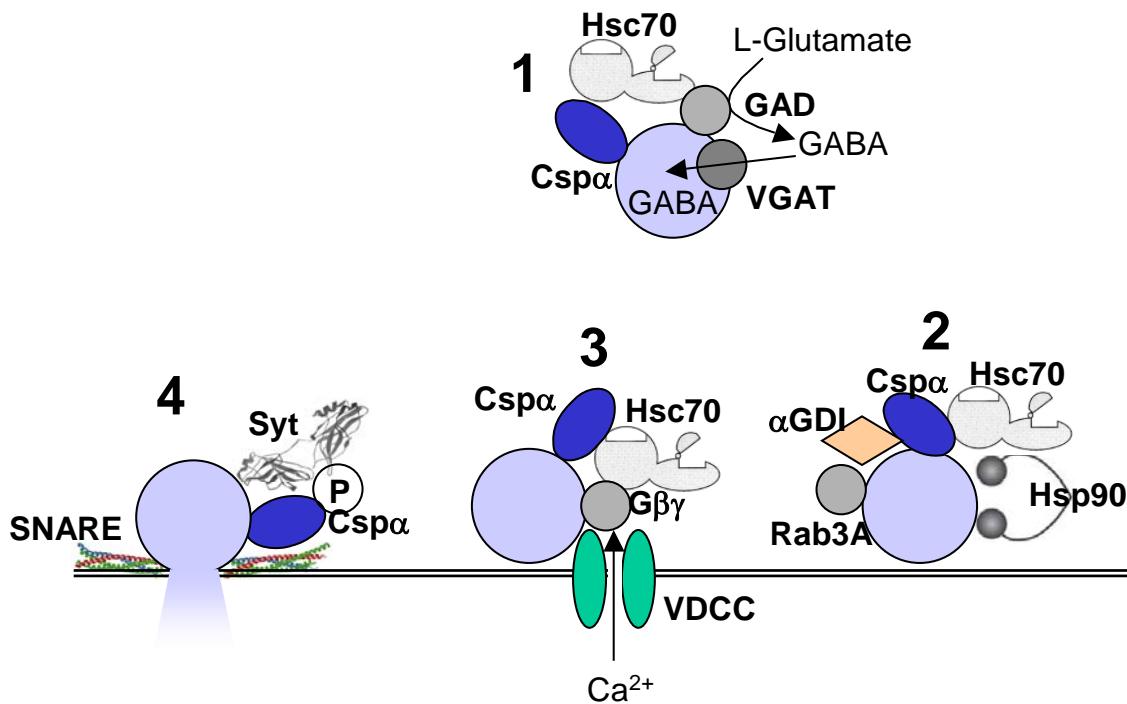


Figure i-18 : La Cspα agit à différents niveaux de la sécrétion régulée

La Cspα agit en coordonnant le couplage entre la synthèse du GABA à partir du glutamate par la GAD et son transport dans la vésicule synaptique par le VGAT (1). Elle joue aussi un rôle éventuel dans le *tethering* des vésicules via son implication dans le cycle de Rab3A par son interaction avec αGDI (2). Elle régule via les protéines Gβγ les canaux calciques de type N (3). Elle interagit avec le senseur calcique Syt1 et avec les SNARE Syntaxine1A et VAMP2 et elle régule l'ouverture du pore de fusion notamment par la phosphorylation du résidu Ser¹⁰ (4).

Finalement, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que le complexe trimérique Csp α /SGT/Hsc70 se retrouve au niveau des vésicules synaptiques. Etant donné que la surexpression de SGT dans des neurones en culture inhibe la neuroexocytose, les auteurs ont proposé un modèle selon lequel le complexe chaperon SGT/Csp α /Hsc70 serait fonctionnellement important dans la transmission synaptique, sans que sa fonction précise ne soit connue à ce jour (Tobaben et al., 2001). Ces mêmes auteurs ont identifié par la suite une nouvelle isoforme de SGT, appelée SGT β , principalement exprimée dans le cerveau (Tobaben et al., 2003). Toujours en utilisant la technique du double-hybride, ils ont pu caractériser que les résidus cystéines du domaine central de la Csp α sont nécessaires à l'interaction avec SGT β . En effet, la mutation de ces résidus en sérine abolit l'interaction (Tobaben et al., 2003).

IV.4.1.2 - Accrochage des vésicules

Il a déjà été vu que les protéines Rab sont impliquées dans les processus de trafic des vésicules vers leur destination, et dans l'accrochage (*tethering*) de ces vésicules à la membrane plasmique (voir partie II.3.2.3). Il existe de nombreuses isoformes des protéines Rab, et chacune d'entre elles est impliquée dans une étape particulière du trafic vésiculaire. Les protéines Rab liées au GDP sont recrutées sur les vésicules, puis l'échange de la molécule de GDP pour une molécule de GTP permet leur activation. L'hydrolyse du GTP en GDP permet de phosphoryler des substrats définis, et la protéine Rab liée au GDP est détachée de la vésicule puis maintenue cytosolique grâce au GDI (*GDP-dissociation inhibitor*). L'isoforme α GDI, spécifique du cerveau de rat, interagit de manière fonctionnelle avec le complexe chaperon Csp α /Hsc70/Hsp90 (Sakisaka et al., 2002) (fig. i-18). Suite à la réticulation covalente des complexes protéiques (qui permet de figer de manière stable ces complexes labiles), l'immunoprécipitation de α GDI a mis en évidence la présence d'un complexe Csp α /Hsc70/Hsp90/ α GDI localisé sur les vésicules synaptiques. La sécrétion de glutamate par les synaptosomes peut être induite par une stimulation directe par le calcium, après perméabilisation préalable de la membrane par la digitonine. Dans ces conditions, les auteurs ont mis en évidence que le complexe Csp α /Hsc70/Hsp90/ α GDI est décroché des vésicules synaptiques (Sakisaka et al., 2002). Ainsi, le complexe chaperon Csp α /Hsc70/Hsp90 permettrait de recruter α GDI sur la

vésicule synaptique à proximité de Rab-GDP, de manière à dissocier celle-ci de la vésicule et permettre son recyclage.

IV.4.1.3 - Recyclage des vésicules

La Csp α interagit avec la chaperonne Hsc70 via son domaine J et stimule son activité ATPasique. Etant donné que la chaperonne Hsc70 est impliquée dans le processus d'endocytose dépendant de la clathrine (voir partie II.2.1.2), plusieurs recherches ont été menées afin de montrer si la Csp α joue un rôle dans ce processus. L'utilisation de drosophiles KO pour la Csp α a permis de mettre en évidence qu'elle n'est pas impliquée dans le recyclage des vésicules synaptiques (Ranjan et al., 1998). Ceci a été mis en évidence en stimulant l'exocytose par du KCl. Le phénomène d'exocytose étant couplé à celui d'endocytose, l'incubation des cellules dans un milieu contenant du FM1-43 (composé soluble fluorescent), permet de charger les vésicules d'endocytose avec ce composé (Betz et al., 1996). Par ce moyen, une étude a montré que le mutant de drosophile KO pour Csp α possède un défaut dans l'exocytose des vésicules synaptiques (ce point sera discuté plus loin), mais pas dans le recyclage des vésicules après la fusion (Ranjan et al., 1998).

IV.4.1.4 - Régulation des canaux calciques

Depuis les premiers travaux qui ont permis de caractériser la Csp α chez la drosophile (Zinsmaier et al., 1990) et chez la torpille (Gundersen and Umbach, 1992) jusqu'aux travaux plus récents, il a été montré que la Csp α joue un rôle régulateur important des canaux calciques. La première évidence vient de l'équipe de Gundersen qui a mis en évidence que l'expression de la Csp α de torpille est nécessaire dans l'oocyte de xénope pour induire l'expression du canal calcique de type N (Gundersen and Umbach, 1992). De plus, l'utilisation d'ARNm antisens de la Csp α inhibe l'expression de ce canal. Ces auteurs ont considéré à l'époque que la Csp α pouvait être une sous-unité régulatrice du canal calcique neuronal.

L'étude de mutants de drosophile KO pour la Csp α a prouvé son implication dans le processus de neuroexocytose (Umbach et al., 1994; Zinsmaier et al., 1994). L'inactivation du gène de la Csp α entraîne un effet marqué sur la viabilité des mouches,

avec seulement 4% des mutants qui survivent jusqu'à l'âge adulte (Zinsmaier et al., 1994). Les mouches qui survivent présentent des mouvements non coordonnés, voire une paralysie quasi-complète. Étonnement, ces mutants sont sensibles à la température : ils survivent jusqu'à 5 jours à 22°C (température permissive), tandis qu'à 30°C leur durée de vie ne dépasse pas une heure (température non-permissive). Ces données mettent en évidence que la Csp α est une protéine essentielle à la viabilité des drosophiles. De nombreuses études électrophysiologiques ont été réalisées sur ces larves mutantes. Elles montrent un défaut dans la libération de neurotransmetteurs au niveau de la plaque motrice (Umbach et al., 1994). La neurosécrétion stimulée par dépolarisation est inhibée de 50% à la température permissive (Umbach et al., 1994). De plus, la neurotransmission est totalement abolie à la température non-permissive.

Un phénotype thermosensible est couramment obtenu avec l'expression de protéines mutantes chez la drosophile. C'est par exemple le cas des mutants *comatose* (mutation dans la protéine NSF) (Pallanck et al., 1995), *shibire* (mutation dans la dynamine) (Grigliatti et al., 1973; Kosaka and Ikeda, 1983) ou encore les mutants *stoned* (Grigliatti et al., 1973; Fergestad et al., 1999). La sensibilité à la chaleur de ces mutants reflète les problèmes de conformation des protéines altérées. Une chaleur excessive exacerbe les altérations de structure dues aux mutations ponctuelles et révèle le phénotype mutant. Dans le cas des mouches KO pour Csp α , le phénotype thermosensible obtenu n'est pas dû à l'expression d'un mutant thermosensible mais bien au KO de gène. La chaleur induit un stress important sur la machinerie de sécrétion, qui se révèle alors instable en absence de Csp α . Cela suggère un rôle protecteur de Csp α sur cette machinerie. La libération spontanée de neurotransmetteurs est aussi diminuée chez ces mutants, mais ce défaut est moins prononcé que celui sur la libération évoquée (Umbach et al., 1994). Il apparaît qu'il existe une certaine redondance entre les trois isoformes de Csp α de drosophile car leur surexpression permet de restaurer un phénotype sauvage chez ces mutants, bien que cet effet soit à terme délétère sur la survie des mouches (Nie et al., 1999).

Deux hypothèses ont été énoncées pour expliquer le défaut de neuroexocytose des mutants KO pour la Csp α . D'après la première, on peut envisager que ce KO a pour effet de rendre les vésicules synaptiques non-compétentes pour la fusion (par exemple un effet sur la genèse de ces vésicules, ou l'adressage de protéines clés sur la vésicule). Selon la seconde hypothèse, on peut envisager que l'absence de Csp α perturbe le couplage entre le

stimulus calcique et le déclenchement de l'exocytose. Pour trancher entre ces deux hypothèses, le venin de l'araignée Veuve Noire (*Latrodectus mactans*) est un outil très utile. En effet, l'exocytose des vésicules synaptiques peut être déclenchée par ce venin qui, en se liant à un récepteur spécifique, stimule la sécrétion de manière massive et indépendante de la dépolarisation (Ushkaryov et al., 2004). De même, l'utilisation de cellules perméabilisées par des ionophores calciques (comme la ionomycine) permet de s'affranchir de l'action des canaux calciques. Chez les drosophiles KO pour la $Csp\alpha$, la neuroexocytose peut être efficacement déclenchée par ces deux traitements (Umbach and Gundersen, 1997; Ranjan et al., 1998). Ces analyses montrent que les vésicules synaptiques chez ces mutants sont intactes et peuvent être libérées et successivement endocytées, mais qu'il existe un défaut dans le couplage stimulation/sécrétion. La mesure de la concentration en calcium intracellulaire grâce à des chélateurs fluorescents a montré que l'entrée de calcium dans les synapses des mouches mutantes est bloquée à la température non-permissive (Umbach et al., 1998). Ainsi, il a été proposé que la $Csp\alpha$ peut être impliquée dans le couplage entre l'entrée de calcium dans la cellule via le canal calcique (activé par dépolarisation) et l'exocytose évoquée. La $Csp\alpha$ pourrait assurer un lien physique pour ancrer la vésicule à proximité des canaux calciques, c'est à dire au niveau des sites actifs de l'exocytose (Mastrogiacono et al., 1994).

L'injection de $Csp\alpha$ recombinante dans des neurones de poulet a pour effet d'augmenter l'influx de calcium déclenché par dépolarisation (Chen et al., 2002). L'analyse électrophysiologique avancée menée par ces auteurs a montré que cette augmentation n'est pas due à un changement dans les propriétés cinétiques du canal, ni dans sa dépendance au voltage, ni à l'inhibition via des protéines G. L'application de $Csp\alpha$ recombinante permettrait de recruter des canaux calciques de type N normalement dormants.

Il existe un lien physique entre la $Csp\alpha$ et les canaux de type N. En effet, la $Csp\alpha$ facilite l'inhibition tonique du canal de type N via les protéines G hétérotrimériques (Magga et al., 2000). La régulation des canaux calciques par la $Csp\alpha$ est multiple. D'une part, le domaine J de $Csp\alpha$ interagit avec la sous-unité α des protéines G de manière dépendante de l'ATP, vraisemblablement via Hsc70 (Magga et al., 2000; Miller et al., 2003a). D'autre part, la partie C-terminale de la protéine recrute de manière directe et indépendante de l'ATP les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G (Magga et al., 2000; Miller et al., 2003a). Cela a été montré par interaction directe des protéines purifiées *in vitro*, par *pull-*

down à la GST, par co-immunoprécipitation ou encore par réticulation covalente à partir de neurones d'hippocampe. De plus, l'expression hétérologue de Csp α et du canal de type N montre que la Csp α induit une inhibition tonique du canal via les protéines G $\alpha\beta\gamma$ (Magga et al., 2000) (fig. i-18). Il est étonnant de constater que d'une part la Csp α semble avoir un effet direct activateur sur les canaux calciques N (Chen et al., 2002) et que d'autre part elle a un effet inhibiteur sur ces mêmes canaux via les protéines G (Magga et al., 2000; Miller et al., 2003a). Cette apparente discordance peut résulter dans le fait que la première étude utilise une Csp α recombinante de drosophile injectée dans des neurones de poulet (soit un système hétérologue), tandis que la deuxième étude a caractérisé ces interactions protéiques à partir du cerveau de rat.

Nous avons déjà vu que le canal calcique de type N n'est pas le seul à être impliqué dans la neuroexocytose. En effet, le canal P/Q est aussi fonctionnellement important dans ce processus (voir partie I.4.2). Chez le rat, la Csp α interagit de manière directe avec le domaine cytosolique compris entre les boucles II et III de la sous-unité $\alpha 1_A$ du VDCC de type P/Q (motif *synprint*) (Leveque et al., 1998). L'interaction détectée par liaison directe des protéines purifiées *in vitro* n'a pas pu être caractérisée par co-immunoprécipitation à partir du cerveau de rat. Cela peut s'expliquer par l'utilisation de détergent nécessaire pour extraire les protéines d'intérêt des membranes cellulaires. Les détergents peuvent entraîner la dissociation des complexes protéiques.

Il est indéniable aujourd'hui que la Csp α joue un rôle régulateur important dans les neurones sur les canaux calciques, qu'ils soient de type N ou de type P/Q. Néanmoins, il est difficile de faire la part des choses entre l'implication de la Csp α dans la régulation directe de l'activité du canal, de son trafic ou de son insertion dans la membrane plasmique. Ainsi, nous savons que la Csp α de torpille est nécessaire à l'expression d'un canal calcique de type N dans l'oocyte de xénope (Gundersen and Umbach, 1992).

Plusieurs observations indiquent également que la Csp α joue un rôle direct dans l'exocytose, indépendamment de la régulation des canaux calciques. Nous allons montrer dans cette prochaine partie que ces données, apparemment contradictoires, peuvent s'expliquer par des différences de fonctionnement entre différents types cellulaires.

IV.4.1.5 - Implication directe dans la fusion

Chez la drosophile, plusieurs types de synapses neuromusculaires sont caractérisées et constituent des modèles bien définis dans la littérature (Martinez-Padron and Ferrus, 1997). On peut distinguer les boutons synaptiques de faibles et moyennes dimensions, qui correspondent majoritairement à des synapses à glutamate, et des boutons synaptiques de grandes dimensions, qui contiennent des LDCV et qui correspondent à une sécrétion de neuropeptides (Gorczyca et al., 1993). Chez le mutant KO pour la Csp α , ces synapses peptidergiques présentent un influx calcique normal induit par dépolarisation (Morales et al., 1999), contrairement aux synapses de type neuronal (Umbach et al., 1998). Cela suggère que la Csp α n'agit pas comme un régulateur des canaux calciques dans tous les types cellulaires, et particulièrement pour l'exocytose des LDCV, et ceci même dans des neurones.

Chez les mammifères, des constats similaires peuvent être dressés. Dans les cellules β -pancréatiques, la surexpression transitoire de Csp α ou l'inhibition de son expression par une stratégie antisens induit une inhibition importante de la sécrétion d'insuline (Brown et al., 1998; Zhang et al., 1998a; Zhang et al., 1999). Il a été montré par mesures électrophysiologiques (Brown et al., 1998) ou sur cellules perméabilisées (Zhang et al., 1998a; Zhang et al., 1999) que cet effet inhibiteur n'est pas dû à la régulation des canaux calciques voltage-dépendants. De plus, des cellules PC12 qui surexpriment de manière stable la Csp α ne présentent pas d'altération de l'influx calcique déclenché par dépolarisation (Chamberlain and Burgoyne, 1998b). L'ensemble de ces données suggèrent fortement que la Csp α ne contrôle pas l'exocytose des LDCV via une régulation des canaux calciques.

Dans les cellules β -pancréatiques, la fonction co-chaperonne de la Csp α semble être primordiale à sa régulation de la sécrétion d'insuline. Ainsi, alors que la surexpression de la Csp α inhibe l'exocytose (voir plus haut), des mutations ponctuelles dans le motif HPD du domaine J (nécessaire à l'activation de Hsc70) réversent cette inhibition (fig. i-17B) (Zhang et al., 1999).

En utilisant la technique d'ampérométrie, qui permet la détection d'évènements de fusion individuels et l'analyse de leur cinétique, il a été démontré que la surexpression de la Csp α dans les cellules chromaffines a deux effets distincts sur l'exocytose des LDCV (Graham and Burgoyne, 2000). Tout d'abord, on peut observer une diminution du nombre

d'événements évoqués sur les cellules perméabilisées et stimulées par 10 μ M de calcium libre. Cette inhibition est similaire à celle observée dans les cellules β -pancréatiques (Brown et al., 1998; Zhang et al., 1999). Dans un second temps, l'analyse des paramètres cinétiques des événements de fusion restants montre une augmentation du temps de montée du pic et de la largeur du pic à mi-hauteur (Graham and Burgoyne, 2000). Cela reflète un ralentissement de l'événement de fusion, et peut être interprété comme une altération des étapes finales de l'exocytose : régulation du complexe SNARE ou du pore de fusion (fig. i-18). Plusieurs études ont été réalisées dans ce sens et ont montré que la Csp α interagit avec plusieurs protéines impliquées dans les étapes tardives de l'exocytose (fig. i-18).

Tout d'abord il a été mis en évidence, par co-immunoprécipitation, que la Csp α interagit avec la protéine SNARE VAMP2 dans des neurones de cerveau de rat (Leveque et al., 1998) et avec la Syntaxine 1A chez la drosophile (Nie et al., 1999). Cette dernière interaction a été caractérisée par co-immunoprécipitation, par interaction directe des protéines purifiées, mais également par évidence génétique. En effet, alors que la surexpression de Csp α induit un phénotype délétère, la surexpression simultanée de Syntaxine 1A rétablit un phénotype sauvage (Nie et al., 1999). Chez les mammifères, la Csp α interagit dans les adipocytes avec la Syntaxine 4 et *in vitro* avec la Syntaxine 1A (Chamberlain et al., 2001). Néanmoins, cette interaction n'a pas été retrouvée dans les neurones de mammifère (Leveque et al., 1998; Matos et al., 2000). La protéine Syntaxine est connue pour être peu structurée en solution (Misura et al., 2000) et est une protéine réputée « collante » (Fletcher et al., 2003). Des précautions doivent donc être prises quant à l'interprétation des expériences de liaison *in vitro* des protéines purifiées.

La Csp α peut être phosphorylée au niveau de son domaine N-terminal sur le résidu sérine 10 (Evans et al., 2001). Il a été montré que la PKA (Evans et al., 2001) et également la PKB/Akt (Evans et al., 2006) peuvent phosphoryler la Csp α *in vitro* mais aussi *in vivo*. Cette phosphorylation participe à la régulation de l'exocytose par la Csp α . En effet, la surexpression d'un mutant non phosphorylable de Csp α (mutation de la sérine 10 en alanine) altère les paramètres cinétiques des événements d'exocytose (Evans et al., 2001). Cela suggère que cette phosphorylation influe sur la régulation des étapes tardives de l'exocytose par Csp α . L'effet de cette phosphorylation sur l'exocytose pourrait être dû à une régulation d'interactions protéiques. En effet, il a été mis en évidence que l'interaction *in vitro* entre la Csp α et Syntaxine 1A est négativement régulée par la phosphorylation de la Csp α (Evans et al., 2001). De plus, une autre étude a montré que la Csp α interagit avec

le senseur calcique Synaptotagmine 1 dans les neurones et que cette interaction est inhibée par la phosphorylation de la Csp α (Evans and Morgan, 2002).

Plus récemment, une étude a suggéré une interaction entre la Csp α et SNAP25 dans les neurones, mais peu de données fonctionnelles existent à ce sujet (Chandra et al., 2005).

IV.4.2 - Neurodégénérescence et développement

Plusieurs études ont récemment montré que la Csp α joue un rôle important dans le développement embryonnaire et dans le maintien de l'activité synaptique, vraisemblablement grâce à son activité de co-chaperonne.

La protéine Huntingtine, dont le rôle physiologique n'est pas connu, est étudiée car des mutations dans la séquence de son gène conduisent au développement de la maladie neurodégénérative de Huntington. Ces mutations conduisent à l'ajout en C-terminal de la protéine d'un train de glutamine (de 36 à 250 répétitions selon les mutations) qui a pour effet d'induire la formation de corps d'inclusion à la surface des neurones, un des premiers symptômes de la maladie. Ce dépôt de corps d'inclusion entraîne à terme la mort neuronale. Il a été montré que la Huntingtine interagit dans les neurones avec la Csp α (Miller et al., 2003b). De plus, la forme mutante de la Huntingtine, mais pas la forme sauvage, séquestre la Csp α et lève l'inhibition tonique des canaux calciques de type N médiée par les protéines G hétérotrimériques (voir plus haut). Bien qu'aucun lien physiologique n'ait été fait entre cette levée d'inhibition et la maladie, il est intéressant d'observer que la forme mutante de la Huntingtine séquestre la co-chaperonne Csp α . En effet, plusieurs études suggèrent que le développement des maladies neurodégénératives par dépôts de plaques neurales impliquerait une telle séquestration des activités chaperonnes (Muchowski et al., 2000; Muchowski, 2002; Sakahira et al., 2002). La Csp α apparaît ainsi comme une cible potentielle thérapeutique pour traiter ces maladies.

La Csp α interagit de manière fonctionnelle avec le canal chlore CFTR (*cystic fibrosis conductance transmembrane regulator*). Le CFTR est une protéine dont une mutation est responsable du développement de la mucoviscidose (voir partie III.2.2). Il a déjà été vu que la Csp α est exprimée dans les cellules épithéliales mais elle ne semble pas être impliquée dans la sécrétion constitutive dans ces cellules (Gleave et al., 2001). Il a été mis en évidence par co-immunoprécipitation que la Csp α interagit avec le CFTR dans les

cellules épithéliales de la plèvre pulmonaire (Zhang et al., 2002). La localisation par immunofluorescence de la Csp α dans ces cellules a montré que l'interaction avec le CFTR a probablement lieu au niveau du réticulum endoplasmique. La co-expression des deux protéines dans des oocytes de xénope a mis en évidence que la Csp α est impliquée dans la maturation du CFTR, et plus particulièrement au niveau des nombreuses glycosylations de ce dernier.

La Csp α peut être phosphorylée sur le résidu Sérine 10 par la PKA (Evans et al., 2001) ou par la PBK/Akt (Evans et al., 2006). Le développement d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de Csp α a permis de caractériser un rôle potentiel de cette phosphorylation dans le développement embryonnaire de la souris. En effet, la proportion de Csp α phosphorylée varie entre différentes zones du cerveau, et présente également une régulation au cours du développement (Evans and Morgan, 2005). Cette étude a mis en évidence une nouvelle population de Csp α phosphorylée *in vivo* qui ne colocalise pas avec des marqueurs synaptiques au cours du développement précoce du cortex cérébral de l'embryon de souris. Ces données suggèrent un rôle important de la Csp α dans le développement embryonnaire précoce, vraisemblablement via la régulation de son état de phosphorylation.

La Csp α est aussi impliquée dans le développement de l'oreille interne. En effet, la Csp α est exprimée au niveau des cellules ciliées internes de la cochlée, et son taux d'expression est corrélé au développement de cette structure (Eybalin et al., 2002). Cela suggère donc un rôle important de la Csp α dans le développement embryonnaire de l'appareil auditif mais également dans la transmission du signal nerveux auditif au cerveau.

L'étude de souris KO a renforcé la notion d'un rôle important de la Csp α dans le développement embryonnaire. Contrairement aux mutants chez la drosophile (Zinsmaier et al., 1994), les souris KO pour la Csp α ne présentent pas un phénotype précoce léthal (Fernandez-Chacon et al., 2004). La transmission synaptique est normale, ainsi que les courants calciques présynaptiques via les canaux calciques N et P/Q chez les jeunes souris. Les premiers troubles surviennent à partir de 2 semaines après la naissance. Il s'installe un désordre sensori-moteur progressif. D'un point de vue comportemental, les souris KO perdent du poids, sont moins performantes dans les tests d'exploration et mettent plus de temps à se rétablir dans les tests d'équilibre. Elles présentent également des troubles au niveau des jonctions neuromusculaires. Dans la troisième semaine après la naissance, les souris KO entrent dans une phase léthargique mais peuvent toujours s'alimenter et bouger

quand elles sont stimulées. A partir de 30 jours après la naissance, les souris commencent à mourir rapidement, et aucune souris ne survie plus de 3 mois (Fernandez-Chacon et al., 2004). L'analyse morphologique des jonctions neuromusculaires montre une dégénérescence progressive des plaques motrices. L'analyse électrophysiologique des jonctions synaptiques montre une réduction et une désynchronisation de la transmission synaptique à partir de la deuxième semaine de vie des souris KO. De plus, l'étude morphologique de ces jonctions synaptiques montre des caractéristiques de neurodégénérescence importante.

La même équipe a montré que l'interaction entre la Csp α et la protéine α -Synucleine prévient ces troubles synaptiques chez les souris KO pour Csp α (Chandra et al., 2005). La α -Synucleine est une protéine périphérique des vésicules synaptiques. Des mutations dans le gène codant pour cette protéine entraîne la maladie de Parkinson et des corps d'inclusion contenant la α -Synucleine sont retrouvés dans la maladie d'Alzheimer (Norris et al., 2004). Néanmoins, le rôle physiologique de la α -Synucleine reste inconnu. Chandra et coll. ont montré que l'expression transgénique de la α -Synucleine abolit la létalité et les effets neurodégénératifs causés par la délétion du gène csp α (Chandra et al., 2005). Néanmoins, cette étude montre que la α -Synucleine ne se substitue pas à la Csp α , mais agit de manière indépendante. Cela montre pour la première fois un rôle important de cette protéine dans le maintien de l'activité synaptique. De plus, cette étude a montré que les souris KO pour la Csp α présentent une altération dans la formation du complexe SNARE neuronal. En effet, la quantification des complexes SNARE résistants au SDS (donc fonctionnels dans l'exocytose – voir partie II.3.1) montre une réduction de la quantité de ces complexes chez les souris KO pour Csp α . De plus, l'expression de la protéine SNARE SNAP25 est réduite de 30% chez ces souris, de même que Hsc70. Les auteurs ont également montré par *pull-down* à la GST que SNAP25 interagit avec Csp α . Néanmoins, ils n'ont pu retrouver par co-immunoprécipitation ni cette interaction, ni d'autres décrites (VAMP2, Syntaxine1A).

Objectifs du travail

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à la *Cysteine-string protein* (Csp), qui est une protéine co-chaperonne localisée sur les LDCV dans les cellules β -pancréatiques. Afin de préciser le rôle de cette protéine dans la sécrétion d'insuline, nous avons recherché ses partenaires protéiques dans les cellules β . Cette protéine semblant être particulièrement impliquée les étapes tardives de la sécrétion, nous nous sommes concentrés sur les protéines de l'exocytose connues comme régulant ces étapes.

En utilisant comme modèle différentes lignées cellulaires établies, nous avons pu caractériser de nouveaux partenaires protéiques de la Csp, en combinant différentes techniques biochimiques (*pull-down* à la GST, réticulation covalente, immunoprécipitation).

Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation fonctionnelle des différents domaines de la Csp α dans les cellules β . Nous avons ainsi mis en évidence que son domaine C-terminal est nécessaire à l'interaction avec la protéine VAMP2, et qu'il est responsable de l'homodimérisation de la Csp α .

Dans une deuxième étude, nous nous sommes intéressés à une isoforme de Csp, récemment identifiée : la Csp β . Nous avons réalisé la première étude biochimique la concernant. Nous avons montré que, contrairement à la Csp α , l'isoforme Csp β , produite dans les cellules β -pancréatiques, l'est majoritairement sous forme non-palmitoylée. Nous avons également montré que les propriétés intrinsèques des Csp sont suffisantes pour expliquer leur ancrage dans les membranes cellulaires, mais que leur association stable avec la bicouche lipidique nécessite la machinerie cellulaire.

Dans une troisième partie, nous avons mis en évidence que la Csp α interagit avec la protéine SNAP25 dans les cellules β -pancréatiques, de manière indirecte. Nos résultats, encore préliminaires, suggèrent que le senseur calcique Synaptotagmine 9 pourrait être l'intermédiaire nécessaire à cette interaction.

L'ensemble de ce travail de thèse contribue à améliorer la connaissance globale du rôle de la Csp dans la sécrétion d'insuline ainsi que les connaissances fondamentales sur certaines propriétés biophysiques de cette protéine.

Résultats – Partie I

*The variable C-terminus of Cysteine string proteins
modulates exocytosis and protein-protein interactions*

INTRODUCTION

L'hormone peptidique insuline est stockée dans les vésicules larges à cœur dense (*large dense core vesicles*, LDCV) des cellules β -pancréatiques et libérée selon le processus finement régulé d'exocytose. Selon l'hypothèse actuelle, les protéines SNARE (*soluble NFS attachment receptor*) constituent le cœur de la machinerie nécessaire à l'exocytose, et cela dans de nombreux systèmes sécréteurs (neurones, cellules β -pancréatiques, cellules chromaffines). Néanmoins, de nombreuses autres protéines sont nécessaires au bon déroulement de l'exocytose.

Les protéines Csp (*cysteine string proteins*) ont été initialement décrites chez la drosophile comme étant des protéines portées par les vésicules synaptiques et impliquées dans la neurotransmission. Chez les mammifères, trois gènes différents codant pour des Csp sont connus : $csp\alpha$ et ses deux variants d'épissage Csp1 et Csp2 ; $csp\beta$ et $csp\gamma$. Le variant Csp1 est exprimé et localisé à la surface des vésicules synaptiques et des LDCV dans des cellules neuroendocrines et endocrines comme les cellules β -pancréatiques.

Plusieurs interactions protéiques impliquant la Csp1 ont été décrites. La Csp1 interagit directement avec le senseur calcique de la neuroexocytose Synaptotagmine 1, et cette interaction est régulée par la phosphorylation du résidu sérine 10 de la Csp. Elle interagit également avec le canal calcique de type P/Q, avec la chaperonne Hsp90, avec la chaperonne Hsc70 via son domaine J, et avec les protéines G hétérotrimériques. De plus, un complexe chaperon trimérique impliqué dans la neurosécrétion composé de Hsc70, Csp1 et SGT (*small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein*) a été caractérisé. L'interaction entre Csp1 et SGT est principalement basée sur le domaine riche en cystéines de la Csp1. Des données contradictoires ont été rapportées sur l'interaction de la Csp1 avec la protéine SNARE Syntaxine.

Ces interactions protéiques ont été principalement décrites dans un système de neuroexocytose. Il n'est pas clair si elles s'appliquent aussi à un système endocrine comme les cellules β -pancréatiques. La Csp étant impliquée dans l'exocytose des LDVC, les cellules β -pancréatiques constituent un bon modèle pour étudier le rôle de cette protéine dans ce processus complexe.

The Variable C-Terminus of Cysteine String Proteins Modulates Exocytosis and Protein–Protein Interactions[†]

Frédéric Boal,^{‡,§} Hui Zhang,^{§,||} Céline Tessier,[‡] Pier Scotti,[‡] and Jochen Lang^{*,‡}

Institut Européen de Chimie et Biologie, Pôle Biologie Cellulaire et Moléculaire, JE 2390, 33607 Pessac/Bordeaux, France, and Department of Cell Biology and Physiology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania 15261

Received July 1, 2004; Revised Manuscript Received September 28, 2004

ABSTRACT: Cysteine string proteins (Csps) are vesicle proteins involved in neurotransmission and hormone exocytosis. They are composed of distinct domains: a variable N-terminus, a J-domain followed by a linker region, a cysteine-rich string, and a C-terminus which diverges among isoforms. Their precise function and interactions are not fully understood. Using insulin exocytosis as a model, we show that the linker region and the C-terminus, but not the variable N-terminus, regulate overall secretion. Moreover, endogenous Csp1 binds in a calcium-dependent manner to monomeric VAMP2, and this interaction requires the C-terminus of Csp. The interaction is isoform specific as recombinant Csp1 binds VAMP1 and VAMP7, but not VAMP3. Cross-linking in permeabilized clonal β -cells revealed homodimerization of Csp which is stimulated by Ca^{2+} and again modulated by the variant C-terminus. Our data suggest that both interactions of Csp occur during exocytosis and may explain the effect of the variant C-terminus of this chaperon protein on peptide hormone secretion.

The peptide hormone insulin is stored in large dense core vesicles in pancreatic β -cells and released by exocytosis, a multistage process involving transport of vesicles to the plasma membrane, their docking, their priming, and finally their fusion with the plasma membrane (1). The SNARE¹ hypothesis has been proposed as a unifying model to account in molecular terms for membrane docking and/or fusion of exocytotic vesicles in different secretory systems (2, 3). Regulated exocytosis requires proteins in addition to this core complex to ensure controlled hormone or neurotransmitter release coupled to the appropriate stimulus. The cysteine string proteins (Csps) are one of the components involved and probably act as molecular chaperones at a late stage, though their exact function remains unknown (4).

Csps were originally identified as synaptic vesicle proteins in *Drosophila* implicated in neurotransmitter release (5, 6). Csps have recently been classified as members of DnaJ homologue subfamily C, and in mammals, several isoforms have been described: Csp1 and Csp2, which are generated by alternative splicing and differ only in their C-terminus (7), as well as the predicted isoforms Csp- β and Csp- γ (4). Csp1 is expressed on synaptic vesicles and on large dense

core vesicles (LDCVs) in mammalian neuroendocrine and in endocrine cells such as the pancreatic β -cells (7–10). Csps contain several domains: the N-terminal J-domain, which stimulates the ATPase activity of chaperones such as Hsc70 (11, 12), a functionally defined linker region (13), and the hydrophobic cysteine string region, containing a dense cluster of 11–15 mostly acylated cysteine residues (14). Whereas these domains are highly conserved throughout evolution, the extreme N-terminus (amino acids 1–13) and the C-terminus are variable.

Several proteins interacting with Csp have been described, and some binding regions have been mapped. Csp interacts directly with synaptotagmin I, upon the phosphorylation of a serine at the N-terminus of Csp (15), with the P/Q-type Ca^{2+} channels (16) and the chaperone Hsp90 (17), via its J-domain with Hsc70 (11–13) and the α -subunit of heterotrimeric G-proteins (18). G-Protein β -subunits bind the C-terminal portion of Csp, including the cysteine string and the C-terminus (19). Moreover, a trimeric complex of Csp, Hsc70, and the cochaperone SGT has been characterized (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein), wherein SGT interacts with the cysteine string motif (20, 21). Divergent data have been reported for the interaction between Csp1 and the SNARE protein syntaxin (16, 22–24).

These interactions have been observed mainly in synaptic vesicle preparations. It is not clear whether they also apply to large dense core vesicles (LDCVs) and whether they occur during Ca^{2+} stimulation of exocytosis in cellular systems. β -cells provide a convenient model as we and others have previously demonstrated the role of Csp in the exocytosis of LDCVs independent of regulation of Ca^{2+} fluxes (9, 10). We have now examined the effect of different truncations

[†] This work was supported by grants from the Region of Aquitaine, the University of Bordeaux I (BQR2002/3), and the ACI (Drab).

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: j.lang@iecb-polytechnique.u-bordeaux.fr.

[‡] Pôle Biologie Cellulaire et Moléculaire, JE 2390.

[§] Both authors contributed equally to the work.

^{||} University of Pittsburgh School of Medicine.

¹ Abbreviations: Csp, cysteine string protein; DMSO, dimethyl sulfoxide; DSS, disuccinimidyl suberate; GST, glutathione S-transferase; hCB, human cellubrevin; LDCV, large dense core vesicle; SNAP-23, synaptosome-associated protein of 23 kDa; SNAP-25, synaptosome-associated protein of 25 kDa; SNARE, soluble NSF attachment receptor; VAMP, vesicle-associated membrane protein.

on exocytosis and defined two protein–protein interactions. Our results indicate that the variable C-terminus modulates interactions with the SNARE protein VAMP and homodimerization during exocytosis of LDCVs.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. The following reagents were used: glutathione–Sephadex 4B (Pharmacia), protein A–agarose (VectorLab), protein G–sephadex 4B beads and isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma), leupeptin semisulfate and aprotinin (Sigma), lysozyme (Roche), fluorophore-coupled second antibodies (Jackson Laboratories), and TNT *in vitro* transcription and translation system (Promega). All cross-linking reagents were obtained from Pierce. Polyclonal rabbit anti-Csp1 antiserum was raised against recombinant Csp1 (7). In addition, the commercial anti-CSP antibody A1567 (Chemicon) directed against soluble domains was used. Csp1 and Csp2 cDNA sequences were cloned from bovine adrenal chromaffin cells and ligated into the *Bam*HI–*Eco*RI sites of pcDNA3 (Invitrogen), pcDNA3-myc, pcDNA3-2myc, or pCMV-Tag (Stratagene). Streptolysin O was prepared and purified as described previously (25). cDNAs encoding the cytoplasmic domains of human VAMP3 (amino acids 1–71) and VAMP7 (amino acids 1–179 in pGEX-2T), SNAP-23 (in pcDNA3), and polyclonal rabbit antibody against VAMP7 (26) were generously provided by T. Galli (Paris, France). The plasmid encoding GST–VAMP2 (amino acids 1–96) was kindly provided by R. Regazzi (Lausanne, Switzerland). The following monoclonal antibodies were used: anti-VAMP (Synaptic Systems, Goettingen, Germany), anti-syntaxin 1 (anti-HPC-1, Sigma), anti-insulin (K36aC10, Sigma), and anti-synaptophysin (SVP38, Roche). Monoclonal anti-myc antibodies were produced from 9E10 myeloma cell culture medium.

Molecular Cloning. The *Bam*HI–*Eco*RI fragments of wild-type Csp1, wild-type Csp2, and the point mutants Csp1H43Q and Csp1E93V were excised from pcDNA3 and subcloned into the corresponding sites of the pGEX-2T or pQE30-Csp vector. Constructions of Csp point mutants have been described previously (13). Csp deletion mutants were constructed by PCR using the following primers: Csp1_{14–198} or Csp2_{14–167} plus strand (TCGGATCCGAGTCCCTGTAC-CATGTACTGG) and minus strand (ACGAATTCATT-TAGTTGAACCCGTCGGTGTG), Csp1_{1–82} and Csp1_{1–110} plus strand (AAGGATCCATGGCTGACCAGAGGCAGCG), Csp1_{1–82} minus strand (AGGAATTCACAGTGAGCCG-TACTGTGTCG), and Csp1_{1–110} minus strand (AGGAATTCACAGGGCCTGGCCCACCAGC); *Bam*HI or *Eco*RI restriction sites are underlined. The Csp1_{1–110} with the E93V mutation was obtained using Csp1E93V as a template. The PCR products were digested with *Bam*HI and *Eco*RI, purified from 1.5% agarose gels, and inserted into the corresponding sites of a pcDNA3-myc vector. Fragments containing Csp1_{83–198} and Csp1_{137–198} were digested from pQE-30 vectors (12) and inserted in frame into the pcDNA3-myc vector. All constructs were verified by sequencing of both strands. 2myc-Csp was obtained by excision of myc-Csp1 and its ligation into a myc-epitope encoding pcDNA3 plasmid. Flag-Csp constructs were obtained by in-frame insertion of Csp fragments into the appropriate pCMV-Tag plasmid (Stratagene).

Cell Culture, Transient Transfection, Secretion, and Immunohistochemistry. Cell culture, transient transfection, and secretion assays were performed as described previously (13, 27). For immunofluorescence, HIT-T15 cells were seeded on glass coverslips. Two days later, cells were transfected with the indicated constructs as described previously. Cell permeabilization with streptolysin O, immunocytochemistry, and confocal microscopy were performed as described previously (13). Imaging of transiently transfected cells was performed on an LSM 510 Meta confocal laser microscope (Zeiss) with a 100 \times objective, and quantitative image analysis was carried out using the incorporated software after thresholding and creation of a mask. To determine expression levels of transiently expressed proteins by immunoblots, cells were detached 48 h after transfection by incubation for 5 min at 37 °C with PBS containing 10 mM EDTA, centrifuged at 4 °C and 14000g for 10 min, resuspended in ice-cold PBS-EDTA, sonicated, and again centrifuged for 30 min at 4 °C and 14000g. Samples were applied on 12% SDS–PAGE or on Tricine gels (28) and transferred to a PVDF membrane. Subsequently, blots were incubated with primary antibodies (anti-myc antibody, 1:20 dilution; anti-Csp1 antibody, 1:3000 dilution; AB1576, 1:5000), and antibody binding was detected by chemiluminescence (Roche).

Immunoprecipitation and Binding Assays. Polyclonal anti-Csp1 antibody (20 μ L), monoclonal anti-VAMP2 antibody (20 μ L), or nonimmunoreactive IgG₁ (20 μ L) was immobilized to 100 μ L of protein A–Sephadex beads by incubation at 4 °C overnight in intracellular buffer A [140 mM L-glutamic acid/monopotassium salt, 5 mM NaCl, 7 mM MgSO₄, and 20 mM HEPES (pH 7)] in the presence of 10 mM EGTA and 0.1 μ M free Ca²⁺ (low calcium, LC) or 10 μ M free Ca²⁺ (high calcium, HC) (27). Subsequently, the antibody-coupled beads were washed three times with buffer A containing 5 mM ATP. Crude membranes (50 μ L, 200 μ g) from HIT-T15 cells were extracted with 1% Triton X-100 in buffer A in the presence of LC or HC for 1 h, followed by centrifugation at 15000g for 1 h. The resulting supernatant was mixed with antibody-coupled protein A–Sephadex beads at 4 °C and incubated overnight on a shaking platform. Subsequently, the mixture was centrifuged at 15000g for 5 min, and the pellets were washed three times with 1 mL of intracellular buffer containing the corresponding concentration of Ca²⁺. Finally, pellets were resuspended in 100 μ L of SDS–PAGE sample buffer. After the samples had been heated for 5 min at 100 °C, 60 μ L was analyzed by Western blotting probed with antibodies against Csp1, syntaxin, synaptophysin, or VAMP2. All procedures for immunoprecipitation were carried out at 4 °C. Signals were quantified as described in Cross-Linking.

Recombinant glutathione S-transferase (GST) or His₆ epitope-tagged fusion proteins (Csp1, Csp2, Csp1H43Q, Csp1E93V, VAMP2, TI-VAMP, hCB, and GST) were purified according to the protocol provided by the manufacturer (Pharmacia and Qiagen, Courtaboeuf, France), followed by dialysis for 48 h in buffer A with at least four changes of buffer. Purification of these proteins was verified by Coomassie blue staining of 12% SDS–PAGE gels, and the specificity of recombinant GST–Csp1 and VAMP2 was tested by Western blotting. [³⁵S]Csp1, [³⁵S]VAMP, and [³⁵S]-SNAP-23 were synthesized by coupled transcription and translation using the TNT *in vitro* system (Promega). Free

[³⁵S]cysteine or [³⁵S]methionine was removed by using Micro-10 columns (Amicon Inc., Beverly, MA).

Dialyzed GST or GST fusion proteins (10 μ g) were coupled to 30 μ L of glutathione–Sepharose beads (1:1 suspension in buffer A) and incubated overnight with 1×10^6 dpm of ³⁵S-labeled probes in buffer A containing 0.25% BSA at 4 °C. The total reaction volume was 400 μ L. Subsequently, supernatants were separated by centrifugation for 5 min at 4 °C (20000g), and the beads were washed twice with 1 mL of intracellular buffer containing 0.5% BSA and once with intracellular buffer without BSA. Beads were resuspended in 80 μ L of SDS–PAGE sample buffer, boiled for 3 min, and briefly centrifuged. The resulting supernatant (8 μ L) was applied for scintillation counting (duplicates), and 60 μ L was separated on a 12% SDS–PAGE gel followed by autoradiography of the dried gels.

Cross-Linking. Cells were detached with Krebs Ringer buffer (KRB) [125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 25 mM Hepes, 0.4 mM EGTA, 5 mM glucose, and 0.1% BSA (pH 7.4)] containing 10 mM EDTA at 37 °C, centrifuged (for 5 min at 2000g and 4 °C), resuspended in LC buffer, and permeabilized by the addition of streptolysin O for 5 min at 37 °C. Permeabilization was controlled by Trypan Blue uptake. The permeabilized cell suspension was divided into aliquots, centrifuged, and resuspended with the corresponding intracellular buffers described above except that KCl instead of potassium glutamate was used. Bismaleimido-hexane (BMH, Pierce) and disuccinimidyl suberate (DSS, Pierce) were prepared in DMSO at a concentration of 20 mM. BS3 [bis(sulfosuccinimidyl) suberate, Pierce], the water soluble analogue of DSS, was prepared in water. Cross-linking was initiated by the addition of 1 mM (final concentration) cross-linker, or a corresponding amount of DMSO (670 μ M), for 15 min at 37 °C. Cross-linking was stopped by the further addition of 0.1 mM glycine (final concentration) at pH 8 for 15 min at 4 °C. Proteins were subsequently solubilized using 1% Triton X-100 for 15 min at 4 °C followed by sonication (three 10 s pulses). Samples were centrifuged at 15000g (20 min at 4 °C) and supernatants diluted in SDS–PAGE sample buffer prior to electrophoresis and immunoblotting. For immunoprecipitations from cells transfected with plasmids encoding 2mycCsp1 or Csp1, supernatants were incubated overnight at 4 °C with a monoclonal anti-myc antibody after Triton X-100 extraction and centrifugation. Samples were subsequently incubated with protein G–Sepharose beads for 2 h at 4 °C, and the beads were washed four times with 600 μ L of LC buffer prior to being resuspended in 60 μ L of SDS–PAGE sample buffer and further analyzed by electrophoresis and immunoblotting.

Signals were imaged and quantified (FluorChem version 2.00, Alpha Innotech Corp.), and the linearity of the signal was tested for each membrane using different exposure times. The amount of dimerized Csp was normalized against the amount of Csp in the absence of a cross-linker, but in the presence of DMSO, which corresponds to the total initial amount of Csp present in the sample.

RESULTS

The Extreme N-Terminus of Csp Does Not Alter the Total Amount of Insulin Release. The extreme N-terminus varies

considerably among the different Csp isoforms known or deduced in humans and mice. We first determined the subcellular distribution of full-length and N-terminally truncated Csps by transient expression in hamster insulinoma HIT-T15 cells. The constructs that were used were tagged with an N-terminal myc epitope to distinguish the proteins overexpressed in a subpopulation of cells from endogenous proteins present in all cells (Figure 1). Confocal immunocytochemistry demonstrates that both Csp1 and Csp2 as well as their N-terminally truncated forms (Csp1_{14–198} and Csp2_{14–167}, respectively) colocalize to a large extent with insulin as a marker of LDCVs. Detailed statistical image analysis revealed that 89–92% of pixels from insulin and myc signals of different Csp constructs colocalize, except for mycCsp2 for which only 78% coincided ($n = 9–14$; $2p < 0.05$). However, this difference was no longer apparent when taking into account either pixel intensities in colocalization or correlations between channels, the latter ranging from 0.75 ± 0.09 to 0.85 ± 0.03 for the different constructs. The data therefore indicate that the N-terminus is not required for correct targeting.

Prior to examination of the effects on hormone exocytosis, protein expression levels were compared by Western blotting of homogenates from cotransfected cells using either an anti-Csp1 antibody or an anti-myc antibody (Figure 2A). The anti-Csp1 antibody revealed a band of approximately 35 kDa in transfected as well as control cells indicating the presence of endogenous Csp1. Cotransfection with myc-tagged Csp1 or Csp1_{14–198} constructs resulted in the appearance of a second band with a slightly higher molecular weight, as would be expected for the myc-tagged proteins, and of comparable intensities as detected by the polyclonal anti-Csp1 antibody. Since the antibody is specific for Csp1, only endogenous Csp1 was visualized after coexpression of Csp2 constructs. The anti-myc antibody did not reveal any staining in the controls, but stained corresponding bands in homogenates from transiently transfected cells. Interestingly, both myc-tagged N-terminally truncated Csps stained to a lesser degree than the full-length protein using the anti-myc antibody, whereas the anti-Csp1 antibody recognized myc-Csp1 and myc-Csp1_{14–198} to the same extent. This indicates a possible influence of the adjacent amino acids in the recognition of the myc epitope. To verify this observation, we have repeated the experiments using in addition a distinct commercial anti-Csp antibody (A1567) directed against the soluble domains of the protein (Figure 2B). Endogenous Csp, myc-tagged Csp1, and myc-tagged Csp1_{14–198} migrate at different distances, excluding the possibility that overexpression of endogenous Csp1 may have taken place. Both anti-Csp antibodies recognized myc-Csp1 and myc-Csp1_{14–198} to the same extent. In contrast, only a faint signal was detected by the anti-myc antibody in the case of myc-Csp1_{14–198}. Note also that in cells overexpressing myc-Csps the monoclonal anti-myc antibody recognizes a faint band migrating slightly faster than the major band and comigrating with endogenous Csp1. This signal corresponds to nonacylated myc-Csp1 and slightly enhances the minor signal in blots incubated with the polyclonal antibodies. A similar observation concerning the reactivity of a myc epitope has been reported for another membrane protein (29). It is therefore reasonable to assume that Csp2 and Csp2_{14–167} were expressed at comparable levels. Like immunoblots using the anti-Csp1 antibody, an

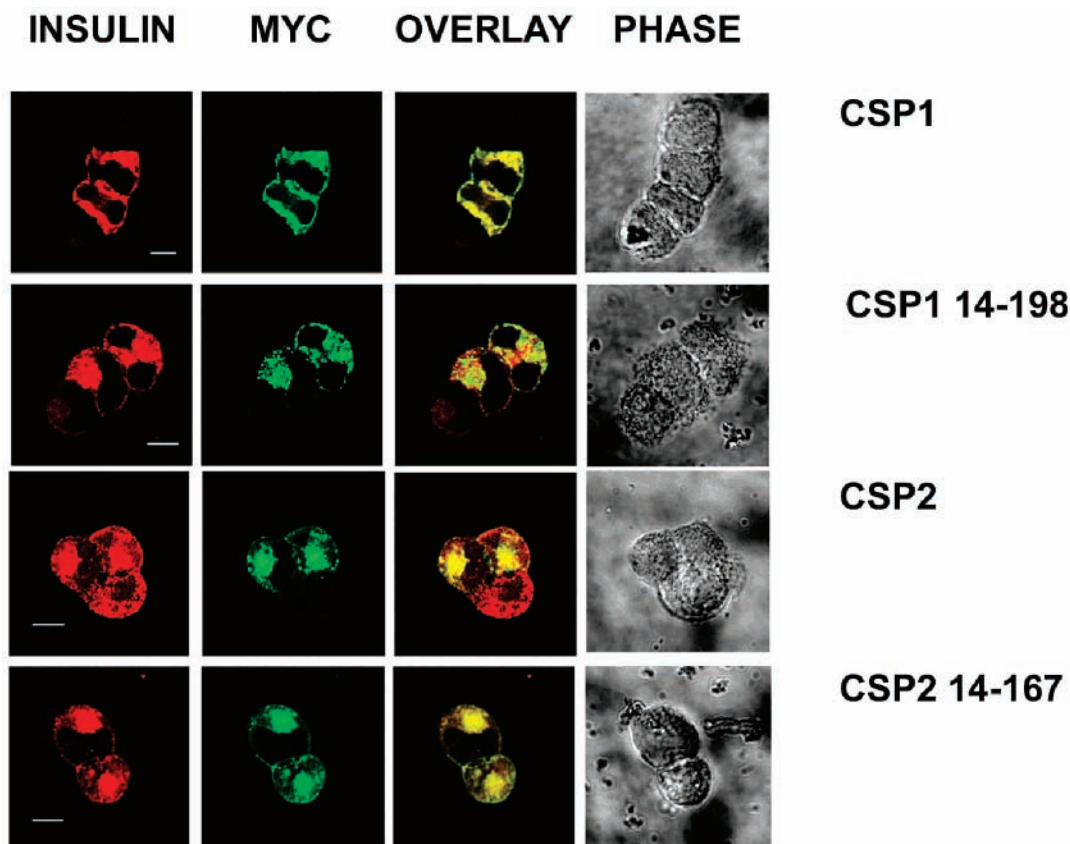


FIGURE 1: Localization of wild-type and N-terminally truncated Csps upon expression in insulin-secreting HIT-T15 cells. Cells were seeded on glass coverslips and transiently cotransfected with the indicated constructs. Two days later, cells were double-stained with a polyclonal anti-insulin antibody (insulin) and a monoclonal anti-myc antibody (myc). Insulin staining was detected with a rhodamine-conjugated anti-guinea pig IgG, and immunostaining of myc-Csps was revealed by fluorescein-coupled anti-mouse IgG.

additional band of 33 or 27 kDa appeared for Csp1 or Csp2, respectively. These bands represent most likely a minor amount of nonpalmitoylated Csps.

To test for a putative function in exocytosis, we resorted to a well-established transient cotransfection system which employs a plasmid encoding human preproinsulin (phINS) as a reporter gene. The release of the resulting insulin split product, human insulin C-peptide, reliably reflects peptide hormone release from cotransfected cells only. Cotransfected HIT-T15 cells were exposed to Krebs Ringer buffer alone or stimulated by 50 mM KCl (Figure 2 C), which causes a depolarization-induced Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels. As reported previously, overexpression of full-length Csp1 or Csp2 results in a profound inhibition of stimulated hormone release as compared to control cotransfections using pcDNA3. This effect is most likely due to scavenging of other proteins required for exocytosis. Note that only stimulated, but not basal, levels of insulin C-peptide release were altered, which is in line with the proposed specific role of Csps during stimulated exocytosis only. Transient expression of Csp1₁₄₋₁₉₈ and Csp2₁₄₋₁₆₇ inhibited the release of human C-peptide to the same extent as full-length constructs. Therefore, the first 13 amino acids at the N-terminus of Csps are not important for membrane association or for overall insulin release as measured by biochemical methods.

Effect of C- and N-Terminal Truncations of Csp on Localization and Exocytosis. Csp binds a number of proteins relevant to exocytosis or its regulation, and the corresponding

domains have been partially mapped. As the precise residues involved in interaction were in most cases unknown, we used truncated forms of Csp to evaluate their effect in insulin exocytosis. We employed constructs (see Figure 3) which encompass either full-length Csp, only the J-domain and the variable N-terminus (Csp₁₋₈₂), the N-terminal part including the linker region (Csp₁₋₁₁₀), or the C-terminal half of the protein (Csp₁₈₃₋₁₉₈). All these constructs were tagged with an N-terminal myc epitope to allow selective detection in transfected cells.

Expression of only the N-terminus and the J-domain common to all mammalian Csps (Csp₁₋₈₂, Figure 3) in HIT-T15 cells resulted in uniform staining of the cell, except for the nucleus, which is indicative of a cytosolic distribution. In contrast, expression of Csp containing the J-domain including the linker region (Csp₁₋₁₁₀) partially colocalized with insulin-containing secretory granules, and this was not altered by the E93V mutation, a position important for Csp action (13). Expression of the C-terminal half of Csp1 (Csp₁₈₃₋₁₉₈, Figure 3) or of Csp2 (Csp₂₈₃₋₁₆₇, data not shown) resulted in a granular pattern, but colocalization was observed to a lesser extent than for wild-type Csp. The levels of expression were compared in immunoblots using Tricine gels to resolve the truncated peptides with low molecular weights (Figure 4, top panel). The anti-myc antibody exhibits non-specific reactions with 43 and 29 kDa bands in homogenates from nontransfected cells (Figure 4, top panel, CON). However, truncated peptides migrated at the expected molecular weights but were expressed to a lower extent than

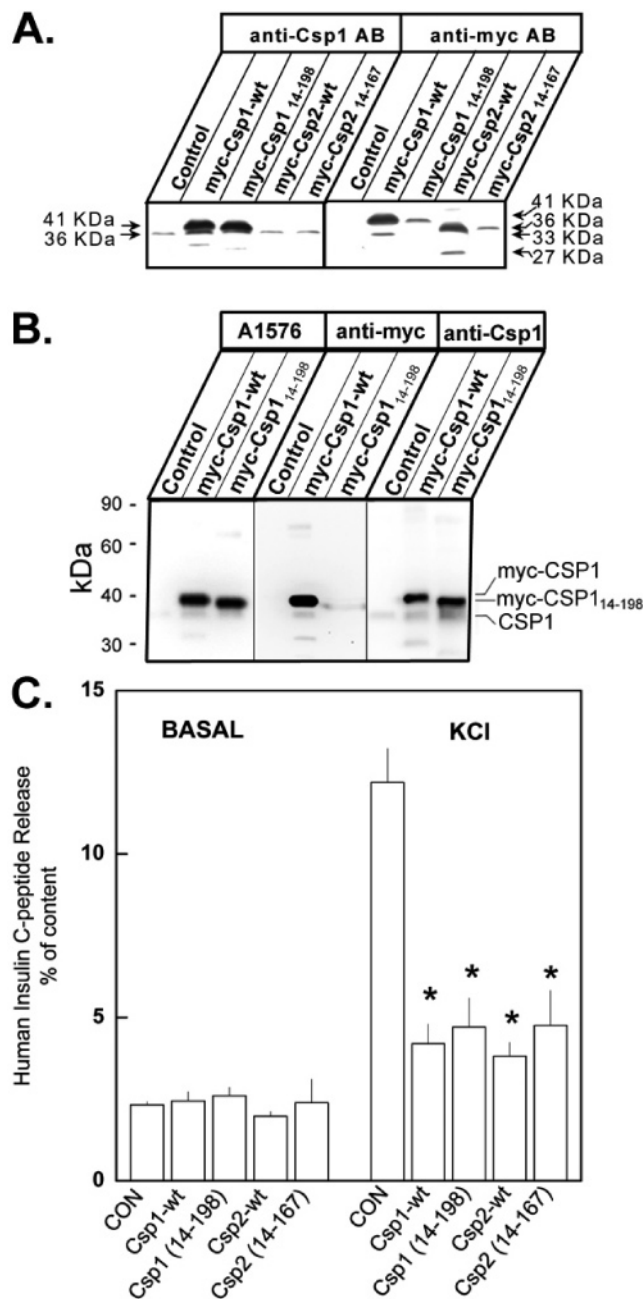


FIGURE 2: Expression and regulation of insulin secretion by full-length Csp and N-terminal deletion mutants. HIT-T15 cells were transiently cotransfected with plasmids encoding human preproinsulin and with pcDNA3 vector (control, CON) or with pcDNA3 encoding Csp or indicated N-terminal truncations of Csp1 or Csp2. Two days later, cells were analyzed. (A and B) Immunoblot analysis using 40 μ g of proteins/lane separated on a 12% mini-SDS-PAGE gel, transferred to PVDF membranes, and incubated with the indicated antibodies. (C) Cells were washed and kept in Krebs Ringer buffer (KRB) alone (basal) or stimulated by the addition of 50 mM KCl (KCl). Human insulin C-peptide release, reporting secretion from cotransfected cells, was assessed with an ELISA. $N = 6-10$ from at least three independent experiments. An asterisk means $2p < 0.05$ as compared to control.

full-length Csp. Comparable amounts were detected by anti-myc antibodies for Csp₈₃₋₁₉₈ (20 kDa), Csp₁₋₁₁₀ (15 kDa), Csp₁₋₁₁₀E93V (15 kDa), Csp₈₃₋₁₉₈, Csp₁₋₁₁₀, and Csp₁₋₁₁₀-E93V, whereas only minor amounts of Csp₁₋₈₂ (14 kDa) were visualized. Anti-Csp1 antibodies detected equal amounts of Csp₁₋₁₁₀, Csp₁₋₁₁₀E93V, and Csp₁₋₈₂, indicating again that

detection of the myc epitope is probably context-dependent. Csp₈₃₋₁₉₈ was not detected by anti-Csp, consistent with the observation that the J-domain is part of the epitope. Assessment of insulin secretion from cotransfected cells revealed that Csp₈₃₋₁₉₈ and Csp₁₋₁₁₀ inhibited hormone release, although to a smaller extent than the full-length protein (Figure 4, bottom panel). Like previous results, the E93V mutation in the linker region abolished the effect of Csp₁₋₁₁₀. In contrast, the J-domain alone (Csp₁₋₈₂) did not alter insulin secretion. Csp₁₃₇₋₁₉₈ was only expressed at very low levels as assessed by immunofluorescence and immunoblots, and did not change insulin release (data not shown).

Isoform and Calcium-Dependent Interaction of Csp with VAMP. In our attempt to identify proteins interacting with Csp in our model system, immunoprecipitations were performed using extracts from HIT-T15 cells. As initial experiments conducted in the presence of EGTA (without calcium added) were negative, we examined the possible effect of calcium-induced exocytosis on protein-protein interactions. As shown in Figure 5, immunoprecipitation of endogenous Csp1 under stimulating conditions (10 μ M free calcium) led to the co-immunoprecipitation of the SNARE protein VAMP2 (11.9 \pm 4.5% of the total VAMP2). Immunoprecipitation using an antibody directed against VAMP2 also coprecipitated Csp1 (9.7 \pm 3.6% of the total Csp1), and again, the effect was only observed in the presence of 10 μ M free calcium. In contrast, the SNARE protein syntaxin 1 or the marker protein for synaptic-like microvesicles, synaptophysin, was not coprecipitated with either low (0.1 μ M) or high (10 μ M) calcium.

To test whether the observed interaction may be direct or indirect, we performed binding assays using recombinant proteins and radioactive, in vitro-translated products (Figure 6). ³⁵S-labeled Csp1 bound significantly to GST-VAMP2 and to the cytosolic domain of Ti-VAMP/VAMP7, but not to VAMP3/cellubrevin in a buffer containing residual Ca²⁺ levels (no EGTA added, Figure 6A). Note that Ti-VAMP is expressed in primary islet cells and the derived clonal rat, hamster, and mouse cell lines INS-1E, HIT-T15, and MIN6, respectively (data not shown). We also assessed the binding of another SNARE protein, SNAP-23, known to bind to the three recombinant VAMP proteins that were used. [³⁵S]-SNAP-23 bound, as expected, to all three VAMP proteins, suggesting that the absence of binding of [³⁵S]Csp1 to GST-VAMP3 is not due to a major alteration of the recombinant protein (Figure 6B). Next we examined whether any difference in binding can be observed between the two Csp splice variants, Csp1 and Csp2, and whether the point mutation in the linker region (E93V) has any influence. This point mutation considerably alleviates the effect of Csp overexpression on insulin secretion (see above and Figure 4). Whereas [³⁵S]Csp1 and [³⁵S]Csp1E93V bound GST-VAMP2, [³⁵S]Csp2 did not bind to a significant extent (Figure 6C). Finally, we performed binding experiments using recombinant GST-Csp and in vitro-translated [³⁵S]-VAMP (Figure 6D). Again, binding was observed only between Csp1 and VAMP2, but not in the case of Csp2.

Calcium-Dependent Dimerization of Csp. The conditions employed in immunoprecipitation favor the detection of stable complexes, although lower-affinity interactions may be physiologically relevant. We therefore resorted to chemical cross-linking of Csp in streptolysin O-permeabilized HIT-

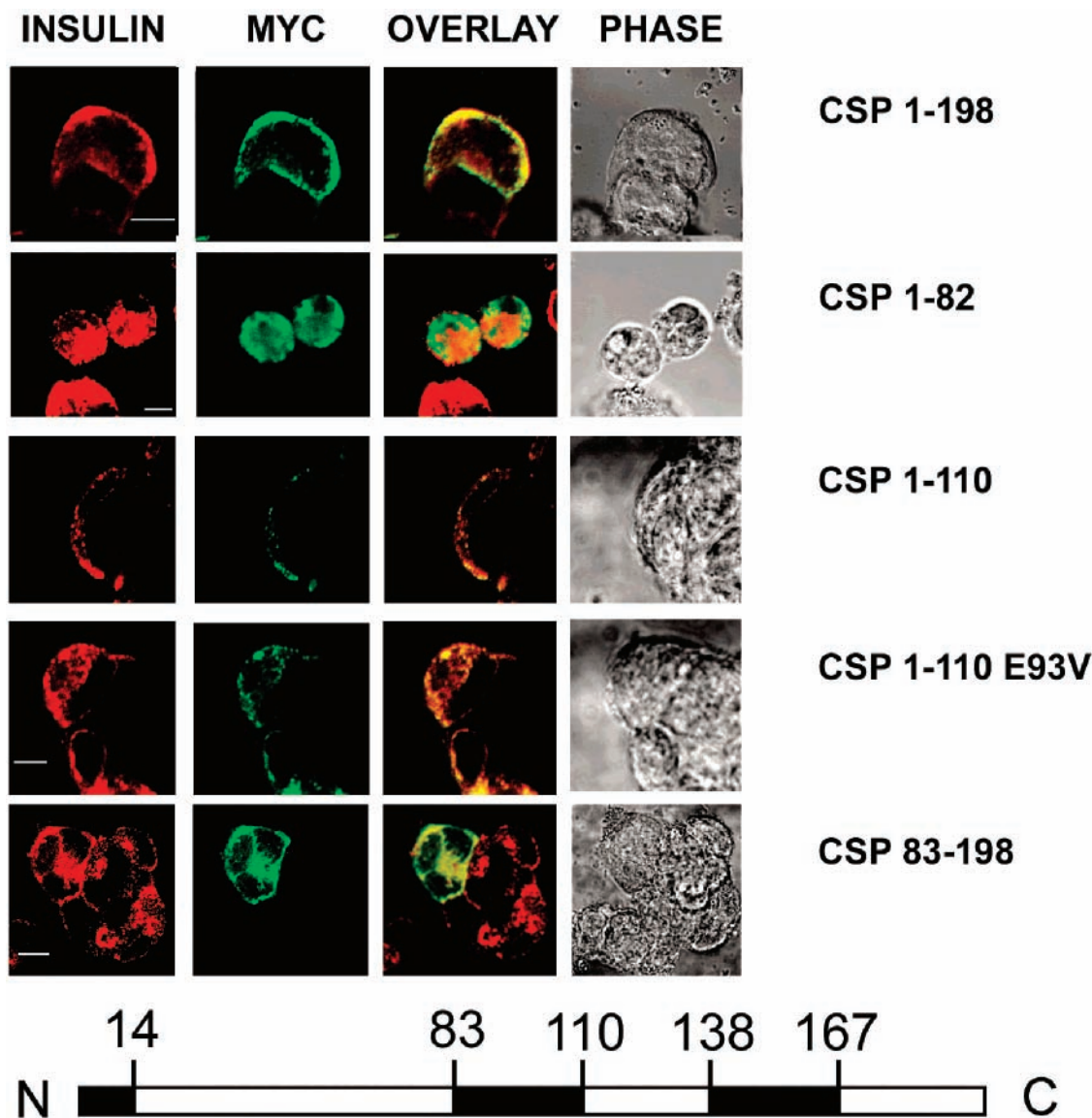


FIGURE 3: Localization of wild-type and C-terminally truncated Csp1s upon expression in insulin-secreting HIT-T15 cells. Cells were handled as described in the legend of Figure 1. Insulin staining was detected with a rhodamine-conjugated anti-guinea pig IgG, and immunostaining of myc-Csp1s was revealed by using fluorescein-coupled anti-mouse IgG.

15 cells under basal ($0.1 \mu\text{M}$) and stimulatory concentrations ($10 \mu\text{M}$) of free calcium as imposed by calcium/EGTA buffers. The cross-linker used, disuccinimidyl suberate, reacts with the ϵ -amine of lysine. The experimental conditions have been selected to prevent complete cross-linking and favoring the appearance of one or few additional species within the separating range of the gel. Under native conditions, an additional band of 45 kDa was observed; this band was neither altered by calcium (Figure 7A) nor detected using a commercial anti-Csp antibody (data not shown). Under cross-linking conditions, an additional band of 62 kDa was detected with an anti-Csp antibody (Figure 7A). The intensity of this 62 kDa band increased in the presence of stimulatory calcium levels by approximately 50% ($2p < 0.05$; see Figure 7A,D). Note that all conditions included equal percentages of DMSO and that the carrier DMSO alone did not alter migration or induce additional bands (data not shown). We also tested other reagents, such as BS3, a water-soluble analogue of disuccinimidyl suberate, and bismaleimido-hexane which cross-links cysteines. In both cases, we could not detect any

additional band within the separation range of the gel. Note that most cysteines are probably acylated in Csp1 (14).

Using antibodies directed against VAMP2 or syntaxin, we could not detect any immunoreactivity at 62 kDa, suggesting that these proteins are not part of the complex (data not shown). The observed molecular mass of the 62 kDa band is, however, compatible with the approximate size of a Csp1 dimer, taking into account that cross-linked proteins often migrate at a molecular mass slightly lower than the predicted value. To test this hypothesis, we took advantage of the observation that Csp1 constructs tagged with a 2myc epitope exhibit a considerable shift in migration during SDS-PAGE (Figure 7B). Western blot analysis using an anti-Csp1 antibody of cells expressing 2myc-Csp1 revealed two major bands of 34 and 38 kDa representing endogenous Csp1 and 2myc-Csp1, respectively. After cross-linking by DSS, an additional band at approximately 80 kDa is apparent. Transiently expressed Csp1 migrates at a molecular mass of 34 kDa and was not separated from endogenous Csp1, and cross-linking resulted in an additional band at 62 kDa (Figure 7B).

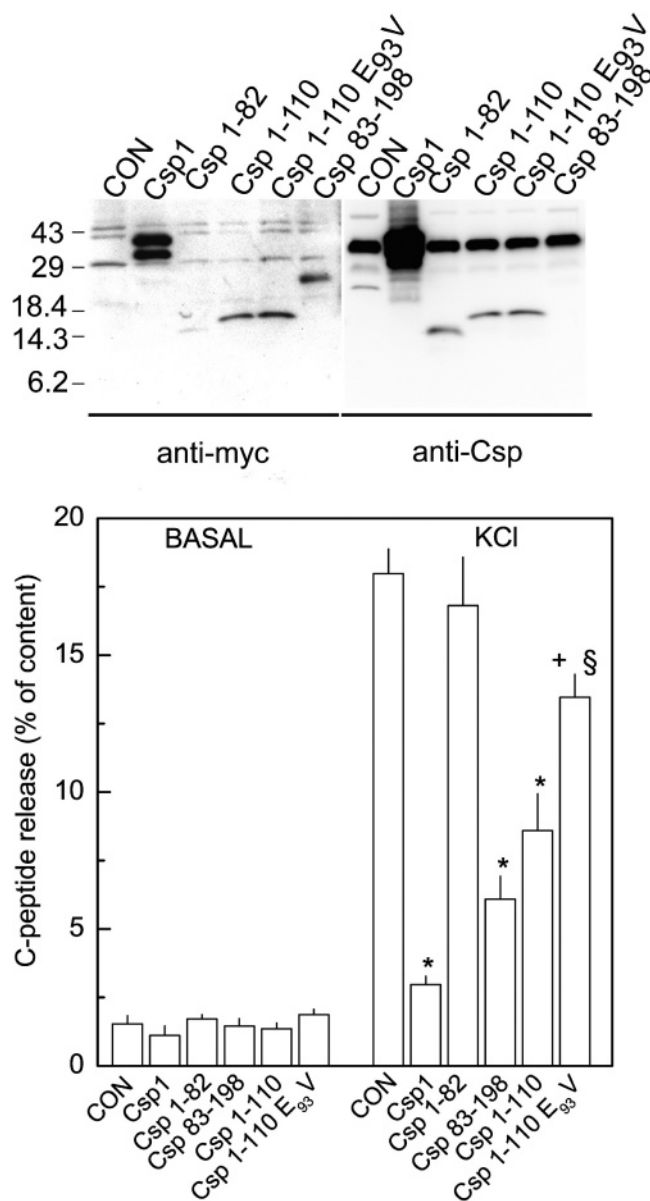


FIGURE 4: Regulation of insulin secretion by Csp truncation mutants. In the top panel are shown expression levels of Csp constructs. Homogenates of cells transiently cotransfected with plasmids encoding the indicated myc-tagged constructs were separated on Tricine gels, subsequently transferred to PVDF membranes, and stained with anti-myc or anti-csp antibodies. Migration of molecular mass markers is indicated in kilodaltons. In the bottom panel, cells were handled as described in the legend of Figure 2 and either kept in Krebs Ringer buffer (KRB) alone (basal) or stimulated by the addition of 50 mM KCl (KCl). Human insulin C-peptide release, reporting secretion from cotransfected cells, was assessed with an ELISA. $N = 6-13$ from at least three independent experiments. An asterisk means $2p < 0.05$ as compared to control. A plus sign means the value is not significantly different from control. The section mark means $2p < 0.05$ as compared to Csp₁₋₁₁₀.

Transient cotransfection of cells with plasmids encoding both proteins, 2myc-Csp1 and Csp1, resulted in an increase in the magnitude of the 34 kDa band (as compared to that for 2myc-Csp1) and the 38 kDa band of 2myc-Csp1. Cross-linking in these cells (Figure 7B, right lanes) produced a 62, 70, and 80 kDa band, which is compatible with the presence of Csp1 dimers at 62 kDa, Csp1–2myc-Csp1 dimers at 70 kDa, and 2myc-Csp1 dimers at 80 kDa. This

interpretation was further supported by immunoprecipitations using an anti-myc antibody (Figure 7B, right lanes) as the 80 kDa band was precipitated from cells overexpressing 2myc-Csp or 2myc-Csp and Csp, whereas the 70 kDa band was only precipitated from cells overexpressing Csp.

Both Csp1 and Csp2 are localized to insulin-containing LDCVs upon their overexpression, and differ only in their C-terminus. We were therefore interested in whether both isoforms can be cross-linked and whether cross-linking depends on calcium levels (Figure 7C). Although mRNA encoding Csp2 is present in insulin-secreting cells (13), the protein cannot be detected by our antibody. For this reason, we resorted to transient expression of epitope-tagged proteins. Transiently expressed Flag–Csp1 can indeed be cross-linked in a calcium-sensitive manner similar to that for endogenous Csp1 (Figure 7D). This was also observed for Flag–Csp2, though the pronounced diminution of the non-cross-linked band suggests that additional complexes with high molecular masses are generated but may not have entered the gels. The point mutant Csp2E93V was cross-linked to an extent similar to that of wild-type Csp2 (data not shown). Most interestingly, the influence of stimulatory calcium levels was more pronounced in the case of Flag–Csp2 than in the case of Flag–Csp1 (Figure 7D). Similar results were obtained using the myc epitope, and again, the observed extent of cross-linking in the case of Csp2 exceeded that of Csp1 at 0.1 and 1 μ M Ca^{2+} by 69 ± 4 and $164 \pm 73\%$, respectively, in three independent experiments ($2p < 0.05$ as compared to Csp1). The different propensity for Csp1 or Csp2 to undergo cross-linking could not be explained by differences in expression levels as this effect was still observed after variation of expression levels by a factor of 3 (data not shown). Note also that both transiently expressed proteins contain the same number of lysines available for the cross-linker. Our data therefore suggest that the C-terminus of Csp influences its homodimerization.

DISCUSSION

In this study, we examined the functional domains of Csp in the exocytosis of LDCVs and provide evidence for a crucial role of the C-terminus in its regulation and the protein's capacity to form protein–protein interactions. Indeed, a number of such interactions have been described previously, such as with chaperone proteins (11, 13, 20, 30), the SNARE proteins VAMP2 (16) and syntaxin 1 (22, 24), neuronal calcium channels (16) and associated G-proteins (18, 19), and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (31). However, in most cases, synaptic or transport vesicles have been studied, whereas little is known as far as LDCVs and non-neuronal systems are concerned.

Sequence comparison of known or predicted Csp reveals not only conserved domains but also two regions of striking diversity: the N- and C-termini. Clearly, the N-terminus is not required for targeting of Csp to vesicles and did not contribute to the overall inhibition observed upon transient expression of the wild-type form. This observation is in line with results obtained in chromaffin cells (32), where mutation of the conserved phosphorylation site within the N-terminus mainly changed release kinetics, but not the total amount released. Note that the identified binding protein, synaptotagmin I, is expressed and functional in the cell lines that

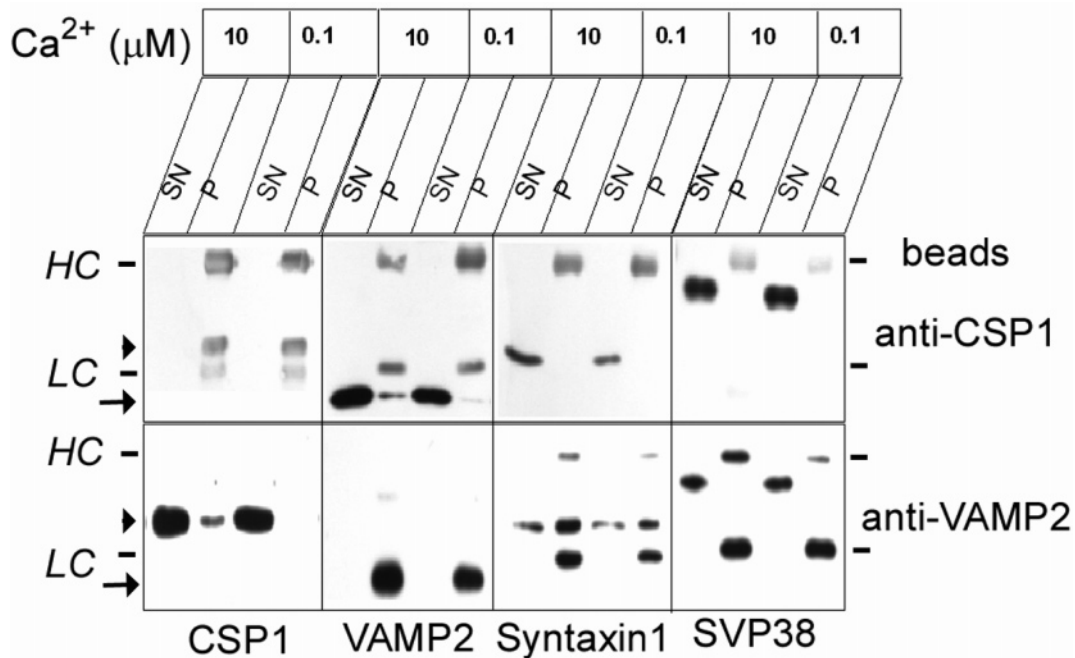


FIGURE 5: Ca^{2+} -dependent co-immunoprecipitation of Csp1 and VAMP2. Crude HIT-T15 membranes (200 μg) were extracted in the presence of 0.1 μM Ca^{2+} or 10 μM Ca^{2+} for 2 h at 4 $^{\circ}\text{C}$. After centrifugation, supernatants were incubated overnight with anti-Csp1 or anti-VAMP2 antibodies coupled to Sepharose beads (beads anti-Csp1, anti-VAMP2), and subsequently, beads were washed as described in Experimental Procedures. Aliquots from supernatant (SN) and pellet (P) fractions were applied to a 12% SDS-PAGE gel and immunoblotted using polyclonal anti-Csp1 antibodies (Csp1) or monoclonal anti-VAMP2 (VAMP2), anti-syntaxin 1 (syntaxin 1), or anti-synaptophysin (SVP-38) antibodies. Lines indicate positions of the IgG heavy chain (HC, 55 kDa) and light chain (LC, 25 kDa); the positions of Csp1 (arrowheads) and VAMP2 (arrows) are also given.

were studied (33, 34). Such kinetic alterations cannot be detected by our biochemical release assay.

Functional data and interaction studies indicate that the different domains of Csp interact with distinct proteins and their concerted action leads to the physiological effect (13, 20). The J-domain (Csp₁₋₈₃) has been shown to be sufficient for binding to and activation of the chaperone Hsc70 (11-13), and this is not changed by the E93V mutation in the Csp linker region (13). We cannot draw conclusions from the transient overexpression of Csp₁₋₈₃ alone as expression was cytosolic and relevant levels may not be attained at membranes. However, both Csp₁₋₁₁₀ and the mutant Csp₁₋₁₁₀E93V can interact with Hsc70 and stimulate its ATPase activity, but only Csp₁₋₁₁₀ altered insulin secretion. We can obviously not exclude the possibility that functional changes after overexpression as used here may reflect sequestering of components of the secretory machinery. Nevertheless, our current observation is in line with our previous findings that interfering with Csp-Hsc70 interactions is not sufficient for production of the profound inhibition of LDCV exocytosis as seen on Csp overexpression (13). It has been shown recently that separate deletions either in the linker region or in the C-terminus only marginally impair Csp function in *Drosophila* (35). This observation is compatible with our findings as mutations in the linker affect peptide hormone secretion only in the absence of the extended C-terminus (this study and ref 13).

To our surprise, Csp₁₋₁₁₀ was still localized to membranes, although it lacked the cysteine string whose palmitoylation is required for initial vesicle attachment, but not for stable membrane association (24, 36). Our data do not contradict these observations since protein interactions of the linker,

as suggested by functional data (13), or the mainly hydrophobic nature of amino acids 98-110 may lead to a secondary membrane attachment, thus providing an artificial though useful probe.

In neurons, Csp has been shown to form trimeric complexes containing chaperones such as Hsc70 (30) or Hsp90 (17). Hsp90 and Csp are complexed with αGDP dissociation inhibitor to form a Rab recycling complex (17). Although the precise binding sites of Hsp90 on Csp have not been mapped, it is reasonable to assume that the J-domain is concerned. Hsc70 forms trimeric complexes with Csp and the ubiquitous cochaperone αSGT (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) on synaptic vesicles (20). Overexpression of SGT inhibits neuroexocytosis and is largely absent from synaptic vesicles in Csp knockout mice, indicating a physiological role for this trimer (20). The site for SGT binding to Csp has been mapped to the cysteine string motif (amino acids 117-140) (21). Although interactions with SGT may contribute to the observed effects in our system with regard to the effect of full-length Csp, the current study clearly indicates that additional interactions have to be invoked in LDCV exocytosis. Indeed, overexpression of constructs excluding the domain binding for αSGT , such as Csp₁₋₁₁₀, interfered with insulin secretion, although to a lesser extent than full-length Csp1.

The J-domain (Csp₁₋₈₃) also interacts with the α -subunit of heterotrimeric G-proteins, G_{α} , and thereby inhibits N-type Ca^{2+} channels (18, 19). Moreover, a direct interaction with P/Q-type Ca^{2+} channels has been reported for Csp1, though the binding site within Csp is unknown (16). The absence of an effect of the J-domain in our study, as found for Csp₁₋₁₁₀E93V, on depolarization-induced insulin secretion

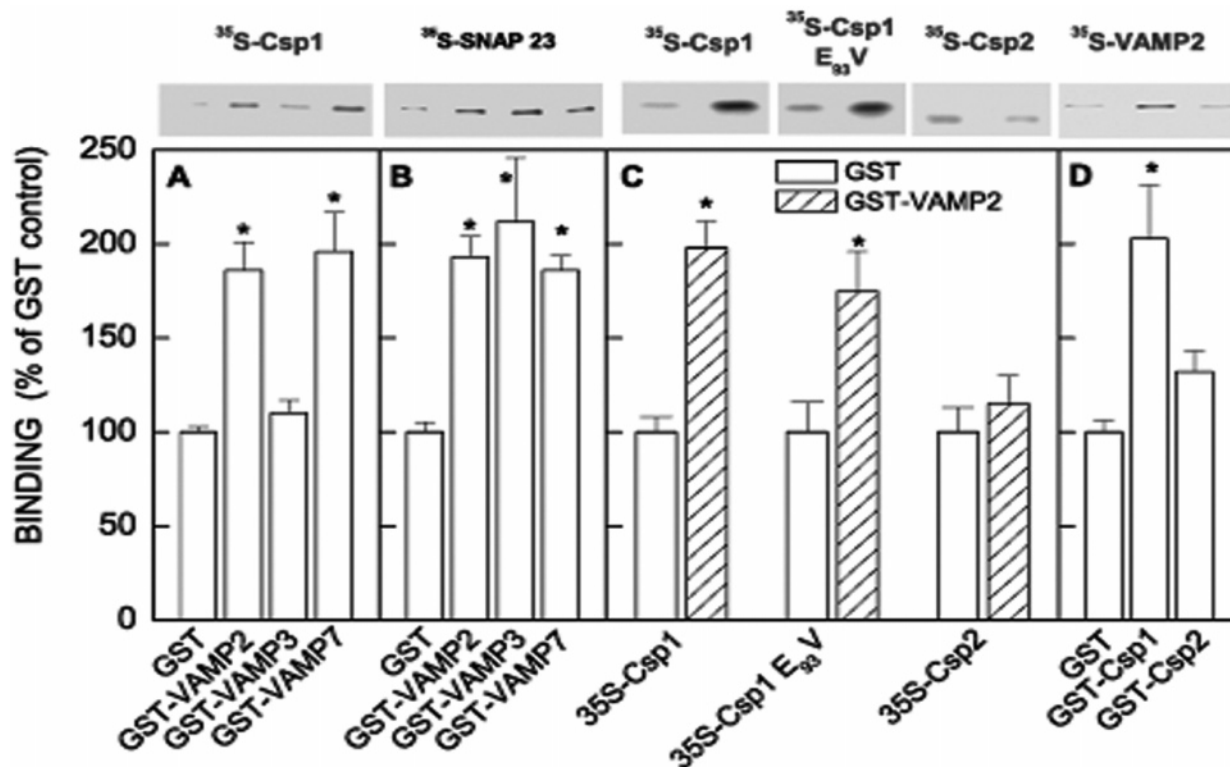


FIGURE 6: Csp1, but not Csp2, binds to VAMP2 and VAMP7 in vitro. Across the top are autoradiography results for bound probes separated by SDS-PAGE. (A) Purified GST, GST-VAMP2, GST-VAMP3, or GST-VAMP7 (10 μ g) was incubated with 30 μ L of pre-equilibrated glutathione-Sepharose beads in the presence of 10^6 dpm of [35 S]Csp1 in calcium-containing buffer A with BSA (0.25% BSA) at 4 $^{\circ}$ C overnight. Bound [35 S]Csp1 was quantified by scintillation counting and verified by autoradiography. $N = 3-5$. (B) Same as panel A, but beads were incubated with 10^6 dpm of [35 S]SNAP-23. $N = 3$. (C) GST or GST-VAMP2 (10 μ g) was incubated as described for panel A using 10^6 dpm of [35 S]Csp1, [35 S]Csp1E93V, or [35 S]Csp2. $N = 3$. (D) GST, GST-Csp1, or GST-Csp2 (10 μ g) was incubated with 10^6 dpm of [35 S]VAMP2 and analyzed as described above. $N = 3$. An asterisk means $2p < 0.05$.

is most likely due to the use of different systems. L-Type but not N- or P/Q-type Ca^{2+} channels play the major role in insulin secretion (37). Moreover, Csp overexpression does not affect voltage-dependent Ca^{2+} channel activity in clonal β -cells (10) and exerts comparable effects in intact and permeabilized cells (9). Indeed, care must be taken in comparing results between different cellular systems. Interactions with syntaxin have not been found in all systems, and overexpression of Csp induces distinct phenotypes in different preparations. Whereas no effect was observed during exocytosis at *Drosophila larva* neuromuscular junctions (22), exocytosis of LDCVs is largely inhibited in chromaffin and in insulin-secreting cells (10, 13, 38). This may reflect distinct binding partners or different stoichiometries.

We observed two interactions of Csp which are modulated by the C-terminus: interaction with the SNARE protein VAMP2 and homodimerization. We were unable to co-immunoprecipitate the SNARE protein syntaxin 1, which is required for insulin exocytosis (39). Although genetic and functional data support such an interaction in *Drosophila* neurons (22) and for plasma membrane-bound Csp in adipocytes (24), it was not found in mammalian brain extracts (16, 23). One possible explanation for this discrepancy may reside in the physical distance between the binding partners. Whereas tight coupling of vesicles to membranes may be expected in neuronal systems or in the case of the location of both partners in the plasma membrane as in adipocytes, only 7% of LDCVs reside next to the plasma membrane in insulin-secreting cells (40). It should also be noted that DnaJ

binds peptides with low affinity and detergents may interfere (41). In the absence of detectable amounts of syntaxin and synaptophysin, which both may bind to VAMP2 (42), we assume that Csp1 interacts with monomeric VAMP2. A considerable amount of plasma membrane-bound SNAREs are indeed present in a monomeric conformation prior to docking or fusion, and the same may apply to the vesicular SNAREs (43). As monomeric VAMP tends to be less structured (44), it may benefit from the action of a chaperone such as Csp. The calcium dependency of Csp-Csp and Csp-VAMP2 interactions in our cellular system suggests that both interactions are occurring during or after stimulation of exocytosis, as there is no indication for binding of calcium to Csp. These findings also provide some explanation for the observation that the different C-termini are important in exocytosis, and their difference becomes apparent in the presence of additional mutations. Our data do not indicate at what stage of the exo-endocytotic cycle Csp and VAMP interact, but functional data from chromaffin cells and neuroexocytosis largely favor a function for Csp during the exocytotic part of the cycle (38, 44). Cross-linking did not reveal any complex with VAMP. This may be due to the hydrophobic nature of the cross-linker used and the fact that none of the 14 lysines present in Csp1 or Csp2 is found in the variant C-terminus, which is at least required in vitro for VAMP binding.

As Csp1, Csp1E93V, and Csp2 can be cross-linked in permeabilized cells, we assume that neither the linker nor the variant C-terminus is required for homodimerization

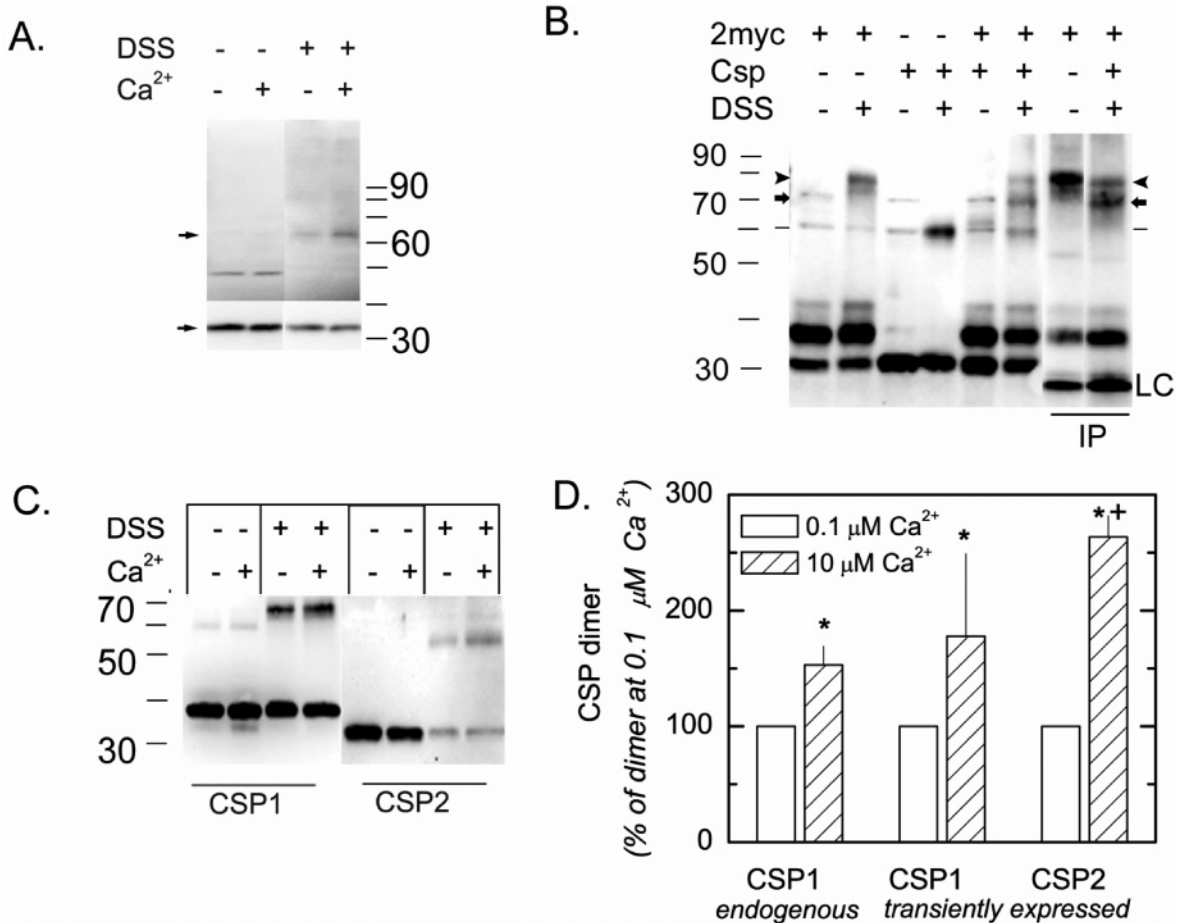


FIGURE 7: Calcium-induced dimerization of Csp1 and Csp2 in permeabilized cells. Streptolysin O-permeabilized HIT-T15 cells were exposed to 0.1 (–) or 10 μM (+) free calcium in the absence (–) or presence (+) of a cross-linking reagent (disuccinimidyl suberate, DSS). DMSO was present under both conditions. Subsequently, proteins were solubilized and subjected to SDS–PAGE followed by immunoblots. Molecular mass standards are given at 10 kDa intervals. (A) Calcium-dependent cross-linking of endogenous Csp1 as revealed by immunoblots using an anti-Csp antibody. Monomeric and dimeric forms are indicated with arrows. (B) Cross-linking of Csp1 in cells transiently expressing either 2myc–Csp1 (2myc), Csp1 (wt), or both constructs revealed by immunoblots using an anti-Csp antibody. Cross-linked transiently expressed proteins are indicated with different symbols (arrowheads for 2myc–Csp1/2myc–Csp1, lines for 2myc–Csp1/Csp1, and arrows for Csp1/Csp1). Analysis was performed either on cell homogenates or after immunoprecipitation with an anti-myc antibody (IP). LC represents the immunoglobulin light chain. (C) Calcium-dependent dimerization of Flag–Csp1 and Flag–Csp2 revealed by anti-Flag antibodies. (D) Calcium-dependent dimerization of Csp1 and Csp2. Amounts of dimers were normalized over Csp expression in native samples (for details, see Experimental Procedures). $N = 3–6$. An asterisk means $2p < 0.05$ vs 0.1 μM Ca²⁺. In the t -test, a plus sign means $p < 0.05$ vs Csp1 (one-tailed ANOVA).

itself. In vitro studies using recombinant proteins have mapped dimerization sites to the linker and cysteine string (45), a region containing a large stretch of hydrophobic amino acids. Under our conditions in permeabilized cells, these residues are most likely buried in the membrane bilayer. It is noteworthy that this hydrophobic region contains three of the 14 available lysines. The lack of efficiency of the water-soluble DSS analogue may indicate that these residues are in the vicinity. The role of hydrophobic domains has also been demonstrated for the dimerization of other DnaJ domain-containing proteins, namely, Sis1 and Dj1A, and seems to be required for their chaperone activity, but not for the activation of heat-shock proteins. Note also that a Csp dimer is probably present in the reconstituted Csp–Hsc70–SGT complex (20). Dimerization in insulin-secreting cells was stimulated by levels of Ca²⁺ that induce exocytosis and interactions between Csp1 and VAMP2. It is tempting to speculate that these events occur simultaneously. The interaction between the terminus of Csp1 and VAMP may

relieve some constraint on Csp homodimerization. In contrast, Csp2, not being restricted by the variant C-terminus, can form a dimer more often.

In conclusion, we have demonstrated that the linker region and the C-terminus of Csp are interfering with exocytosis and could assign two functions to the C-terminus in Ca²⁺-stimulated cells: interaction with the SNARE protein VAMP and modulation of Csp homodimerization. What may be the role of these events? Csp has a chaperone activity of its own, which may be favored by dimerization in analogy to other J-domain-containing chaperones (46, 47). This process may also increase the local concentration of Csp at docking and fusion sites. Moreover, Csp has been implicated in a number of distinct interactions, and it is still unclear which interaction occurs at what stage (15, 17, 20, 22). They may be organized either sequentially or by functionally different Csp. Although it remains a hypothesis at present, dimerization could favor simultaneous interactions with distinct partners at the same location.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Marie-Noëlle Benassy for excellent technical assistance. We are grateful to Dr. T. Galli for the generous gift of antibodies and cDNAs.

REFERENCES

- Lang, J. (1999) Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion, *Eur. J. Biochem.* **259**, 3–17.
- Burgoyne, R. D., and Morgan, A. (2003) Secretory granule exocytosis, *Physiol. Rev.* **83**, 581–632.
- Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T. C. (2003) Membrane fusion, *Cell* **112**, 519–533.
- Evans, G. J., Morgan, A., and Burgoyne, R. D. (2003) Tying everything together: The multiple roles of cysteine string protein (CSP) in regulated exocytosis, *Traffic* **4**, 653–659.
- Zinsmaier, K. E., Eberle, K. K., Buchner, E., Walter, N., and Benzer, S. (1994) Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*, *Science* **263**, 977–980.
- Umbach, J. A., Zinsmaier, K. E., Eberle, K. K., Buchner, E., Benzer, S., and Gunderson, C. B. (1994) Presynaptic dysfunction in *Drosophila* csp mutants, *Neuron* **13**, 899–907.
- Chamberlain, L. H., and Burgoyne, R. D. (1996) Identification of a novel cysteine string protein variant and expression of cysteine string proteins in non-neuronal cells, *J. Biol. Chem.* **271**, 7320–7323.
- Pupier, S., Leveque, C., Marqueze, B., Kataoka, M., Takahashi, M., and Seagar, M. J. (1997) Cysteine string proteins associated with secretory granules of the rat neurohypophysis, *J. Neurosci.* **17**, 2722–2727.
- Zhang, H., Kelley, W. L., Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., Wollheim, C. B., and Lang, J. (1998) Cysteine-string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes, *FEBS Lett.* **437**, 267–272.
- Brown, H., Larsson, O., Branstrom, R., Yang, S. N., Leibiger, B., Leibiger, I., Fried, G., Moede, T., Deeney, J. T., Brown, G. R., Jacobsson, G., Rhodes, C. J., Braun, J. E., Scheller, R. H., Corkey, B. E., Berggren, P. O., and Meister, B. (1998) Cysteine string protein (CSP) is an insulin secretory granule-associated protein regulating β -cell exocytosis, *EMBO J.* **17**, 5048–5058.
- Braun, J. E., Wilbanks, S. M., and Scheller, R. H. (1996) The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase, *J. Biol. Chem.* **271**, 25989–25993.
- Chamberlain, L. H., and Burgoyne, R. D. (1997) The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins, *J. Biol. Chem.* **272**, 31420–31426.
- Zhang, H., Kelley, W. L., Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., and Lang, J. (1999) Mutational analysis of cysteine-string protein function in insulin exocytosis, *J. Cell Sci.* **112**, 1345–1351.
- Gundersen, C. B., Mastrogiacomo, A., Faull, K., and Umbach, J. A. (1994) Extensive lipidation of a *Torpedo* cysteine string protein, *J. Biol. Chem.* **269**, 19197–19199.
- Evans, G. J., and Morgan, A. (2002) Phosphorylation-dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagmin I, *Biochem. J.* **364**, 343–347.
- Leveque, C., Pupier, S., Marqueze, B., Geslin, L., Kataoka, M., Takahashi, M., De Waard, M., and Seagar, M. (1998) Interaction of cysteine string proteins with the α 1A subunit of the P/Q-type calcium channel, *J. Biol. Chem.* **273**, 13488–13492.
- Sakisaka, T., Meerlo, T., Matteson, J., Plutner, H., and Balch, W. E. (2002) Rab- α GDI activity is regulated by a Hsp90 chaperone complex, *EMBO J.* **21**, 6125–6135.
- Magga, J. M., Jarvis, S. E., Arnot, M. I., Zamponi, G. W., and Braun, J. E. (2000) Cysteine string protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels, *Neuron* **28**, 195–204.
- Miller, L. C., Swayne, L. A., Kay, J. G., Feng, Z. P., Jarvis, S. E., Zamponi, G. W., and Braun, J. E. (2003) Molecular determinants of cysteine string protein modulation of N-type calcium channels, *J. Cell Sci.* **116**, 2967–2974.
- Tobaben, S., Thakur, P., Fernandez-Chacon, R., Sudhof, T. C., Rettig, J., and Stahl, B. (2001) A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine, *Neuron* **31**, 987–999.
- Tobaben, S., Varoqueaux, F., Brose, N., Stahl, B., and Meyer, G. (2003) A brain specific isoform of small glutamine-rich tetra-copeptide repeat containing protein (SGT) binds to Hsc70 and the cysteine string protein, *J. Biol. Chem.* **278**, 23.
- Nie, Z., Ranjan, R., Wenniger, J. J., Hong, S. N., Bronk, P., and Zinsmaier, K. E. (1999) Overexpression of cysteine-string proteins in *Drosophila* reveals interactions with syntaxin, *J. Neurosci.* **19**, 10270–10279.
- Matos, M. F., Rizo, J., and Sudhof, T. C. (2000) The relation of protein binding to function: What is the significance of munc18 and synaptotagmin binding to syntaxin 1, and where are the corresponding binding sites? *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 377–382.
- Chamberlain, L. H., Graham, M. E., Kane, S., Jackson, J. L., Maier, V. H., Burgoyne, R. D., and Gould, G. W. (2001) The synaptic vesicle protein, cysteine-string protein, is associated with the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes and interacts with syntaxin 4, *J. Cell Sci.* **114**, 445–455.
- Weller, U., Muller, L., Messner, M., Palmer, M., Valeva, A., Tranum-Jensen, J., Agrawal, P., Biermann, C., Dobereiner, A., Kehoe, M. A., and Bhakdi, S. (1996) Expression of active streptolysin O in *Escherichia coli* as a maltose-binding-protein–streptolysin-O fusion protein. The N-terminal 70 amino acids are not required for hemolytic activity, *Eur. J. Biochem.* **236**, 34–39.
- Galli, T., Zahraoui, A., Vaidyanathan, V. V., Raposo, G., Tian, J. M., Karin, M., Niemann, H., and Louvard, D. (1998) A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells, *Mol. Biol. Cell* **9**, 1437–1448.
- Lang, J., Regazzi, R., and Wollheim, C. B. (1997) in *Bacterial toxins: Tools in cell biology* (Aktories, K., Ed.) pp 217–240, Chapman & Hall, Weinheim, Germany.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **166**, 368–379.
- Fan, H., Villegas, C., Chan, A. K., and Wright, J. A. (1998) Myc-epitope tagged proteins detected with the 9E10 antibody in immunofluorescence and immunoprecipitation assays but not in western blot analysis, *Biochem. Cell Biol.* **76**, 125–128.
- Bronk, P., Wenniger, J. J., Dawson-Scully, K., Guo, X., Hong, S., Atwood, H. L., and Zinsmaier, K. E. (2001) *Drosophila* Hsc70-4 is critical for neurotransmitter exocytosis in vivo, *Neuron* **30**, 475–488.
- Zhang, H., Peters, K. W., Sun, F., Marino, C. R., Lang, J., Burgoyne, R. D., and Frizzell, R. A. (2002) Cysteine string protein interacts with and modulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J. Biol. Chem.* **277**, 28948–28958.
- Evans, G. J., Wilkinson, M. C., Graham, M. E., Turner, K. M., Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., and Morgan, A. (2001) Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis, *J. Biol. Chem.* **276**, 47877–47885.
- Lang, J., Fukuda, M., Zhang, H., Mikoshiba, K., and Wollheim, C. B. (1997) The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic β -cells: Action of synaptotagmin at low micromolar calcium, *EMBO J.* **16**, 5837–5846.
- Lang, J., Ushkaryov, Y., Grasso, A., and Wollheim, C. B. (1998) Ca^{2+} -independent insulin exocytosis induced by α -latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor, *EMBO J.* **17**, 648–657.
- Arnold, C., Reisch, N., Leibold, C., Becker, S., Prufert, K., Sautter, K., Palm, D., Jatzke, S., Buchner, S., and Buchner, E. (2004) Structure–function analysis of the cysteine string protein in *Drosophila*: Cysteine string, linker and C terminus, *J. Exp. Biol.* **207**, 1323–1334.
- Chamberlain, L. H., and Burgoyne, R. D. (1998) The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting, *Biochem. J.* **335**, 205–209.
- Barg, S., Eliasson, L., Renstrom, E., and Rorsman, P. (2002) A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca^{2+} channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse β -cells, *Diabetes* **51**, S74–S82.
- Graham, M. E., and Burgoyne, R. D. (2000) Comparison of cysteine string protein (Csp) and mutant α -SNAP overexpression reveals a role for csp in late steps of membrane fusion in dense-core granule exocytosis in adrenal chromaffin cells, *J. Neurosci.* **20**, 1281–1289.
- Lang, J., Zhang, H., Vaidyanathan, V. V., Sadoul, K., Niemann, H., and Wollheim, C. B. (1997) Transient expression of botulinum

- neurotoxin C1 light chain differentially inhibits calcium and glucose induced insulin secretion in clonal β -cells, *FEBS Lett.* 419, 13–17.
40. Olofsson, C. S., Gopel, S. O., Barg, S., Galvanovskis, J., Ma, X., Salehi, A., Rorsman, P., and Eliasson, L. (2002) Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells, *Pfluegers Arch.* 444, 43–51.
41. Han, W., and Christen, P. (2003) Mechanism of the targeting action of DnaJ in the DnaK molecular chaperone system, *J. Biol. Chem.* 278, 19038–19043.
42. Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R., and Jahn, R. (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: A potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine, *EMBO J.* 14, 224–231.
43. Lang, T., Margittai, M., Holzler, H., and Jahn, R. (2002) SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs, *J. Cell Biol.* 158, 751–760.
44. Fasshauer, D., Eliason, W. K., Brunger, A. T., and Jahn, R. (1998) Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly, *Biochemistry* 37, 10354–10362.
45. Swayne, L. A., Blattler, C., Kay, J. G., and Braun, J. E. (2003) Oligomerization characteristics of cysteine string protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 921–926.
46. Toutain, C. M., Clarke, D. J., Leeds, J. A., Kuhn, J., Beckwith, J., Holland, I. B., and Jacq, A. (2003) The transmembrane domain of the DnaJ-like protein Dj1A is a dimerisation domain, *Mol. Genet. Genomics* 268, 761–770.
47. Sha, B., Lee, S., and Cyr, D. M. (2000) The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1, *Struct. Folding Des.* 8, 799–807.

BI048612+

CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons caractérisé l'effet de formes tronquées de la protéine Csp α sur la sécrétion de l'insuline. De plus nous avons caractérisé de nouvelles interactions protéines-protéines impliquant le domaine C-terminal de la Csp α .

Dans un premier temps, pour caractériser l'importance du domaine N-terminal de la Csp α dans l'exocytose, nous avons surexprimé des formes tronquées pour ce domaine. Nous avons montré dans cette étude que le domaine N-terminal de la Csp α n'est pas nécessaire à l'adressage correct de la protéine aux LDCV. De plus, en utilisant un système de cotransfection du plasmide d'intérêt avec le plasmide codant pour l'insuline humaine et en mesurant la sécrétion uniquement des cellules transfectées en dosant par ELISA la quantité de C-peptide humain libérée, nous avons montré que le domaine N-terminal de la Csp α n'altère pas la quantité globale d'insuline libérée par dépolarisation. Ces résultats sont en accord avec des études récentes portant sur la phosphorylation du résidu sérine 10 de ce domaine. Les auteurs ont montré que la phosphorylation de la Csp α n'altère pas globalement la sécrétion dans un modèle de cellules chromaffines mais qu'elle influe sur les paramètres cinétiques fins de l'exocytose. De telles altérations cinétiques ne peuvent pas être mesurées par notre approche.

Le domaine J de la Csp α est un domaine fonctionnellement important car il lui permet de recruter la chaperonne Hsc70 et de l'activer. Nous avons montré dans cette étude que le domaine J seul (construction Csp 1-82) ne suffit pas à l'adressage correct de la Csp α ni à sa fonction observée par surexpression. Néanmoins, nous avons confirmé le rôle important du domaine Linker, ainsi que de la position E93. En effet, la construction Csp 1-110 (comprenant donc le domaine N-terminal, le domaine J et le domaine Linker) colocalise partiellement avec les granules d'insuline et sa surexpression inhibe bien la sécrétion d'insuline.

Nous avons ensuite caractérisé le domaine C-terminal en terme d'interactions protéines-protéines. Nous avons en effet montré que la Csp1 interagit avec la protéine SNARE vésiculaire VAMP2. Cette interaction est régulée positivement par le calcium, ce qui suggère un rôle important dans l'exocytose régulée. Nous avons montré par des

interactions *in vitro* que cette interaction est directe entre les deux protéines et qu'elle est portée par le domaine C-terminal de la Csp α , car le variant tronqué pour le C-terminus Csp2 n'est pas capable d'interagir avec VAMP2. De plus, nous avons montré que cette interaction est isoforme-spécifique, car la Csp1 interagit avec VAMP2, VAMP7/TI-VAMP mais pas avec VAMP3/Cellubrevin.

Les expériences d'immunoprécipitation utilisées précédemment ne permettent que la détection de complexes stables. La protéine Csp étant une protéine co-chaperonne, elle est vraisemblablement impliquée dans des processus transitoires au cours des différentes étapes de l'exocytose. Pour caractériser ces complexes transitoires, nous avons eu recours à la technique de réticulation covalente dans des cellules insulino-sécrétoires perméabilisées par la streptolysine-O, ceci permettant d'équilibrer le cytosol en cofacteurs indispensables à la sécrétion, principalement le calcium en concentration contrôlée de 0,1 μ M (condition basale) ou 10 μ M (condition de stimulation de l'exocytose). L'ajout de l'agent pontant DSS permet de coupler de manière covalente les protéines proches dans l'espace, soit qui interagissent entre elles, via des ponts entre la fonction amine ϵ des lysines. Nous avons montré dans ces conditions que la protéine Csp s'homodimérise, et que cette dimérisation est stimulée par le calcium, ce qui suggère un rôle important du dimère dans les étapes finales de l'exocytose. De plus, le domaine C-terminal de la Csp régule négativement la dimérisation de la protéine, vraisemblablement car il est impliqué dans d'autres interactions protéiques.

Résultats – Partie II

Cysteine-string protein isoform beta (Csp β) is targeted to the trans-Golgi network as a non-palmitoylated CSP in clonal β -cells

INTRODUCTION

La protéine vésiculaire Csp est une protéine palmitoylée et étroitement impliquée dans les processus d'exocytose des cellules neuronales et endocrines. La Csp est capable d'interagir avec le complexe chaperon Hsc70/SGT impliqué dans la neuroexocytose.

De nouvelles isoformes ont été décrites à partir des programmes de séquençage des génomes humains et murins. On distingue aujourd'hui trois isoformes principales : Csp α , Csp β et Csp γ dont les numéros d'accèsion *GenBank* sont respectivement NM_025219, AF368276, AK097736 chez l'homme et NM_016775, AK005749, NP_808345 chez la souris. Chez les mammifères, deux variants de l'isoforme α sont connus, résultant d'un épissage alternatif et conduisant à la production d'une forme tronquée pour le domaine C-terminal. Les isoformes β et γ sont quant à elles codées par des gènes distincts. L'existence de ces isoformes peut compliquer l'analyse du phénotype des souris KO pour la Csp α . En effet, on peut envisager des phénomènes de compensation entre les différentes isoformes dans un contexte où l'une est déficiente. Les séquences des isoformes β et γ ont été obtenues à partir de banques d'ADNc de testicules, et des travaux récents ont montré par Northern-blot que leur expression semble être spécifique à cet organe. Cependant, aucune étude biochimique ni fonctionnelle de ces nouvelles isoformes n'a été à ce jour menée.

Title page

Cysteine-string protein isoform beta (Csp β) is targeted to the trans-Golgi network as a non-palmitoylated CSP in clonal β -cells.

Frédéric Boal, Séverine Le Pevelen, Celina Cziepluch[§], Pier Scotti^{||} and Jochen Lang^{||}*

Institut Européen de Chimie et Biologie, Pôle Biologie Cellulaire et Moléculaire, JE 2390, F-33607 Pessac, France and [§] Infection and Cancer Department-F010 and INSERM U701, Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69120 Heidelberg, Germany

*AUTHOR EMAIL ADDRESS j.lang@iecb.u-bordeaux.fr

PHONE NUMBER: +33 (0)5 40 00 33 49

FAX NUMBER: +33 (0)5 40 00 33 48

^{||} both authors contributed equally to the work

RUNNING TITLE: Non-palmitoylated Csp β is targeted to the TGN

KEYWORDS: chaperones; exocytosis; pancreatic β -cells; cysteine string proteins; palmitoylation; protein-membrane association

ABBREVIATIONS

CSP, cysteine string protein; LDCV, large dense core vesicles; SLMV, synaptic-like microvesicles; SNAP25, synaptosome associated protein of 25 kDa; SNARE, soluble NSF-attachment receptor; VAMP, vesicle associated membrane protein; Hsc70, heat-shock cognate protein of 70 kDa; SGT, small-glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein; TGN, trans-Golgi network

SUMMARY

Cysteine string proteins (CSPs) belong to the DnaJ-like chaperone family and play an important role in regulated exocytosis in neurons and endocrine cells. The palmitoylation of several cysteine residues may anchor CSPs to the exocytotic vesicle surface and in pancreatic β -cells, Csp α is localized on insulin containing large dense core vesicles (LDCVs). An isoform closely related to Csp α in term of sequence, Csp β , has been obtained from testis cell cDNA libraries. In order to gain insights on this isoform and more generally on the properties of CSPs, we compared Csp α and Csp β in term of protein-protein interactions and localization. In pull-down experiments, Csp β was able to interact to the same extent with two of the known Csp α chaperone partners, Hsc70 and SGT. When transiently overexpressed in clonal β -cells, Csp β was mainly produced as a non-palmitoylated protein but remained tightly bound to membranes. This result suggests that intrinsic properties of CSPs are sufficient to enable an interaction with membranes. Indeed, recombinant Csp α and Csp β were capable to interact with membranes even in their non-palmitoylated forms. Furthermore, overexpressed Csp β was not associated with LDCVs, but was localized at the trans-Golgi network. Our results suggest a possible correlation between the specific membrane targeting and the palmitoylation level of CSPs.

1. INTRODUCTION

The hormone insulin is stored in large dense core vesicles in pancreatic β -cells and released by exocytosis, a tightly controlled phenomenon [1]. The core machinery of exocytosis is composed of the SNARE complex, formed by Syntaxin1A, VAMP2-Synaptobrevin, and SNAP25 [2]. Regulated exocytosis implies structural rearrangement for assembly and disassembly of different protein complexes, and thus requires chaperone activity to proceed [3]. Among chaperone proteins, Cysteine-string proteins (CSPs) have been proposed to act as bona fide folding catalysts during late stages of insulin secretion and also in neuroexocytosis [4-7]. Together with SGT proteins (small-glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein), CSPs regulate the Hsc70 chaperone. For instance, the trimeric complex Csp α /Hsc70/SGT has been characterized as a chaperone complex functionally important in neurotransmission [8, 9]

CSPs were discovered as presynaptic proteins in *Drosophila* [10] and are involved in neurotransmission as deletion of the *csp* gene in *Drosophila* causes a temperature-sensitive inhibition of synaptic transmission [11, 12]. CSPs are composed of several conserved domains: the N-terminal domain that contains a PKA-phosphorylation site implicated in the precise control of exocytosis in chromaffin cells [13]; the J-domain, highly homologous to bacterial chaperone DnaJ, interacts with and stimulates the eucaryotic chaperone Hsc70 [14-16]; the linker region which according to a point mutation study plays a role in the function of CSPs in exocytosis [16]; the hydrophobic central domain rich in cysteine residues which can be extensively palmitoylated [17] and the C-terminal domain, which is highly variable throughout evolution.

Several isoforms have been described with a wide range of tissue expression in mouse and human [18], Csp α , the first isoform characterized, plays a central role in mammalian neurosecretion by regulating calcium channel activity, presumably through its interaction with G proteins [19, 20]. Moreover, in *Drosophila* Csp α also acts on the regulation of exocytosis by other means [21].

In insulin-secreting cells, Csp α is localized mainly on insulin-containing large dense-core vesicles (LDCV) but also on synaptic-like microvesicles (SLMV) [6]. Csp α has been shown to be implied in insulin exocytosis as its overexpression or silencing impairs insulin secretion [6, 16, 22]. Csp α acts directly on insulin exocytosis, independently from calcium transmembrane fluxes [6, 23].

Recently, two new predicted isoforms, Csp β and Csp γ were described [5], obtained from human and mouse testis cDNA libraries. It has been shown that Csp β and Csp γ mRNA are detected only in testis total mouse mRNA in northern-blot analysis [24]. So far the functional relevance of the different isoforms is not known. Does it reflect a location specificity, each isoform being devoted to defined membrane fusion events within the cell ? Displaying a high sequence homology with Csp α , the isoform Csp β can be considered as a natural variant and therefore constitutes a valuable tool to gain insight on the cellular function of CSPs. Therefore, we have investigated the expression of Csp β in pancreatic β -cell lines and compared its localization and its biochemical properties to those of Csp α . When overexpressed in clonal β -cells, Csp β was mainly produced as a non-palmitoylated protein tightly bound to membranes. Furthermore, we found that overexpressed Csp β displayed a cellular localization different from Csp α . It was clearly not associated with LDCV, but rather

localized at the trans-Golgi network. Taking together these results suggest a correlation between a defined intracellular location of CSPs and their level of palmitoylation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

The following reagents were used: glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare); isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), Dnase I, leupeptin hemisulfate, aprotinin, PMSF and pepstatin A (Sigma); Trizol (Invitrogen); ImProIITM Reverse Transcriptase and Wizard[®] SV PCR Clean-up System (Promega). Restriction enzymes and ECL detection kit (Lumi-Light Western Blotting Substrate) were from Roche Applied Science. The following antibodies were used: anti-Csp1 serum [25]; monoclonal anti-myc (clone 9E10, Sigma); polyclonal anti-myc (C3956, Sigma); monoclonal anti-insulin (clone K36aC10, Sigma); monoclonal anti-GST (clone GST-2, Sigma); monoclonal anti-SNAP25 (SMI81, Stemberger Monoclonals Incorporated); monoclonal anti-Hsc70 (clone BRM-22, Sigma); monoclonal anti- β -actin (clone ab276, Abcam); monoclonal anti-SVP38 (Synaptic Systems GmbH); anti-Vti1b monoclonal antibody (clone 7, Transduction Laboratories). Polyclonal anti-SGT antibody was previously described [26]. Monoclonal anti-EEA1 was kindly provided by Dr. J. Gruenberg [27]. HRP-conjugated secondary antibodies (anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG) were from GE Healthcare. Fluorophore-coupled secondary antibodies used in immunofluorescence studies were from Jackson Laboratories.

2.2 Molecular cloning

The plasmids pGEX2T-Csp α and pcDNA3-myc-Csp α were described previously [22]. The Csp β sequence was obtained from a human EST (RZPD, Accession number: AF368276). MycCsp β was obtained by PCR using the following primers: plus strand 5'-CGCGGATCCATGGCATGTAACATACCTAACC-3' and minus strand 5'-CCGGAATTCGGGACTGTGGACTCTCTGAGG-3' ; *Bam*HI or *Eco*RI sites are underlined.

PCR products were purified, digested with *Bam*HI and *Eco*RI, and inserted into the corresponding sites of a pcDNA3-myc vector [16] or a pGEX2T vector (GE Healthcare). All constructs were verified by double strand sequencing.

2.3 RT-PCR

Total RNA was prepared using Trizol from fresh mouse brain or cultured cells according to the manufacturer's instructions and reverse transcribed using oligo(dT)₁₅ primers and ImProIITM Reverse Transcriptase. Mouse testis cDNA were kindly provided by Dr P. Dubus (Bordeaux, France). To amplify the mouse Csp β cDNA, we used the following primers designed according to the predicted sequence (Accession number: AK005749): 5'-ATGGCATGTAACGCACCCAACC-3' and 5'-TTAAGAGTCTGTGCAGTAACTTCGAGATCC -3'.

2.4 Purification of recombinant proteins

E. coli BL21 (DE3) strain (Stratagen) were transformed by pGEX2T vector containing the coding sequence for Csp α or Csp β and protein expression was induced by growing the cells in presence of 0.4 mM IPTG for 3 hours at 30°C. Bacteria were washed in PBS and resuspended in lysis buffer A [PBS, 5 mM β -mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1% TritonX-100, 10 U/ml Dnase I, protease inhibitors (apoprotinine, leupeptine, pepstatine A 1 μ g/ μ l each and 0.1 mM PMSF) final pH8] and passed twice through a French-Press (Carver, 25000 psi). Bacterial extracts were clarified by centrifugation (20000g, 1h 4°C) and GST-fusion proteins were recovered from the supernatants by binding to glutathione-sepharose beads according to manufacturer instructions (GE Healthcare – Amersham Biosciences). Recombinant proteins were over 95% pure as judged by Coomassie blue stained SDS-PAGE.

2.5 GST-pull down experiments

MIN6 cells were washed with PBS, detached by incubation in PBS-10 mM EDTA (15 min at 37°C), recovered by centrifugation and washed once with PBS prior to be resuspended in homogenate buffer B [20 mM MOPS (pH7), 250 mM sucrose, 4.5 mM MgCl₂, 10 µg/ml orthovanadate and protease inhibitors as in buffer A). Cells were lysed at 4°C first by sonication (6 times 10 sec pulses) followed by 20 passages through a 27 Gauge needle. The homogenate was clarified by centrifugation (1000g for 5 min at 4°C) and protein concentration in the resulting lysate was quantified (Bradford Biorad Protein Assay, Biorad). For each binding experiment, MIN6 homogenate aliquots (500 µg of proteins) were first treated extemporary with 0.5% (w/v) Triton X-100 (60 min, 4°C). After centrifugation (20000g 5 min 4°C) supernatants were recovered. These supernatants were diluted in binding buffer C [20 mM MOPS (pH7), 5 mM MgCl₂, 200 mM NaCl) in order to dilute Triton X-100 down to 0.1% (w/v). Then 25 µg of recombinant GST proteins were added (GST, GST-Csp α or GST-Csp β). After incubation at 4°C for 2 hours, 40 µl of glutathione-sepharose beads (equilibrated in buffer C) were added and incubation was continued for 2 hours. Beads were recovered by centrifugation and washed 3 times with 20 bead volumes of buffer C supplemented with 0.1% Triton X-100 and once with 20 bead volume of Buffer C alone prior to be resuspended in SDS-PAGE sample buffer (2% (w/v) SDS, 8% (v/v) β -mercaptoethanol, 10% (w/v) glycerol, 50 µg/ml bromophenol blue, 50 mM Tris pH6.8). One third of each resulting samples was applied on 10% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and analyzed by Western-blotting. Prior to immunoblotting membranes were stained with Coomassie blue to assess that an equivalent amount of recombinant GST proteins was recovered for each conditions (not shown).

2.6 Cell culture, transfection and immunofluorescence

Cell culture and transfections were performed as described [16, 22]. For immunofluorescence studies, cells were fixed with paraformaldehyde three days after transfection as described [22, 28] and incubated with the following antibodies: anti-myc 1/500, anti-insulin 1/100, anti-SVP38 1/200, anti-EEA1 1/100, and anti-Vti1b 1/500. Fluorophore-coupled second antibodies were used at a dilution of 1/500 (anti mouse IgG Cy3-coupled and anti rabbit IgG FITC-coupled antibodies). Imaging was performed on a LMS 510 Meta confocal laser microscope (Zeiss).

2.7 Subcellular fractionation and chemical treatments

HIT-T15 cells were treated 3 days after transfection. Cells were washed with PBS, then detached with PBS-10 mM EDTA at 37°C, centrifuged 5 minutes at 300g and 4°C. Cell pellets were resuspended in Buffer C [20 mM HEPES (pH7.4), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, protease inhibitors as in buffer A]. Cells were lysed by sonication (Sonicator XL2020 Misonix, 6 time 10 sec pulses, level 2). Cell extracts were clarified by centrifugation (2000g, 5 min 4°C) to obtain a post-nuclear supernatant (PNS). Membranes (M) and cytosol (C) were separated by centrifugation at 20000g for 1h at 4°C. For NH₂OH treatment, an aliquot of the PNS was mixed with 1 volume of 2 M NH₂OH (pH8) or 1 volume of 2 M Tris (pH8) as control. After 12 h incubation at 4°C, reaction mixtures were immediately analyzed by Western-blotting.

Membrane association tests were assayed by mixing PNS aliquots and the following buffers (final concentrations): Buffer C or 1 M NH₂OH (pH8) or 1 M NaCl or 1 M NH₂OH combined with 1 M NaCl or 0.2 M Na₂CO₃ (pH11) or 1% Triton X-100. After incubation for 10h at 4°C, samples were centrifuged for 90 min at 20000g. Pellets were resuspended in 50 µl SDS-PAGE sample buffer, and analyzed by Western-blotting after SDS-PAGE. Membrane

association was estimated by quantification of the signals present in each pellet fraction and expressed as a percentage of the control condition (PBS treatment). Results are presented as means +/- sem.

2.8 Membrane attachment of recombinant proteins

For membrane attachment experiments, HIT-T15 cells were homogenized by sonication in Buffer D (10 mM Tris (pH7), 150 mM NaCl, 0.32 M Sucrose, 4 mM EDTA, and protease inhibitors as in Buffer A). Cell debris were pelleted by centrifugation (5 min 1000g 4°C) and the protein amount in resultant post-nuclear supernatant (PNS) were quantified by Bradford reaction. Binding assays were performed in 500 µL final volume by mixing recombinant GST proteins (from 2 nM to 310 nM) with 20 µg of PNS for 2 h at 4°C under constant agitation. Membranes and membrane associated proteins (bound) and supernatant (unbound) were separated by centrifugation (1 h, 20000g, 4°C). Pellets were either washed three times in buffer D and solubilized directly in SDS-PAGE sample buffer or were resuspended in buffer D or 0.2 M Na₂CO₃, incubated for 2 hours and centrifugated again (1h, 20000g, 4°C). Resulting pellets were resuspended in SDS-PAGE sample buffer. Proteins were separated on a 12% SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane. GST, GST-Csp α and GST-Csp β were stained with an anti-GST antibody. Images were quantified as described before [22].

2.9 In-silico prediction of Csp membrane domains

The TMHMM program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) was run on human sequences as Csp β has not been cloned from other species. More detailed thermodynamic calculations were obtained employing MPex (version 3; <http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>) assuming the absence of β -sheets, using a final window size of 24, a helicity value set to 0 and no salt bridges were introduced.

3. RESULTS

3.1 Csp β interacts with the chaperone complex Hsc70/SGT in MIN6 cells

Csp α and Csp β are highly similar according to the sequence alignment (Figure 1A). They exhibit 66% overall amino-acid identity. However, looking closely to homology between each domain, some differences can be noted. For instance the N-terminus differs, particularly by the presence of a short extension in Csp β , whereas the J-domain and the linker region are largely conserved (75% and 82% identity, respectively). The cysteine-rich domains are similar (80%) and the C-terminal domains constitute the most variable part exhibiting only 45% identity.

Csp α is known to be part of a trimeric complex including Hsc70 and the cognate regulatory protein SGT [8, 9]. In a first attempt to compare Csp α and Csp β , we resorted to pull-down experiments in insulin-secreting MIN6 cells. GST alone, GST-Csp α or GST-Csp β were immobilized on glutathione-sepharose beads, incubated with homogenates of MIN6 cells, washed extensively and bound proteins were eluted and loaded on SDS-PAGE. First, Csp α interacts in MIN6 extracts with Hsc70/SGT, suggesting a relevant implication of this complex in insulin secretion (Figure 1B). Second, regarding the homology between the two J-domains, we investigated the ability of Csp β to recruit this complex. GST-Csp β was able to bind both Hsc70 and SGT to the same extent as GST-Csp α ($106 \pm 11\%$ and $99 \pm 22\%$ respectively, compared to Csp α , n=3). Thus, Csp β can recruit the chaperone complex composed by Hsc70/SGT in β -cells to a similar extent as Csp α , excluding therefore a role of the less conserved C-terminus domain in the formation of the trimeric complex.

3.2 Endogenous expression of Csp β in insulin-secreting cells

Next we addressed the question of Csp β expression in β -cells using RT-PCR. Since only mouse and human sequences are known, we used primers designed specifically for mouse Csp β sequence. We investigated the presence of Csp β in cDNA preparation obtained from MIN6 mouse cell line and from mouse brain. Mouse testis cDNA preparation was used as positive control since the original EST was obtained from a testis library. According to the actin amplification control, the cDNA concentration in this control template is lower than in the other ones. Nevertheless, an amplification signal displaying the expected size of 600bp for Csp β could be obtained with this cDNA template (Figure 2). On the other hand no amplification signal was obtained using mouse brain or MIN6 cells templates. This is consistent with previous northern-blot studies showing that Csp β mRNA was only detected in mouse testis [24]. Our data suggest that Csp β is not expressed in the β -pancreatic cell line MIN6.

3.3 Overexpressed Csp β is mainly non-palmitoylated but tightly bound to membranes

Since Csp β was not expressed in insulin-secreting cells, overexpression of myc-tagged CSPs in such cells allowed further characterization of Csp β in comparison to Csp α . In the MIN6 cells only very low expression rates of mycCsp β could be achieved (data not shown). For this reason we used the hamster insulinoma HIT-T15 cells, in which transient transfection is more efficient and overexpressed Csp α has been shown to be properly targeted within these cells [22]. We investigated Csp β distribution by Western-blot analysis after cellular fractionation into cytosolic and membrane fractions. Both, overexpressed mycCsp β and mycCsp α , were mainly found as a membrane associated proteins (Figure 3A). According to

the primary sequence, mycCsp α protein should display a molecular weight of 30kDa and post-translational modifications such as palmitoylations raise the apparent molecular weight up to ~38kDa as described previously [16, 22] (Figure 3A, lane 1, upper band). Consequently, overexpressed mycCsp β was detected as three different species (Figure 3A, lane1). The major band with an apparent molecular weight of ~30kDa most probably corresponded to a non-palmitoylated form. The minor band at ~33kDa probably correspond to a partially palmitoylated protein (see below). The band at ~65kDa observed upon overexpression of mycCsp β could correspond to a dimeric form of the overexpressed protein as previously observed for Csp α [22].

To investigate the level of palmitoylation of these proteins, we used hydroxylamine (NH₂OH) which is known to cleave such modifications, resulting in a decrease of the apparent molecular weight of the protein as previously observed for Csp α [16, 17]. Indeed, upon treatment with NH₂OH, mycCsp α was mainly detected as a ~30kDa band (Figure 3B lane 2). The minor band of ~33kDa could correspond to a partially depalmitoylated form, since it was more predominant with shorter NH₂OH treatments (data not shown) and in agreement with previous study [17]. When cell extracts containing mycCsp β were treated with NH₂OH, the minor band of ~33kDa disappeared (Figure 3B lane 4) and therefore represented probably a partially palmitoylated monomeric form. The major ~30kDa band was not affected by this treatment according to its electrophoretic motility, and thus most probably corresponds to a non-palmitoylated form.

Palmitoylation of CSPs is believed to be implicated in the stable association of CSPs with membranes [16, 17, 29, 30]. Treatments with several chemicals were done to test the membrane association of mycCsp β and compared to their effects on the membrane association

of mycCsp α . NH₂OH treatment which removes palmitoyl groups from cysteines is not able to detach mycCsp α and mycCsp β from the membrane pellets (Figure 3C), with 104 +/- 11% and 87 +/- 4% remaining membrane bound after such a treatment (Figure 3D). As a control we determined the behavior of endogenous SNAP25, a hydrophilic protein bound to membranes via four palmitoylated cysteine residues [31]. SNAP25 was stripped off from the membrane fraction by such a treatment (Figure 3C and D). Other treatments, such as high ionic stringency (1M NaCl) or combined NH₂OH/high ionic strength treatment did not displace significantly any of the CSP isoforms from the membrane fractions, whereas membrane associated β -actin used as a control was detached from membranes by such treatments (data not shown). As reported before [29], sodium carbonate treatment, known to release peripheral membrane proteins [32], was not able to displace mycCsp α from membranes (Figure 3C and D). In contrast, SNAP25 was efficiently removed from the membrane pellet by this treatment. MycCsp β was only partially stripped off by sodium carbonate treatment with 62 +/- 2% remaining membrane associated. Complete solubilization of mycCsp α and mycCsp β from membranes was only achieved after Triton X-100 treatment. Thus, both mycCsp α (palmitoylated or not) and mycCsp β (non-palmitoylated) expressed in β -pancreatic cell lines behave like integral membrane proteins.

3.4 Unmodified recombinant Csp α and Csp β bind to cellular membranes

It has been proposed that palmitoylation itself is not strictly required for stable membrane association but is rather essential for initial targeting of the protein to the vesicle membranes [33]. We therefore first evaluated in-silico the propensity of Csp to distribute into the lipid bilayer. The TMHMM program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) predicts

a membrane domain between A₁₀₈ and N₁₃₀ in CSP α and between A₁₁₂ and C₁₃₃ in CSP β . Further analysis using MPEx [34] indicates that these domains indeed have a propensity to move from the aqueous environment to the interface (ΔG -10.3 and -11.2 kJ/mol for Csp α and Csp β , respectively). However, calculation of the interface/octanol values for these hydrophobic domains, which reflects the tendency to insert fully into the hydrophobic core of the membrane, revealed values for ΔG of -0.1 and -0.9 kJ/mol only. For comparison, the corresponding values obtained for the known transmembrane domains of the SNARE proteins VAMP2 or syntaxin 1 are -9.8 and -6.6 kJ/mol. Helix-wheel drawing did not reveal any obvious amphipathy. These calculations suggest that Csp α and β are membrane embedded but do most likely not traverse the lipid bilayer.

To assess *in-vitro* the respective role of palmitoylation and intrinsic properties of CSPs in terms of membrane association, we investigated the ability of recombinant GST-CSPs to bind to membranes. As these proteins were produced in bacteria, they are non-palmitoylated and the assay is therefore not influenced by lipidation. Incubation of recombinant GST-Csp α or GST-Csp β protein with freshly prepared cellular homogenates (PNS) at 4°C resulted in a saturable association with membrane fraction with an EC₅₀ of approx. 18 nM for Csp α and 10 nM for Csp β (Figure 4). This association did not occur with GST alone and less than 10% of GST-Csp was recovered in the absence of PNS. Therefore attachment to PNS membranes is mediated by the intrinsic properties of CSPs. This result indicated that palmitoylation of CSPs was not required for membrane association and corroborates our previous data obtained from overexpression of Csp β in clonal β -cells. However, after *in vitro* binding of recombinant proteins to membranes, both GST-Csp α and GST-Csp β were partially stripped off from membranes by sodium carbonate treatment but not by buffer alone (data not shown). This

indicated that the attachment obtained in vitro was weaker than the ones observed in transfected cells.

3.5 Subcellular localization of overexpressed Csp β

We next asked whether the behavior of mycCsp β in term of post-translational modifications and membrane association may be linked to a particular subcellular localization within the cells. Therefore, the subcellular localization of overexpressed mycCsp β was investigated in comparison to mycCsp α in HIT-T15 cells by immunofluorescence. Csp α and overexpressed mycCsp α are mainly addressed to LDCV in pancreatic β -cells ([6, 16, 23] and Figure 5A). MycCsp β displayed a specific granular staining, but clearly did not co-localize with insulin-containing granules (Figure 5B). As Csp α localizes also on synaptic-like microvesicles (SLMV) [6], we examined whether the same applies for Csp β using SVP38/Synaptophysin as a marker for this compartment. We could not find any co-localization between mycCsp β and SVP38, or with EEA1 (early endosomal antigen 1) (data not shown), indicating that mycCsp β was not localized on these organelles. However, co-staining with an antibody against Vti1b, a marker for the trans-Golgi network (TGN) and derived vesicles [35, 36] clearly revealed that overexpressed mycCsp β was mainly found within or adjacent to the TGN (Figure 5D). In contrast, co-localization with Vti1b was not observed in the case of mycCsp α (Figure 5C). Thus mycCsp β , despite its wide sequence homology with Csp α , displayed a specific sub-cellular localization in HIT-T15 cells distinct from Csp α .

4. DISCUSSION

CSPs are synaptic vesicle and secretory granule associated proteins. The isoform Csp α has a major role in exocytosis, mainly by regulating calcium channel activity in neurosecretion and also by acting directly on insulin secretion in β -pancreatic cells independently from ion channel regulation [6, 23]. Several different isoforms have been described and could reflect differences in terms of activity or localization. In this study, we compared two CSP isoforms, Csp α , the first one described in the literature [10] and the newly described from testis cDNA library, Csp β [24]. Regarding the heterogeneity of cell types composing the testis and the variations between primary cells and the available tumor cell lines, we resorted to transient expression of both isoforms in pancreatic β -cell derivative cell lines, a cell system in which Csp α has been previously characterized in term of location, interactions and post-translational modifications.

As shown here, Csp α interacts with the Hsc70/SGT chaperone complex also in endocrine cells, a complex previously identified as functionally relevant in neurosecretion [8]. It is thus likely that the trimeric Csp/Hsc70/SGT complex intervenes not only in exocytosis of synaptic vesicles, but also during exocytosis of large dense core vesicles such as insulin-containing secretory granules. The J-domain of Csp α has been reported to support most of its interaction with Hsc70 [14, 15, 37]. Our finding that Csp β interacts to a comparable extent with Hsc70 further strengthens the role of the J-domain in this interaction in view of the very high sequence homology between Csp α and Csp β within this domain. Moreover, pull-down experiments using Csp α or Csp β recovered similar amounts of SGT. Direct interaction of Csp α with SGT is mainly mediated by its cysteine string region which is indeed well conserved between the two isoforms [9]. As the C-terminus domain of CSPs is the less

conserved domain, the formation of the trimeric Csp/Hsc70/SGT complex does probably not require the latter domain.

Csp β was not expressed in MIN6 cells according to our RT-PCR analysis. Since specific antibodies are not available for this isoform, we used myc tagged Csp β to compare this isoform with Csp α in insulin-secreting cell lines. Two main features were observed. First, unlike mycCsp α , mycCsp β is mainly produced as a non-palmitoylated form. According to previous studies, Csp α is no longer able to interact *in vivo* with membranes when cysteine residues are replaced by serine residues [33]. However it is difficult to conclude if this mis-targeting results from the absence of palmitoylation or from the replacement *per se* of hydrophobic residues, such as the cysteines. The persistent membrane attachment observed for mycCsp β strongly indicates that the establishment of a tight membrane association does not require an extensive palmitoylation of cysteine residues within CSP proteins *in vivo*. It should be noticed that even though mycCsp β was lacking extensive palmitoylations, it was only partially displaced from membranes by sodium carbonate treatment. It is therefore likely that membrane anchoring of both mycCsp α and mycCsp β is not solely based on posttranslational acylation of cysteine residues but also relies on intrinsic properties of these proteins or interactions. According to membrane domain predictions and thermodynamic calculations, both CSPs contain a hydrophobic domain including the cysteine-string but which has not a strong propensity to fully translocate into the hydrophobic core. This *in-silico* assessment is strengthened by the results obtained using recombinant CSP isoforms produced and purified from bacteria, thus without any palmitoylation. They were still able to interact rather efficiently with HIT-T15 cell membranes *in vitro* at 4°C but were not fully embedded in membranes according to the sensitivity to sodium carbonate. Therefore *in-silico* and *in-vitro*

data suggest the presence of additional factors in-vivo promoting the insertion into the hydrophobic core such as energy, a specific machinery or folding of the hydrophobic domain that may not be fully attained by the recombinant protein.

Second, we have shown here that mycCsp β displayed a different intracellular localization than either endogenous Csp α or overexpressed mycCsp α since it clearly did not co-localize with LDCVs, the insulin containing granules. MycCsp β rather co-localized with Vti1b, a known marker for the TGN and derived vesicles [35, 36]. It is tempting to correlate the lack of extensive post-translational modifications of Csp β and its specific location within the Golgi apparatus. One may consider that palmitoylation could be either necessary to reinforce the interaction with membranes or to assist in the targeting/retention of the protein to a specific intracellular compartment. Even though Csp β and Csp α display a high degree of sequence homology within the cysteine string domain, a slight difference could be critical for the initiation of the post-translational modification [38]. Subsequently the lack of extensive palmitoylation on Csp β could interfere with its targeting to LDCVs. Alternatively, palmitoylation may occur subsequent to targeting as had been proposed for the t-SNARE SNAP25 where this modification occurs after targeting to plasma membrane and depends on the interaction with another protein, i.e. syntaxin 1 [39].

Our data stress the relevance of Csp β as a tool to investigate not only the behaviour of CSPs in insulin secreting cells but also to examine more generally the functions of CSPs, particularly regarding the possible correlation between targeting and palmitoylation level. It has been recently proposed that Hsc70 could have a regulatory role in the membrane fusion processes taking place during ER to Golgi transport possibly via an interaction with the specific ER/Golgi SNAREs. [40]. Hsc70 like any other DnaK proteins can be considered as

general folding catalyst which performs tasks requiring a DnaJ like partner to recruit a specific target substrate at a defined location, to activate its ATPase activity and to recycle the chaperone [41]. Distinct protein-protein interactions via their variable C-terminus, as had been described for Csp1 and Csp2 [22], and different post-translational modifications, as shown here, may contribute to the specificity of CSP isoforms in distinct membrane fusion events.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. J. Gruenberg for the generous gift of the anti-EEA1 antibody. We thank Marie-Noëlle Benassy for excellent technical assistance. We are grateful to Drs V. Lagrée-Bringtown, B. Roger and M. Dubois for helpful discussions and careful readings of the manuscript. This work was supported by grants of the Region of Aquitaine, of the University of Bordeaux I (BQR) and the MENRT.

REFERENCES

- [1] J. Lang, Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 3-17.
- [2] R. Jahn, T. Lang, T.C. Sudhof, Membrane fusion, *Cell* 112 (2003) 519-533.
- [3] A. Morgan, R.D. Burgoyne, Is NSF a fusion protein?, *Trends Cell Biol.* 5 (1995) 335-359.
- [4] L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse, *J. Neurochem.* 74 (2000) 1781-1789.
- [5] G.J. Evans, A. Morgan, R.D. Burgoyne, Tying everything together: the multiple roles of cysteine string protein (CSP) in regulated exocytosis, *Traffic* 4 (2003) 653-659.
- [6] H. Zhang, W.L. Kelley, L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, C.B. Wollheim, J. Lang, Cysteine-string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes, *FEBS Lett.* 437 (1998) 267-272.
- [7] K.E. Zinsmaier, P. Bronk, Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis, *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 1-11.
- [8] S. Tobaben, P. Thakur, R. Fernandez-Chacon, T.C. Sudhof, J. Rettig, B. Stahl, A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine, *Neuron* 31 (2001) 987-999.
- [9] S. Tobaben, F. Varoqueaux, N. Brose, B. Stahl, G. Meyer, A brain-specific isoform of small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein binds to Hsc70 and the cysteine string protein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 38376-38383.
- [10] K.E. Zinsmaier, A. Hofbauer, G. Heimbeck, G.O. Pflugfelder, S. Buchner, E. Buchner, A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of *Drosophila*, *J. Neurogenet.* 7 (1990) 15-29.
- [11] J.A. Umbach, K.E. Zinsmaier, K.K. Eberle, E. Buchner, S. Benzer, C.B. Gundersen, Presynaptic dysfunction in *Drosophila* csp mutants, *Neuron* 13 (1994) 899-907.
- [12] K.E. Zinsmaier, K.K. Eberle, E. Buchner, N. Walter, S. Benzer, Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*, *Science* 263 (1994) 977-980.

- [13] G.J. Evans, M.C. Wilkinson, M.E. Graham, K.M. Turner, L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, A. Morgan, Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47877-47885.
- [14] J.E. Braun, S.M. Wilbanks, R.H. Scheller, The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 25989-25993.
- [15] L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine-string protein, *Biochem. J.* 322 (1997) 853-858.
- [16] H. Zhang, W.L. Kelley, L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, J. Lang, Mutational analysis of cysteine-string protein function in insulin exocytosis, *J. Cell Sci.* 112 (1999) 1345-1351.
- [17] C.B. Gundersen, A. Mastrogiacomo, K. Faull, J.A. Umbach, Extensive lipidation of a Torpedo cysteine string protein, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 19197-19199.
- [18] T. Coppola, C. Gundersen, Widespread expression of human cysteine string proteins, *FEBS Lett.* 391 (1996) 269-272.
- [19] J.M. Magga, S.E. Jarvis, M.I. Arnot, G.W. Zamponi, J.E. Braun, Cysteine string protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels, *Neuron* 28 (2000) 195-204.
- [20] M. Natochin, T.N. Campbell, B. Barren, L.C. Miller, S. Hameed, N.O. Artemyev, J.E. Braun, Characterization of the G α (s) regulator cysteine string protein, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 30236-30241.
- [21] P. Bronk, Z. Nie, M.K. Klose, K. Dawson-Scully, J. Zhang, R.M. Robertson, H.L. Atwood, K.E. Zinsmaier, The multiple functions of cysteine-string protein analyzed at *Drosophila* nerve terminals, *J. Neurosci.* 25 (2005) 2204-2214.
- [22] F. Boal, H. Zhang, C. Tessier, P. Scotti, J. Lang, The variable C-terminus of cysteine string proteins modulates exocytosis and protein-protein interactions, *Biochemistry* 43 (2004) 16212-16223.
- [23] H. Brown, O. Larsson, R. Branstrom, S.N. Yang, B. Leibiger, I. Leibiger, G. Fried, T. Moede, J.T. Deeney, G.R. Brown, G. Jacobsson, C.J. Rhodes, J.E. Braun, R.H.

- Scheller, B.E. Corkey, P.O. Berggren, B. Meister, Cysteine string protein (CSP) is an insulin secretory granule-associated protein regulating beta-cell exocytosis, *EMBO J.* 17 (1998) 5048-5058.
- [24] R. Fernandez-Chacon, M. Wolfel, H. Nishimune, L. Tabares, F. Schmitz, M. Castellano-Munoz, C. Rosenmund, M.L. Montesinos, J.R. Sanes, R. Schneggenburger, T.C. Sudhof, The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration, *Neuron* 42 (2004) 237-251.
- [25] L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, Identification of a novel cysteine string protein variant and expression of cysteine string proteins in non-neuronal cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7320-7323.
- [26] C. Cziepluch, E. Kordes, R. Poirey, A. Grewenig, J. Rommelaere, J.C. Jauniaux, Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1, *J. Virol.* 72 (1998) 4149-4156.
- [27] R. Gagescu, N. Demarex, R.G. Parton, W. Hunziker, L.A. Huber, J. Gruenberg, The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 2775-2791.
- [28] C. Monerrat, F. Boal, F. Grise, A. Hemar, J. Lang, Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 73-81.
- [29] J. van de Goor, R.B. Kelly, Association of Drosophila cysteine string proteins with membranes, *FEBS Lett.* 380 (1996) 251-256.
- [30] A. Mastrogiacomo, S.A. Kohan, J.P. Whitelegge, C.B. Gundersen, Intrinsic membrane association of Drosophila cysteine string proteins, *FEBS Lett.* 436 (1998) 85-91.
- [31] D.T. Hess, T.M. Slater, M.C. Wilson, J.H. Skene, The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS, *J. Neurosci.* 12 (1992) 4634-4641.

- [32] Y. Fujiki, A.L. Hubbard, S. Fowler, P.B. Lazarow, Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum, *J. Cell Biol.* 93 (1982) 97-102.
- [33] L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting, *Biochem. J.* 335 (1998) 205-209.
- [34] S.H. White, W.C. Wimley, Membrane protein folding and stability: physical principles, *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28 (1999) 319-365.
- [35] Y. Xu, S.H. Wong, B.L. Tang, V.N. Subramaniam, T. Zhang, W. Hong, A 29-kilodalton Golgi soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Vti1-rp2) implicated in protein trafficking in the secretory pathway, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 21783-21789.
- [36] W. Antonin, D. Riedel, G.F. von Mollard, The SNARE Vti1 α -beta is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex, *J. Neurosci.* 20 (2000) 5724-5732.
- [37] L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31420-31426.
- [38] J.E. Smotryś, M.E. Linder, Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function, *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 559-587.
- [39] K. Vogel, J.P. Cabaniols, P.A. Roche, Targeting of SNAP-25 to membranes is mediated by its association with the target SNARE syntaxin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 2959-2965.
- [40] A.P. Joglekar, J.C. Hay, Evidence for regulation of ER/Golgi SNARE complex formation by hsc70 chaperones, *Eur. J. Cell Biol.* 84 (2005) 529-542.
- [41] S. Rudiger, J. Schneider-Mergener, B. Bukau, Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone, *EMBO J.* 20 (2001) 1042-1050.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. The Csp β isoform is able to recruit both Hsc70 and SGT. (A) Sequence comparison between mouse Csp α and Csp β . Mouse Csp α protein sequence and predicted sequence for mouse Csp β are depicted. Identical residues are shaded in dark grey whereas similar residues are colored in light grey. Gaps inserted are represented by '-'. The different domains are indicated by arrows above sequences. (B) Csp β interacts with Hsc70 and SGT. MIN6 cell extracts were incubated with either glutathione-sepharose beads or with beads coated with GST, GST-Csp α or GST-Csp β . Thirty percent of bound proteins and 0.5% of the extract (Input) were immunoblotted with antibodies raised against Hsc70 and SGT as indicated. The data are representative of three separate experiments.

Fig. 2. Csp β cDNA is present in testis but not in brain nor in the insulin secreting MIN6 cell line by RT-PCR. MIN6 cells, mouse brain or mouse testis cDNA were amplified with specific primers for mouse Csp β (upper panel) or β -Actin (lower panel). Specific amplification of a band displaying the expected size of 600 bp was only achieved with testis cDNA.

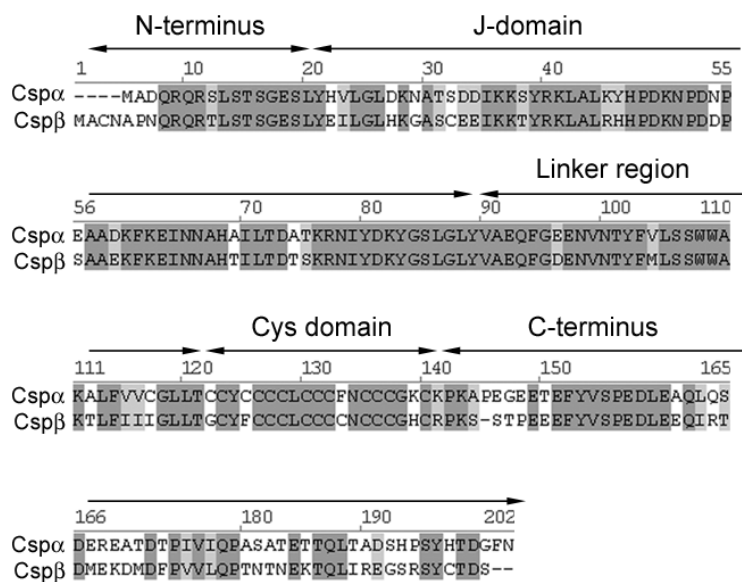
Fig. 3. Transiently expressed Csp β is mainly unpalmitoylated but tightly bound to membranes in β -pancreatic HIT-T15 cells. (A) Subcellular fractionation of HIT-T15 cells transiently overexpressing mycCsp α or mycCsp β . Post-nuclear supernatant (PNS), membrane (M) and cytosolic (C) fractions were submitted to SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-myc antibody. Molecular mass markers are indicated in kilodaltons. (B) Total cell extracts from cells expressing mycCsp α or mycCsp β were treated (+) or not (-) with NH₂OH to cleave palmitoylation modifications. (C) Membrane association of mycCsp α and mycCsp β was assayed by indicated treatments. After treatments, samples were centrifuged and the same amount of each membrane fractions (volume to volume) were immunoblotted with an anti-myc antibody to reveal myc-Csp α and myc-Csp β and with an anti-SNAP25 antibody. (D) Membrane association of mycCsp α , mycCsp β and SNAP25 after chemical treatments was quantified and expressed as percentage of each protein present in the PBS treated resulting pellet. Results are presented as means +/- sem, n=3. An asterisk means p<0.003 as compared to PBS treatment.

Fig. 4. Recombinant unpalmitoylated GST-Csp α and GST-Csp β can bind to membranes. Recombinant GST-Csp α , GST-Csp β or GST alone was mixed at indicated concentration with freshly prepared cellular post-nuclear supernatant (PNS). After 2h incubation at 4°C, cellular membranes and associated proteins (Bound material) were pelleted by centrifugation, extensively washed and solubilized. The amount of recombinant proteins bound to membranes were analyzed by Western-blot using an anti-GST antibody and quantified (upper panel). Bound on unbound material was plotted against recombinant protein concentrations used in each binding assay (lower panel). The EC₅₀ was estimated to be about 18 nM for GST-Csp α and about 10 nM for GST-Csp β (calculated by the program Origin v.6.1). These data are representative of three independent experiments.

Fig. 5. Transiently expressed Csp β is located on the trans-Golgi network in clonal β -cells. Immunofluorescence studies were performed on HIT-T15 cells transiently expressing mycCsp α (A and C) or mycCsp β (B and D) as indicated. Cells were double-stained with a polyclonal anti-myc antibody revealed by a FITC-coupled secondary antibody (green channel, “myc”) and with either a monoclonal anti-insulin antibody (red channel, “insulin”) or with in a monoclonal anti-Vti1b antibody (red channel, “Vti1b”) revealed by a Cy3-conjugated antibody. Images were acquired using a confocal laser microscope. Phase contrast, green and red channels and overlay images are shown. Colocalization results in yellow. Bar size equals to 10 μ m.

Fig. 1

A



B

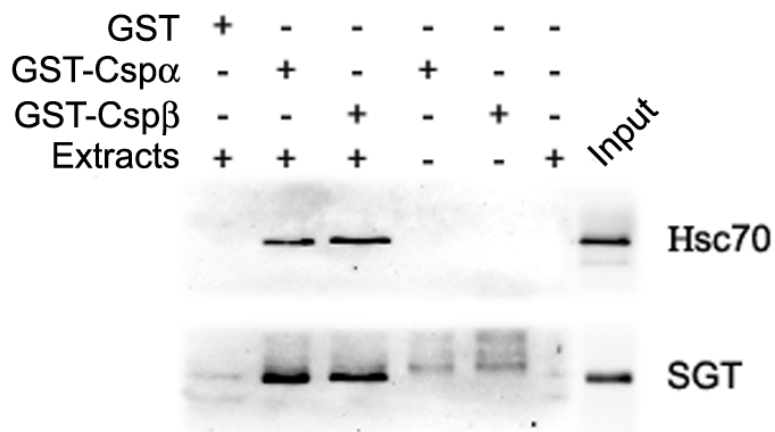


Fig. 2

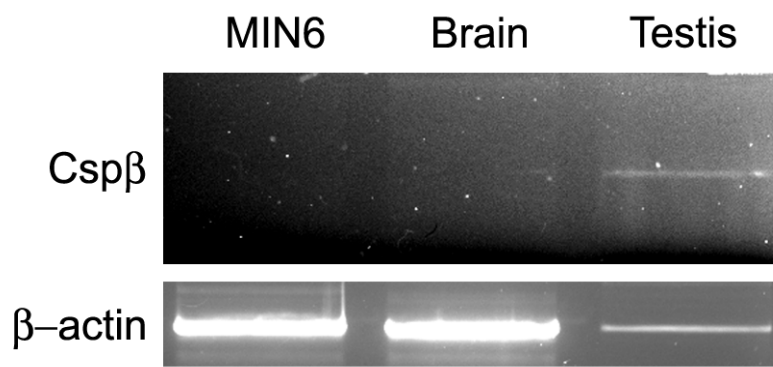


Fig. 3

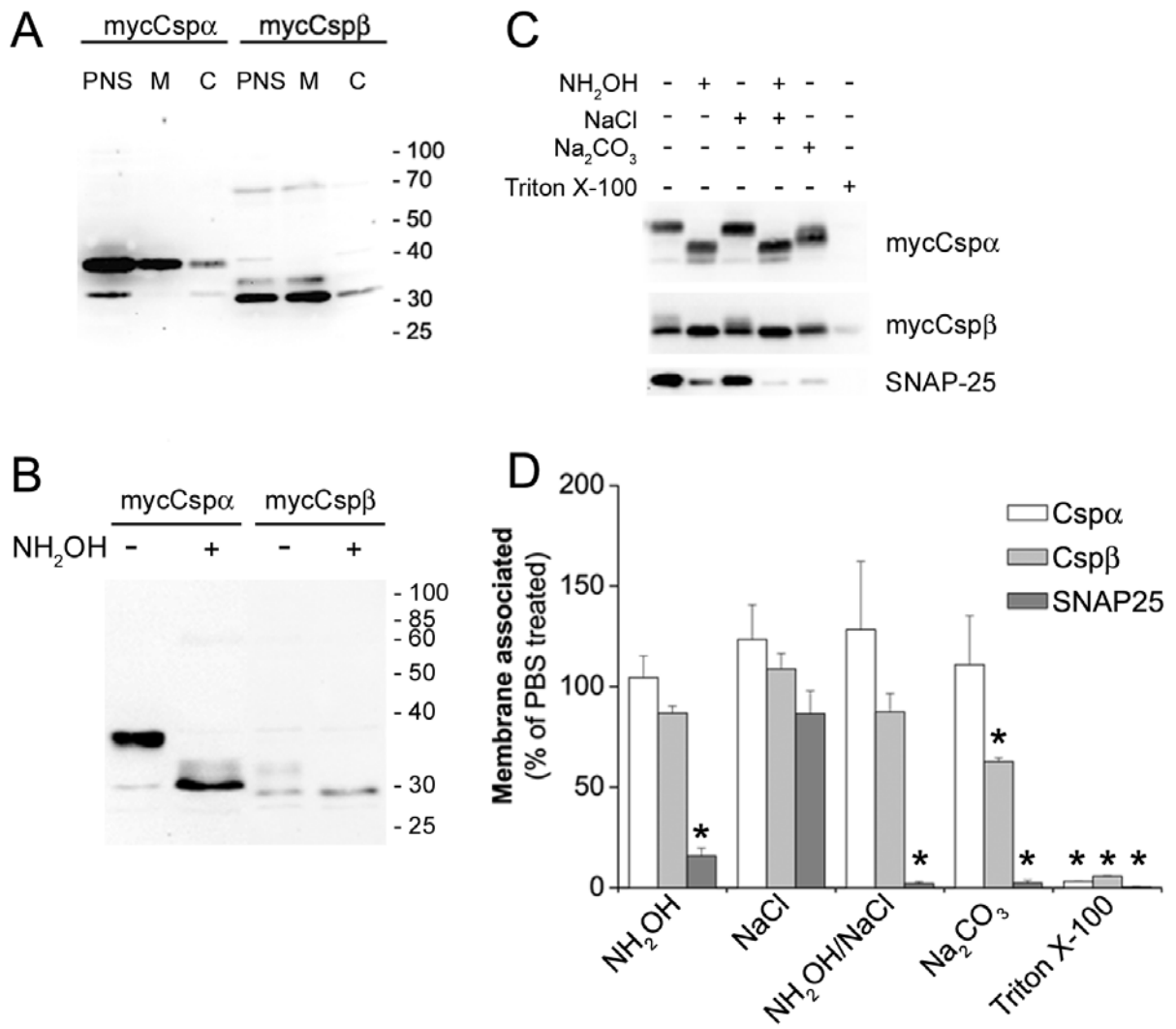


Fig. 4

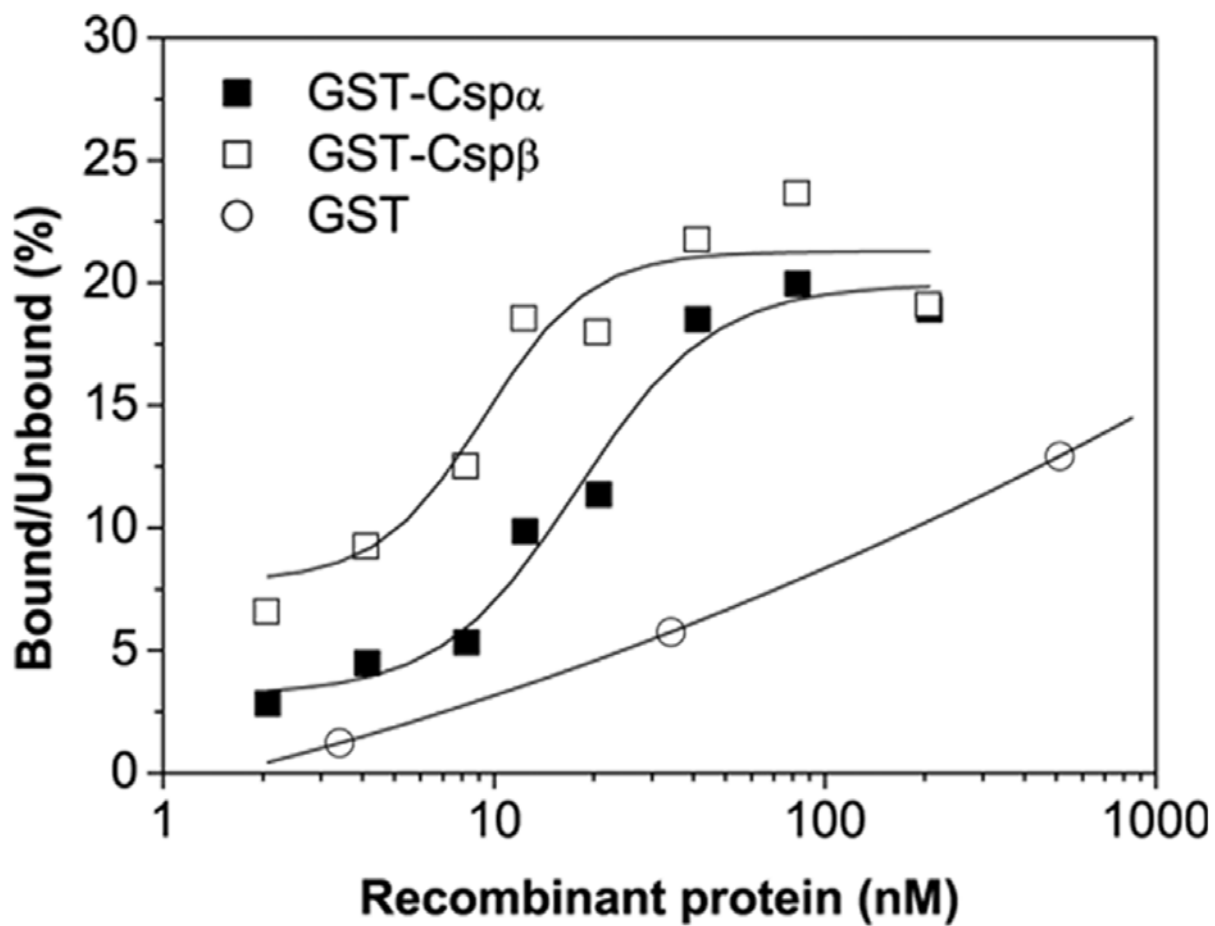
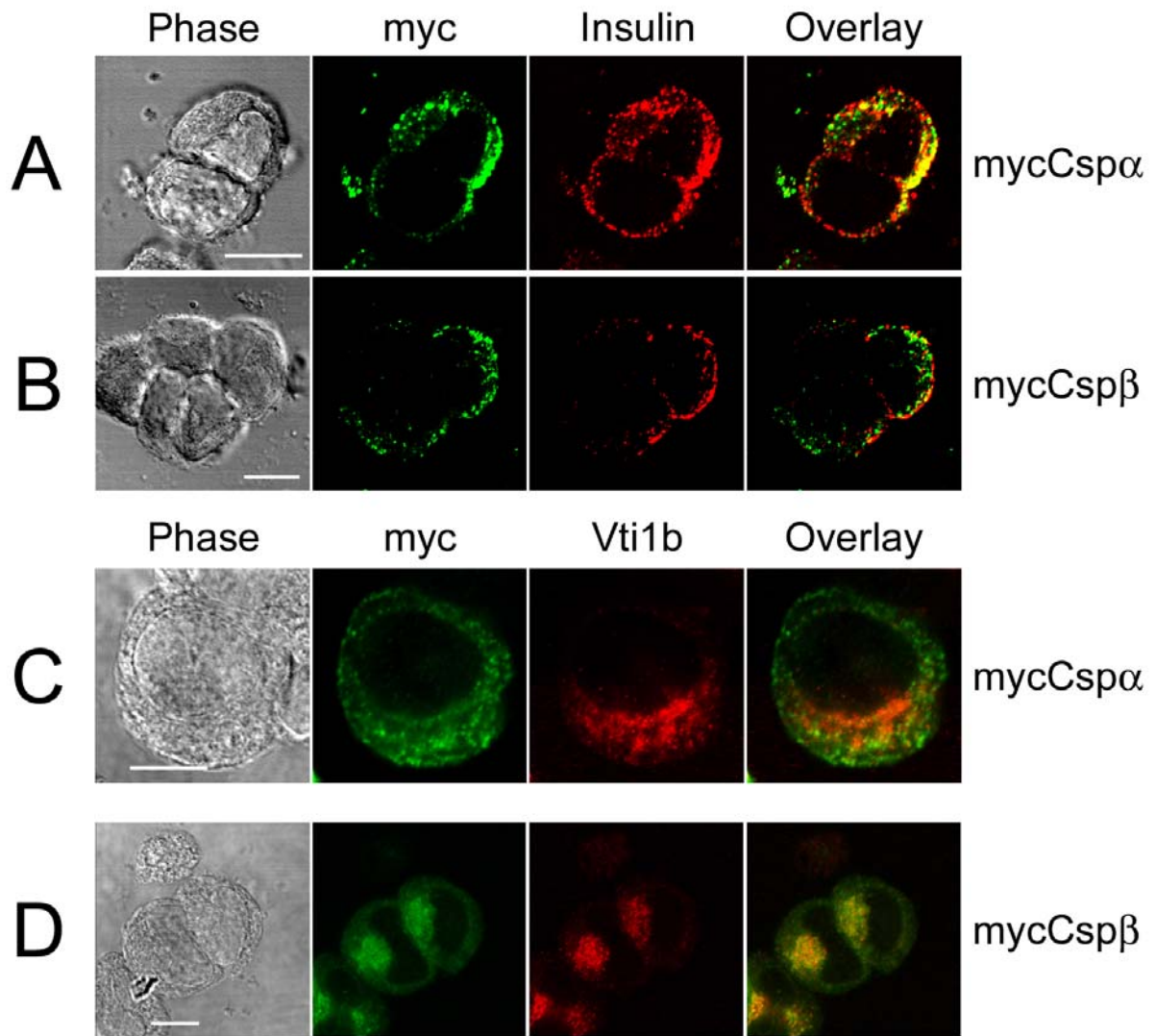


Fig. 5



CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons caractérisé biochimiquement l'isoforme Csp β dans les cellules β -pancréatiques.

Nous avons dans un premier temps montré que le complexe Csp α /Hsc70/SGT se forme dans les cellules β -pancréatiques, ce qui suggère que ce complexe chaperon joue un rôle également dans la sécrétion d'insuline. La Csp β est capable elle-aussi de recruter ce complexe, est cela dans une échelle équivalente à Csp α . En se basant sur les homologies de séquences entre Csp α et Csp β , ce résultat suggère que le recrutement du complexe Hsc70/SGT n'est pas basé sur le domaine C-terminal, parce que celui-ci est variable entre les deux isoformes. Nous avons ensuite montré par RT-PCR que la Csp β n'est pas exprimée dans la lignée MIN6 de cellules β -pancréatiques. Ainsi, pour poursuivre plus avant notre caractérisation de Csp β , nous avons choisi de la surexprimer.

Par une approche de fractionnement sous-cellulaire, nous avons montré que la Csp β se trouve dans la fraction membranaire bien qu'elle ne soit majoritairement pas palmitoylée. De plus, en traitant chimiquement les extraits cellulaires, nous avons montré que la Csp β , tout comme la Csp α , se comporte majoritairement comme une protéine intrinsèque de la membrane, et ce de manière indépendante du niveau de palmitoylation de la protéine. Ces résultats confirment que les palmitoylations des Csp ne sont pas nécessaires pour l'ancrage stable des protéines dans la membrane. De même, nous avons montré que les protéines recombinantes (donc sans modifications post-traductionnelles) Csp α et Csp β sont capables de s'associer avec des membranes cellulaires, ce qui renforce l'hypothèse que l'insertion des Csp dans les membranes est médiée par leurs propriétés intrinsèques. Néanmoins, en absence de la machinerie cellulaire, Csp α et Csp β ne sont pas capables de s'insérer de manière stable dans la bicouche lipidique.

Nous avons ensuite localisé la Csp β surexprimée dans les cellules β -pancréatiques et avons montré qu'elle présente une localisation différente de celle de Csp α . Cette dernière est localisée sur les LDVC tandis que la Csp β est localisée au niveau du réseau trans-golgien.

Ce travail a été soumis au journal *Biochimica and Biophysica Acta*, dans la section *Molecular Cell Research*. Il est actuellement en révision.

Résultats – Partie III

*Indirect interaction between Cystein-string protein
(Csp) α and SNAP25 is mediated by the calcium
sensor synaptotagmin 9 in clonal β -pancreatic cells*

INTRODUCTION

La protéine Csp est une protéine vésiculaire impliquée dans le processus d'exocytose des vésicules synaptiques des neurones et des granules d'insuline des cellules β -pancréatiques.

Il est généralement admis qu'elle régule l'activité des canaux calciques neuronaux, probablement en assurant un lien physique entre les canaux calciques de type N ou P/Q et les protéines de l'exocytose, notamment les protéines SNARE. Ainsi, elle interagit de manière directe avec le canal de type P/Q, et régule négativement l'activité du canal de type N via les protéines G hétérotrimériques. Elle interagit également de manière directe avec la t-SNARE Syntaxine 1A, ainsi qu'avec le senseur calcique neuronal Synaptotagmine (Syt) 1.

Il semble cependant que sa fonction précise varie d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi, dans les cellules β -pancréatiques ou chromaffines, elle agit au niveau des étapes tardives de la sécrétion, indépendamment d'une régulation des canaux calciques. Il a été proposé que son action de co-chaperonne serait prépondérante dans ces types cellulaires. En effet, la Csp est une protéine dite co-chaperonne car elle est capable de recruter et d'activer la chaperonne Hsc70 grâce à son domaine J.

De manière à mieux comprendre son rôle dans la sécrétion d'insuline, nous avons entrepris une recherche de partenaires protéiques de la Csp dans les cellules β -pancréatiques par une approche de co-sédimentation à la GST et mesures des interactions entre protéines recombinantes purifiées. En raison de nos précédents résultats sur l'interaction de Csp α avec VAMP2 (voir partie I des Résultats), nous avons concentré nos efforts sur la t-SNARE SNAP25 et le senseur calcique Syt9, ainsi que sur les domaines impliqués dans ces interactions.

TITLE PAGE

Indirect interaction between Cystein-string protein (Csp) α and SNAP25 is mediated by the calcium sensor synaptotagmin 9 in clonal β -pancreatic cells

Frédéric Boal, Pier Scotti, Thomas Gil-de-Muro, and Jochen Lang

Institut Européen de Chimie et Biologie, Pôle Biologie Cellulaire et Moléculaire, JE 2390, F-33607 Pessac, France

SUMMARY

Cysteine-string protein α (Csp α) is a vesicular co-chaperone protein involved in the control of neurotransmission and hormone exocytosis. It is composed of several characterized domains: a variable N-terminus, a highly conserved J-domain, a linker region, a central cysteine-rich domain, and a C-terminus which could support substrate specificity regarding the Hsc70 chaperone activity. Its precise role in insulin secretion is still not understood. We investigate in this study new binding partners in MIN6 β -pancreatic cells. Pull-down experiments and *in vitro* binding of recombinant proteins demonstrated that Csp α interacts with the t-SNARE SNAP25. This interaction is indirect and is supported by the N-terminal domains of Csp α . Csp α also interacted directly with the calcium sensor Synaptotagmin 9 (Syt9) in a calcium-independent manner. Furthermore, Syt9 directly interacted *in vitro* with SNAP25 and direct interactions of Syt9 with either SNAP25 or with Csp α are not exclusive. Taking together, our data suggest that Csp α could interact with SNAP25 via Syt9 and this complex may be relevant in the control of a late stage of exocytosis.

ABBREVIATIONS

Csp: cysteine-string proteins; LDVC: large dense core vesicles; SNARE: soluble N-ethyl maleimide sensitive factor; SNAP25: synaptosome-associated protein of 25kDa; VAMP: vesicle-associated membrane protein; Hsc70: heat shock cognate protein of 70kDa; SGT: small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein, Syt: synaptotagmin.

1. Introduction

Insulin secretion occurs in pancreatic β -cells by regulated exocytosis, a tightly controlled phenomenon involving several steps including budding of large dense core vesicles (LDCV) from the Golgi apparatus, transport and docking of these vesicles near the plasma membrane, priming step and then triggering of exocytosis by a calcium influx through calcium channels [1, 2].

SNARE (soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor) proteins are believed to be the core of the exocytotic machinery composed by syntaxin 1A and SNAP25 located on the plasma membrane and VAMP2/Synaptobrevin on the vesicle [3, 4]. Additional proteins are needed to ensure regulated exocytosis. The co-chaperones cysteine-string proteins (Csp) are one of these proteins involved in this process [5, 6].

Csp were originally described in drosophila as synaptic vesicle proteins implicated in neurotransmitter release [7, 8]. In mammals, several isoforms have been described: Csp α 1 and Csp α 2 which are generated by alternative splicing of a single gene [9], and recently described Csp β and Csp γ [10]. Csp α are expressed on synaptic vesicles [11] and on LDCV in mammalian neuroendocrine and endocrine cells such as pancreatic β -cells [12-14]. Csp contains several domains: the N-terminal domain which is not involved in the overall regulation of insulin release [15] but is phosphorylated on its serine 10 residue by PKA [16] and PKB/Akt [17], the conserved J-domain which recruits and activates the chaperone Hsc70 [18-20], the linker region which is implicated in the control of insulin exocytosis according to point mutation study [21], the central cysteine-rich region which plays a role in the anchoring or targeting of the protein [22, 23], and the evolutionary variable C-terminal domain which is involved in homodimerization and interaction with VAMP2 [15].

Several proteins interacting with Csp α have been described. Csp α interacts with the P/Q-type calcium channel [24], the chaperone Hsp90 [25], via its J-domain with Hsc70 [18, 20],

and with heterotrimeric G $\beta\gamma$ proteins [26, 27]. The latter interaction involves the C-terminal part of Csp α including the cysteine-rich region, and results in a tight inhibition of the N-type calcium channel [26, 27]. Moreover, a trimeric chaperone complex involving Csp α , Hsc70 and the cochaperone SGT (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein) has been characterized. SGT interacts with the cysteine-rich region of Csp α and this complex may be relevant in neurosecretion [28, 29] and in insulin release [23]. Csp α also interacts directly with the protein SNARE syntaxin but divergent data have been reported [24, 30, 31]. It has been shown that Csp α interacts with VAMP2 in a calcium-dependant manner in neurons [24] and in pancreatic β -cells [15]. Recently, preliminary data obtained from Csp α KO mice indicate a possible interaction between SNAP25 and Csp α . Indeed, deletion of Csp α inhibits SNARE complex assembly and reduces SNAP25 expression by 30 to 40% [32].

Phosphorylation of Csp α on its serine 10 residue appears to be implicated in the control of exocytosis kinetic as suggested by expression of a non-phosphorylatable mutant Csp α in PC12 cells [16]. Csp α interacts directly with the neuronal calcium sensor synaptotagmin (Syt) 1 and this interaction is limited by the phosphorylation of Csp α [33].

Synaptotagmins form a family of calcium-sensing proteins implicated in the regulation of membrane fusion in vesicular transport [34]. They are composed of a short luminal N-terminal domain, a transmembrane domain and two C2 cytosolic domains. These domains named C2A and C2B bind phospholipids and SNARE proteins in a calcium-dependant manner [35, 36]. Whereas Syt1 is implicated in the triggering of neuroexocytosis [4], Syt9 may be the calcium sensor regulating exocytosis triggering of LDCV in PC12 cells [37] and in pancreatic β -cells [38].

In this study we investigated the interaction between Csp α and the tSNARE protein SNAP25. Our data demonstrate that this interaction was indirect and involved the N-terminal

part of Csp α and not the cysteine-rich domain. In an attempt to find the intermediate, we investigated the direct interaction between Csp α and Syt9. We found that it bound to Syt9 in a greater extent than to Syt1, suggesting specific sequence requirements, and that the interaction seemed to be supported by the N-terminal part of Csp α and possibly by the conserved C2 domains of Syt. Taking together, our results indicate that the interaction between Csp α and SNAP25 could be mediated by the calcium sensor Syt9 in pancreatic β -cells.

2. Material and methods

Material

Glutathione-sepharose 4B was obtained from GE Healthcare, Ni²⁺-NTA matrix was from Qiagen, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), Dnase I, leupeptin hemisulfate, aprotinin, PMSF and pepstatin A from Sigma. Restriction enzymes were from Roche, and Pfu turbo DNA polymerase (Stratagene) was used for PCR. The following antibodies were used in immunoblot experiments: anti-Csp antiserum [9] (1/2000) or anti-Csp antibody A1567 (Chemicon) (1/2000); anti-PentaHis (Qiagen) (1/1000). HRP-conjugated secondary anti-mouse and anti-rabbit IgG antibodies were from GE Healthcare and used 1/2000 for immunoblotting.

Molecular cloning

Plasmids encoding the cytoplasmic domains of Syt1,9,11 and 13 fused to GST were described previously [39]. Most pQE30 vectors encoding for His⁶-Csp constructs used in this study were as described [15] or were obtained by subcloning the corresponding coding sequence in pQE30 vectors. The point mutation S10D was obtained by using the

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer instructions, using the following primers: 5'-CCAGAGGCAGCG(C/G)TCACTC(TC/GA)TACCTCTGGGG-3' (sense) and 5'-CCCCAGAGGTA(GA/TC)GAGTGA(G/C)CGCTGCCTCTGG-3' (antisense). Corresponding wild-type Csp α -containing vectors were used as a template. The C/G mutation (sense primer) was used to screen the obtained clones against *Eco47III* restriction site. To obtain the His⁶-SSP construct, a *Bam*HI/*Sal*I SSP fragment was excised from pVP16-3 vector kindly provided by Dr G. Meyer (Max Plank Institute for Experimental Medicine, Germany) [29] and ligated with pQE11 empty vector (Quiagen) digested with the same enzymes. SSP in fusion with GST was constructed by PCR using the following primers: 5'-CGGGATCCATGGCTGACCAGAGG-3' (sense, *Bam*HI restriction site underlined) and 5'-CCGCTCGAGTTAGTTGAACCCGTCG-3' (antisense, *Xho*I restriction site underlined). The purified PCR fragment was digested by corresponding enzymes and inserted into the corresponding site of pGEX2T vector. His6-SNAP25 was obtained from pET28a-SNAP25 vector, kindly provided by Dr G. Schiavo (Molecular NeuroPathobiology Laboratory, United-Kingdom) [40]. To obtain the GST-SNAP25 construct, a *Bam*HI fragment was subcloning into pGEX2T empty vector. All constructs used was verified by double strand sequencing.

Recombinant protein purification

Purification of recombinant GST-Csp α and SNAP25 fusion proteins was done as described [23]. Since GST-Syts are sensitive to protease degradation, we used a slightly different protocol. Briefly, expression of GST-Syt was induced by incubation of a *E. coli* BL21 (DE3) culture transformed by pGEX2T-Syt vector with 0.4 mM IPTG for 3 hours at 30°C with vigorous shaking. After washing with ice-cold PBS, bacteria were resuspended in Lysis Buffer [PBS supplemented by protease inhibitors (1 μ g/ml apoprotinin/leupeptin/pepstatin A)

final pH8], and 0.1 mg/ml lysozyme was added. The cells were left on ice for 30 min, and 1% w/v Triton-X100 was added to ensure solubilization of cell membranes for 30 min at 4°C. Following ultrasonication, 10 U/ml DNase was added for 15 min at 4°C. After clarification by centrifugation at 20,000 g for 20 min, GST-fusion proteins were recovered from the supernatant using glutathione-sepharose beads according to manufacturer instructions (GE Healthcare).

Purification of His⁶-tagged proteins was done essentially as published [19] with slight modifications. Briefly, expression of His⁶-tagged recombinant proteins was induced from E. coli M15[pRep4] cells transformed by pQE or pET28 vectors by adding 1 mM IPTG for 5 hours at 37°C with vigorous shaking. The induced cells were washed and resuspended in Breaking Buffer [100 mM HEPES, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 2 mM β-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, and 1 mM pepstatin A, pH 7]. 1% w/v Triton-X100 was added and cells were ultrasonicated. Bacterial extracts were clarified by centrifugation (100,000 g for 1 hour 4°C) and His⁶-fusion proteins were recovered from the supernatants by binding to Ni²⁺-NTA beads (Qiagen) overnight at 4°C. Beads were washed extensively in Washing Buffer [20 mM HEPES, 200 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.6 mM ATP, 2 mM β-mercaptoethanol, 50 mM imidazole, pH 7]. His⁶-tagged proteins were eluted by adding Elution Buffer [20 mM HEPES, 200 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.6 mM ATP, 2 mM β-mercaptoethanol, 10% w/v glycerol, 500 mM imidazole, pH 7]. Recombinant proteins were quantified by SDS-PAGE and coomassie blue staining against BSA standard.

Cell culture and pull-down experiments

MIN6 cells were cultured as published [15, 39, 41]. Cosedimentation assays were performed as described before [23]. Briefly, 500 μg of a freshly solubilized MIN6 cell post-nuclear supernatant was mixed with 25 μg of GST fusion proteins immobilized onto

glutathione-sepharose in buffer [20 mM MOPS, 250 mM sucrose, 4.5 mM MgCl₂, 0.1% w/v Triton-X100, 10 µg/ml orthovanadate, 1 µg/ml leupeptin/aprotinin/pepstatin A, pH 7]. After incubation at 4°C for 2 hours, beads were extensively washed and bound proteins were eluted by adding SDS-dissociation buffer. One-third of each resulting samples was analyzed by immunoblotting.

In vitro binding assays

The *in vitro* binding of His⁶-fusion proteins to GST fusion proteins was performed essentially as described [33, 42]. Briefly, 0.16 µM of either GST, GST-SNAP25 or GST-Synaptotagmin was immobilized onto glutathione-sepharose beads in Buffer A [20 mM HEPES, 150 mM potassium acetate, 1 mM MgCl₂, 0.05% Tween20, pH7] supplemented by either 1 mM CaCl₂ or 2 mM EGTA. After washing, 0.43 µM of His⁶-tagged protein was added in the corresponding Buffer A and incubated for 2 hours at 4°C. Beads were washed 3 times with corresponding Buffer A and 3 times with corresponding Buffer A containing 5% w/v glycerol to prevent hydrophobic binding of Csp to beads. Bound proteins were eluted by boiling the beads in SDS-dissociation buffer and analyzed by immunoblotting as indicated in figure legends.

Far-Western blot

The binding of His⁶-Csp α to GST-Syt fusion proteins was assayed by a blot overlay technique [43]. The GST-Syt proteins (1 µg per lane for the full-length protein) were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred onto PVDF membrane. The membrane was washed with Buffer A containing 1 mM CaCl₂, and blocked by a 30 min incubation in the same Buffer A supplemented by 2% w/v BSA. His⁶-Csp α (1 µg/ml in Buffer A + 1 mM CaCl₂) was overlaid overnight at 4°C. The blots were washed three times with Buffer A + 1

mM CaCl₂ and incubated for 2 hours at room temperature with either a polyclonal anti-CspA1567 or monoclonal anti-PentaHis antibodies. The blots were washed again three times and incubated for 1 hour at room temperature with a HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG secondary antibody. Following three final washes, the binding of His⁶-Csp α was visualized by chemiluminescence and linearity of the signal was verified as described [15].

Dot-blotting

Dot-blot analysis were performed as published with minor modifications [44]. GST fusion proteins were immobilized on a methanol-activated PVDF membrane by adsorption (1 to 4 μ g per spot). The filter was blocked in Buffer A + 1 mM CaCl₂ supplemented by 5% w/v nonfat dry milk for 30 min at room temperature. His⁶-Csp α was incubated (1 μ g/ml in Buffer A + 1 mM CaCl₂) overnight at 4°C. The membrane was washed and His⁶-Csp α bound was revealed by incubation with an anti-PentaHis antibody followed by an HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody as described above. Signals were quantified and the amount of Csp α bound was normalized against binding to Syt9. Results are presented as means +/- sem.

3. Results and Discussion

Csp α interacts with SNAP25 in β -pancreatic cells by its N-terminal part

To investigate potential new binding partners for Csp α in the β -pancreatic cell line MIN6 we used co-sedimentation experiments with GST-Csp α as a bait. In subsequent immunoblots the well-known partners Hsc70 [20] and VAMP2 [15] were identified as binding partners (fig. 1A, Hc70 and VAMP2 panels). To our surprise, we found that GST-Csp α also bound SNAP25 (fig. 1A, SNAP25 panel). To ensure specificity of the observed binding, we reversed the experiment using GST-SNAP25 immobilized onto beads. This allowed to recover

significant amounts of Csp α from MIN6 homogenates as well as Hsc70 and VAMP2 (fig. 1B). Interestingly, Csp α bound to SNAP25 to similar extent than to VAMP2. It is reasonable to assume that Hsc70 recovery was mediated by Csp α , as no binding between the chaperone and the t-SNARE SNAP25 has been described in the literature. An interaction between SNAP25 and Csp α has been reported most recently, and our results are consistent with this study [32].

To gain insight in the molecular details of this interaction, we decided to map the binding domains of Csp α to SNAP25. We used several truncated forms in our pull-down experiments (fig. 2A). The C-terminally truncated form Csp α 2 was capable to interact with SNAP25, but not as efficiently as full length Csp α 1 (fig. 2C, 1-167 vs. 1-198). This may indicate a potential regulatory role for the C-terminus domain of Csp α in this interaction. Such regulatory role has been proposed concerning the interaction with VAMP2 and homodimerization of Csp α [15]. Coomassie blue staining of recombinant proteins ensured equal loading between at least GST, GST-Csp 1-198 and GST-Csp 1-167 (fig. 2B). The C-terminus domain of Csp α was not able to interact with SNAP25 (fig. 2, 138-198). Thus, the difference between Csp α 1 and Csp α 2 in the binding of SNAP25 was probably not attributable solely to the C-terminus domain, but rather the contribution of this domain to the full secondary or tertiary structure of Csp α is necessary for the maximal interaction with SNAP25.

The J-domain of Csp α is functionally relevant for its co-chaperone activity, as it is necessary for Hsc70 activation [12, 18, 19]. In our pull-down experiments, truncated form of Csp α corresponding to this domain recovered Hsc70 as the full-length protein, but failed to recover SNAP25 (fig. 2C, 1-83). The truncated form corresponding to the J-domain plus the Linker region recovered weakly Hsc70 and SNAP25 as shown by long exposure (fig. 2C, 1-110, SNAP25*). The Linker region is known to be implicated in Csp α functions in insulin

secretion [21] and our results reinforce this view in term of protein-protein interactions. Care must be taken with results from GST-Csp 1-110 and 138-198 because Coomassie blue staining indicated that a lesser extent of recombinant proteins were used in these experiments (fig. 2B).

Several interactions implicating Csp α are known to be mediated by the cysteine-rich region [26, 29]. To address this question we used a mutant form of Csp α , in which the 12 central cysteine residues in the string were changed to serine. This mutation is known to abolished the binding to SGT [29]. This mutant SSP (for “serine-string protein”) still bound to SNAP25 (fig. 3B, SNAP25 panel), indicating that observed interactions can not be attributed to non-specific disulfide bounds or hydrophobic interactions . It also indicates that the cysteine-rich domain is not involved in the interaction described here. Surprisingly, this mutant was not able to bind efficiently Hsc70 (fig. 3B, Hsc70 panel). As the activation of Hsc70 by Csp α is mainly supported by its J-domain [18-20], our results suggest that the cysteine string may be required for tight binding between Csp α and Hsc70.

Csp α is phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by both PKA and PKB on the serine 10 residue [16, 17]. This phosphorylation is known to regulate protein-protein interactions with syntaxin and Synaptotagmin [16, 33]. In order to investigate its effect on Csp α -SNAP25 interaction, we used a point mutation, Csp α 1 S10D, which mimics phosphorylation [45, 46]. In our pull-down experiments, this mutant was able to recruit Hsc70 in the same extent than wild-type Csp α 1 (data not shown). Thus it is reasonable to assume that the chaperon complex Csp α /Hsc70 is not regulated by phosphorylation of Csp α . Furthermore, this mutant was capable to interact with SNAP25 as good as wild-type Csp α 1 (data not shown). Again, phosphorylation of Csp α seems not to be implicated in the regulation of this interaction.

Next we addressed the question if the interaction between Csp α and SNAP25 is direct or indirect and resorted to direct *in vitro* binding between recombinant proteins. Recombinant

GST-SNAP25 was purified and immobilized onto glutathione-sepharose and incubated with His⁶-Csp α . After washing, bound proteins were separated by SDS-PAGE and bound His⁶-Csp α was revealed by an anti-PentaHis antibody. Using this assay, we could not find any direct interaction between SNAP25 and Csp α (data not shown). As this interaction may be indirect, we investigated a potential intermediate which could link Csp α and SNAP25. According to our results, we could exclude Hsc70 for being this intermediate because first as shown in figure 2, Csp α 1-83 was able to recruit Hsc70, but not SNAP25 and second, the SSP mutant was not capable to recruit Hsc70 but interacted rather efficiently with SNAP25 (fig. 3).

It has been shown in neurons that SNAP25 interacts directly with the calcium sensor Syt1 [40, 47]. This interaction is mediated by the C-terminus part of SNAP25 as shown by clostridial neurotoxins cleavage and is calcium-dependant [47]. Syt1 is generally accepted to be the calcium sensor of neuroexocytosis [34]. In contrast, in primary β -pancreatic cells, the isoform Syt9 may be the calcium sensor functionally relevant in insulin secretion [38]. Thus, we investigated the possibility that Syt9 could be the intermediate in the Csp α /SNAP25 interaction.

Csp α directly interacts with Syt9 in a calcium-independent manner

Cytoplasmic domain of Syt1, 9, 11 and 13 in fusion with GST were purified but harbored some residual degradation products. All these products were C-terminally truncated forms because they bound to glutathione-sepharose and were detected by an anti-GST antibody (data not shown). To verify that His⁶-Csp α binds to full-length Syt and not with degradation products only we resorted to far-western blot experiments. Overlaid His⁶-Csp α was detected specifically by anti-Csp antibody (A1567). As shown in figure 4A, only a weak non-specific binding was detected on GST protein. Specific binding was found on full-length GST-

Syt1,9,11 and 13 and also with some degradation products of GST-Syt. Csp α bound to Syt9 to a larger extent than to Syt1. The same results were obtained using anti-PentaHis antibody to revealed bound His⁶-Csp α (data not shown). Specific binding was also observed to GST-Syt11 and GST-13 (fig. 4A). This suggests that the interaction is supported mainly by the C2-domains, as the linker region is less conserved among Syt isoforms.

Next we assayed this interaction using the dot-blot technique. His⁶-Csp α bound to GST-Syt was visualized by anti-PentaHis antibody and seemed to have an higher affinity for Syt9 than for Syt1 (fig. 4B). This difference was significant as shown by quantification and curve-fitting followed by statistical analysis (fig 4C, filled squares compared to open squares). This confirmed the results of far western-blot experiments (fig. 4A).

As Syt are able to coordinate several Ca²⁺ ions by their C2 domains [34], we verified that the interaction between Csp α and Syt isoforms was not mediated by the coordination of calcium between Syt C2 domains and His⁶-tag. We immobilized GST-Syt on glutathione-sepharose beads, and incubated them with His⁶-Csp α in buffer added with calcium or with EGTA as indicated (fig. 4D). The same amount of bound His⁶-Csp α was detected in the presence of Ca²⁺ than in the presence of EGTA. Thus, the interaction between His⁶-Csp α and Syt was not mediated by the His⁶-tag by a calcium coordination, and seemed to be calcium-independent. These results are in accordance with a previous study on Syt1 [33].

J-domain and linker region of Csp α are involved in the binding to Syt9

Subsequently we addressed the question which domains of Csp α are implicated in this interaction. Using immobilized GST-Syt, we tested the binding of several constructions and mutants of Csp α (fig. 5), all detected with an anti-PentaHis antibody except for the truncation corresponding to amino-acids 138-198. As this construct could not be detected by the PentaHis antibody (data not shown), anti-Csp antiserum was used [9]. The C-terminus domain

alone was not able to bind to Syt9 (fig. 5, Csp 138-198). We investigated again if this interaction could be mediated by the cysteine residues using our SSP mutant. This mutant still bound Syt9, indicating that cysteine string is not involved in this interaction (fig. 5, SSP). The truncated construction including the J-domain plus the Linker region, i.e. amino-acids 1-110 was able to bind to Syt9 (fig. 5, 1-110). This indicates that the interaction between Csp α and Syt9 requires the J domain plus the Linker, but not the cysteine string.

Phosphorylation of Csp α is known to mediate the interaction with syntaxin [16], and moreover with Syt1 [33]. In order to investigate the phospho-dependency of Csp α -Syt9 interaction, we used our mutant Csp α 1 S10D in our direct binding experiments. His⁶-Csp α S10D bound minimally to GST-Syt9 (fig. 6). This inhibition was significant as shown by statistical analysis (fig. 6, lower panel). These results are in line with previous study about Syt1 [33].

Syt9 could be the intermediate between Csp α and SNAP25

Similar domains requirements were apparent for the interaction of Csp α with SNAP25 and with Syt9 (i.e. involving the N-terminal part of Csp α). This suggests that Syt9 could be the intermediate between Csp α and SNAP25. To further characterize this interaction, we investigated the binding of the three proteins *in vitro*. GST-Syt9 was immobilized onto glutathione-sepharose beads and incubated with His⁶Csp α , His⁶-SNAP25 or both proteins. First of all, our experiments showed that Syt9 directly interacts with SNAP25 (fig. 7). Our results were surprising as a previous study did not find an interaction between Syt9 and SNARE proteins using co-immunoprecipitation from brain homogenate [48]. Nevertheless, it should be considered that co-immunoprecipitation of membrane protein complexes may be difficult to establish, as detergents are used and may interfere as described in other cases [24, 32]. In contrast, Syt9 interacts *in vitro* with the heterodimeric SNARE complex

syntaxin/SNAP25, but not with the monomeric forms [49]. In these experiments, they used a construction corresponding to amino-acid from 63 to 386 of Syt9, i.e. including both C2 domains and in part the linker region. In our experiments, we used the construction corresponding to amino-acids 48-386. Our fusion protein includes an additional highly charged region (FCLYRKRCRRRMGKKS), which could be crucial for the interaction with SNAP25.

When GST-Syt9 was incubated with Csp α and SNAP25, we recovered the same amount of both proteins than in single incubations. This indicates that the interactions between Csp α and Syt9 on one hand, and SNAP25 and Syt9 on the other hand are not exclusive. The binding sites do probably not overlap.

Our results demonstrate that an indirect interaction occurs between the co-chaperone Csp α and the t-SNARE SNAP25. Moreover, we found that Csp α interacts directly with the calcium sensor synaptotagmin 9. Taking together, our results suggest that synaptotagmin 9 could be the intermediate between Csp α and SNAP25 (fig. 8). This complex may be relevant in the control of a late stage, e.g. triggering, of exocytosis in β -pancreatic cells.

REFERENCES

- [1] J. Lang, Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion, *Eur J Biochem* 259 (1999) 3-17.
- [2] P. Rorsman, E. Renstrom, Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells, *Diabetologia* 46 (2003) 1029-45.
- [3] T. Sollner, S.W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, J.E. Rothman, SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion, *Nature* 362 (1993) 318-24.
- [4] R. Jahn, T. Lang, T.C. Sudhof, Membrane fusion, *Cell* 112 (2003) 519-33.
- [5] L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse, *J Neurochem* 74 (2000) 1781-9.
- [6] G.J. Evans, A. Morgan, R.D. Burgoyne, Tying everything together: the multiple roles of cysteine string protein (CSP) in regulated exocytosis, *Traffic* 4 (2003) 653-9.
- [7] K.E. Zinsmaier, A. Hofbauer, G. Heimbeck, G.O. Pflugfelder, S. Buchner, E. Buchner, A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of *Drosophila*, *J Neurogenet* 7 (1990) 15-29.
- [8] K.E. Zinsmaier, K.K. Eberle, E. Buchner, N. Walter, S. Benzer, Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*, *Science* 263 (1994) 977-80.
- [9] L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, Identification of a novel cysteine string protein variant and expression of cysteine string proteins in non-neuronal cells, *J Biol Chem* 271 (1996) 7320-3.
- [10] R. Fernandez-Chacon, M. Wolfel, H. Nishimune, L. Tabares, F. Schmitz, M. Castellano-Munoz, C. Rosenmund, M.L. Montesinos, J.R. Sanes, R. Schneggenburger, T.C. Sudhof, The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration, *Neuron* 42 (2004) 237-51.
- [11] A. Mastrogiacomo, S.M. Parsons, G.A. Zampighi, D.J. Jenden, J.A. Umbach, C.B. Gundersen, Cysteine string proteins: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca²⁺ channels, *Science* 263 (1994) 981-2.
- [12] L.H. Chamberlain, J. Henry, R.D. Burgoyne, Cysteine string proteins are associated with chromaffin granules, *J Biol Chem* 271 (1996) 19514-7.
- [13] H. Brown, O. Larsson, R. Branstrom, S.N. Yang, B. Leibiger, I. Leibiger, G. Fried, T. Moede, J.T. Deeney, G.R. Brown, G. Jacobsson, C.J. Rhodes, J.E. Braun, R.H. Scheller, B.E. Corkey, P.O. Berggren, B. Meister, Cysteine string protein (CSP) is an insulin secretory granule-associated protein regulating beta-cell exocytosis, *Embo J* 17 (1998) 5048-58.
- [14] H. Zhang, W.L. Kelley, L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, C.B. Wollheim, J. Lang, Cysteine-string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes, *FEBS Lett* 437 (1998) 267-72.
- [15] F. Boal, H. Zhang, C. Tessier, P. Scotti, J. Lang, The variable C-terminus of cysteine string proteins modulates exocytosis and protein-protein interactions, *Biochemistry* 43 (2004) 16212-23.
- [16] G.J. Evans, M.C. Wilkinson, M.E. Graham, K.M. Turner, L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, A. Morgan, Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis, *J Biol Chem* 276 (2001) 47877-85.
- [17] G.J. Evans, J.W. Barclay, G.R. Prescott, S.R. Jo, R.D. Burgoyne, M.J. Birnbaum, A. Morgan, Protein kinase B/Akt is a novel cysteine string protein kinase that regulates exocytosis release kinetics and quantal size, *J Biol Chem* 281 (2006) 1564-72.
- [18] J.E. Braun, S.M. Wilbanks, R.H. Scheller, The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase, *J Biol Chem* 271 (1996) 25989-93.

- [19] L.H. Chamberlain,R.D. Burgoyne, The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins, *J Biol Chem* 272 (1997) 31420-6.
- [20] L.H. Chamberlain,R.D. Burgoyne, Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine-string protein, *Biochem J* 322 (1997) 853-8.
- [21] H. Zhang, W.L. Kelley, L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne,J. Lang, Mutational analysis of cysteine-string protein function in insulin exocytosis, *J Cell Sci* 112 (1999) 1345-51.
- [22] L.H. Chamberlain,R.D. Burgoyne, The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting, *Biochem J* 335 (1998) 205-9.
- [23] F. Boal, S. Le Pevelen, C. Cziepluch, P. Scotti,J. Lang, Cysteine-string protein isoform beta is targeted to the trans-Golgi network as a non-palmitoylated CSP in clonal beta-cells., *Biochim Biophys Acta* (submitted).
- [24] C. Leveque, S. Pupier, B. Marqueze, L. Geslin, M. Kataoka, M. Takahashi, M. De Waard,M. Seagar, Interaction of cysteine string proteins with the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel, *J Biol Chem* 273 (1998) 13488-92.
- [25] T. Sakisaka, T. Meerlo, J. Matteson, H. Plutner,W.E. Balch, Rab-alphaGDI activity is regulated by a Hsp90 chaperone complex, *Embo J* 21 (2002) 6125-35.
- [26] J.M. Magga, S.E. Jarvis, M.I. Arnot, G.W. Zamponi,J.E. Braun, Cysteine string protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels, *Neuron* 28 (2000) 195-204.
- [27] L.C. Miller, L.A. Swayne, L. Chen, Z.P. Feng, J.L. Wacker, P.J. Muchowski, G.W. Zamponi,J.E. Braun, Cysteine string protein (CSP) inhibition of N-type calcium channels is blocked by mutant huntingtin, *J Biol Chem* 278 (2003) 53072-81.
- [28] S. Tobaben, P. Thakur, R. Fernandez-Chacon, T.C. Sudhof, J. Rettig,B. Stahl, A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine, *Neuron* 31 (2001) 987-99.
- [29] S. Tobaben, F. Varoquaux, N. Brose, B. Stahl,G. Meyer, A brain specific isoform of small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein (SGT) binds to Hsc70 and the cysteine string protein, *J Biol Chem* 278 (2003) 23.
- [30] Z. Nie, R. Ranjan, J.J. Wenniger, S.N. Hong, P. Bronk,K.E. Zinsmaier, Overexpression of cysteine-string proteins in *Drosophila* reveals interactions with syntaxin, *J Neurosci* 19 (1999) 10270-9.
- [31] M.F. Matos, J. Rizo,T.C. Sudhof, The relation of protein binding to function: what is the significance of munc18 and synaptotagmin binding to syntaxin 1, and where are the corresponding binding sites?, *Eur J Cell Biol* 79 (2000) 377-82.
- [32] S. Chandra, G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O.M. Schluter,T.C. Sudhof, Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration, *Cell* 123 (2005) 383-96.
- [33] G.J. Evans,A. Morgan, Phosphorylation-dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagmin I, *Biochem J* 364 (2002) 343-7.
- [34] E.R. Chapman, Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis?, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 498-508.
- [35] E.R. Chapman,R. Jahn, Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain, *J Biol Chem* 269 (1994) 5735-41.
- [36] E.R. Chapman, P.I. Hanson, S. An,R. Jahn, Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1, *J Biol Chem* 270 (1995) 23667-71.

- [37] M. Fukuda, RNA interference-mediated silencing of synaptotagmin IX, but not synaptotagmin I, inhibits dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells, *Biochem J* 380 (2004) 875-9.
- [38] M. Iezzi, G. Kouri, M. Fukuda, C.B. Wollheim, Synaptotagmin V and IX isoforms control Ca²⁺-dependent insulin exocytosis, *J Cell Sci* 117 (2004) 3119-27.
- [39] C. Monterrat, F. Boal, F. Grise, A. Hemar, J. Lang, Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells, *Biochim Biophys Acta* 1763 (2006) 73-81.
- [40] G. Schiavo, G. Stenbeck, J.E. Rothman, T.H. Sollner, Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 997-1001.
- [41] S. Lajus, P. Vacher, D. Huber, M. Dubois, M.N. Benassy, Y. Ushkaryov, J. Lang, alpha-Latrotoxin induces exocytosis by inhibition of voltage-dependent K⁺ channels and by stimulation of L-type Ca²⁺ channels via full-length latrophilin in beta-cells, *J Biol Chem* (2005).
- [42] L.H. Chamberlain, M.E. Graham, S. Kane, J.L. Jackson, V.H. Maier, R.D. Burgoyne, G.W. Gould, The synaptic vesicle protein, cysteine-string protein, is associated with the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes and interacts with syntaxin 4, *J Cell Sci* 114 (2001) 445-55.
- [43] J. Xu, M. Paquet, A.G. Lau, J.D. Wood, C.A. Ross, R.A. Hall, beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95, *J Biol Chem* 276 (2001) 41310-7.
- [44] J. Li, G.P. Smith, J.C. Walker, Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 7821-6.
- [45] J. Leger, M. Kempf, G. Lee, R. Brandt, Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau, *J Biol Chem* 272 (1997) 8441-6.
- [46] K. Gopalbhai, G. Jansen, G. Beauregard, M. Whiteway, F. Dumas, C. Wu, S. Meloche, Negative regulation of MAPKK by phosphorylation of a conserved serine residue equivalent to Ser212 of MEK1, *J Biol Chem* 278 (2003) 8118-25.
- [47] R.R. Gerona, E.C. Larsen, J.A. Kowalchuk, T.F. Martin, The C terminus of SNAP25 is essential for Ca²⁺-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes, *J Biol Chem* 275 (2000) 6328-36.
- [48] O.H. Shin, A. Maximov, B.K. Lim, J. Rizo, T.C. Sudhof, Unexpected Ca²⁺-binding properties of synaptotagmin 9, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 2554-9.
- [49] C. Rickman, M. Craxton, S. Osborne, B. Davletov, Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family, *Biochem J* 378 (2004) 681-6.

FIGURES AND FIGURE LEGENDS

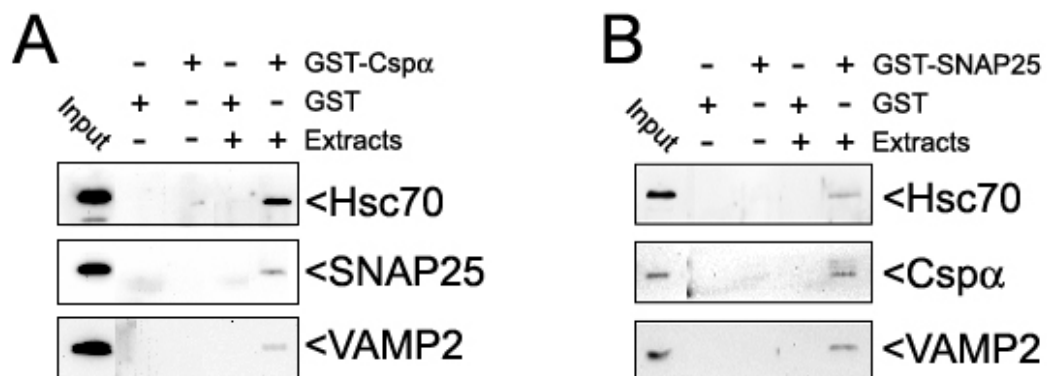


Figure 1 : Csp α interacts with SNAP25 in MIN6 β -cells

(A) A Triton X-100 extract of MIN6 cells was incubated with GST or GST-Csp α immobilized onto glutathione-sepharose beads. After washing, one third of bound proteins and 0.5% of the homogenate (Input) were separated by SDS-PAGE and analysed by immunoblotting using anti-Hsc70, anti-VAMP2 or anti-SNAP25 (clone SMI81) antibodies as indicated. (B) The binding experiment was reversed to show the specificity of the interaction between Csp α and SNAP25. Results are representative of three separate experiments.

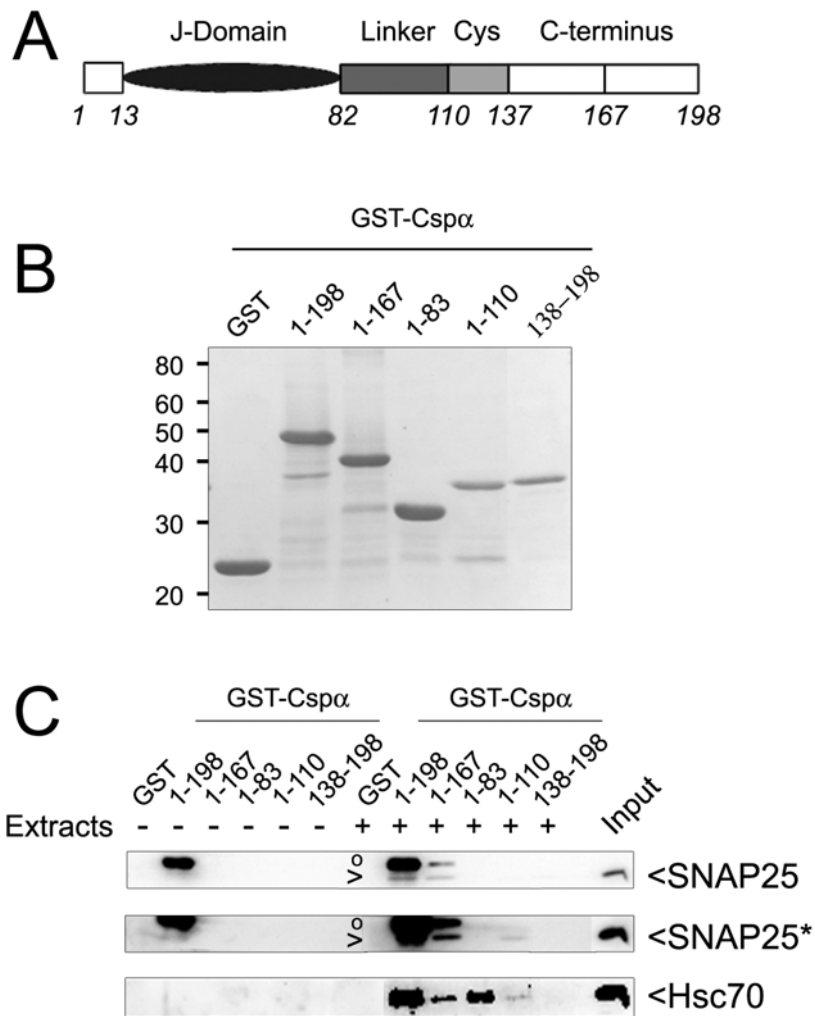


Figure 2: Domain analysis of Csp α binding to SNAP25

(A) Schematic representation of domains of Csp α . Amino-acids are indicated by numbers. (B) Coomassie blue staining of truncated forms of Csp α used in pull-down experiments. (C) Indicated fusion proteins were incubated with homogenates from MIN6 cells. Beads were washed and one third of bound material and 0.5% of total extract (Input) was probed by an anti-Hsc70 antibody or by an anti-SNAP25 (clone 71.1) antibody as indicated. SNAP25 was revealed after short exposure (SNAP25) and after prolonged exposure (SNAP25*). SNAP25 is indicated by an arrow head, the upper band (circle) corresponds to non-specific staining of a degradation product of GST-Csp α (as shown by lane 2, GST-Csp α without extract).

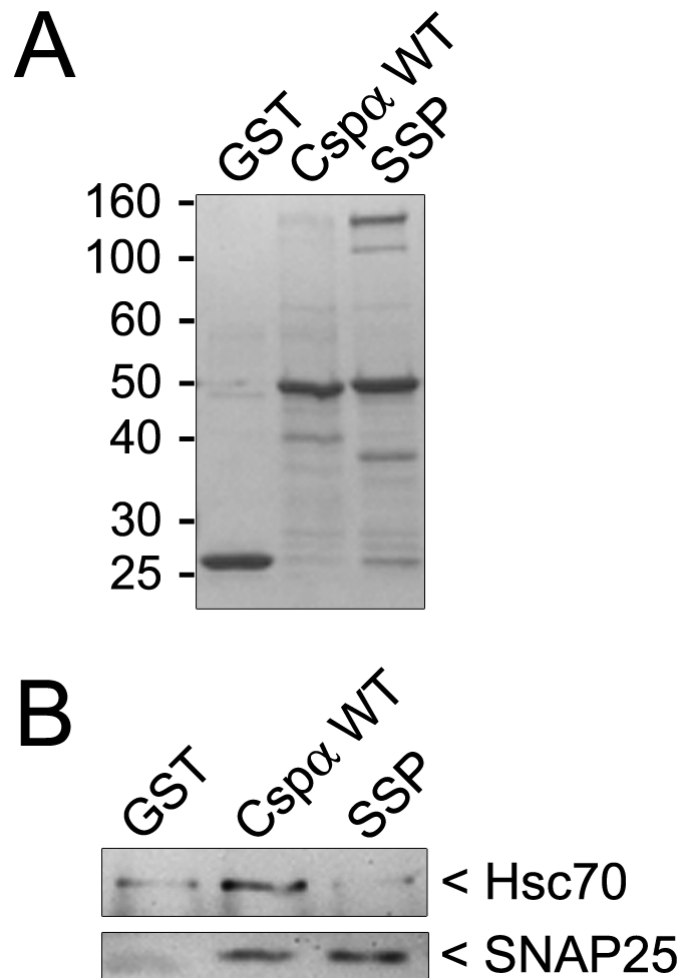


Figure 3: The cysteine-rich domain of Csp α is not involved in the recruitment of SNAP25

(A) Coomassie blue staining of recombinant proteins used in pull-down experiment: wild-type Csp α (Csp α WT) or mutant in which all central cysteines are changed to serine residues (SSP). (B) Indicated recombinant proteins were immobilized onto glutathione-sepharose beads and incubated with MIN6 cells extracts. After washing, one-third of bound proteins were analyzed for the presence of Hsc70 and SNAP25.

Figure 4

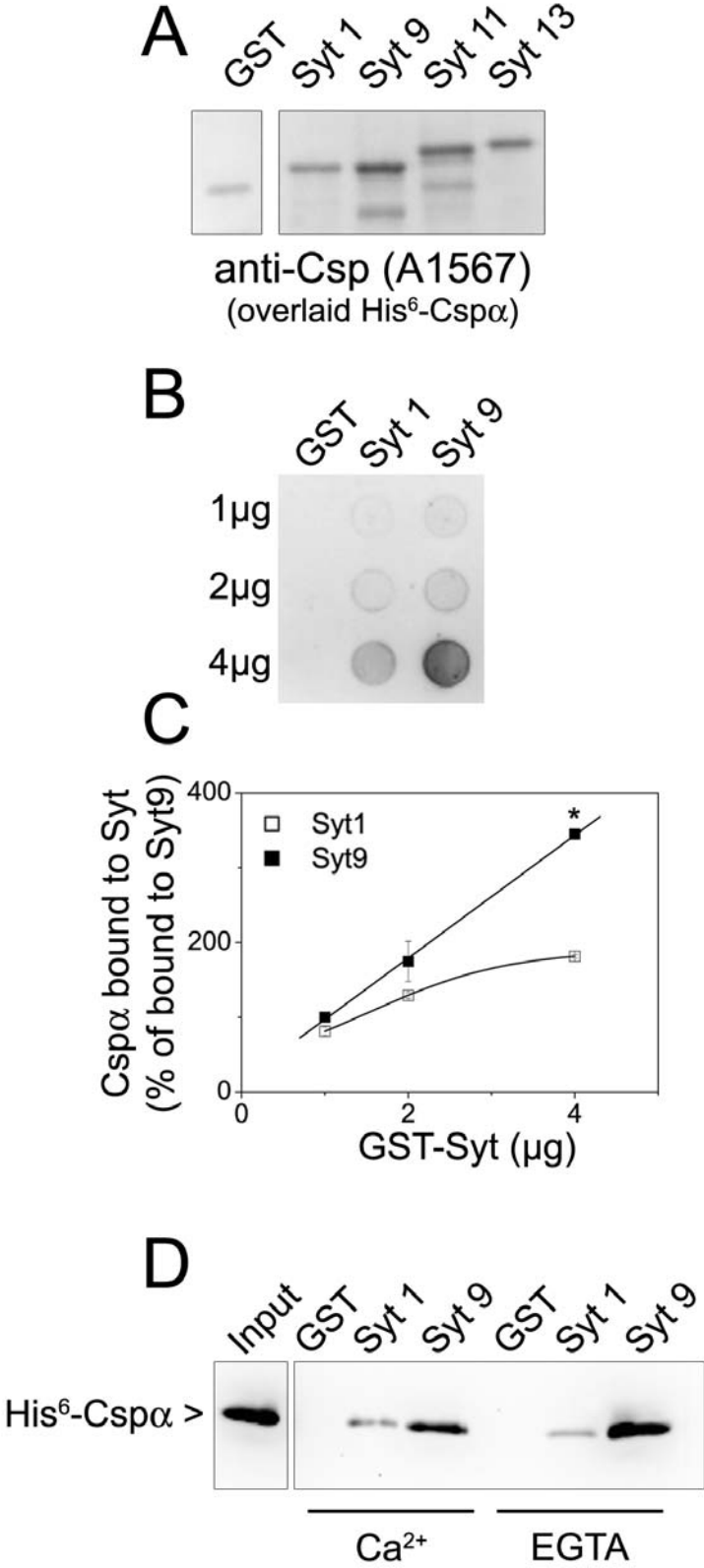


Figure 4: Csp α directly interacts with Syt9 in a calcium-independent manner

(A) Indicated recombinant GST-Syt were separated by SDS-PAGE (1 μ g of full-length protein per lane) and overlaid by His⁶-Csp α which was detected by an anti-Csp antibody (A1567). (B) The interaction was assayed using dot-blot by overlaid His⁶-Csp α on increasing quantities of GST-Syt as indicated. Bound His⁶-Csp α was visualized by an anti-PentaHis antibody. (C) Quantification of dot-blot signals for Syt1 (open squares) and for Syt9 (filled squares). Results are represented as mean \pm sem, n=3; *, p<0.05 as compared to binding to Syt1. (D) GST-Syt were immobilized onto glutathione-sepharose beads, and incubated with His⁶-Csp α in the presence of 1 mM CaCl₂ (Ca²⁺) or 2 mM EGTA (EGTA). Proteins bound to the beads and 5% of His⁶-Csp α input (Input) were immunoblotted with an anti-PentaHis antibody. Data shown are representative of three separate experiments.

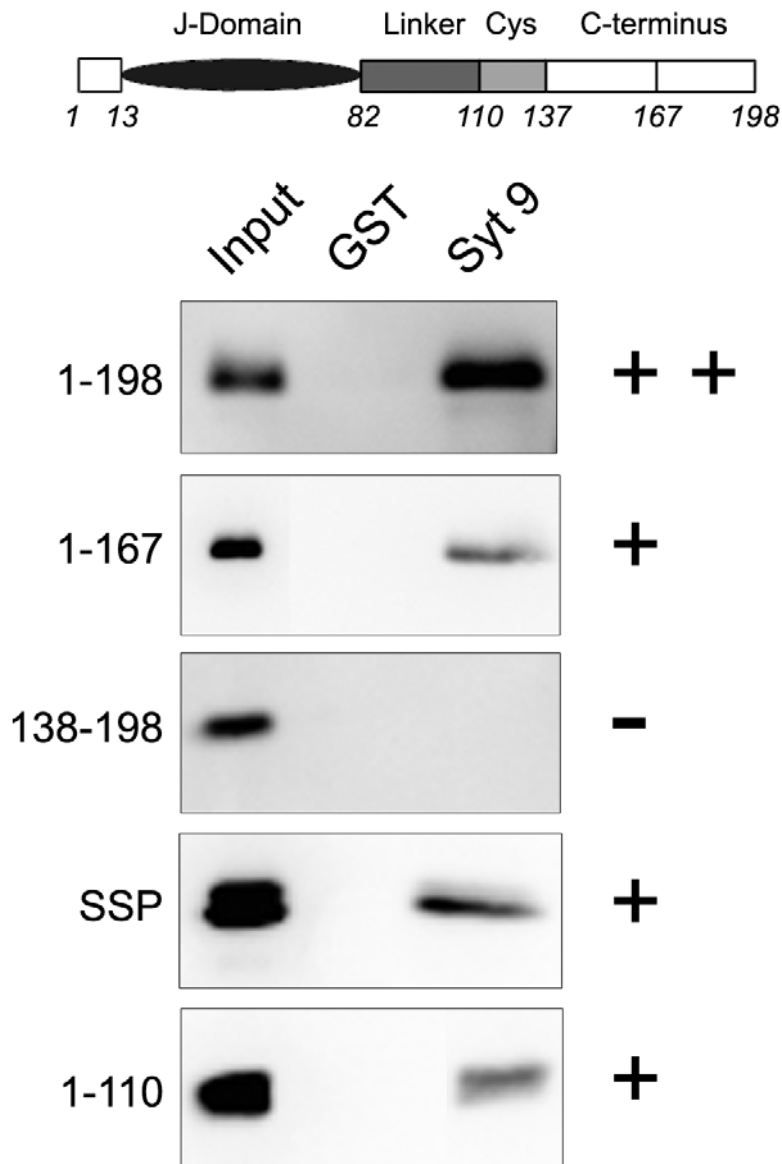


Figure 5: Csp α interacts with Syt9 by its N-terminal domains

Immobilized GST-Syt9 was incubated with indicated truncated forms of His⁶-Csp α . Proteins bound to the beads and 5% of the input (Input) were loaded on SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-Csp antiserum (for 138-198) or with an anti-PentaHis antibody (for all others constructs). Intensity of binding is indicated as strong binding (+ +), weak binding (+) or no binding (-). The data shown are representative of three separate experiments.

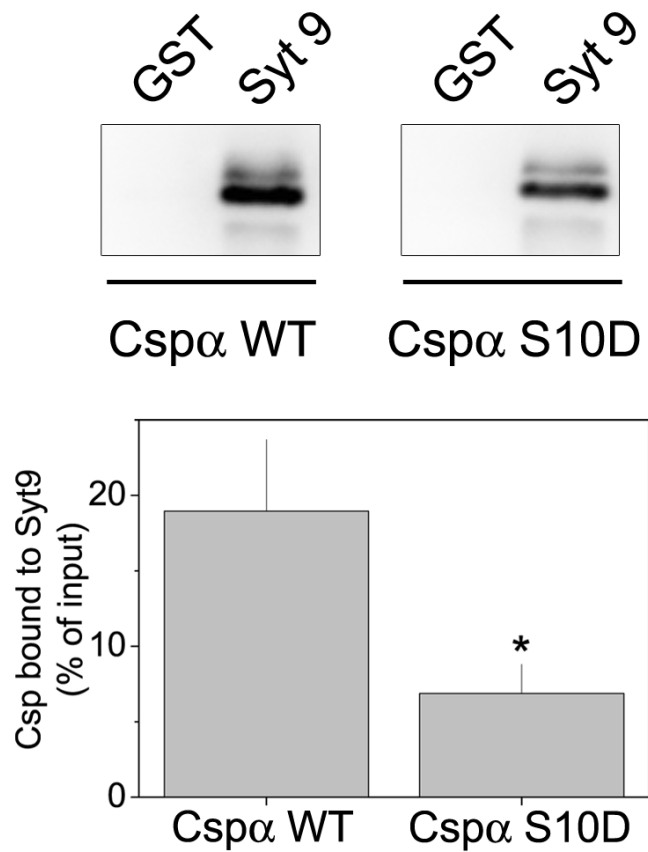


Figure 6: The S10D mutation in Csp α inhibits interaction with Syt9

Wild-type His⁶-Csp α (Csp α WT) or the S10D mutant (Csp α S10D) were used in the GST-Syt9 binding assay. Bound proteins were visualized by an anti-PentaHis antibody and signals were quantified and represented as % of input. *, $p < 0.05$ as compared to Csp α WT, $n = 3$.

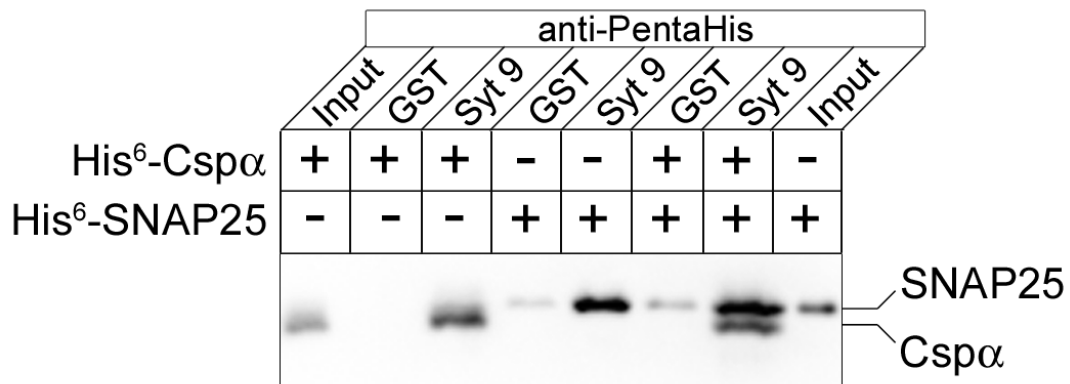


Figure 7: Interactions of Csp α or SNAP25 with Syt9 are not exclusive

His⁶-Csp α (Csp α) and/or His⁶-SNAP25 (SNAP25) were incubated with immobilized GST or GST-Syt9 (Syt9). After washing, proteins bound to the beads and 5% of His⁶-Csp α or His⁶-SNAP25 (Input) were analyzed by immunoblotting. SNAP25 and Csp α were revealed by an anti-PentaHis antibody. The upper band corresponds to SNAP25 and the lower band to Csp α . Data shown are representative of three separate experiments.

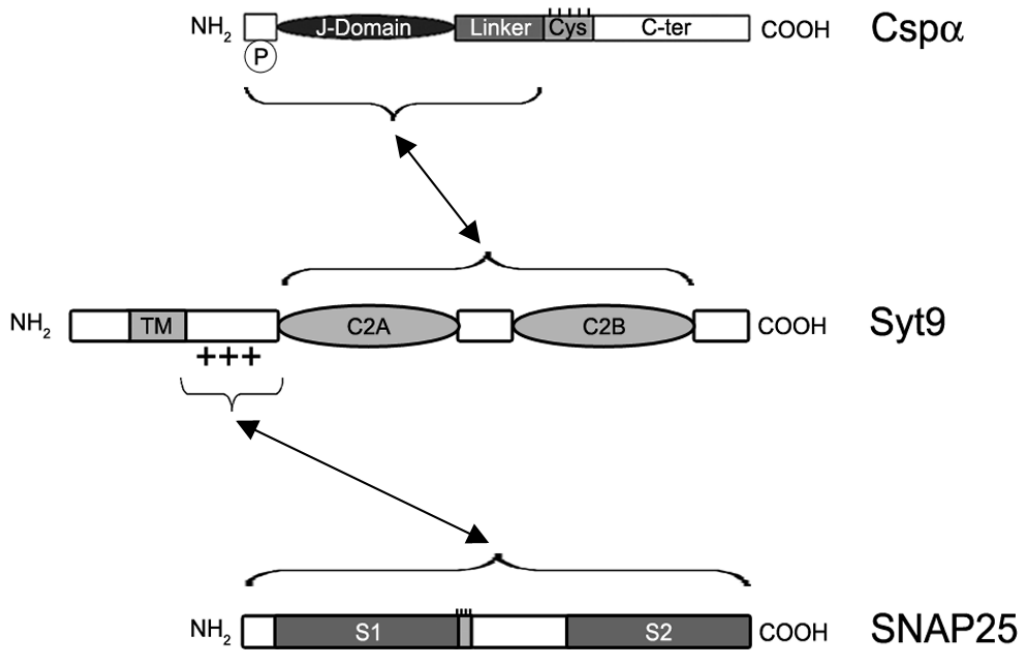


Figure 8: Model of the interaction between Csp α and SNAP25 mediated by Syt9

Proteins are represented by boxes corresponding to indicated domains. The C2 domains of Syt9 interact in a calcium-independent manner with the N-terminal part of Csp α (J- and Linker domains). Syt9 directly interacts with SNAP25 probably by the highly charged region (plus signs) and could mediate indirect binding of Csp α to SNAP25.

CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons caractérisé deux nouvelles interactions protéiques impliquant la Csp α dans les cellules β -pancréatiques.

Premièrement, nous avons montré qu'elle interagit avec la t-SNARE SNAP25. Bien que cette interaction ait récemment été mise en évidence dans les neurones de rat, cette étude constitue la première analyse moléculaire à ce sujet. Nous avons montré que la partie N-terminale de la Csp α est nécessaire à cette interaction, mais pas le domaine central riche en cystéines. Cette interaction semblant être indirecte, nous avons cherché à identifier le partenaire protéique potentiel nécessaire à l'établissement de cette liaison. Nos données montrent que Hsc70 ne peut être cet intermédiaire. L'interaction directe entre la Csp α et le senseur calcique neuronal Syt1 est connue dans la littérature. Une interaction directe entre Syt1 et SNAP25 ayant été rapportée par ailleurs, nous avons cherché à savoir si la synaptotagmine pouvait être notre intermédiaire. Nos résultats montrent que la Csp α interagit de manière directe et indépendamment du calcium avec l'isoforme Syt9 impliquée dans le contrôle de l'exocytose des granules d'insuline. Cette interaction étant également valable pour les isoformes 11 et 13 des synaptotagmines, isoformes les plus éloignées du point de vue phylogénétique de Syt9, nous proposons que cette liaison est portée par les domaines C2 conservés entre les isoformes. L'analyse des domaines de la Csp α impliqués dans cette interaction révèle une concordance étroite avec les domaines de liaison de SNAP25, soit la partie N-terminale. Nos résultats suggèrent que Syt9 pourrait être l'intermédiaire protéique nécessaire à l'établissement de la liaison entre Csp α et SNAP25 dans les cellules β -pancréatiques.

Ces travaux sont en cours de finalisation en vue d'une prochaine publication. Nous sommes en train de poursuivre les expériences de *pull-down* à la GST de manière à montrer si Syt9 peut être récupérée en utilisant la Csp α ou SNAP25 comme appât. Cela nécessite des conditions d'électrophorèse particulières car le signal spécifique de Syt9 (~48 kDa) est couvert par le bruit de fond induit par la grande quantité de protéines recombinantes utilisées. De plus, nous sommes en train de tester le comportement du mutant Csp α S10D dans les expériences de liaison directe avec Syt9 et SNAP25. Cela nous permettrait de savoir si le fait de perturber la liaison de Csp α sur Syt9 peut influencer sur la liaison de SNAP25 sur Syt9, et renforcerait notre hypothèse selon laquelle Syt9 serait l'intermédiaire entre Csp α et SNAP25.

Résultats – Partie IV

Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells

INTRODUCTION

Au cours de mon travail de thèse, j'ai collaboré à d'autres études indépendamment de mon sujet principal, et en particulier à l'étude du senseur calcique potentiel Synaptotagmine 8 (Syt8).

Les Synaptotagmines (Syt) constituent une famille de protéines partageant une même structure : un domaine court N-terminal intraluminal, un domaine transmembranaire qui ancre la protéine dans la bicouche lipidique, un domaine charnière variable en terme de longueur et de séquence, et une succession de deux domaines C2 (C2A et C2B) conservés capables de lier des ions calcium. Parmi les 16 isoformes connues, Syt8 est une isoforme non conventionnelle car elle ne possède pas dans les domaines C2 les résidus Aspartate nécessaires à la coordination du calcium. Des études préalables ont montré l'implication probable de Syt8 dans l'exocytose des granules d'insuline, bien que ni sa fonction exacte ni sa localisation n'aient été établies.

Nous rapportons dans cette étude la caractérisation d'un nouvel anticorps spécifique dirigé contre l'extrémité C-terminale de Syt8. Cet anticorps révèle l'expression de deux formes de Syt8 dans des cellules β -pancréatiques clonales, les cellules chromaffines PC12 et dans le cerveau. L'une des isoformes est exprimée sous la forme d'une protéine soluble de 40 kDa, l'autre, de 50 kDa, est exprimée sous la forme d'une protéine membranaire. Nous avons montré que la forme soluble ne présente pas de liaison aux membranes cellulaires calcium-dépendante. L'analyse par immunofluorescence nous a permis de montrer que la forme membranaire est associée à un compartiment sous-cellulaire qui colocalise partiellement avec la protéine SNARE du Golgi Vti1a.

Ma contribution à cette étude s'est plus particulièrement centrée autour de deux aspects. Tout d'abord, j'ai réalisé de nombreux essais d'immunoprécipitation de Syt8 avec notre anticorps. Malgré de nombreuses conditions testées (tampons, détergents, etc), il apparaît que notre anticorps n'est pas capable d'immunoprécipiter Syt8, et empêche de futures recherches de partenaires protéiques par cette approche. Ensuite, j'ai pris en charge l'aspect siRNA de cette étude. Nous avons utilisé des siRNA synthétiques commerciaux. L'utilisation de ces siRNA nous a permis de valider l'identité de la bande à 40 kDa détectée par notre anticorps en tant que Syt8.

Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells

Carole Monterrat^a, Frédéric Boal^a, Florence Grise^a, Agnès Hémar^b, Jochen Lang^{a,*}

^a Institut Européen de Chimie et Biologie, Pôle Biologie Cellulaire et Moléculaire, JE 2390, 33607 Pessac/Bordeaux, France

^b UMR 5091 CNRS/Physiologie Cellulaire de la Synapse, Université Bordeaux 2, Bordeaux/France

Received 11 June 2005; received in revised form 12 November 2005; accepted 14 November 2005

Available online 13 December 2005

Abstract

Synaptotagmins (syt) form a large family of transmembrane proteins and some of its isoforms are known to regulate calcium-induced membrane fusion during vesicular traffic. In view of the reported implication of the isoform syt8 in exocytosis we investigated the expression, localisation and calcium-sensitivity of syt8 in secretory cells. An immunopurified antipeptide antibody was generated which is directed against a C-terminal sequence and devoid of crossreactivity towards syt1 to 12. Subcellular fractionation and immunocytochemistry revealed two forms of synaptotagmin 8 (50 and 40 kDa). Whereas the 40-kDa was present in the cytosol in brain, in PC12 and in clonal β -cells, the 50-kDa form was localised in very typical clusters and partially colocalised with the SNARE protein Vti1a. Moreover, in primary hippocampal neurons syt8 was only found within the soma. Amplification of syt8 by RT-PCR indicated that the observed protein variants were not generated by alternative splicing of the 6th exon and are most likely linked to variations in the N-terminal region. In contrast to the established calcium sensor syt2, endogenous cytosolic syt8 and transiently expressed syt8-C₂AB-eGFP did not translocate upon a raise in cytosolic calcium in living cells. Syt8 is therefore not a calcium sensor in exocytotic membrane fusion in endocrine cells.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Calcium-sensor; Subcellular distribution; Exocytosis; Translocation; Pancreatic β -cells; Synaptotagmin

1. Introduction

Synaptotagmins form a family of calcium-sensing proteins implicated in the regulation of membrane fusion in vesicular transport. They are endowed with a short hydrophilic N-terminus, followed by a transmembrane domain and two cytosolic C₂-domains. The two isoforms of synaptotagmin (syt) which have been studied in most detail, syt1 and 2, bind phospholipids and SNARE proteins in a calcium-dependant fashion via the C₂-domains. Thereby, they attach to lipid membranes and protein complexes involved in exocytosis [1,2]. Genetic, electrophysiological and biochemical evidences have established their role as a calcium-sensor in membrane fusion during exocytosis [1,3]. Several isoforms have been localised on defined subcellular compartments suggesting their implication in defined transport steps.

Whereas syt1, 2, 5 and 9 are found on synaptic vesicles and/or large dense core vesicles [4–6], syt3 and 6 are present on plasma membranes or adjacent structures [7,8], syt4 resides in proximity of the *trans*-Golgi network [8–10] and syt7 on lysosomes [11].

Synaptotagmins can be classified according to their biochemical properties or by sequence alignment [12–14]. The latter indicates a close relationship between syt1, 2, 5 and 8 as being paralogues [12–14]. Interestingly, syt1, 2 and 5 are implicated in the regulation of exocytosis of LDCVs in neuroendocrine and endocrine cells including insulin-secreting clonal β -cells [5,6,8,15,16]. In regard to syt8, we have previously observed that the corresponding mRNA is expressed in islets as well as derived clonal β -cells and that recombinant C₂-domains of syt8 inhibit insulin exocytosis from permeabilised cells [8]. Recently, a crucial role for syt8 has been reported in calcium-induced membrane fusion during the acrosome reaction [17]. However, syt8 lacks several calcium-coordinating residues in each C₂ domain and it remains controversial whether

* Corresponding author.

E-mail address: j.lang@iecb.u-bordeaux.fr (J. Lang).

syt8 binds synthetic phospholipids or recombinant SNARE proteins in a calcium-dependent fashion [12,17,18].

We have therefore addressed the expression and subcellular localisation of this isoform and examined membrane binding in living cells. Our data demonstrate that syt8 exists as a cytosolic and as a membrane bound form in primary neurons, neuroendocrine and endocrine cells. The cytosolic form of syt8 did not translocate to membranes upon increasing calcium in biochemical assays or in living cells thus excluding this isoform as a calcium sensor in membrane fusion.

2. Material and methods

2.1. Material

Glutathione sepharose 4B was obtained from Amersham Biosciences, (Saclay, France), collagenase from Roche Diagnostics (Saclay, France) and all other reagents were from Sigma (Lyon, France). The following commercial monoclonal antibodies were employed: anti-VAMP2 Cl 69.1 (Synaptic Systems, Göttingen, Germany); anti-SNAP25 (Sternberger Monoclonals, Lutherville, MD, USA); anti-Vti1a Cl45, anti-Vti1b Cl7, anti-BiP and anti-PDI (Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgium); anti-calreticulin, anti-membrin and anti-syntaxin 6 (Stressgen; Victoria, BC, Canada); anti-GST, anti-insulin K36, anti-syntaxin/HPC-1, anti- β COP, anti-Golgi 58 K and anti-synaptophysin/SVP38 (Sigma, Lyon, France). Several antibodies were kindly donated: anti-Ti VAMP Cl58.2 (Dr. T. Galli, Paris), anti-EEA1 (Dr. J. Grunberg, Genève) and anti-LAMP1 (Dr. Marie Luisa Malosio, Milano). HRP-linked anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Amersham Biosciences (Saclay, France), LysoTracker Red and Alexa-labelled anti-rabbit secondary antibody were obtained from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). A plasmid encoding PKC α -eGFP was kindly provided by C. Larsson (University of Lund, Sweden), peGFP-ERGIC by H.P. Hauri (University of Basel, Switzerland), peGFP-rab7 by B. van Deurs (Panum Institute, Copenhagen), peGFP-CD63 by G. Griffiths (Cambridge University) and peGFP-SKL by T. Osumi (University of Hyogo, Japan) [19–22]. INS1-E cells were kindly provided by C.B. Wollheim and P. Maechler (Université de Genève). The previously published anti-syt8 antiserum, designated here as AS syt8, was generously donated by M.A. Knepper (NIH, Bethesda, USA) [23].

2.2. Molecular cloning and RT-PCR

Plasmids encoding the cytoplasmic domains of rat syt 1 to 3 and 5 to 8 fused to a GST tag were kindly provided by Dr. T. Sudhof [12]. DNA sequence encoding the cytoplasmic domain of murine syt 4 (residues 63 to 425) was excised from pSP73 (kind gift from Dr. B. Hilbush) [24] and subcloned into the *SmaI/XhoI* sites of pGEX4T-2. cDNA encoding cytoplasmic fragments of other synaptotagmins were amplified by RT-PCR using the following primer pairs (restriction sites underlined): syt 9 (from mouse brain, amino acids 48–386) 5'-AGGATCCTTCTGTCTCTACCGGAAGCG-3' and 5'-AGAATTCTCAGGGTGCAGGTATTGGC-3', syt 10 (from mouse brain cDNA, amino acids 92–523) 5'-AGCGGATCCAACCTCAGTGTCTTCC-3' and 5'-AGCGAATTCTTATGGTGTGGACGGTGGC-3', syt 11 (from EST AA050913; amino acids 36–430), 5'-GAAGATCTGTGTGGACGTGCTGCCACCGAGGC-3' and 5'-TCGAATTCCTACTCGCTCAGACTGTGCCTTGGC-3', Syt 13 (from MIN6 cells cDNA, amino acids 68–426) 5'-ACGGATCCACGGAGCCTGTCCAGC-3' and 5'-AGCGAATTCACAGGTGCAGTTGGTGGC-3'. The nomenclature of synaptotagmins is given according to Fukuda [25]. The PCR products, purified from an agarose gel by Microspin columns (Qiagen, Courtabouef, France), were directly inserted into the pGEM-T vector (Promega, Charbonnières, France), verified by sequencing of both strands and then subcloned into the *BamHI/EcoRI* sites of the pGEX-2T vector. The plasmid encoding Flag-syt8-C₂AB was obtained by subcloning a *EcoRI/HindIII* fragment (amino acids 98–360) from pGEX-syt8C2AB into pCMV-tag. The plasmid coding for syt8C₂AB-eGFP was obtained by amplification of the cytosolic domain of rat syt8 using the following primers

5'-TGGTGAATTCTAGACTCCATGGTTC-3' and 5'-TAGGATCCGAGC-GAGGCTAAGGAG-3'. The amplicon was digested with *EcoRI/BamHI*, cloned into the appropriate site of peGFP-N1 and sequenced on both strands. RNA from indicated sources was purified using Trizol, reverse transcribed and amplification by PCR was performed using the following primers (according to sequence NM_018802 [26]): sense (nt 687–705), GCTGTGGGACTT-CAAGCGG; antisense (nt 1040–1023) ACGGGAACCAAGACG.

2.3. Polyclonal antibody production and immunoblotting

The polyclonal antibody against syt8 was produced by immunisation of New Zealand white rabbits with a synthetic peptide (CLALQPRLPLLRPR; amino acids 383 to 394 of Q9R0N6) coupled to KHL (Covalab; Lyon, France). The resulting antiserum was affinity-purified against the peptide (Syt8) coupled to sepharose and used throughout the study at a concentration of 35 ng/ml (immunoblots) or 140 ng/ml (immunofluorescence). This antibody is termed “anti-syt8 ip”. Recombinant proteins were obtained in *E. coli* BL21 (DE3), transformed with pGEX vectors. SDS-PAGE, immunoblots, visualisation and quantification was performed as published [27]. Attempts to use the antibody in immunoprecipitation were not successful (data not shown).

2.4. Cell culture and fluorescence microscopy

HIT-T15, MIN6 and INS1-E cells were cultured and transfected as described [8]. PC12 were generously provided by Dr. Brian Rudkin (ENS, Lyon, France) and cultured in DMEM supplemented with 7% foetal bovine serum and 7% horse serum. Primary hippocampal neurons were prepared from rat embryos as described previously [28]. The following siRNAs were used (Ambion): siRNA1 GGATAAAGAACTGTGGGCCT corresponding to nts 234–252 and siRNA2 GGGAAGTGATCGTGT corresponding to nts 1127–1144 of the rat sequence AF375467. Note that siRNA1 contains a mismatch in position 11 and was thus used as control. Confocal microscopy was performed as published and images were obtained using a LSM 510 META and a 100 \times objective [27]. Fixation of cells either in paraformaldehyde or in methanol at -20°C gave similar results for anti-syt8 ip although the latter preserved cytosolic staining to a larger extent. Permeabilisation with streptolysin-O was performed as described previously [8] and cells were subsequently incubated for 20 min in intracellular buffer (140 mM L-glutamic acid/monopotassium salt, 5 mM NaCl, 7 mM MgSO₄, 0.4 mM EGTA, 20 mM HEPES, pH 7) and washed once prior to fixation. Imaging of living cells was performed using an inverted microscope (Nikon TD300 equipped with a Z-drive) coupled to a monochromator (Till Photonics) and appropriate emission filters. Images were recorded by a CCD-camera (Micromax 1300Y HS, Roperts Scientific) using Metamorph software (Universal Imaging) and deblurred by deconvolution (Autodeblur, Universal Imaging). Cells on coverslips were kept either in Krebs–Ringer buffer or in intracellular buffer at 37°C on a heated stage during acquisition. Cells were stimulated either with ionomycin (10 μM) or using defined calcium buffers and 30 μM digitonin. Concentrations of free calcium were obtained as described previously [29] or, in the case of concentrations above 10 μM , calculated by winmaxc (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) using NTA and HEDTA [30]. Solutions were pressure ejected (3 psi, 10 s) from a micropipette held at approximately 10 μm from the cell.

2.5. Postnuclear supernatants, subcellular fractionation and in vitro translocation

Cells were washed twice with PBS pH 7.4 (without Mg²⁺), detached by incubation with 10 mM EDTA-PBS for 5 min at 37°C and centrifuged at $800\times g$ for 5 min at 4°C . Pelleted cells were resuspended in appropriate buffer for each experiment and sonicated for 2 min on ice. Brain extracts were prepared as published [6]. Postnuclear supernatants (PNS) were obtained by a 10-min centrifugation of cells or brain homogenates at $1000\times g$ and at 4°C . Subcellular fractionation by velocity sedimentation on sucrose gradient was performed as described [31]. To fractionate brain homogenates, PNS was centrifuged at $17,000\times g$ for 1 h yielding P2 (crude synaptosomal fraction) and S2 (soluble proteins). P2 was resuspended in hypotonic buffer (HEPES 10 mM pH 7.4) and further lysed by Dounce homogenization. Centrifugation at $27,000\times g$ for 40

min at 4 °C separated soluble proteins from membranes (LP1). For separation of cell homogenates into membrane and cytosolic fraction, cells were resuspended in hypotonic buffer (Tris 25 mM pH 7, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 0.5 mM PMSF), sonicated and centrifuged at 100,000×g for 2 h at 4 °C. To determine calcium-dependent translocation, detached and pelleted MIN6 cells were incubated for 5 min at 37 °C in intracellular buffers supplemented with protease inhibitors (1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 0.5 mM PMSF) and either containing 2 mM EGTA or 2 mM CaCl₂ with 10 µM ionomycin. Subsequently they were sonicated on ice for 2 min, centrifuged at 160,000×g for 1 h at 4 °C and resuspended in EGTA or calcium buffer. Total protein contents were measured by Bradford assay (Biorad, Marnes-la-Coquette France) and insulin concentration was determined by ELISA (Mercodia, Uppsala Sweden).

3. Results

3.1. Generation and characterisation of the antibody

Sequence comparison and prediction of antigenicity indicated a specific and sufficiently antigenic sequence in the C-terminus of syt8 to avoid cross-reactivity with other isoforms. In addition, splice variations are not predicted for the last exon in syt8 [14], the peptide is fully conserved in rat and mouse and blast searches using the last 30 amino acids of syt8 suggested the absence of similar sequences in the mouse genome. Specificity of the obtained and immunopurified antiserum, termed anti-syt8 ip, was tested against recombinant cytosolic domains of syt1 to 12 (Fig. 1A). Anti-syt8 ip recognized only syt8 but no other isoform tested. It should be noted that the recently identified isoforms syt 13 to 16, which have not been tested here, do not exhibit any homology to the C-terminus of syt8. We also used a previously published antiserum [23], named here AS Syt8, and compared it with anti-syt8 ip. As given in Fig. 1A, AS Syt8 was specific for synaptotagmin 8 and exhibited only some cross-reactivity to synaptotagmin 1.

3.2. Expression of synaptotagmin 8

The antibody anti-syt8 ip recognized a single band of 40 kDa in homogenates from the insulinoma cells HIT-T15 cells (Fig. 1B) and stained an additional band of 35 kDa after over-expression of the C₂AB domains of syt8 in this cell line. The 40-kDa immunoreactive band was also found in the insulinoma cell lines MIN6 and INS1-E as well as in pheochromocytoma PC12 cells (Fig. 1B, middle panel) which is in line with the known extra-neuronal expression of syt8 [12]. As shown in Fig. 1B, the intensity of the immunoreactive band in endocrine and neuroendocrine cells was completely abolished by co-incubation with the antigenic peptide further indicating the specificity of the antibody employed. In brain homogenates two bands were detected at 40 and about 50 kDa (Fig. 1B, right panel). Whereas the upper band was present in LP1 (synaptosomal plasma membranes and attached synaptic vesicles), the 40-kDa band was found in the S2 fraction which contains cytoplasm and synaptic vesicles [32].

We further examined the specificity the immunopurified antibody by comparing it with AS Syt8 and by the use of siRNA (Fig. 1C and D). The 40-kDa band is recognized by AS Syt8. In addition, a band at approximately 50 kDa is stained that can also

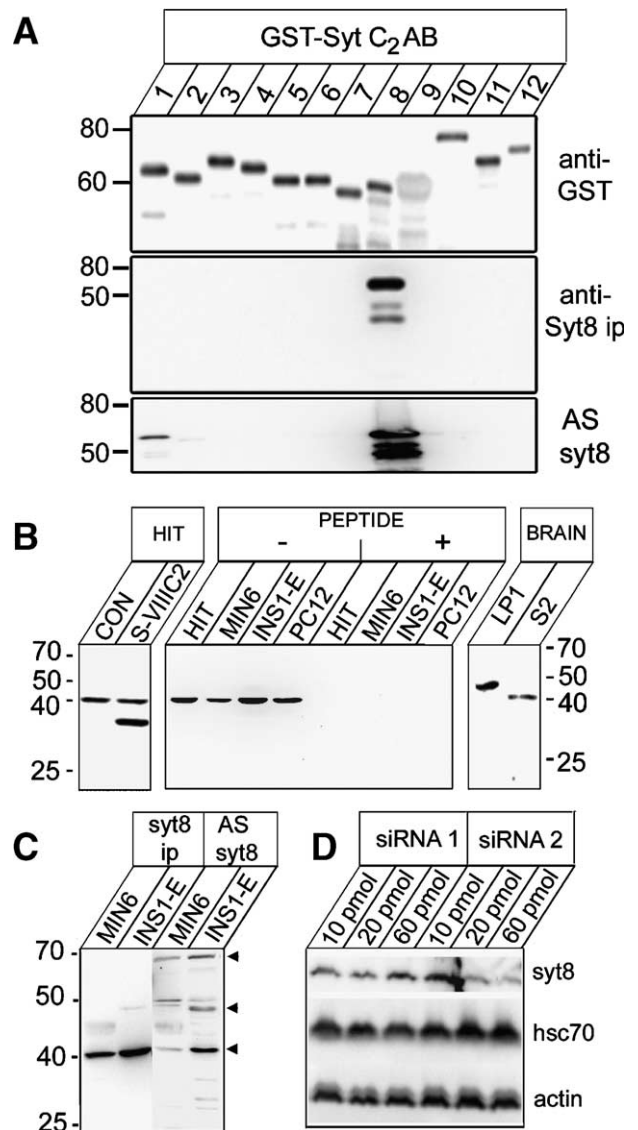


Fig. 1. Specificity of immunopurified anti-syt8 antibody. (A) Immunostaining of recombinant GST-fusion proteins of cytosolic domains of synaptotagmins (GST-sytC₂AB) with anti-GST (upper panel), immunopurified anti-syt8 (antiSyt8 ip; middle panel) or a different anti-syt8 antiserum (AS Syt8; lower panel). Numbering of syt isoforms is given according to Fukuda [25]. (B) 60 µg of postnuclear supernatant from native HIT-T15 cells, HIT-T15 cells over-expressing Flag-syt8-C₂AB (S-VIII-C2; left panel), from HIT-T15, MIN6, INS-1E or PC12 cells (middle panel) or LP1 and S2 fractions from mouse brain (right panel) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-syt8 ip (35 ng/ml) in the absence or presence of antigenic peptide (middle panel). (C) Comparison of immunoreactivity of anti-syt8 ip or AS Syt8 on postnuclear supernatants from MIN6 and INS1-E cells. Major bands in INS1-E cells are indicated by arrows. (D) Transient transfection with siRNA2, but not with (control) siRNA1 reduced the expression of the 40-kDa band in postnuclear supernatants of INS1-E cells as evidenced by immunoblotting using anti-syt8 ip.

be detected, though faint, in INS1-E cells stained with anti-syt8 ip. Additional bands are apparent using AS syt8 such as a 65-kDa protein. This may represent synaptotagmin 1 in view of the cross-reactivity of the antiserum and the known expression of syt1 in insulin-secreting cell lines [6,8]. Transient transfection of INS1-E cells with the control siRNA (siRNA1) did not alter the expression levels of the 40-kDa protein whereas a

considerable reduction was observed after transient transfection of specific siRNA (siRNA2). In contrast, the expression levels of control proteins such as hsc70 and actin were not altered.

Alternative splicing of *syt8* may affect the N- and the C-terminus with variations at the first two or at the sixth of the eight exons present thereby yielding proteins with predicted molecular weights ranging from 25 and 40 to 44 kDa [14]. The relative migration observed in our experiments is therefore compatible with the expected forms of *syt8*. Our attempts to further characterise *syt8* in insulinoma cells by RT-PCR using sense primers located within the first or second exon were unsuccessful and may well be explained by the predicted transcript complexity affecting the N-terminus [14]. Another splice variant is given by the presence or absence of the 6th exon situated within the predicted C2B domain [14]. Using primers situated in the 5th and 7th exon, we obtained amplicons of the predicted size (353 bp) for the presence of the 6th exon (Fig. 2) indicating that this exon is expressed in clonal and primary β -cells.

3.3. Membrane-bound and cytosolic forms of synaptotagmin 8

To determine the subcellular distribution of *syt8* in more detail, we performed fractionation on a continuous sucrose gradient (Fig. 3) in MIN6 cells. The relative distribution of known organelle markers coincided with those reported previously for other insulinoma cells [6,31,33]. Secretory granules (insulin) migrated mainly at fractions 8 to 10 followed by the endoplasmic reticulum as given by the distribution of calreticulin (Fig. 3A). The SNARE proteins syntaxin and SNAP25 were mainly found in fractions 6 to 8 compatible with the density of approximately 1 expected for fractions containing plasma membranes. The broad distribution of the two markers reflects their known presence also on endocytotic compartments. The vesicular protein synaptophysin/SVP38, a marker of synaptic-like microvesicles and endocytotic compartments, was mainly enriched in fraction 5 at a density of approximately 0.9 (Fig. 3B). In contrast, *syt8* migrated in the first fractions of the gradient, a behaviour compatible with a cytosolic protein. After long exposure of the blots we detected also the 50-kDa band which was concentrated in fractions of higher density (0.9 M sucrose). No additional band was observed below or above these two proteins. To examine the specificity of this band, we compared the migration of immunoreactive bands on a similar

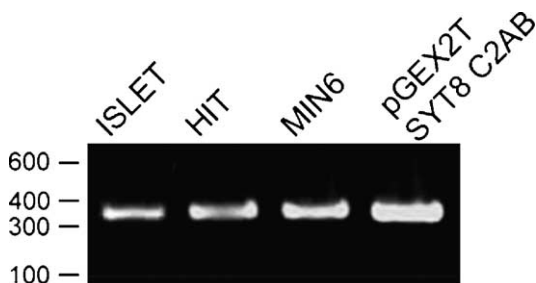


Fig. 2. The sixth exon is present in *syt8* mRNA from islets and clonal β -cells. mRNA from indicated sources was amplified using primers situated in the 5th and 7th exon and separated on agarose gels.

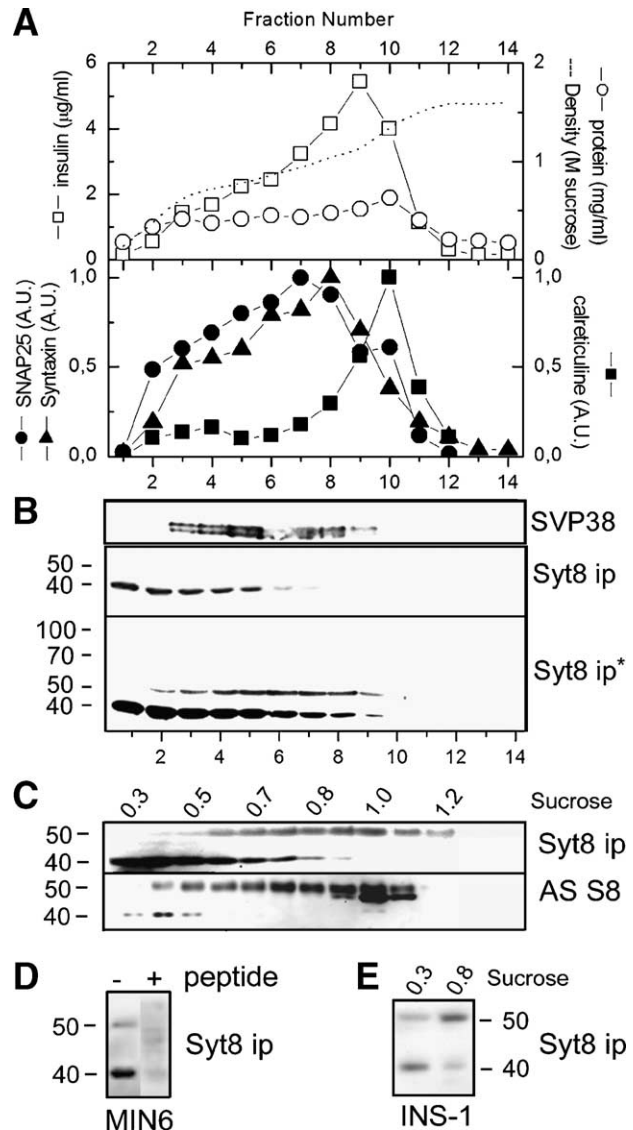


Fig. 3. Subcellular distribution of synaptotagmin 8 in clonal β MIN6 cells. (A) Postnuclear supernatants were fractionated on a continuous sucrose gradient and 14 fractions (0.5 ml each) were analyzed for total protein, insulin, density (upper graph) and distribution of SNAP25, syntaxin or calreticulin (lower graph). (B) Immunoblot for synaptophysin (SVP38) and *syt8* after short exposure (*syt8* ip) or prolonged exposure (*syt8* ip*). (C) Using a similar gradient, the distribution of immunoreactivity for anti-*syt8* ip and for AS *syt8* were compared. The corresponding sucrose concentrations of this gradient are indicated. (D) An aliquot of the 0.7-M sucrose fraction shown in C was incubated with anti-*syt8* ip in the absence or presence of peptide (10 μ M). (E) Postnuclear supernatants of INS1-E cells were separated on a sucrose gradient and two fractions (0.3 M and 0.8 M sucrose) were compared for the expression of the 40- and the 50-kDa band.

gradient using anti-*syt8* ip and AS *syt8* (Fig. 3C). Both bands were recognized by the two antibodies and their distribution over the gradient was comparable in terms of immunoreactivity for anti-*syt8* ip and for AS *syt8*. An additional band of 48 kDa, visible between 0.9 and 1.1 M sucrose, was only apparent for AS *syt8*.

To ensure the specificity of the 40- and 50-kDa band, we tested whether the immunoreactivity against both bands can be blocked by the antigenic peptide. As shown in Fig. 3D, this was

indeed the case. Both proteins were present in postnuclear supernatants of INS1-E cells (see Fig. 1C) although the slower migrating band was faint (see Fig. 1C). To test for the presence of the 50-kDa form in INS1-E cells, we also examined fractions obtained by a sucrose density gradient (Fig. 3E). Similar to our observations in MIN6 cells, the 50-kDa form was found enriched at 0.8 M sucrose thus demonstrating its expression also in this cell line.

3.4. The membrane bound form of synaptotagmin 8 partially colocalises with Vti1a

To investigate further the distribution of synaptotagmin 8, we performed immunochemical staining of clonal β -cells (Fig. 4). Using anti-syt8 ip or AS Syt8, immunoreactivity was dispersed throughout the cytosol, most likely corresponding to the 40-kDa protein, and an additional discrete punctuate staining was observed in MIN6 and INS1-E cells (Fig. 4A–D). A similar distribution was also apparent in HIT-T15 cells (data not shown). Although major features in staining were conserved between anti-syt8ip and AS Syt8, minor differences are notable such as a greater number of puncta in the latter. This may be due to cross-reactivity of AS Syt8 with synaptotagmin 1 (see Fig. 1A) known to be expressed on synaptic like microvesicles and large dense core granules in insulin secreting cells [6]. In addition, the cytosolic stain was less evident for AS Syt8 which is in line with the weaker recognition of the 40-kDa protein in immunoblots.

We further concentrated on the discrete punctua observed with anti-syt8 ip to ascertain its specificity and define the relevant structure or organelle. To this end imaging parameters were employed which mainly visualised the punctuate staining. The picture shown in Fig. 4E gives a representative image as obtained by Z-sectioning and 3D reconstruction in INS1-E cells. Staining of 30 to 50 particles per cell were observed and these organelles were never found at the plasma membrane. The magnification provided in Fig. 4E (right panel) demonstrates the typical aspect of these organelles which most often appeared in clusters. We further examined the specificity of the staining. First, it was still apparent after permeabilisation of cells with streptolysin-O and a buffer wash (Fig. 4F) suggesting that the epitope recognized by the antibody is tightly associated with membranes. Preincubation of anti-syt8 ip with the peptide abolished the immunoreactivity (Fig. 4H) as compared to the absence of the peptide (Fig. 4G). Moreover, immunoreactivity was absent in cells cotransfected with siRNA2 (Fig. 4L), but not in cells co-transfected with siRNA1 (Fig. 4K). The punctate staining was also considerably altered after preincubation with nocodazole, which depolymerises tubulin (Fig. 4M). In contrast, pre-treatment with brefeldin A did not alter the distribution of anti-syt8ip immunoreactivity (data not shown). Using a monoclonal antibody against Vti1a, a presumed Golgi SNARE protein [34], a certain degree of colocalisation was apparent (Fig. 4N). Comparable results were obtained with AS syt8 (data not shown). Although a number of syt8-positive organelles stained for Vti1a, the latter clearly exhibited a wider distribution. We had therefore conducted a vast survey for

colocalisation with other intracellular structures which, however, remained negative. Indeed, anti-syt8 ip staining did not colocalise with markers for peroxisomes (peGFP-SKL), the endoplasmic reticulum (BiP, calreticulin), the intermediate compartment (ERGIC-eGFP), transport vesicles (β -COP), Golgi membranes (membrin, G58k, Vti1b, syntaxin 6), exocytotic vesicles (insulin, synaptophysin) or endocytic compartments (Ti-VAMP, LAMP1, rab7-eGFP, EEA1, lysotracker, CD63-eGFP) (data not shown). Similarly, the distribution of transferrin receptors, cytochrome *c* oxidase or GLUT2 did not have any resemblance to the localisation of syt8 in INS1-E cells (data not shown).

Interestingly, a comparable intracellular distribution of anti-syt8 ip immunoreactivity was apparent in the neuroendocrine cell line PC12 and in primary neurons. In both cells a limited number of rather large structures were apparent (Fig. 5). In neurons, anti-syt8 ip immunoreactivity was strictly confined to the soma as demonstrated by co-staining for synaptophysin, a marker of synaptic vesicles, and comparison with the phase picture.

3.5. Cytosolic synaptotagmin 8 does not translocate in response to calcium

Synaptotagmin 8 was originally described as an isoform which does not bind SNARE proteins or phospholipids in a calcium-dependent manner [12,18]. Most recently, however, it was reported that the cytosolic domain of syt8 still binds to the SNARE proteins syntaxin 1 or SNAP25 in a calcium-dependent manner [13]. We therefore tested whether the cytosolic form of syt8 expressed in insulinoma cells is capable to bind to membranes in a calcium-dependent fashion. As shown in Fig. 6, ultracentrifugation in hypotonic buffer of postnuclear supernatants from insulinoma cells demonstrated again the soluble nature of the endogenous protein. We subsequently tested whether this protein is capable to translocate to biological membranes upon an increase in free calcium. To this end cells were incubated in intracellular buffer in the presence of ionomycin without or with calcium, homogenized and separated into soluble and membrane fractions by ultracentrifugation. Under these conditions syt8 remained soluble whereas the integral membrane proteins VAMP2 and syntaxin were recovered in the membrane fraction. (Fig. 6). In addition, transiently expressed protein kinase C α fully translocated under those conditions. We further compared the behaviour of the cytosolic domain of syt8 with that of syt2 in living cells. To this end eGFP-tagged fusion proteins were expressed in MIN6 cells. This assay measures interactions with endogenous phospholipids and avoids the problem of contamination of recombinant proteins by bacterial lipids [35]. As shown in Fig. 6, exposure of cells to the calcium ionophore ionomycin induced translocation of syt2C₂AB, whereas syt8C₂AB remained dispersed throughout the cell. Stimulation with the calcium mobilizing agent thapsigargin (1 μ M) or carbachol (0.1 mM) did not alter the distribution of syt8C₂AB (data not shown). Using defined calcium buffers and digitonin to perforate the plasma membrane, we compared the calcium sensitivity of the two

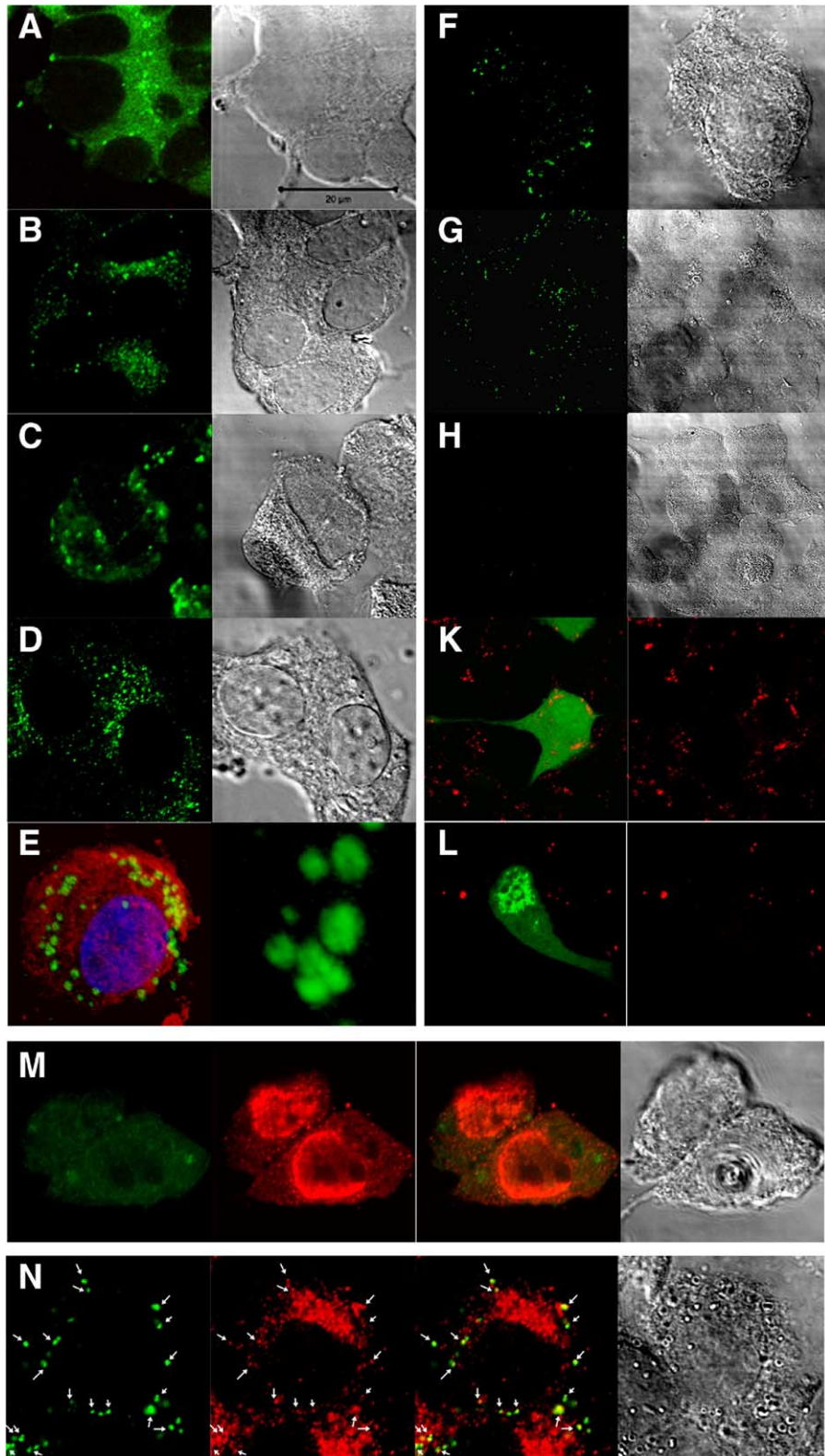


Fig. 4. Immunoreactivity of MIN6 or INS1-E cells using anti-syt8 ip or AS syt8. MIN6 cells are given in panels A and B, all other panels show results using INS1-E cells. Cells stained with AS syt8 (B and D) exhibit immunofluorescence similar to those stained with anti-syt8 ip (A, C), i.e., a cytosolic and a granular pattern. (E to N) Staining with anti-syt8 ip and imaging using parameters that image mainly the granular pattern. (E) Pseudo-3D presentation staining with anti-syt8 ip (FITC), syntaxin 1 (TRITC) and Hoechst X (blue) to demonstrate the cellular distribution of anti-syt8 ip staining. Right panel: enlarged view of a group of syt8-positive structures. (F) Permeabilisation with streptolysin-O and washes prior to fixation and staining with anti-syt8 ip. (G and H) Staining without (G) or with preincubation (H) of anti-syt8 ip with the antigenic peptide (10 μ M). (K and L) Staining with anti-syt8 ip of cells co-transfected with eGFP and (control) siRNA1 (K) or siRNA2 (L). (M) Staining with anti-syt ip (FITC) and anti-tubulin (TRITC) after pre-treatment with nocodazole (5 μ g/ml, 1 h, 37 $^{\circ}$ C). (N) With anti-syt ip (FITC) and anti-Vti1a (TRITC). Colocalisations of visualised structures are indicated by arrows.

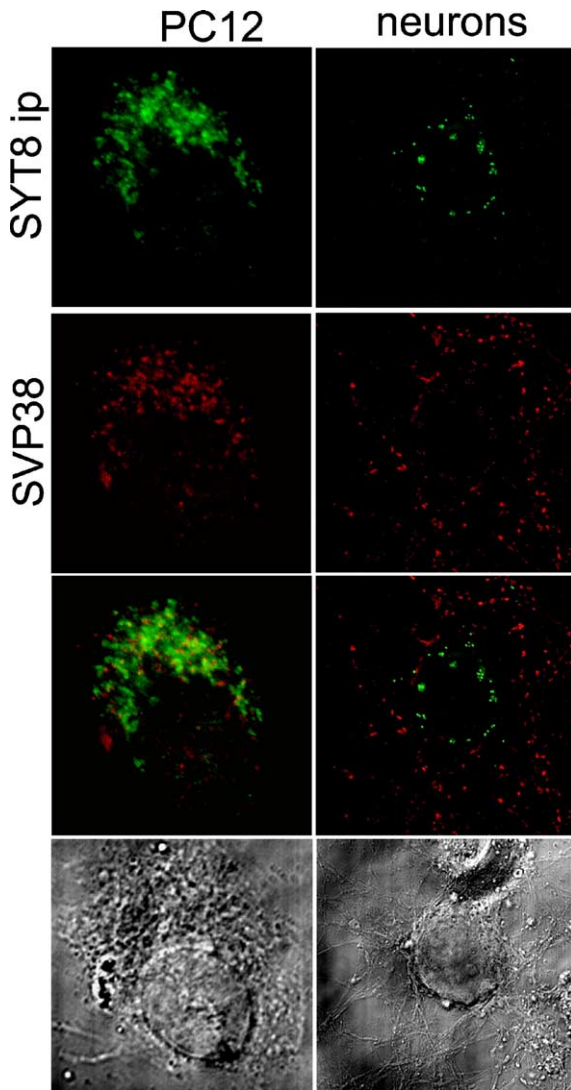


Fig. 5. Immunoreactivity of primary hippocampal neurons or PC12 cells using anti-syt8 ip. Cells were stained with anti-syt8 ip (FITC) and anti-synaptophysin (TRITC).

constructs. Syt2C₂AB translocated with an EC₅₀ of about 2 μ M of free calcium whereas even 1 mM free calcium was unable to induce translocation of syt8C₂AB.

4. Discussion

Characterisation of synaptotagmins has allowed assigning specific localisation and functional roles to several isoforms of this family [1]. The expression of multiple splice variants adds another layer of diversity to the system [14,36,37]. Clearly, the precise identification and precise localisation of the endogenous protein is important. We have therefore immunopurified and carefully characterised our antibody. Its specific recognition of a soluble 40 kDa and a membrane-bound 50 kDa form of synaptotagmin 8 is supported by our data using recombinant synaptotagmin 1 to 12, blockade of recognition by the antigen in immunoblots and immunofluorescence as well as a decrease after transfection with corresponding siRNAs. Moreover,

similar results were obtained in direct comparison with another, previously published antibody. Note that we did not detect any form of higher molecular weight.

Previous studies on endogenous syt8 reported apparent molecular weights of 40 and 50 kDa in brain or kidney and of 40 and 70 kDa in sperm membranes using anti-peptide antibodies [23,38]. Recognition of a 40-kDa protein and of the 50-kDa protein is in line with our study. Transiently expressed full-length syt8 endowed with an epitope-tag migrates at approximately 43 kDa [39]. As synaptotagmins can undergo posttranslational modifications with a corresponding increase in their apparent molecular weight [40,41],

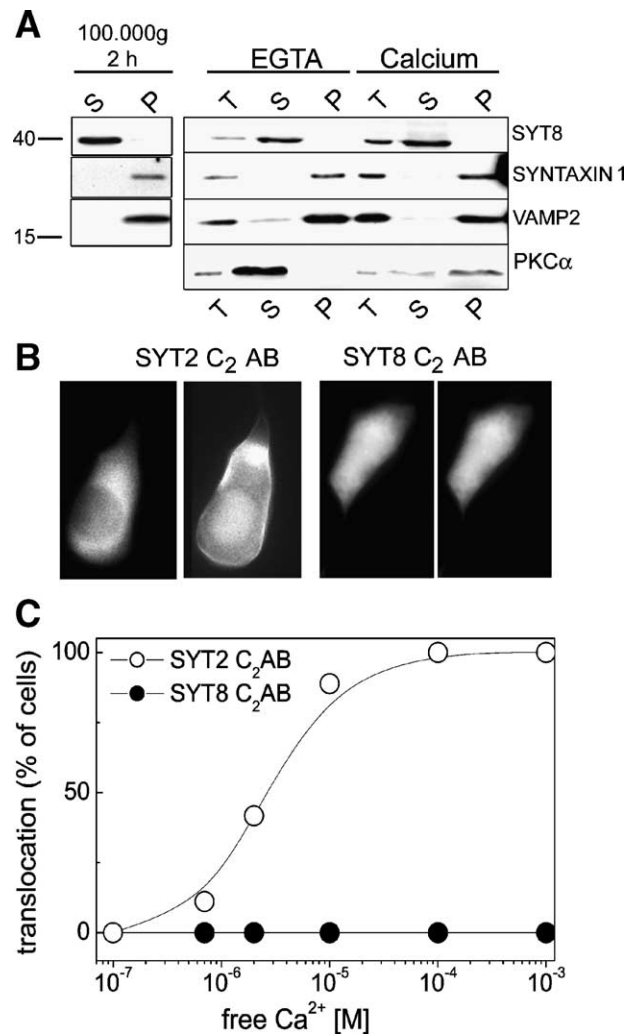


Fig. 6. Synaptotagmin 8 does not translocate upon increases in intracellular calcium. (A) Biochemical characterisation: MIN6 cells were incubated in hypotonic buffer (left panel) or in intracellular buffers in the presence of EGTA (EGTA) or of 2 mM calcium and 10 mM ionomycin (Calcium) at 37 °C, sonicated and ultracentrifuged. An aliquot of the initial sample (T) and obtained supernatants (S) or pellets (P) were immunoblotted for syt8 (using anti-syt8 ip), syntaxin 1 and VAMP2. (B) MIN6 cells transiently expressing syt2C₂AB-eGFP or syt8C₂AB-eGFP kept in KRB (1 mM calcium) were stimulated with 10 μ M ionomycin. Representative frames prior to and 30 s after stimulation are given. (C) Translocation of syt-eGFP in living cells kept in intracellular buffer and exposed for 10 s to indicated concentrations of free calcium and 30 μ M digitonin. 3 to 11 cells were imaged for each concentration.

the 50-kDa protein probably represents the full-length endogenous synaptotagmin 8.

The detection of a major 40 kDa form was clearly surprising. Interestingly, the major immunoreactive band in sperm membranes detected with an antibody directed against a sequence corresponding to the linker between the two C₂ domains exhibited also an apparent molecular weight of 41 kDa [38]. Our antibody was directed against the C-terminus and we did not detect any variations by RT-PCR in the 6th exon encompassing the second C₂ domain. Differences between the two forms should therefore reside within the N-terminal region. Indeed, a complex pattern of alternative splicing has been predicted for the N-terminus of syt8 thereby yielding proteins with predicted molecular weights ranging from 25 and to 44 kDa [14]. This complexity may also explain our failure to amplify this region by RT-PCR. Note also that spliced N-terminal EST clones are absent from the different databases. We cannot formally exclude that the 41-kDa form of syt 8 is generated by proteolytic cleavage of the 50-kDa protein. However, the differential distribution observed by immunocytochemistry coincides with the migration on the sucrose gradient and renders unlikely the occurrence of a proteolytic artefact during fractionation.

The two forms of syt8 observed in β -cells distributed to distinct compartments, a soluble 41 kDa form in the cytosol and a minor 50 kDa membrane-bound. Exon skipping leading to the absence of transmembrane domains have been reported previously for several synaptotagmins [36] and a differential distribution similar to syt8 had been described in the case of full-length and alternatively spliced syt6 [37]. Despite our efforts we could only partially characterise the structure bearing synaptotagmin 8. The effect of microtubule disruption by nocodazole suggests the expression of synaptotagmin 8 on a dynamic compartment. Partial colocalisation was apparent for Vt1a, a vesicular SNARE protein [34]. Although this protein has been described as residing at the TGN and derived vesicles, a localisation insensitive to brefeldin A has been reported recently in adipocytes where Vt1a regulates trafficking of the glucose transporter GLUT4 [42]. Similarly, brefeldin A did not alter the subcellular distribution of syt8 in our cells. We do not think that membrane bound syt8 intervenes in the regulation of glucose transport in β -cells also it is expressed not only in clonal but also in primary cells [8]. Indeed, at least the majority of the physiologically relevant glucose transporter in clonal and primary β -cells, GLUT2, had a distribution very distinct from that of syt8 in INS1-E cells (data not shown). Vt1a is, however, found on aquaporin 2 containing vesicles in renal collecting duct cells as recently evidenced by a proteomic analysis [43] and synaptotagmin 8 may eventually intervene in the exocytosis of channels and transporters in these cells [23] and other tissues such as β -cells. As other N-terminal splice variants might exist [14], we cannot exclude that those variants may eventually localise to exocytotic compartments in cell types different from those than investigated here.

Both forms of synaptotagmin 8 may intervene in distinct transport steps and recombinant syt8 C2AB inhibits insulin

exocytosis from permeabilised β -cells [8] or sperm acrosome reaction, a well characterised model of membrane fusion [17]. Obviously such an approach probes for the affinity of the effector but does not necessarily imply syt8 itself in the physiological regulation of exocytosis. Indeed, we were unable to detect any binding to membranes in homogenized or living cells in the absence or presence of calcium, whereas other C2-domain containing proteins such as protein kinase C α or the cytosolic domain of syt2 completely translocated. This is in line with the known changes in calcium-coordinating aspartates or glutamates in syt8. Whereas the first aspartate in the C₂A domain is lacking in syt8, the third aspartate of the C₂B domain is replaced by alanine [12].

Syt8 has been reported to bind in a cation-insensitive manner to the soluble second messenger inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate via a polybasic motif in its C₂B domain [44]. A small, transient increase in this compound has been observed during stimulation of β -cells by carbachol [45,46]. This agent did not alter the distribution of syt8 C₂AB-eGFP in living cells but we cannot exclude that minor changes had escaped our attention.

In conclusion, our observations indicate that, similar to several other synaptotagmins [14,36,37], two forms of syt8 exist in secretory and neuronal cells with a differential distribution most likely due to alternative splicing. Our observations also strongly suggest that syt8 is not a calcium sensor in endocrine cells or neurons and does thus not participate in the calcium-mediated regulation of evoked exocytosis.

Acknowledgements

We thank Marie-Noëlle Benassy for excellent technical assistance and Dr. Naima Moustaid-Moussa for helpful suggestions on the manuscript. This work was supported by grants from the Region of Aquitaine and the University of Bordeaux I (BQR2003/4).

References

- [1] R. Jahn, T. Lang, T.C. Sudhof, Membrane fusion, *Cell* 112 (2003) 519–533.
- [2] J.H. Evans, S.H. Gerber, D. Murray, C.C. Leslie, The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 371–383.
- [3] T.W. Koh, H.J. Bellen, Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release, *Trends Neurosci.* 26 (2003) 413–422.
- [4] M. Geppert, B.T. Archer III, T.C. Sudhof, Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 13548–13552.
- [5] M. Fukuda, J.A. Kowalchuk, X. Zhang, T.F. Martin, K. Mikoshiba, Synaptotagmin IX regulates Ca²⁺-dependent secretion in PC12 cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4601–4614.
- [6] J. Lang, M. Fukuda, H. Zhang, K. Mikoshiba, C.B. Wollheim, The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic β -cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium, *EMBO J.* 16 (1997) 5837–5846.
- [7] S. Butz, R. Fernandez-Chacon, F. Schmitz, R. Jahn, T.C. Sudhof, The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI. Synaptotagmin III is enriched in synapses and synaptic plasma membranes but not in synaptic vesicles, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18290–18296.

- [8] A. Gut, C.E. Kiraly, M. Fukuda, K. Mikoshiba, C.B. Wollheim, J. Lang, Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 1709–1716.
- [9] F. Berton, V. Cornet, C. Iborra, J. Garrido, B. Dargent, M. Fukuda, M. Seagar, B. Marqueze, Synaptotagmin I and IV define distinct populations of neuronal transport vesicles, *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 1294–1302.
- [10] K. Ibata, M. Fukuda, T. Hamada, H. Kabayama, K. Mikoshiba, Synaptotagmin IV is present at the Golgi and distal parts of neurites, *J. Neurochem.* 74 (2000) 518–526.
- [11] I. Martinez, S. Chakrabarti, T. Hellevik, J. Morehead, K. Fowler, N.W. Andrews, Synaptotagmin VII regulates Ca^{2+} -dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 1141–1149.
- [12] C. Li, B. Ullrich, J.Z. Zhang, R.G. Anderson, N. Brose, T.C. Sudhof, Ca^{2+} -dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins, *Nature* 375 (1995) 594–599.
- [13] C. Rickman, M. Craxton, S. Osborne, B. Davletov, Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family, *Biochem. J.* 378 (2004) 681–686.
- [14] M. Craxton, Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes, *BMC Genomics* 5 (2004) 43, doi:10.1186/1471-2164-5-43.
- [15] L.A. Elferink, M.R. Peterson, R.H. Scheller, A role for synaptotagmin (p65) in regulated exocytosis, *Cell* 72 (1993) 153–159.
- [16] M. Iezzi, G. Kouri, M. Fukuda, C.B. Wollheim, Synaptotagmin V and IX isoforms control Ca^{2+} -dependent insulin exocytosis, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 3119–3127.
- [17] D. Hutt, J. Baltz, J. Ngsee, Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20197–20203.
- [18] W.C. Tucker, J.M. Edwardson, J. Bai, H.J. Kim, T.F. Martin, E.R. Chapman, Identification of synaptotagmin effectors via acute inhibition of secretion from cracked PC12 cells, *J. Cell Biol.* 162 (2003) 199–209.
- [19] A. Raghunath, M. Ling, C. Larsson, The catalytic domain limits the translocation of protein kinase C alpha in response to increases in Ca^{2+} and diacylglycerol, *Biochem. J.* 370 (2003) 901–912.
- [20] H. Ben-Tekaya, K. Miura, R. Pepperkok, H.P. Hauri, Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 357–367.
- [21] C. Bucci, P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy, B. van Deurs, Rab7: a key to lysosome biogenesis, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 467–480.
- [22] N. Hashiguchi, T. Kojidani, T. Imanaka, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, E. Baumgart, S. Yokota, T. Tsukamoto, T. Osumi, Peroxisomes are formed from complex membrane structures in PEX6-deficient CHO cells upon genetic complementation, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 711–722.
- [23] B.K. Kishore, J.B. Wade, K. Schorr, T. Inoue, B. Mandon, M.A. Knepper, Expression of synaptotagmin VIII in rat kidney, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) F131–F142.
- [24] B.S. Hilbush, J.I. Morgan, A third synaptotagmin gene, *Syt3*, in the mouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 8195–8199.
- [25] M. Fukuda, Molecular cloning, expression, and characterization of a novel class of synaptotagmin (*Syt XIV*) conserved from *Drosophila* to humans, *J. Biochem. (Tokyo)* 133 (2003) 641–649.
- [26] M. Fukuda, E. Kanno, K. Mikoshiba, Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo- and heterodimer formation of synaptotagmins III, V, VI, and X, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31247–31251.
- [27] F. Boal, H. Zhang, C. Tessier, P.A. Scotti, J. Lang, The variable C-terminus of cysteine string proteins modulates exocytosis and protein–protein interactions, *Biochemistry* 43 (2004) 16212–16223.
- [28] L. Fourgeaud, A.S. Bessis, F. Rossignol, J.P. Pin, J.C. Olivo-Marin, A. Hemar, The metabotropic glutamate receptor mGluR5 is endocytosed by a clathrin-independent pathway, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 12222–12230.
- [29] J. Lang, R. Regazzi, C.B. Wollheim, in: K. Aktories (Ed.), *Bacterial Toxins: Tools in Cell Biology*, Chapman and Hall, Weinheim, 1997, pp. 217–240.
- [30] C. Patton, S. Thompson, D. Epel, Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions, *Cell Calcium* 35 (2004) 427–431.
- [31] H. Zhang, W.L. Kelley, L.H. Chamberlain, R.D. Burgoyne, J. Lang, Mutational analysis of cysteine-string protein function in insulin exocytosis, *J. Cell Sci.* 112 (Pt. 9) (1999) 1345–1351.
- [32] R. Jahn, W. Schiebler, C. Ouimet, P. Greengard, A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 4137–4141.
- [33] J. Lang, I. Nishimoto, T. Okamoto, R. Regazzi, C. Kiraly, U. Weller, C.B. Wollheim, Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases G_1 and G_o , or by the expression of their active $G\alpha$ subunits, *EMBO J.* 14 (1995) 3635–3644.
- [34] V. Kreykenbohm, D. Wenzel, W. Antonin, V. Atlachkine, G.F. von Mollard, The SNAREs *vt1a* and *vt1b* have distinct localization and SNARE complex partners, *Eur. J. Cell Biol.* 81 (2002) 273–280.
- [35] J. Ubach, Y. Lao, I. Fernandez, D. Arac, T.C. Sudhof, J. Rizo, The C2B domain of synaptotagmin I is a Ca^{2+} -binding module, *Biochemistry* 40 (2001) 5854–5860.
- [36] M. Craxton, M. Goedert, Alternative splicing of synaptotagmins involving transmembrane exon skipping, *FEBS Lett.* 460 (1999) 417–422.
- [37] M. Fukuda, K. Mikoshiba, A novel alternatively spliced variant of synaptotagmin VI lacking a transmembrane domain. Implications for distinct functions of the two isoforms, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31428–31444.
- [38] D.M. Hutt, R.A. Cardullo, J.M. Baltz, J.K. Ngsee, Synaptotagmin VIII is localized to the mouse sperm head and may function in acrosomal exocytosis, *Biol. Reprod.* 66 (2002) 50–56.
- [39] M. Fukuda, E. Kanno, Y. Ogata, K. Mikoshiba, Mechanism of the SDS-resistant synaptotagmin clustering mediated by the cysteine cluster at the interface between the transmembrane and spacer domains, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40319–40325.
- [40] M. Fukuda, Vesicle-associated membrane protein-2/synaptobrevin binding to synaptotagmin I promotes O-glycosylation of synaptotagmin I, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 30351–30358.
- [41] M. Veit, T.H. Sollner, J.E. Rothman, Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25, *FEBS Lett.* 385 (1996) 119–123.
- [42] A. Bose, A. Guilherme, S. Huang, A.C. Hubbard, C.R. Lane, N.A. Soriano, M.P. Czech, The v-SNARE *Vti1a* regulates insulin stimulated glucose transport and ACRP30 secretion in 3T3L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 36946–36951.
- [43] M. Barile, T. Pisitkun, M.J. Yu, C.L. Chou, M.J. Verbalis, R.F. Shen, M.A. Knepper, Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct, *Mol. Cell Proteomics* 4 (2005) 1095–1106.
- [44] K. Ibata, M. Fukuda, K. Mikoshiba, Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding activities of neuronal and non-neuronal synaptotagmins. Identification of conserved amino acid substitutions that abolish inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding to synaptotagmins III, V, and X, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12267–12273.
- [45] C.A. Alter, B.A. Wolf, Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in pancreatic islets and insulin-secreting beta-cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208 (1995) 190–197.
- [46] T.J. Biden, B. Peter Riesch, W. Schlegel, C.B. Wollheim, Ca^{2+} -mediated generation of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in pancreatic islets. Studies with K^+ , glucose, and carbamylcholine, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 3567–3571.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé le senseur calcique putatif Synaptotagmine 8 (Syt8).

Nous avons montré grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique que Syt8 est exprimée dans des lignées de cellules β -pancréatiques, dans la lignée PC12 de cellules chromaffines et également dans les neurones d'hippocampe sous la forme d'une protéine soluble de 40 kDa et d'une protéine membranaire de 50 kDa. Nous avons montré par immunofluorescence que la forme membranaire de Syt8 colocalise partiellement avec le marqueur du Golgi Vt1a. La forme soluble de Syt8 endogène, mais également surexprimée en fusion à la GFP (*green-fluorescent protein*), ne transloque pas vers les membranes cellulaires en présence de calcium, comme montré dans des cellules perméabilisées.

L'ensemble de ces données suggère que Syt8 n'est pas un senseur calcique de la fusion membranaire dans les cellules endocrines.

Indépendamment à ce travail, j'ai également collaboré à l'étude du senseur calcique potentiel Syt9. L'objectif de ce travail était initialement de caractériser la fonction de cette isoforme dans l'exocytose des granules d'insuline. Pour cela, nous avons étudié l'effet de la surexpression de Syt9 sur la sécrétion d'insuline déclenchée par dépolarisation ou par une stimulation par le glucose. Nous avons également réalisé une étude par siRNA, et mon travail s'est centré sur cet aspect. Nous avons dans un premier temps dessiné *in silico* des séquences spécifiques de Syt9. Nous avons ensuite validés certaines des séquences retenues en utilisant dans un premier temps des siRNA transcrits *in vitro*. L'utilisation directe des siRNA n'est pas aisée : coût de synthèse important, nombreuses précautions d'utilisation (sensibilité aux RNases). Nous avons également rencontré des problèmes dans la co-transfection des cellules par un vecteur plasmidique et par des siRNA. Pour cela, nous avons construit un vecteur d'expression plasmidique pour siRNA. L'utilisation d'un vecteur plasmidique permet de s'affranchir de nombreux problèmes encourus avec les siRNA et permet à coût moindre de travailler sur de grandes populations de cellules (nécessaires pour des études biochimiques par exemple). La construction d'un tel plasmide a nécessité de nombreuses étapes d'optimisation. Les analyses fonctionnelles de la conséquence de l'extinction de Syt9 sur la sécrétion d'insuline sont encore en cours au laboratoire.

Conclusions – Perspectives

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la protéine vésiculaire *Cysteine string protein* (Csp) et à son implication dans la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques. Nos résultats apportent des réponses quant aux propriétés intrinsèques de la Csp et à ses partenaires protéiques, et ouvrent de nouvelles voies d'étude.

Ancrage membranaire et localisations des Csp

La Csp est une protéine co-chaperonne de type DnaJ impliquée dans l'exocytose des vésicules synaptiques des neurones, ainsi que dans la sécrétion des LDCV des neurones, des cellules chromaffines et des cellules β -pancréatiques. Elle est fortement palmitoylée au niveau de résidus cystéines compris dans son domaine central. La Csp étant une protéine associée aux vésicules, mais sans domaine transmembranaire, il a été proposé que ces palmitoylations seraient responsables de l'ancrage de la protéine dans la membrane vésiculaire. Néanmoins, la coupure des palmitoylations par traitement chimique ne permet pas de décrocher la protéine de la membrane (Gundersen et al., 1994; van de Goor and Kelly, 1996; Chamberlain and Burgoyne, 1998a).

Ancrage membranaire des Csp

L'émergence de nouvelles isoformes de Csp par le séquençage des génomes humains et murins offre une opportunité d'approfondir nos connaissances sur les propriétés biophysiques des Csp. Nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'isoforme Csp β (partie II des Résultats). Nous avons montré par RT-PCR que la Csp β n'est pas exprimée dans la lignée MIN6 de cellules β -pancréatiques. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui n'a retrouvé l'ARNm de la Csp β que dans les testicules de souris (Fernandez-Chacon et al., 2004). La Csp β surexprimée dans la lignée HIT-T15 de cellules β est produite sous forme majoritairement non-palmitoylée, contrairement à la Csp α . Néanmoins, nous avons montré que la Csp β , comme la Csp α , est associée de manière stable aux membranes cellulaires. L'accrochage des Csp α et β est majoritairement insensible au carbonate de sodium, ce qui indique que ce sont des protéines intrinsèques de la membrane. La nature fortement hydrophobe du domaine situé en N-terminal du domaine

riche en cystéines (résidus 108-134 de la Csp α : ALFIFCGLLTCCYCCCCLCCCFNCCG) peut expliquer un tel comportement. Néanmoins, il semble que la Csp β soit partiellement sensible au carbonate de sodium. Nous pouvons envisager que la Csp β est accrochée aux membranes selon deux modalités : l'une, sensible au carbonate de sodium, correspondrait à des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides (donc une protéine extrinsèque) ; l'autre, insensible au carbonate de sodium, correspondrait à l'insertion stable de la Csp β dans la bicouche lipidique. L'analyse *in silico* des Csp α et β , rapportée dans cette étude, confirme que le domaine compris entre les acides-aminés 108 à 134 (pour la Csp α) possède la propension de s'insérer dans le feuillet externe de la bicouche lipidique, sans pour autant traverser la membrane. Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature au sujet de la Csp α de drosophile (dCsp α) (van de Goor and Kelly, 1996; Mastrogiacomo et al., 1998b). Le déplacement de la dCsp α des membranes par le carbonate de sodium n'est que partiel, tout comme pour la Csp β . Nous avons également montré que les Csp α et β non modifiées sont capables d'interagir de manière significative avec les membranes cellulaires. Les propriétés biophysiques intrinsèques des Csp peuvent donc expliquer leur ancrage dans les membranes. Néanmoins, cette association est sensible au carbonate de sodium, et diffère en cela des protéines surexprimées dans la cellule. Ainsi, la machinerie cellulaire d'adressage est nécessaire pour garantir une insertion stable des Csp dans les membranes cellulaires.

Palmitoylations et localisations cellulaires des Csp

Nous avons montré que la Csp β surexprimée dans la lignée HIT-T15 de cellules β -pancréatiques est adressée dans le réseau trans-golgien (TGN), contrairement à la Csp α localisée sur les LDCV (partie II des Résultats). Il est tentant de corrélérer le manque de modifications post-traductionnelles de Csp β avec sa localisation spécifique. Deux hypothèses peuvent être énoncées. Tout d'abord, bien que Csp α et Csp β possèdent une grande homologie de séquence dans le domaine riche en cystéines, une différence fine pourrait empêcher Csp β d'être palmitoylée. La différence d'adressage ne serait que la conséquence de ce manque de palmitoylations. Ainsi, nous pouvons remarquer que deux résidus cystéine présents dans Csp α sont remplacés par des résidus isoleucine et glycine au niveau de la position 120 (voir partie II des Résultats, fig. 1). De plus, on peut noter une

permutation symétrique dans le cluster central de cystéines autour de la leucine 139 entre Csp α (YCCCCLCCCFN) et Csp β (YFCCCLCCCCN). Une de ces différences pourrait être cruciale pour l'initiation des modifications post-traductionnelles. La seconde hypothèse que l'on peut énoncer est que la palmitoylation des Csp a lieu une fois la destination finale de la protéine atteinte (les vésicules d'insuline pour la Csp α). Fukasawa et coll. ont par exemple démontré dans la levure que la palmitoylation de la SNARE Ykt6, isoforme spécifique du transport golgien, a lieu une fois la protéine adressée à la membrane cible (Fukasawa et al., 2004). Dans le cas de Csp β , soit un signal spécifique présent dans les domaines N ou C-terminaux, moins conservés, pourraient empêcher la protéine de quitter le Golgi, soit cette isoforme n'est pas capable d'interagir avec un partenaire qui serait nécessaire à son adressage aux LDCV. Dans ce cas de figure, la Csp β ne serait tout simplement pas capable de rencontrer la machinerie de palmitoylation *in situ*. Un tel modèle a été proposé pour expliquer l'adressage des protéines G hétérotrimériques (Fishburn et al., 2000).

Il est intéressant de noter que la permutation symétrique dans le domaine riche en cystéines entre la Csp α et la Csp β se retrouve également dans la dCsp α . Cette similitude de séquence peut être mise en parallèle avec la sensibilité de ces Csp au carbonate de sodium (voir plus haut). De plus, la dCsp α est produite sous forme d'une protéine non palmitoylée quand elle est surexprimée dans les PC12 (van de Goor and Kelly, 1996). Ainsi, cette inversion symétrique de séquence apparaît comme un élément potentiellement primordial dans l'initiation des acylations des Csp. Néanmoins, la dCsp α est produite sous forme d'une protéine soluble dans les PC12, ce qui n'est pas le cas de la Csp β . Nous pouvons penser que la dCsp α , exprimée dans un système hétérologue, ne serait pas capable de recruter la machinerie d'adressage des mammifères, contrairement à la Csp β .

Il serait intéressant pour poursuivre cette étude de réaliser des mutations de la Csp α et d'étudier l'effet de ces mutations sur la palmitoylation de la protéine, sur son adressage dans la cellule et sur son interaction avec les membranes cellulaires. Ainsi, nous pouvons envisager d'introduire dans la Csp α les changements de séquences mis ici en lumière. Une approche plus globale d'inversion de domaines entre Csp α et Csp β pourrait aussi permettre de vérifier le rôle des domaines variables N et C-terminaux dans les propriétés biophysiques des Csp. La comparaison des différences de séquence entre la Csp β et la

dCsp α permettrait de désigner d'éventuels domaines responsables soit de l'attachement des Csp aux membranes, soit du recrutement de la machinerie d'adressage de mammifères.

Interactions protéiques

Dans les neurones, il est établi par plusieurs équipes que la Csp α joue un rôle dans le couplage entre l'influx calcique et l'exocytose (Umbach and Gundersen, 1997; Leveque et al., 1998; Magga et al., 2000; Miller et al., 2003a). Néanmoins, dans les cellules β , le rôle de la Csp α dans le contrôle de la sécrétion d'insuline n'est encore que partiellement compris. Pour mieux comprendre sa fonction dans l'exocytose des LDCV, nous avons cherché à caractériser ses partenaires protéiques dans les cellules β -pancréatiques.

Recrutement de la protéine SNARE VAMP2

Tout d'abord, nous avons montré que la Csp α interagit avec la v-SNARE VAMP2 (partie I des Résultats). Cette interaction a été révélée par co-immunoprécipitation et est dépendante du calcium, ce qui suggère qu'elle est impliquée dans le contrôle de l'exocytose déclenchée par le calcium. De plus, nous avons montré que le domaine C-terminal de la Csp α est nécessaire à cette interaction. Par analogie à la co-chaperonne DnaJ, nous pensons que le domaine C-terminal de la Csp α porte la spécificité de substrat. Nos résultats suggèrent que l'interaction entre VAMP2 et Csp α permettrait de recruter *in situ* la chaperonne Hsc70. Elle pourrait ainsi aider aux changements de conformation nécessaires au bon déroulement de l'exocytose (Zinsmaier and Bronk, 2001). Afin de confirmer cette hypothèse, nous pouvons envisager d'étudier l'effet chaperon du complexe Hsc70/Csp α sur la protéine VAMP2. La mesure de l'effet protecteur des chaperonnes sur l'agrégation des protéines induite par la chaleur est un modèle qui pourrait être utilisé (Chamberlain and Burgoyne, 1997a).

Nous avons de plus mis en évidence que la Csp α est capable de s'homodimériser. Cette dimérisation est limitée par le domaine C-terminal et dépendante du calcium. Par analogie à d'autres protéines de type DnaJ, nous proposons que la dimérisation de la Csp α régule son activité co-chaperonne (Sha et al., 2000; Toutain et al., 2003). Il pourrait exister un équilibre dynamique entre la liaison de VAMP2 sur la Csp et sa dimérisation. Néanmoins, nous ne pouvons pas actuellement savoir avec précision à quelle étape ces deux phénomènes ont lieu. Sont-ils concomitants suite à l'influx calcique intracellulaire ou

successifs ? Nous pouvons envisager d'utiliser du calcium encagé, libérable par photo-activation aux rayons UV (Schneppenburger and Neher, 2000). Cette approche de *calcium uncaging* pourrait être couplée à l'utilisation d'agents de réticulation activables aux UV (Zhang et al., 2004). Cela permettrait de réaliser la réticulation covalente des complexes protéiques dans un laps de temps très court après l'influx calcique déclenché. Nous pourrions ainsi observer si la formation de l'homodimère de Csp α a lieu rapidement après cet influx calcique ou de manière différée.

Recrutement du complexe chaperon Hsc70 / SGT

Nous avons montré par *pull-down* à la GST que le complexe chaperon Csp α /Hsc70/SGT est retrouvé dans les cellules β -pancréatiques (partie II des Résultats). Ce complexe est impliqué dans la neuroexocytose (Tobaben et al., 2001; Tobaben et al., 2003), et nos résultats suggèrent qu'il peut jouer un rôle régulateur également sur la sécrétion d'insuline. La Csp β est capable de recruter ce complexe chaperon dans la même échelle que Csp α . La séquence protéique de la Csp β est très proche de l'isoforme Csp α (66% d'identité), et il n'est donc pas étonnant de retrouver des similitudes dans les interactions biochimiques. Le domaine C-terminal est le plus variable entre les deux Csp, et nos résultats confirment donc que ce domaine n'est pas impliqué dans le recrutement du complexe Hsc70/SGT.

Recrutement de SNAP25 / Syt9

Nous avons également mis en évidence que la Csp α interagit dans les cellules β -pancréatiques avec la t-SNARE SNAP25 (partie III des Résultats). Cette interaction est portée par la partie N-terminale de Csp α , et nous avons établi que cette liaison est indirecte. Nous rapportons dans cette étude que Csp α interagit avec Synaptotagmine 9 (Syt9), de manière directe et indépendante du calcium et par sa partie N-terminale. De plus nous avons observé que Syt9 interagit directement avec SNAP25. Les interactions Syt9/Csp α et Syt9/SNAP25 ne sont pas exclusives l'une de l'autre. Cela est une condition pré-requise pour que Syt9 soit l'intermédiaire entre les deux protéines. Bien que cette étude soit à l'heure actuelle encore en cours de finalisation, nous proposons que Syt9 est

l'intermédiaire nécessaire à l'établissement de la liaison entre SNAP25 et Csp α . Ces interactions protéiques permettraient de relier la machinerie d'exocytose en *cis* (c'est-à-dire localisée sur la vésicule d'insuline) à la machinerie en *trans* (soit sur la membrane plasmique).

Nous pouvons envisager de mesurer l'influence de la présence de Csp α sur la structure de Syt9. Le dichroïsme circulaire qui permet de distinguer les contributions relatives des hélices α et des feuillets β dans une structure protéique, ou encore des expériences de protéolyse partielle permettraient de résoudre ce point, en utilisant les protéines recombinantes purifiées (Sivaram et al., 2005). Les synaptotagmines ayant la capacité de lier les phospholipides anioniques de façon calcium-dépendante (Shin et al., 2004), nous pouvons envisager d'étudier *in vitro* l'influence de Csp α sur la liaison de Syt9 aux phospholipides en utilisant des liposomes synthétiques.

Il est envisageable d'étudier ces interactions protéiques dans le contexte de la cellule vivante. La technique du FRET (*fluorescence resonance energy transfert*) consiste en l'expression de protéines en fusion avec des protéines fluorescentes dont les spectres d'émission et d'excitation respectifs se recouvrent partiellement (Miller, 2005). L'excitation de l'une des protéines peut entraîner par transfert d'énergie l'excitation de la seconde, si les deux protéines sont proches dans l'espace. Cette technique permet ainsi de mesurer de manière dynamique l'interaction *in vivo* entre deux protéines. Il serait intéressant d'étudier les interactions entre Csp α , Syt9 et SNAP25 au cours de l'exocytose stimulée.

Fonctions cellulaires de la Csp - Perspectives

Knock-out / Knock-in, siRNA

La majorité des études de la Csp α sur la sécrétion d'insuline a été réalisée par surexpression de formes entières, tronquées ou mutées de la Csp α (Brown et al., 1998; Zhang et al., 1998a; Zhang et al., 1999). La surexpression en elle-même ayant pour conséquence d'inhiber la sécrétion d'insuline, l'analyse des différents mutants de la Csp α peut s'avérer délicate. Il pourrait être envisagé d'établir à partir des souris KO pour le gène csp α des lignées de cellules β -pancréatiques stables. Cela permettrait d'étudier la fonction de certaines formes mutées de la Csp α dans un système ne possédant pas de Csp α .

endogène (approche de *knock-out* / *knock-in*). Une approche de siRNA pourrait également être développée dans le même but. Des lignées cellulaires stables peuvent être établies par l'utilisation de plasmides permettant l'expression de siRNA dirigé contre Csp α (Moore et al., 2006). Nous pourrions par la suite envisager d'exprimer dans ces lignées des formes mutantes de Csp α résistantes au siRNA, ce qui permettrait encore une fois d'étudier leurs fonctions dans un contexte où la Csp α endogène serait éteinte.

La technique d'imagerie TIRF (ou microscopie par ondes évanescentes) permet de visualiser des événements situés jusqu'à 100nm de distance sous la membrane plasmique (Steyer and Almers, 2001). Une telle technique permet par exemple de suivre de manière dynamique la libération par exocytose d'un cargo fluorescent (Zenisek et al., 2002). D'une part, nous pouvons ainsi envisager d'étudier la mobilité des LDCV à proximité de la membrane plasmique pour voir l'effet régulateur éventuel de la Csp α ou de formes mutantes sur ces étapes précoces. D'autre part nous pourrions observer le recrutement des LDCV et leur exocytose évoquée par dépolarisation, soit l'effet de la Csp α sur les étapes tardives.

Les régulateurs physiologiques

La sécrétion de l'insuline ainsi que les fonctions générales de la cellule β -pancréatique sont régulées par le glucose. L'exposition des cellules à des taux élevés de sucre induit de nombreux effets au niveau de la signalisation cellulaire. Le métabolisme du glucose entraîne une augmentation du ratio ATP/ADP, et également l'activation de kinases telle que la PKA et la PKB. La PKB est de plus régulée par l'IGF-1, un facteur de croissance important dans l'homéostasie de la cellule β (Dickson et al., 2001). Ceci ouvre plusieurs champs d'investigation pour placer la fonction de Csp α dans le contexte de la physiologie cellulaire.

L'augmentation du ratio ATP/ADP pourrait activer l'ATPase Hsc70, et par voie de conséquence le complexe chaperon Hsc70/SGT/Csp α . Ce complexe serait alors recruté sur les LDCV pour préparer la sécrétion d'insuline en aidant aux changements de conformations nécessaires.

Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la phosphorylation de la Csp α par la PKB, en réponse à des stimulations aiguës par l'IGF-1. La PKB est en effet capable

de phosphoryler la Csp α dans les cellules chromaffines (Evans et al., 2006). Qu'en est-il dans les cellules β ? Quelle peut-être l'implication de cette voie régulatrice dans la sécrétion d'insuline ? La phosphorylation de la Csp α , en altérant certaines interactions protéiques décrites par nous (voir partie III des Résultats) et par d'autres (Evans et al., 2001; Evans et al., 2006), régule la cinétique fine des événements de fusion, en augmentant le temps d'ouverture du pore de fusion (Graham and Burgoyne, 2000; Evans et al., 2001). L'insuline se trouve dans les LDCV sous forme cristalline et doit être dissoute dans le milieu extracellulaire. Certaines observations publiées suggèrent que les LDCV sont sujettes à l'évènement de *kiss-and-run*, qui laisserait peu de temps afin de dissoudre et libérer le peptide cristallin (Barg et al., 2002). Un rallongement du temps d'ouverture du pore de fusion pourrait permettre une meilleure libération du cargo, en favorisant sa dissolution dans le milieu extracellulaire.

Les canaux calciques

Dans les neurones, la Csp α régule les canaux calciques. Cependant, il n'est pas clairement établi si elle régule les paramètres cinétiques des canaux ou éventuellement leur insertion dans la membrane plasmique. Une seule étude, basée sur l'injection de Csp α de drosophile recombinante dans des neurones de poulet, a montré que les paramètres cinétiques des canaux calciques ne sont pas altérés (Chen et al., 2002). Bien que dans les cellules β il semble que l'action majoritaire de la Csp α sur la sécrétion d'insuline ne passe pas par la régulation des canaux calciques, aucune étude poussée n'a été réalisée dans ce sens (Brown et al., 1998; Zhang et al., 1998a). Une étude électrophysiologique approfondie devrait permettre de répondre à la question. De plus, l'utilisation des toxines marquées (ω -Agatoxine pour le canal P/Q ; ω -Conotoxine pour le canal N ; DHP pour le canal L) permet de quantifier les canaux exposés à la membrane plasmique (Olivera et al., 1994; Seagar et al., 1999). Il peut être ainsi envisagé de comparer la quantité de canaux calciques exposés à la surface de cellules β isolées à partir de souris sauvages avec celles de souris KO pour Csp α , de manière à confirmer ou infirmer si la Csp α est impliquée dans le contrôle de l'insertion des canaux calciques dans la membrane plasmique.

Pris dans leur globalité, nos résultats suggèrent que la Csp α aurait un rôle majoritaire de co-chaperonne dans les cellules β -pancréatiques. Nous proposons qu'elle ait deux modes d'action distincts (fig. c-1). Tout d'abord, elle aurait une action indépendante

du calcium, via les interactions avec Syt9 et SNAP25, qui permettrait de relier les machineries en *cis* et en *trans*, et qui pourrait permettre de coordonner les différents partenaires en attente de l'influx calcique déclencheur de la fusion membranaire. Nous proposons également un second mode d'action, calcium-dépendant, vraisemblablement de manière concomitante à l'influx calcique (étape de *triggering* de l'exocytose). Elle permettrait ainsi par son interaction avec VAMP2, et éventuellement via sa dimérisation, de recruter Hsc70/SGT sur les LDCV pour réguler la formation du complexe SNARE ou préparer l'entrée de VAMP2 dans le complexe SNARE binaire Syntaxine/SNAP25.

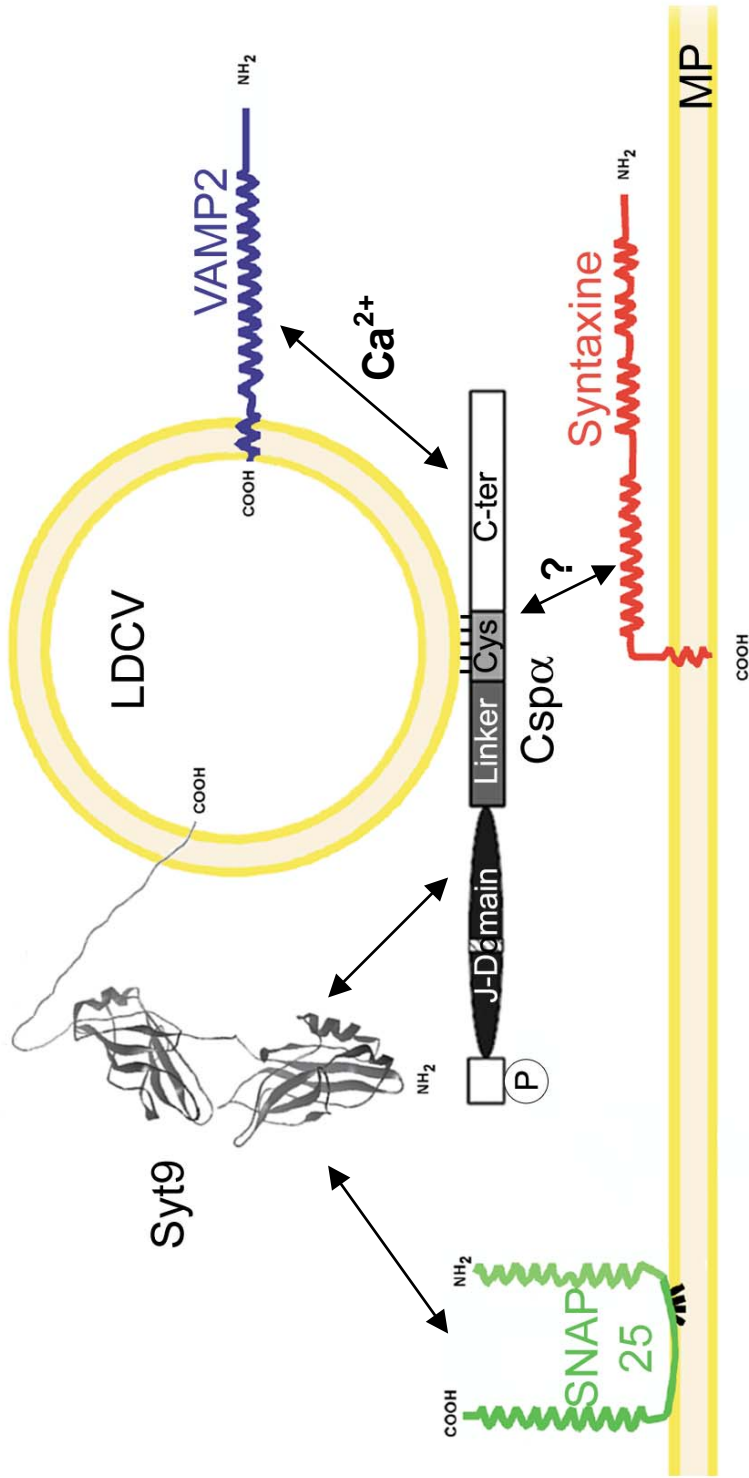


Figure c-1 : Deux modes de fonctionnement de la Csp α dans les cellules β -pancréatiques.

La Csp α portée par les LDCV permettrait de mettre en relation les machineries en *cis* (VAMP2, Synaptotagmine 9) et en *trans* (SNAP25) de l'exocytose. L'interaction avec VAMP2 est portée par le domaine C-terminal de Csp α et dépendante du calcium. La dimérisation de Csp α pourrait également jouer un rôle. L'interaction avec SNAP25 peut être médiée par Synaptotagmine 9 (Syt9), de manière indépendante du calcium mais éventuellement via la phosphorylation de Csp α . Une interaction entre Csp α et Syntaxine n'a pas été retrouvée dans les cellules β -pancréatiques.

Matériel et Méthodes

I - Matériel biologique

I.1 - Souches de bactéries

Trois souches de bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) ont été utilisées au cours de ce travail :

- la souche XL1-Blue (Stratagene) pour le clonage et la propagation d'ADN plasmidique dont le génotype est : *recA1 endA1 gyr96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tetr)*]
- la souche BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) pour la production de protéines recombinantes et dont le génotype est : B, F' *dcm ompT hsdSB(r_B-m_B-) gal λ(DE3)* [pLysS Cam^r]. Cette souche présente une délétion du gène *lon* codant pour une protéase majoritaire, et une délétion du gène *ompT* codant pour une protéase membranaire. De plus, cette bactérie comporte, intégré à son génome, le gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7. Elle porte aussi le plasmide pLysS, capable de coder pour une enzyme (le lysozyme T7) inhibitrice de l'ARN polymérase. Ce système permet de contrôler l'expression de la protéine à induire
- la souche M15 [pREP4 Kan^r] (QIAGEN) dont le génotype est Nal^S Str^S Rif^S Thi⁻ Lac⁻ Ara⁺ Gal⁺ Mtl⁻ F⁻ RecA⁺ Uvr⁺ Lon⁺. Cette souche porte le plasmide pREP4 qui permet, comme dans le cas du plasmide pLysS de la souche BL21 (DE3), de bloquer efficacement l'expression des protéines tant que cette dernière n'est pas induite.

I.2 - Lignées cellulaires

Deux lignées de cellules adhérentes de mammifère ont été employées au cours de ce travail. Il s'agit de cellules immortalisées par transformation par l'antigène T du virus SV40 et sont capables de synthétiser, stocker puis sécréter l'insuline suite à un stimulus :

- la lignée HIT-T15 (ATCC n° CRL-1777), qui est dérivée d'une culture primaire de cellules β issues d'îlot de Langherans de hamster syrien
- le clone m9 de la lignée MIN6, qui est dérivée d'une culture primaire de cellules β isolées à partir d'îlots de Langherans de souris. Ces cellules nous ont été généreusement données par le Dr S. Seino (Chiba, Japon) (Minami et al., 2000)

- la lignée INS-1E, qui est dérivée d'une culture primaire de cellules β isolées à partir d'îlots de Langerhans de rat. Ces cellules nous ont été généreusement données par le Dr C. Wollheim (Merglen et al., 2004).

I.3 - Vecteurs de clonage

Les cartes de restriction des vecteurs plasmidiques vides utilisés pour effectuer les sous-clonages sont présentées sur la figure m-1. A partir de ces vecteurs, différentes constructions ont été réalisées et sont présentées dans les tableaux m-1 (vecteurs d'expression procaryote) et m-2 (vecteurs d'expression eucaryote). Enfin, d'autres constructions plasmidiques utilisées, listées dans le tableau m-3 nous ont été généreusement fournies par les auteurs les ayant publiées.

II - Milieux et conditions de culture

II.1 - Milieu pour bactéries

Le milieu de culture LB (Luria Bertani) pour bactéries est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

Les antibiotiques sont stérilisés par filtration sur membrane de nylon 0,22 μ m (Millipore) et sont ajoutés si besoin au milieu après autoclavage, à une concentration finale fonction de l'antibiotique : ampicilline à 100 μ g/ml, kanamycine à 30 μ g/ml, chloramphénicol 100 μ g/ml.

Composition du milieu LB: Tryptone 10 g/L, Extrait de levure 5 g/L, Chlorure de sodium 5 g/L

Pour les milieux solides : Bacto-agar 20 g/L

II.2 - Conditions de culture et de conservation des bactéries

La souche BL21 (DE3) pLysS est cultivée à 30°C tandis que les souches XL1-Blue et M15 [pREP4] sont cultivées à 37°C. Les cultures en milieu liquide sont faites sous agitation (220rpm) avec un rapport permettant une bonne oxygénation des cultures (rapport volume culture / volume total de 1/4).

Les bactéries transformées ou non sont conservées à -80°C et à -20°C. Pour cela, une culture bactérienne en phase exponentielle est effectuée puis stockée en glycérol 20 %.

II.3 - Milieux pour cellules de mammifères

La composition des milieux utilisés pour cultiver les cellules de mammifères est variable selon la lignée :

- HIT-T15 : RPMI 1640 supplémenté de sérum de veau fœtal (Invitrogen) 10 % (v/v), d'acide sélénieux (Sigma) 0,1 μ M, de L-glutamine (Invitrogen) 2 mM, de glutathion réduit (Sigma) 32,5 μ M, de pénicilline (Invitrogen) 50 unités/ml, de streptomycine (Invitrogen) 50 μ g/ml
- MIN6 : DMEM supplémenté de sérum de veau fœtal 10 % (v/v), de bicarbonate de sodium (Invitrogen) 45 mM, de pénicilline 50 unités/ml, de streptomycine 50 μ g/ml, de β -mercaptoéthanol (Sigma) 50 μ M
- INS-1E : RPMI 1640 supplémenté de sérum de veau fœtal 5% (v/v), de β -mercaptoéthanol 50 μ M, de pyruvate 1 mM, de L-glutamine 2 mM, de Hepes pH 7,3 10 mM, de pénicilline 50 unités/ml, de streptomycine 50 μ g/ml

II.4 - Conditions de culture et de conservation des cellules de mammifères

Les cellules sont cultivées en flasque de 75 cm² (Nunc) à 37°C, sous 5 % de dioxyde de carbone et 95 % d'air en atmosphère humide. Une fois par semaine, les cellules, à confluence doivent être diluées et repiquées. Pour cela, elles sont dans un premier temps lavées avec du PBS sans calcium/magnésium (Invitrogen). Les cellules MIN6 et les HIT-T15 sont décollées respectivement à l'aide de Trypsine/EDTA (Trypsine 0,5g/l, EDTA 0,5mM, Invitrogen) et de PBS-EDTA 10mM, par incubation à 37°C pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite comptées, puisensemencées dans des flasques à la concentration de 3.10⁶ cellules/75cm² pour les HIT-T15 ou 2,5 10⁶ cellules/75cm² pour les MIN6. Le milieu de culture est changé deux fois par semaines.

Afin d'être utilisées, les cellules sontensemencées dans des plaques de culture à des concentrations par puits variables :

50 000 cellules dans 750 μ l de milieu pour une plaque de 24 puits (diamètre 16 mm, Nunc)

25 000 cellules dans 200 μ l de milieu pour une plaque de 96 puits (diamètre 6,5 mm, Nunc)

50 000 ou 200 0000 cellules dans 3ml de milieu pour une boîte de Pétri (diamètre 35 mm, Nunc)

La conservation des cellules se fait après le décollement du fond de la flasque. Elles sont conservées dans un mélange de sérum de veau fœtal (90 % v/v) et de diméthylsulfoxyde (DMSO) (10 % v/v). La congélation des cellules se fait lentement en les plaçant dans un bain d'isopropanol à -80°C pendant 24 heures, puis elles sont conservées dans de l'azote liquide.

La décongélation s'effectue rapidement en plongeant le tube stocké dans l'azote liquide dans un bain-marie à 37°C jusqu'à décongélation complète. La suspension de cellules est alors centrifugée afin d'éliminer le DMSO, puis mise en culture dans le milieu et dans les conditions de culture décrites précédemment.

III - Biologie moléculaire

III.1 - Sous-clonage

III.1.1 - Digestion de l'ADN

Les réactions de digestion sont réalisées des endonucléases provenant de Roche Diagnostics ou NEB. Le protocole couramment utilisé est le suivant :

- ADN 0,1 à 1 µg
- tampon de restriction (10x) 2 µl
- endonucléase 0,2 à 1 unité
- complété à 20 µl par de l'eau osmosée stérile

Le mélange est ensuite incubé à la température optimale pour l'activité de l'enzyme pendant une à deux heures.

III.1.2 - Ligature de l'ADN

Pour les ligatures, 50 à 100 ng de plasmide receveur et d'insert sont incubés avec un rapport plasmide/insert de 1/2 à 1/3. Une unité d'enzyme T4 DNA Ligase (NEB) est employée afin d'effectuer la réaction. Le tampon de ligature fourni avec la ligase est dilué comme proposé par le fournisseur. Le mélange est incubé sur la nuit à 16°C.

III.2 - Séparation et purification des acides nucléiques par électrophorèse

III.2.1 - Migration des acides nucléiques

Les gels d'agarose sont composés de 0,8 à 2 % d'agarose dilué dans du tampon TBE et contenant du bromure d'éthidium à la concentration de 0,2 µg/ml. La quantité d'agarose utilisée est fonction de la taille de l'ADN à séparer. Les solutions d'acide nucléique à faire migrer sont mélangées avec du Tampon de Charge ADN puis déposées dans le gel. La migration de l'ADN dans le gel est faite en appliquant un champ électrique de 30 à 60 V, dans du TBE. Les ADN sont visualisés par exposition du gel aux ultraviolets (302 nm).

Les gels sont photographiés à l'aide d'une caméra CCD couplée à un programme d'analyse d'images FluorChem v2.00 (Alpha Innotech Corp.) décrit plus loin.

III.2.2 - Purification des acides nucléiques à partir de gel d'agarose

Pour purifier les ADN à partir d'un gel d'agarose, le kit « *Wizard[®] Plus SV Gel Clean-up System* » (Promega) est employé selon les recommandations du fabricant. L'ADN est repris dans 70 µl d'eau stérile. La quantification de l'ADN ainsi purifié est estimée après migration d'une partie de la solution sur gel d'agarose. L'estimation se fait par comparaison de l'intensité des bandes avec celles d'un ADN utilisé comme référence de taille et de quantité : le marqueur de taille « phage λ *Hind*_{III} » (Invitrogen).

III.3 - Extraction d'acides nucléiques

III.3.1 - ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique des bactéries XL1-Blue est effectuée en utilisant le kit commercial « *Wizard[®] Plus SV Miniprep* » (Promega). Le protocole suivi est celui préconisé par le fournisseur. Les plasmides sont remis en suspension dans de l'eau stérile déminéralisée ou dans le tampon fourni en fonction de leur utilisation.

Pour des préparations d'ADN plus importantes (supérieures à 250 µg), le kit « *Qiagen Plasmid Midi Kit* » (Qiagen) est utilisé selon les recommandations du fournisseur.

III.3.2 - ARN totaux de cerveaux ou de cellules de mammifères

La préparation des ARN totaux est effectuée à partir du cerveau d'une souris CD-1. L'animal est sacrifié et son cerveau est isolé, découpé, lavé deux fois dans du PBS et homogénéisé dans un volume de Trizol (Invitrogen) défini en fonction de la masse du cerveau (1 ml/50 à 100 mg de tissu). L'extraction des ARN totaux se fait en présence de chloroforme (0,2 ml/ml de Trizol) puis la suspension est centrifugée à 12 000g pendant 15 minutes à 4°C. Les ARN se trouvent dans la phase aqueuse supérieure qui est récupérée. Les ARN totaux en solution sont précipités par ajout d'isopropanol (0,5 ml/ml de Trizol) et centrifugation à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est rincé avec de l'éthanol à 75 % (1 ml/ml de Trizol), centrifugé de nouveau et repris dans un petit volume d'eau DEPC (30 µl) et conservé à -80°C. La concentration de la solution est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm. L'intégrité des ARN est contrôlée par migration sur gel d'agarose 0,8 % dans un tampon TAE.

Les cellules MIN6 sont traitées de la même façon, le Trizol étant directement ajouté sur les cellules (1 ml/10 cm² de culture).

III.4 - Amplification d'un fragment d'acides nucléiques

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier *in vitro* une séquence d'ADN plasmidique et d'en obtenir de grande quantité. L'amplification de la matrice d'ADN se fait à l'aide d'oligonucléotides spécifiques utilisés comme amorces et d'une ADN polymérase ADN-dépendante. Les oligonucléotides sont conservés à -20°C à une concentration de 0,5 mM dans du TE 10:1. La réaction de PCR est effectuée dans un thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems).

Le protocole utilisé est le suivant :

- ADN plasmidique 10 à 50 ng
- amorces 300 nM de chaque
- dNTPs 200 µM de chaque dNTP
- ADN polymérase 0,75 unité
- tampon commercial (10x) 10 % (v/v)
- complété par de l'eau à 20 ou 50 µl.

L'ADN polymérase employée est la Pfu Turbo (Stratagene). La température de dénaturation utilisée est de 92°C, la température d'élongation est 72°C. La température d'hybridation est calculée par rapport à la température de fusion de l'oligonucléotide

employé. Elle est inférieure de 2 °C à cette température. Le nombre de cycles de PCR est variable de 20 à 30 et la PCR se termine par une élongation finale de 7 minutes.

Une fraction de la réaction de PCR est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose comme décrit précédemment. Après vérification, les produits de PCR restants sont purifiés à l'aide du kit « *Wizard® Plus SV PCR Clean-up System* » (Promega).

Les différents oligonucléotides d'utilisation spécifique à cette étude sont donnés dans le tableau m-4.

III.5 - Mutagenèse dirigée

Les mutagenèses dirigées sont réalisées selon un protocole basé sur le kit *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Pour ce faire, deux oligonucléotides complémentaires sont dessinés encadrant la mutation à réaliser. Au moins 10 nucléotides sont conservées de part et d'autre de la mutation.

III.6 - Transcription inverse des ARN messagers

La transcription inverse est effectuée en deux étapes :

- ARN totaux (1 µg) et oligo(dT)₁₅ (0,5 µg) sont mélangés dans un volume final de 5 µl (complété avec de l'eau distillée) et incubés à 70°C pendant 5 minutes
- la réaction de transcription inverse se fait dans un volume final de 20 µl en présence du tampon commercial, de MgCl₂ 3 mM, de dNTP 0,5 mM, d'enzyme ImPromII™ Reverse Transcriptase 1 µl (Promega) selon le cycle suivant :

25°C pendant 5 minutes (pour permettre l'hybridation)

40°C pendant 60 minutes (pour permettre l'élongation)

70°C pendant 15 minutes (afin d'inactiver l'enzyme)

Ce protocole permet d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN messagers. La qualité de la transcription inverse est vérifiée en effectuant une PCR avec des oligonucléotides permettant l'amplification de l'ADNc contrôle, celui codant pour l'actine, considéré comme un gène de ménage.

Les ADNc issus de testicules de souris nous ont été généreusement données par le Dr. P. Dubus (Laboratoire d'Histologie et Pathologie Moléculaire, Université Bordeaux 2 et CHU Bordeaux)

III.7 - Précipitation de l'ADN

La précipitation des ADN est faite afin de concentrer l'ADN et est réalisée avec de l'isopropanol. Pour cela, de l'acétate de sodium 3 M pH 5,2 (10 % du volume de la solution d'ADN) est ajouté à l'ADN, supplémenté d'isopropanol (70 % du volume d'ADN). Le mélange est ensuite incubé 15 minutes à température ambiante, puis centrifugé à 14 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le précipité est lavé avec de l'éthanol 70 %. Pour cela, 150 µl d'éthanol à 70 % sont ajoutés sur le culot d'ADN, puis la solution est centrifugée comme précédemment. Le culot d'ADN est séché à l'air libre puis remis en suspension dans un volume d'eau déminéralisée stérile variable selon l'utilisation ultérieure.

III.8 - Séquençage d'ADN

Le séquençage de l'ADN plasmidique est réalisé afin de vérifier l'absence de mutation suite à une PCR ou à un sous-clonage. Il a été confié au Pôle Génotypage et Séquençage de la Plateforme Génomique Fonctionnelle de l'Université de Bordeaux 2. Dans ce dernier cas, le kit « DNA Sequencing Kit, version 1.1 » (ABI Prism, Applied Biosystem) qui a pour principe la technique de Sanger, a été employé. L'amplification de l'ADN matrice à séquencer se fait par PCR. Des didésoxynucléotides (ddNTPs), couplés à des fluorophores sont ajoutés au milieu réactionnel et sont utilisés par l'ADN polymérase. Leur intégration empêche la formation de la liaison phosphodiester suivante, bloquant ainsi l'élongation de la chaîne nucléotidique en 3' et la marquant avec une base fluorescente. Les quatre bases étant couplées à des fluorophores dont la longueur d'onde d'émission est différente, la séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille par migration électrophorétique et le passage de ces molécules dans un faisceau laser permettent de connaître la nature de la base à chaque position et donc la séquence nucléotidique de l'ADN.

III.9 - Transformation des bactéries *E. coli* compétentes

III.9.1 - Préparation de bactéries chimio-compétentes

Avant d'être utilisables pour la transformation, les bactéries doivent être rendues chimio-compétentes. Pour cela, 1,25 ml d'une culture en phase stationnaire sont utilisés pour ensemençer 50 ml de milieu LB. La culture est incubée à 37°C sous agitation (220 rpm) jusqu'à une densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) d'environ 0,6.

Elles subissent ensuite un traitement au chlorure de calcium (CaCl₂). Pour cela, 20 ml de bactéries sont récoltées par centrifugation (5 minutes, 5 000g, 4°C), puis le culot est repris avec 10 ml de CaCl₂ à 100 mM froid, et incubées environ 30 minutes sur glace. Elles sont ensuite de nouveau centrifugées (5 minutes, 5 000g, 4°C), et reprises avec 2 ml de CaCl₂ froid 100 mM.

Après addition de 1,3 ml de glycérol 50 % stérile froid aux bactéries, le mélange est alors aliquoté et conservé à -80°C. La compétence de chaque lot de bactéries est testée avant utilisation (de l'ordre de 4 à 5.10⁶ colonies/μg d'ADN plasmique).

III.9.2 - Transformation de bactéries

Le protocole suivant est appliqué :

- 200μl de bactéries sont ajoutés à la préparation d'ADN à transformer
- Incubation de 40 minutes sur glace
- Choc thermique à 42°C pendant 2 minutes, puis sur glace environ 2 minutes
- Mélange des bactéries avec du milieu LB et mise en expression une heure à 37°C sous agitation (220rpm)
- Etalement sur milieu LB solide sélectif

III.10 - Techniques particulières à l'ARN interférence

Au cours de ce travail j'ai utilisé pour différentes études la technique de ARN interférence (ou siRNA – *small interfering RNA*). Cette approche a été utilisée pour l'étude du senseur calcique potentiel Synaptotagmine 8 mais également pour l'étude du senseur calcique Synaptotagmine 9 (voir partie IV des Résultats). Cette technique consiste en l'utilisation de petits ARN de 19 ou 21 nucléotides. Ces ARN sont par leur séquence spécifiques d'un ARNm cible. La transfection des siRNA dans les cellules eucaryotes résulte en la dégradation de l'ARNm cible. Brièvement, la formation d'un duplex entre le siRNA et l'ARNm cible induit sa reconnaissance puis sa dégradation par différents complexes enzymatiques dédiés (Elbashir et al., 2001). Nous avons utilisé soit directement des siRNA commerciaux validés et synthétisés chimiquement (Ambion), soit des siRNA produits par transcription *in vitro* (*SilencerTM siRNA Construction Kit*, Ambion), selon les recommandations de fournisseur. Les siRNA utilisés ont été dessinés au laboratoire par le Dr. Valérie Lagrée-Bringtown, à partir des différents outils en ligne (Ambion, Qiagen).

Les siRNA ont été transfectées dans les cellules HIT-T15, MIN6 ou INS-1E en utilisant la Lipofectamine2000. Les études biochimiques standard nécessitant de grandes quantités de cellules transfectées, nous avons construit un vecteur plasmidique permettant d'exprimer le siRNA après transfection des cellules. L'expression des siRNA peut être obtenue dans les cellules eucaryotes sous contrôle d'un promoteur H1 qui permet de recruter l'ARN polymérase III. Le plasmide pSUPER a été utilisé dans ce travail (OligoEngine) (fig. m-2). Des oligonucléotides ont été dessinés selon les recommandations de Brummelkamp et coll. (Brummelkamp et al., 2002) (fig. m-2, séquence spécifique de Synaptotagmine 9). Les oligonucléotides sont repris à la concentration finale de 100 μ M en eau distillée stérile. 0,1 unité de DO sont utilisés pour réaliser l'hybridation des oligonucléotides, dans un volume final de 50 μ l en tampon STE. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 4 minutes, puis refroidi par paliers progressifs (90°C, 4 min / 70°C, 10 min / 65°C, 4 min / 55°C, 4 min / 40°C, 4 min / 37°C, 20 min / 4°C). Le plasmide pSUPER est digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *BglIII*, purifié comme décrit plus haut et les extrémités 5' sont déphosphorylées par un traitement à la SAP (*shrimp alcalin phosphatase*, Roche). Les oligonucléotides hybridés sont phosphorylés sur leurs extrémités 5' par un traitement à la T4 kinase (NEB) selon les recommandations du fournisseur. La ligation est réalisée selon les protocoles standards avec un ratio plasmide:oligonucléotide de (1:5). La vérification des clones bactériens obtenus se fait par double digestion *EcoRI* et *HindIII* et comparaison de la taille du fragment obtenu (environ 200 pb) par migration sur gel d'agarose 2 %.

IV - Biochimie

IV.1 - Expression de protéines recombinantes

Deux souches différentes ont été utilisées au cours de ce travail pour l'expression des protéines recombinantes. La souche BL21 (DE3) pLysS pour permettre l'expression des protéines en fusion avec la GST (issues des plasmides pGEX2T ou pGEX6P) et la souche M15 [pREP4] pour l'expression des protéines en fusion avec l'étiquette 6xHis.

Après transformation par le plasmide portant le gène codant pour la protéine à exprimer, une culture liquide estensemencée à partir d'un clone, la veille de l'induction. Cette culture est utilisée pour ensemencer 500 ml de culture à une DO_{600nm} de 0,05 qui est placée dans un incubateur à la température souhaitée (30°C pour la souche BL21, 37°C pour la souche M15) et agitée (220 rpm) jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5 à 0.7 environ. A cette densité, la

production de protéine d'intérêt est induite par ajout d'IPTG (Isopropyl-1-thio- β -galactoside) stérile à une concentration de 0,4 mM pour la souche BL21 ou à 1 mM pour la souche M15. Un aliquot de culture est prélevé à ce stade pour servir de contrôle non-induit. L'IPTG utilisé est auparavant stérilisé par filtration sur membrane de nylon 0,22 μ m (Millipore) et conservé à -20°C. La culture est encore incubée sous agitation pendant 4 heures pour la souche BL21 ou 5 heures pour la souche M15. La densité optique de fin de culture est alors mesurée et les bactéries sont récupérées par centrifugation (8 000g, 10 minutes, 4°C), puis lavées avec du PBS pH 8 froid et centrifugées de nouveau. Le culot de bactéries est alors traité immédiatement ou conservé sec à -80°C.

IV.2 - Extraction et purification des protéines recombinantes

IV.2.1 - Extraction et purification des protéines en fusion avec l'étiquette GST

La purification des protéines recombinantes en fusion à la GST (*Gluthatione-S-transferase*) est réalisée par chromatographie d'affinité de la GST pour son substrat glutathion immobilisé sur des billes de sépharose (Gluthatione Sepharose 4B, GE Healthcare - Amersham Biosciences).

Suite à l'induction de l'expression protéique, le culot de bactéries obtenu est repris dans 10 ml de Tampon de Lyse GST. La lyse bactérienne est alors effectuée par deux passages à la french-press (Carver), à une pression de 41 bars. La suspension est alors centrifugée 1 heure à 20 000 g à 4°C pour éliminer les débris insolubles et le surnageant contenant les protéines solubilisées est récupéré. Cinq cent μ l d'une suspension de billes équilibrées à 50 % v/v dans le Tampon de Lyse GST sont ajoutés au surnageant de lyse, puis incubées sur la nuit à 4°C sous agitation constante. Après centrifugation (500g pendant 5 minutes à 4°C), les billes sont lavées extensivement en Tampon de Lavage GST. Trois éluions successives sont réalisées par compétition par ajout de glutathion libre pendant 1 heure à 4°C sous agitation (Tampon d'Elution GST). Les fractions d'éluion sont ensuite aliquotées et conservées à -80°C pour utilisation ultérieure.

IV.2.2 - Extraction et purification des protéines en fusion avec l'étiquette 6xHis

Le principe de cette purification est basé sur la chromatographie d'affinité pour un métal immobilisé (*Immobilized-metal affinity chromatography*, IMAC). L'étiquette 6xHis possède une affinité importante pour le Ni²⁺. Cet ion est immobilisé sur les billes d'agarose par l'intermédiaire de l'acide iminodiacétique qui sert de bras chélateur. L'élution se fait couramment par compétition avec de l'imidazole.

Le protocole de purification des protéines de fusion 6xHis utilisé a été adapté d'après Chamberlain et coll. (Chamberlain and Burgoyne, 1997a). Le culot de bactéries M15 [pREP4] induites pour l'expression de protéines de fusion 6xHis est repris dans 10 ml de Tampon de Lyse His, puis soumis à sonification (2 minutes par cycle de 15 secondes interrompues de 10 secondes de pause, puissance 20-30 %). La suspension est alors clarifiée par centrifugation à 100 000g pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant est récupéré et incubé sur la nuit à 4°C avec 500µl de billes Ni-NTA (QIAGEN) équilibrées à 50 % v/v en Tampon de Lyse His. Les billes sont alors centrifugées à 1000g pendant 5 minutes à 4°C puis lavées abondamment en Tampon de Lavage His. Les protéines recombinantes sont éluées par ajout de Tampon d'Elution His, aliquotées et stockées à -80°C pour utilisation ultérieure.

IV.3 - Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Le gel d'électrophorèse est un réseau de mailles de taille variable selon le pourcentage d'acrylamide / bisacrylamide (37 : 1) utilisé, ce qui permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire dans un champ électrique et dans des conditions dénaturantes.

IV.3.1 - Migration des protéines sur gels Glycine

La technique a été décrite par Laemmli en 1970 (Laemmli, 1970). Le gel est constitué de deux parties : un gel de concentration (4 % d'acrylamide / bisacrylamide 37 : 1) et un gel de séparation. Selon la masse moléculaire de la protéine d'intérêt, la résolution du gel varie de 8 % à 15 %.

IV.3.2 - Migration des protéines sur gels Tricine

La résolution sur gel discontinu de polyacrylamide des protéines de faible poids moléculaire (5 à 50 kDa) nécessite l'utilisation de gels Tricine (Schagger and von Jagow, 1987). Le gel de concentration est composé d'un mélange d'acrylamide / bisacrylamide à 4%. Le gel de résolution est à 15% d'acrylamide / bisacrylamide et contient du glycérol. Le gel de concentration est directement coulé au dessus du gel de séparation avant sa polymérisation, le glycérol empêchant les deux gels de se mélanger.

Les échantillons sont préparés en ajoutant du Tampon de Charge aux protéines. Les protéines sont alors dénaturées en chauffant les échantillons à 95°C pendant 5 minutes. La migration se fait sous ampérage constant (10 mA pour le gel de concentration, 30 mA pour le gel de résolution) dans du tampon de migration.

IV.3.3 - Coloration des gels et quantification des protéines recombinantes

Les gels après migration peuvent être colorés. Le kit Silver Stain Plus (Bio-Rad) est utilisé afin de détecter de faibles quantités de protéines. La coloration au bleu de Coomassie (Bio-Safe Coomassie Stain, Bio-Rad) est utilisée pour détecter des quantités plus importantes de protéines. Ces deux produits sont utilisés selon les recommandations du fournisseur.

Les protéines recombinantes purifiées sont quantifiées après SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie d'après une gamme de protéine BSA (albumine sérique de bœuf) grâce au système FluorChem v2.00 (Alpha Innotech Corp.) décrit plus loin.

IV.4 - Electrotransfert sur membrane PVDF ou nitrocellulose et immunodétection

IV.4.1 - Electrotransfert semi-sec des gels d'acrylamide

Après migration, les protéines sont électrotransférées sur membrane de PVDF (porosité de 0,45 µm), ou de nitrocellulose (GE Healthcare - Amersham Biosciences) afin de permettre une immunodétection de la protéine d'intérêt. Les membranes PVDF sont activées avant le transfert par un passage dans du méthanol pur, puis réhydratée par un lavage dans de l'eau distillée. Elle est ensuite équilibrée dans le Tampon de Transfert. Les membranes en

nitrocellulose sont hydratées dans l'eau distillée puis équilibrées dans le Tampon de Transfert. Après équilibration dans le Tampon de Transfert, les protéines du gel sont alors électrotransférées dans un système semi-sec (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) pendant une à deux heures, à 4°C et à voltage constant (15 V).

IV.4.2 - Immunodétection après transfert

Après le transfert, les membranes de PVDF sont lavées en eau distillée afin d'éliminer les traces de SDS. Les protéines sont ensuite colorées au Bleu de Coomassie, puis décolorées à l'aide de la Solution de Décoloration. La coloration des membranes permet d'avoir une vue qualitative de l'efficacité du transfert, ainsi que de noter la position des différents marqueurs de tailles protéiques. La membrane est ensuite entièrement décolorée au méthanol absolu, puis la saturation des sites aspécifiques a lieu dans du TBS-T-Lait pendant une heure. L'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt et dilué du TBS-T-Lait est alors incubé sur la membrane à 4°C sur la nuit ou à température ambiante pendant 2 heures. Après trois lavages de quinze minutes en TBS-T, l'anticorps secondaire dilué en TBS-T-Lait est incubé sur la membrane pendant une heure à température ambiante. Cet anticorps est dirigé contre la partie constante de l'anticorps primaire et est couplé à la peroxydase. Après trois lavages de quinze minutes en TBS-T, la révélation du signal se fait à l'aide du kit ECL Lumi-Light^{plus} (Roche Diagnostics) selon les recommandations du fournisseur. L'acquisition des images est réalisée grâce à une caméra CCD (Ropers Scientific) pilotée par un système FluorChem v2.00 (Alpha Innotech Corp.). Les signaux peuvent être quantifiés grâce à ce système et la linéarité de chaque signal peut être vérifiée au cours des différentes expositions.

Un protocole différent a été utilisé pour les membranes de nitrocellulose. Après le transfert, la membrane est lavée à l'eau distillée, puis colorée au Rouge Ponceau. Après décoloration à l'eau distillée, les membranes sont traitées selon le même protocole que les membranes PVDF.

La liste des anticorps primaires et secondaires, ainsi que les dilutions auxquelles ils ont été employés sont données dans les tableaux m-5 et m-6.

IV.5 - Dosage des protéines

Les protéines sont dosées grâce au réactif Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) sur le principe du dosage de Bradford (Bradford, 1976).

IV.6 - Recherche de partenaires protéiques

IV.6.1 - Préparation d'homogénat de cellules

Les homogénats de cellules MIN6 sont effectués à partir de cellules à 80% de confluence cultivées en flasque de 75cm². Les cellules sont lavées en PBS sans calcium/magnésium, décollées en PBS-EDTA 10 mM, récoltées, centrifugées à 500g pendant 5 minutes à 4°C. L'ensemble du protocole suivant se fait à 4°C pour éviter des dégradations protéiques. Les cellules sont resuspendues en Tampon de Lyse Cellulaire, sonifiées (1 minute par pulse de 10 secondes interrompues de 10 secondes de pause, puissance 10-20 % - Sonicator®, Misonix). La lyse est complétée par 20 passages à travers une seringue munie d'une aiguille de 27 gauge. L'homogénat est clarifié par centrifugation à 1000g pendant 5 minutes à 4°C, aliquoté et conservé à -80°C. La quantité de protéines contenues dans le surnageant est alors déterminée par dosage de Bradford comme décrit plus haut.

IV.6.2 - Co-précipitation à la GST ou “*GST pull-down*”

Afin de trouver des partenaires protéiques capables d'interagir avec les protéines recombinantes purifiées, des expériences de “*GST pull-down*” sont réalisées selon le protocole suivant :

Les homogénats de cellules MIN6 préparés comme indiqué ci-dessus sont solubilisés par ajout de Triton X-100 0,5 % m/v pendant une heure à 4°C sous agitation puis clarifiés par centrifugation à 10 000g pendant 30 minutes à 4°C. 500 µg d'homogénat solubilisé de cellules MIN6 sont dilués dans cinq fois leur volume dans du Tampon de Binding sans Triton X-100 afin que la concentration en détergent passe de 0,5 % à 0,1 %.

25µg de protéines en fusion à la GST sont ajoutés au mélange et incubés pendant deux heures sous agitation à 4°C.

Cette incubation permet de mettre en relation la protéine fusionnée à la GST avec ses éventuels partenaires contenus dans l'homogénat cellulaire.

Quatre-vingt µl billes de glutathion-sépharose équilibrées en Tampon de Binding sont ajoutées et l'incubation est poursuivie pendant trois heures sous agitation à 4°C.

Cette étape a pour but de capter sur les billes les protéines fusionnées à la GST et leurs partenaires éventuels.

Les billes sont sédimentées par centrifugation à 800g pendant 5 minutes à 4°C, puis lavées délicatement deux fois avec du Tampon de Binding. Un troisième lavage est effectué avec du tampon sans détergent.

Du Tampon de Charge est ajouté sur le culot de billes pour décrocher les protéines liées et les dénaturer. L'échantillon peut être conservé à -20°C jusqu'à analyse par électrophorèse.

IV.6.3 - Réticulation covalente ou « *cross-linking* » dans les cellules HIT-

Les cellules transfectées ou non sont lavées dans du PBS sans calcium/magnésium, décollées en tampon KRB-EDTA 10 mM, centrifugées pendant 5 minutes à 2000g à 4°C puis reprises dans du Tampon Intracellulaire (IC). Ce tampon est équilibré à une concentration en calcium libre de 0.1 µM (« bas calcium ») ou de 10 µM (« haut calcium »).

La perméabilisation des cellules a été réalisée par ajout de Streptolysine-O (SL-O). Cette protéine cytotoxique, produite par *Streptococcus pyogenes*, est capable de former des pores dans la membrane plasmique qui sont de taille suffisante pour permettre la diffusion passive des composés cytosoliques (Lang et al., 1997c). Cela nous permet de fixer la composition du cytosol en contrôlant la composition du tampon utilisé, et plus particulièrement la concentration en calcium libre. La perméabilisation a été réalisée à 37°C, pendant 5 minutes. Pour chaque expérience, la quantité optimale de SL-O a été déterminée sur des aliquotes : des quantités croissantes de SL-O ont été ajoutées aux cellules. Après 5 minutes de perméabilisation à 37°C, 5 µl de suspension cellulaire ont été ajoutés à 5 µl de Bleu Trypan, qui colore seulement les cellules perméabilisées. Nous avons pu ainsi déterminer que 0.5 µl de SL-O suffisent pour perméabiliser en 5 minutes la totalité des cellules récoltées, équivalent à une plaque 24 puitsensemencée à 50.000 cellules/puit.

Le DSS (disuccinimidyl suberate) (Pierce) est un agent homobifonctionnel qui permet le pontage entre deux groupes amines situés à une distance maximale de 12 Å. Le DSP (dithiobis(succinimidyl)propionate) (Pierce) est un agent homobifonctionnel équivalent au DSS à la différence près qu'il est réductible, permettant ainsi de dissocier ultérieurement les complexes formés. Ces deux agents pontants réagissent avec les fonctions amines des résidus

Lysines des protéines. Ils ont été préparé en DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration stock de 20mM. Le BS3 (bis(sulfosuccinimidyl)suberate) (Pierce) est l'analogue soluble du DSS et a été préparé dans l'eau. Le BMH (bismaleimidohexane) a aussi été utilisé. Cet agent pontant est spécifique des résidus Cystéines et il se dilue en DMSO.

La suspension de cellules perméabilisées et équilibrées en Tampon IC bas ou haut calcium est mise en présence de l'agent pontant à une concentration finale de 1 mM pendant 15 minutes à 37°C ou en présence de DMSO seul (concentration finale : 670 µM). Dans le cas des agents pontants spécifiques aux Lysines, la réticulation est arrêtée par ajout de 0.1 M de Glycine à pH=8 pendant 15 minutes à 4°C. Le pKa de la Glycine étant de 9.78, la fonction amine de la Glycine est protonnée à pH=8, donc réagit fortement avec les agents pontants utilisés et cela permet de les saturer. Les protéines membranaires sont ensuite solubilisées par un traitement au Triton X-100 à 1 % pendant 15 minutes à 4°C. Les temps d'incubation et la concentration des réactifs ont été mis au point au laboratoire pour permettre une réticulation ménagée des protéines en quelques complexes distincts et observables dans la gamme de séparation des gels d'acrylamide utilisés.

Les extraits totaux sont ensuite sonifiés à 4°C pendant 1 minute par impulsions de 10 secondes à une puissance de 10-15 % suivies d'une pause de 10 secondes, centrifugés à 15 000g pendant 20 minutes à 4°C afin de sédimenter les gros débris cellulaires non solubilisés.

Dans le cas des cellules transitoirement transfectées par 2mycCsp1 ou Csp1, les complexes réticulés ont été immunoprécipités. Pour cela, le surnageant de lyse a été incubé sur la nuit à 4°C avec un anticorps monoclonal anti-Myc. Les échantillons ont ensuite été incubés en présence de billes protéine G-sépharose pendant 2 heures à 4°C. Les billes ont été lavées abondamment en Tampon IC bas calcium puis reprises en Tampon de Charge.

Les échantillons sont ensuite analysés par SDS-PAGE.

IV.7 - Interactions entre protéines recombinantes

IV.7.1 - Interactions directes sur billes de glutathion

La mesure de l'interaction directe entre protéines purifiées est faite comme décrit préalablement avec quelques modifications (Evans et al., 2001).

Les protéines GST sont incubées en présence de billes glutathion-sépharose (40 µl d'une préparation équilibrée à 50%) en Tampon Direct Binding Ca ou EGTA (volume final de 200 µl) pendant 30 minutes à 4°C sous agitation constante. Après centrifugation, le

surageant est enlevé et les billes sont alors incubées en présence de la protéine partenaire présentant une étiquette 6xHis indiquée dans un volume final de 200 µl. Après une incubation de deux heures à 4°C, les billes sont centrifugées pendant 5 minutes à 500g à 4°C, lavées trois dans 500 µl de Tampon Direct Binding Ca ou EGTA, puis à nouveau lavées trois fois dans 500 µl du tampon correspondant supplémenté par du Glycérol 5% m/v. Les billes sont alors reprises en Tampon de Charge puis analysées par Western-blot pour déterminer la quantité de protéines 6xHis liée au partenaire GST.

IV.7.2 - Far Western-blot

La mesure de l'interaction directe entre protéines purifiées par Far Western-blot a été réalisée essentiellement comme décrit préalablement (Xu et al., 2001).

Les protéines GST sont séparées sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes, puis transférées sur membrane de PVDF. La membrane est lavée en Tampon Direct Binding Ca, ce qui permet de renaturer les protéines, puis bloquée par une incubation en tampon supplémenté de BSA 2% m/v. La protéine étiquetée 6xHis est alors incubée sur la nuit à 4°C en solution dans du Tampon Direct Binding Ca (1 µg/ml). La membrane est alors lavée dans le même tampon, puis incubée deux heures à température ambiante avec un anticorps spécifique de l'étiquette 6xHis dilué dans le même tampon. Après de nouveaux lavages, l'anticorps secondaire couplé à la HRP est incubé sur la membrane. La présence de la protéine 6xHis liée aux différentes protéines GST est alors révélée par réaction chimiluminescence.

IV.7.3 - Dot-blot

La mesure de l'interaction entre protéines purifiées par dot-blot a été réalisée comme décrit précédemment (Li et al., 1999). Les protéines GST sont immobilisées sur une membrane PVDF préalablement activée au méthanol par adsorption. La membrane est bloquée par incubation de 30 minutes dans du Tampon Direct Binding Ca supplémenté de lait 5% m/v. La protéine étiquetée 6xHis est incubée comme pour les études de Far Western-blot et la membrane est ensuite traitée de manière identique.

V - Biologie cellulaire

V.1 - Transfection des cellules de mammifères en plaque 24 puits

Différents agents de transfection commerciaux ont été utilisés selon les lignées cellulaires. La Lipofectamine2000 (Invitrogen) a été utilisée sur les cellules MIN6 et sur les cellules INS-1E, et le JetPEI (PolyPlus-Transfection) sur les cellules HIT-T15. Pour chacun d'eux, des conditions optimales de transfection ont été établies en fonction de la condition de culture. Les transfactions sont réalisées avec des produits à température ambiante trois jours après que les cellules aient étéensemencées. Au moment de la transfection, le milieu de culture des cellules est changé.

Les conditions de transfection sont données pour 50 000 cellulesensemencées dans un puits d'une plaque 24 puits :

- JetPEI : le volume de milieu de culture pour la transfection est de 1 ml. L'ADN (300 ng) est mélangé à 50 µl de chlorure de sodium (NaCl, 150 mM) stérilisé par filtration sur membrane de nylon 0,22 µm. Le JetPEI (0,5 µl) est mélangé séparément à 50 µl de NaCl 150 mM. Chaque solution est mélangée à l'aide d'un vortex, centrifugée rapidement, puis la solution contenant le JetPEI est ajoutée sur la solution d'ADN. L'ensemble est mélangé à l'aide d'un vortex, puis rapidement centrifugé. Après 15 à 20 minutes d'incubation, les 100 µl sont placés sur les cellules.
- Lipofectamine2000 : les cellules sont placées dans 1 ml de milieu de culture. L'ADN (400 ng) est dilué dans 50 µl d'Optimem1 (Invitrogen). De même, 1 µl de Lipofectamine est dilué. Après 5 minutes, le mélange des deux solutions est effectué et incubé 15 minutes avant d'être ajouté sur les cellules.

L'efficacité de transfection est observée à chaque transfection en utilisant un plasmide témoin codant pour la protéine fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) codée par le plasmide peGFP-N1 (Clonetech).

L'arrêt de la transfection est réalisé par changement du milieu de culture, 48 heures après le début de la transfection.

Pour certaines expériences, les cellules sont transfectées avec plusieurs plasmides. Dans ce cas, la quantité d'ADN utilisée pour transfecter un puits reste constante et est réparti entre les différents plasmides selon un pourcentage variable en fonction du type d'expérience réalisée.

V.2 - Immunocytochimie indirecte

Les cellules sontensemencées en plaque de 24 puits et sur une lamelle de verre. Trois jours après la transfection, les cellules sont traitées comme suit :

- deux lavages de 5 minutes dans du PBS pH 7,4
- fixation des cellules avec une solution de PBS-Paraformaldéhyde 4 % (PBS-PFA) à température ambiante pendant 20 minutes
- deux lavages de 5 minutes en PBS, suivi d'un lavage en PBS supplémenté de BSA 2% (PBS-BSA) afin d'éliminer les dernières traces de paraformaldéhyde
- saturation des sites aspécifiques en PBS-BSA pendant 30 minutes, cette étape est couplée à l'étape de perméabilisation des cellules en ajoutant de la saponine 0,1% au PBS-BSA (PBS-BSA-SAP)
- incubation des cellules avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA-SAP pendant une nuit à 4°C
- trois lavages de 5 minutes en PBS-BSA-SAP
- incubation pendant 60 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore dilué dans du PBS-BSA-SAP et à l'obscurité pour protéger le fluorophore
- quatre lavages des cellules en PBS
- montage des lamelles sur lame : les lamelles sont rincées à l'eau pour éliminer le PBS. Les cellules sont mises en contact avec un milieu de montage (Vectashield, Vector) afin d'éviter le photo-blanchiment au moment de l'observation. Les lamelles sont fixées sur la lame de verre à l'aide de vernis à ongle. Les lames sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à l'observation.

Les photographies sont effectuées à l'aide d'un microscope laser confocal Zeiss couplé à un système d'analyse d'image LSM 510 meta.

La liste des anticorps primaires et secondaires, ainsi que les dilutions utilisées en immunocytochimie est donnée dans le tableau m-7.

Compositions des tampons et solutions :

Solutions pour acides nucléiques :

Tampon de Charge pour ADN (concentrations finales) : Glycérol 20% (m/v), bleu de bromophénol 1mg/ml dans de l'eau déminéralisée

TBE : TRIS 89mM, Borate 89mM, EDTA 2mM

TAE : TRIS-acétate 40mM, EDTA 2mM

Eau DEPC : DEPC 0,2% (v/v) dans de l'eau déminéralisée, agité 12 heures puis stérilisé par autoclavage

TE 10:1 pH8 : Tris 10 mM, EDTA 1 mM ; pH 8

Tampon STE 4X : Tris 40 mM, NaCl 200 mM ; pH 7.5

Solutions pour purification des protéines recombinantes :

Tampon de Lyse GST : PBS ; β -mercaptoéthanol 5 mM ; $MgCl_2$ 10 mM ; Dnase I 10 μ g/ml ; ATP 1mM ; Leupeptine / Aprotinine / Pepstatine A 1 μ g/ml ; Pefabloc 0.1 M ; Triton X-100 1% m/v ; pH 8

Tampon de Lavage GST : PBS ; β -mercaptoéthanol 5 mM ; $MgCl_2$ 10 mM ; Triton X-100 1% m/v

Tampon d'Elution GST : Tris 50mM ; Gluthation réduit 10 mM ; pH 8

Tampon de Lyse His : HEPES 100 mM ; KCl 500 mM ; $MgCl_2$ 5 mM ; ATP 5 mM ; β -mercaptoéthanol 2 mM ; Leupeptine / Aprotinine / Pepstatine A 1 μ g/ml ; PSMF 1 mM ; pH 7

Tampon de Lavage His : HEPES 20 mM ; KCl 200 mM ; $MgCl_2$ 2mM ; ATP 0.6 mM ; β -mercaptoéthanol 2mM ; Glycérol 10% m/v ; Imidazole 50mM ; pH 7

Tampon d'Elution His : HEPES 20 mM ; KCl 200 mM ; $MgCl_2$ 2mM ; ATP 0.6 mM ; β -mercaptoéthanol 2mM ; Glycérol 10% m/v ; Imidazole 500mM ; pH 7

Composition des gels de polyacrylamide-Glycine :

Composants	Gel de concentration	Gel de résolution
Tris	125mM, pH 6,8	375 mM, pH 8,8
SDS	0,1% (m/v)	0,1% (m/v)
Acrylamide / bisacrylamide (37 : 1)	4% (m/v)	8 à 12% (m/v)
APS	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)
TEMED	0,2% (v/v)	0,1% (v/v)

Composition des gels de polyacrylamide-Tricine :

Composants	Gel de concentration	Gel de résolution
Tris	0.75 M, pH 8.45	1 M, pH 8.45
SDS	0.075% (m/v)	0.1% (m/v)
Acrylamide / bisacrylamide	(48 : 1.5) 4% (m/v)	(46.5 : 1.5) 15% (m/v)
Glycérol	-	16.7% (m/v)
APS	0,07% (v/v)	0,125% (v/v)
TEMED	0,07% (v/v)	0,125% (v/v)

Solutions pour gels d'acrylamide / Western-blot :

Tampon de Charge (concentrations finales) : Glycérol 10% (m/v) ; β -mercaptoéthanol 8% (v/v) ; SDS 2% (m/v) ; bleu de bromophénol 50 μ g/ml

Tampon de migration gels glycine: Tris 25mM ; glycine 320mM ; SDS 3,5mM

Tampon d'anode gels tricine : Tris 200 mM, pH 8.9

Tampon de cathode gels tricine : Tris 100 mM, Tricine 100 mM, SDS 0.1%, pH ~8.25

Tampon de transfert : Tris 47,8mM ; glycine 38,6mM ; SDS 0,036% (m/v) ; méthanol 20% (v/v)

Solution de coloration des membranes PVDF : acide acétique 10% (v/v) ; méthanol 25% (v/v) ; bleu de Coomassie 0,05% (m/v)

Solution de décoloration des membranes PVDF : methanol 50% ; acide acétique 7%

Solution de coloration des membranes nitrocellulose : PonceauS 0.2% m/v ; acide acétique 1%

TBS-T : TRIS 50mM ; NaCl 190mM ; Tween 0,1% (v/v) ; pH 8

TBS-T-Lait : TBS-T supplémenté de 5% de lait écrémé

Solutions générales :

PBS : NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na₂HPO₄ 4,3 mM ; KH₂PO₄ 1,4 mM ; pH 8 ou 7,4

KRB : NaCl 125 mM ; KCl 5 mM ; MgCl₂ 2 mM ; KH₂PO₄ 1,2 mM ; HEPES 25 mM ; pH 7,4

Solutions pour cellules ou tissus:

Tampon d'Homogénéisation : Hepes 10 mM ; Saccharose 0,25M ; KCl 0,130 M ; PMSF 0,5 mM ; pH 7

Tampon de Membranes : MOPS 20 mM ; MgCl₂ 4,5 mM ; Leupeptine / Aprotinine / Pepstatine A 1 µg/ml ; pH 7

Tampon Intracellulaire : KCl 140 mM ; NaCl 5 mM ; MgSO₄ 7 mM ; HEPES 20 mM ; EGTA 10 mM ; Leupeptine 12,5 µg/ml ; Aprotinine 2,5 µg/ml ; CaCl₂ 1,65 mM (: calcium libre 0.1 µM - « bas calcium ») ou 10 mM (: calcium libre 10 µM - « haut calcium ») ; pH 7

Solution d'acide/éthanol : acide chlorhydrique 17M 1,5% ; éthanol pur 75%

Tampon de Lyse Cellulaire : MOPS 20 mM ; Saccharose 0.25 M ; MgCl₂ 5 mM ; Leupeptine / Aprotinine / Pepstatine A 1 µg/ml ; Pefabloc 0.1 M ; Sodium Orthovanadate 10 µg/ml ; pH 7

Solutions pour interactions protéiques :

Tampon de Binding : MOPS 20 mM ; MgCl₂ 5 mM ; NaCl 200 mM ; +/- Triton X-100 0.1 % m/v ; pH 7

Tampon Direct Binding Ca ou EGTA : K Acetate 150 mM ; MgCl₂ 1 mM ; HEPES 20 mM ; CaCl₂ 1mM ou EGTA 2 mM ; Tween20 0.05% m/v ; pH 7

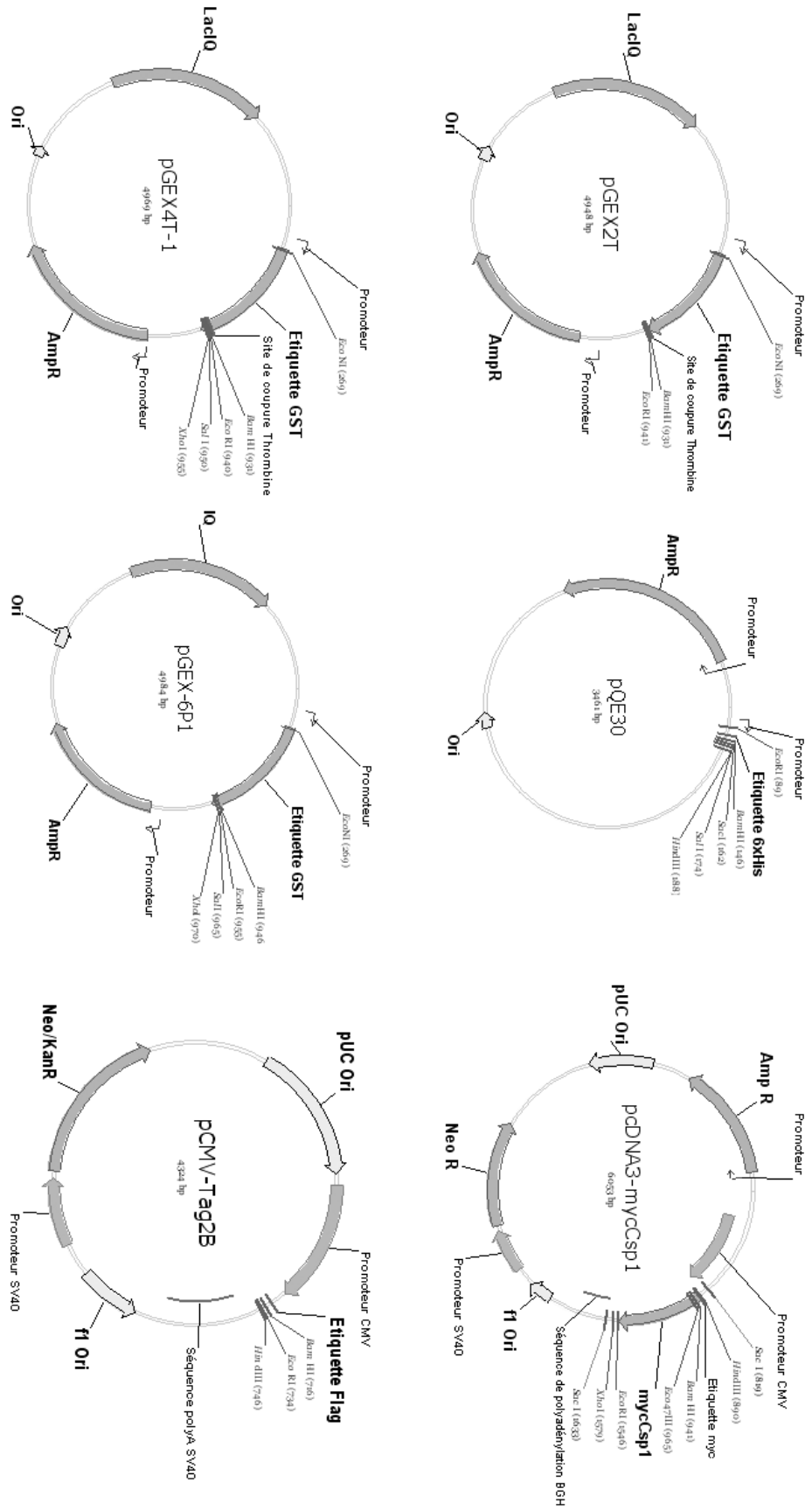


Figure m-1 : Cartes de restriction des vecteurs plasmidiques utilisés.

Les sites de restrictions importants sont indiqués ainsi que leur position en paire de base.

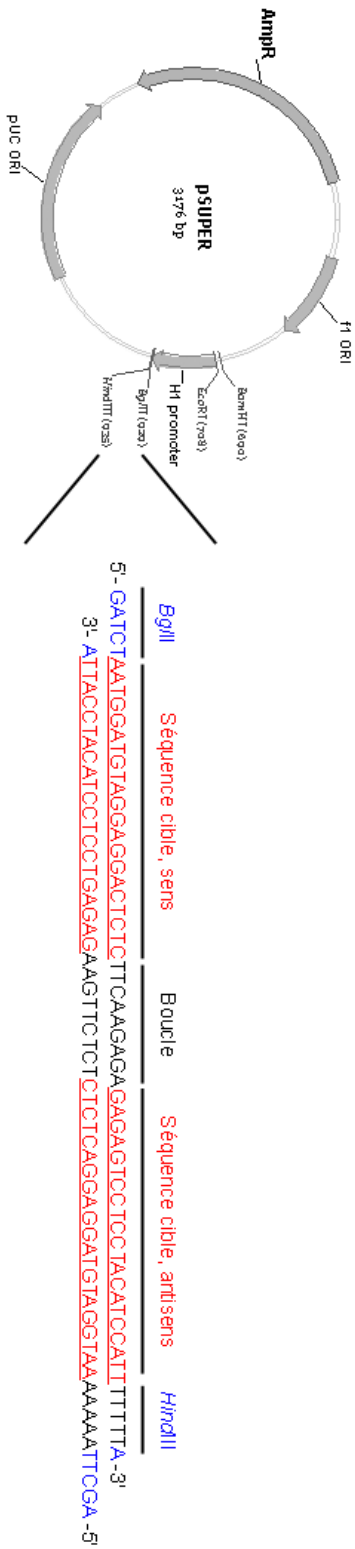


Figure m-2 : Carte de restriction du plasmide pSUPER et séquences des oligonucléotides utilisés pour la construction du plasmide spécifique de la Synaptotagmine 9 de souris.

Les sites de restrictions importants sont indiqués ainsi que leur position en paire de base. Les séquences nucléotidiques des oligonucléotides sont légendées pour indiquer les séquences spécifiques de Syt9, la boucle, ainsi que les sites utilisés pour l'insertion dans le pSUPER.

Nom	Partie de la protéine exprimée (acides-aminés)	Source	Vecteur
GST-Csp	1-198	(Chamberlain and Burgoyne, 1996)	pGEX2T
	1-167	(Chamberlain and Burgoyne, 1996)	pGEX2T
	14-198	pcDNA3	pGEX2T
	14-167	pcDNA3	pGEX2T
	1-82	pcDNA3	pGEX6P1
	1-110	pcDNA3	pGEX6P1
	110-198	pcDNA3	pGEX6P1
	138-198	pcDNA3	pGEX6P1
GST-Csp1 S10D		Mutagenèse	pGEX2T
GST-ASP		PCR	pGEX2T
GST-SSP		PCR	pGEX2T
GST-Csp β		pcDNA3	pGEX2T
His ⁶ -Csp	1-198	(Chamberlain and Burgoyne, 1997b)	
	1-167	(Chamberlain and Burgoyne, 1997b)	
	14-198	pcDNA3	pQE30
	14-167	pcDNA3	pQE30
	1-110	pcDNA3	pQE30
	138-198	pcDNA3	pQE30
His6-Csp2 DM	1-167 H43Q/D45N + E93V	pcDNA3	pQE30
His ⁶ -Csp1 S10D		Mutagenèse	pQE30
His ⁶ -SSP		pVP16-3	pQE11
GST-SNAP25	WT	pET28+a	pGEX2T
	BotE	PCR	pGEX2T
	BotA	PCR	pGEX2T

Tableau m-1 : Liste des vecteurs d'expression procaryote construits/utilisés au cours de ce travail.

Nom	Partie de la protéine exprimée (acides-aminés)	Source	Vecteur
myc / 2myc - Csp	1-198	(Zhang et al., 1999)	pcDNA3
	1-167	(Zhang et al., 1999)	pcDNA3
	14-198	PCR	pcDNA3
	14-167	PCR	pcDNA3
	1-82	PCR	pcDNA3
	1-110	PCR	pcDNA3
	110-198	(Zhang et al., 1999)	pcDNA3
	138-198	(Chamberlain and Burgoyne, 1997b)	pcDNA3
Myc-Csp β	EST AF368276	pcDNA3	
Flag-Csp β	pcDNA3	pCMV-Tag2B	
Flag-Csp1	pcDNA3	pCMV-Tag2B	
Flag-Csp2	pcDNA3	pCMV-Tag2B	

Tableau m-2 : Liste des vecteurs d'expression eucaryote construits/utilisés au cours de ce travail.

Nom	Vecteur	Source
His ⁶ -SNAP25 wt	pET28a	(Schiavo et al., 1997)
ASP	pVP16-3	(Tobaben et al., 2003)
SSP	pVP16-3	(Tobaben et al., 2003)
GST-SytI	pGEX2T	(Monterrat et al., 2006)
GST-SytIX	pGEX2T	(Monterrat et al., 2006)

Tableau m-3 : Liste des autres plasmides utilisés au cours de ce travail

Nom	Séquence sens (5' - 3')	Séquence antisens (5' - 3')
Csp 1 S10D	CCAGAGGCAGCGGTCACTCGATAACCTCTGGGG <i>Eco47III</i> S10D	CCCCA GAGGTATCGA GTGACCCGCTGCCTCTGG S10D <i>Eco47III</i>
ASP/SSP	CGGGATCCATGGCTGACCA GAGG <i>BamHI</i>	CCGCTCGAGTTAGTTGAA CCCCCTCG <i>XhoI</i>
SNAP25 BotE	CCAA TGTGCCCTGGATGOGTTCCC (primer universel pGEX2T)	GAATTC TTAACCTGTCGATCTGGCGATT <i>EcoRI</i>
SNAP25 BotA	CCAA TGTGCCCTGGATGOGTTCCC (primer universel pGEX2T)	GAATTC TTAATTGGTTGGCTTCATCAATC <i>EcoRI</i>
Csp 14-198	TCGGATCCGAGTCCCTGTACCATGTA CTGG <i>BamHI</i>	ACGAA TTCATTAGTTGAACCCGTCGGGTGTG <i>EcoRI</i>
Csp 14-167	TCGGATCCGAGTCCCTGTACCATGTA CTGG <i>BamHI</i>	ACGAA TTCATTAGTTGAACCCGTCGGGTGTG <i>EcoRI</i>
Csp 1-82	AAGGATCCATGGCTGACCA GAGGCA GCG <i>BamHI</i>	AGGAA TTCACAGT GAGCCGTA CTGTGTCG <i>EcoRI</i>
Csp 1-110	AAGGATCCATGGCTGACCA GAGGCA GCG <i>BamHI</i>	AGGAA TTCACAGGGCCCTGGCCCCACCAGC <i>EcoRI</i>
Myc-C β	CGCGGATCCATGGCATGTAA CATACTAACC <i>BamHI</i>	CCGGAA TTCGGGGA CTGTGGACTCTCTGAGG <i>EcoRI</i>

Tableau m-4 : Séquence des oligonucléotides employés

La première colonne donne le nom de l'oligonucléotide, la deuxième la séquence sens (5'-3') et la troisième la séquence antisens (5'-3'). Dans le cas de la mutagenèse dirigée le site *Eco47III* a été muté pour faciliter le criblage. Dans le cas de sous-clonages simples, les sites de restriction utilisés ont été soulignés.

Anticorps	Clone	Espèce	Fournisseur	Dilution de l'anticorps	
				primaire	secondaire
Anti-Myc	9E10	Souris	Sigma	1/2000	1/3000
Anti-Myc	C3956	Lapin	Sigma	1/1000	1/5000
Anti-GST	GST2	Souris	Sigma	1/10 000	1/5000
Anti-Syntaxin-1	HPC-1	Souris	Sigma	1/3000	1/3000
Anti-SNAP25	SMI81	Souris	Sternberger M. Inc.	1/2000	1/3000
Anti-SNAP25	71.1	Souris	Synaptic Systems	1/2000	1/3000
Anti-VAMP2	69.1	Souris	Synaptic Systems	1/2000	1/3000
Anti-Csp	-	Lapin	(Chamberlain and Burgoyne, 1996)	1/2000	1/3000
Anti-Csp	A1567	Lapin	Chemicon	1/2000	1/3000
Anti-Hsc70	Brm22	Souris	Sigma	1/5000	1/5000
Anti-Hsp90	AC16	Souris	Sigma	1/3000	1/3000
Anti-SGT	-	Lapin	(Winnefeld et al., 2004)	1/1000	1/2000
Anti-PentaHis	-	Souris	Qiagen	1/1000	1/1000

Tableau m-5 : Anticorps et dilutions utilisés en Western blot

La 1^{er} et la 2^{ème} colonne indique le nom et le clone de l'anticorps, la 3^{ème} l'origine de l'anticorps. La 4^{ème} colonne mentionne le fournisseur et les deux dernières colonnes donnent les dilution de l'anticorps employées.

Nom	Espèce	Fournisseur
Anti-Souris	Chèvre	Amersham Biosciences
Anti-Lapin	Chèvre	Amersham Biosciences

Tableau m-6 : Anticorps secondaires utilisés en Western blot

La 1^{er} colonne indique le nom de l'anticorps, la 2^{ème}, l'espèce dans laquelle il est fabriqué, et la 3^{ème} l'origine commerciale de l'anticorps

Anticorps	Clone	Espèce	Fournisseur	Dilution de l'anticorps	
				primaire	secondaire
Anti-Myc	9E10	Souris	Sigma	1/500	1/300
Anti-Myc	C3956	Lapin	Sigma	1/300	1/300
Anti-Syntaxin 1	HPC-1	Souris	Sigma	1/500	1/300
Anti-SNAP25	SMI 81	Souris	Sternberger M. Inc.	1/500	1/300
Anti-VAMP2	69.1	Souris	Synaptic Systems	1/500	1/300
Anti-SVP38	-	Souris	Synaptic Systems	1/500	1/300
Anti-Vti1b	7	Souris	Transduction Laboratories	1/100	1/300
Anti-EEA1	-	Souris	(Gagescu et al., 2000)	1/500	1/300
Anti-insuline	K36aC10	Souris	Sigma	1/500	1/300

Tableau m-7 : Anticorps et dilutions utilisés en immunocytochimie

La 1^{er} et la 2^{ème} colonne indique le nom et le clone de l'anticorps, la 3^{ème} l'origine de l'anticorps. La 4^{ème} colonne mentionne le fournisseur et les deux dernières colonnes donnent les dilution de l'anticorps employées. Les anticorps secondaires sont des anticorps dirigés contre les parties constantes des IgG de souris ou de lapin selon le cas. Ils sont couplés aux fluorophores TRITC, FITC, TexasRed ou Cy³ (Jackson Laboratories) selon les utilisations.

Références bibliographiques

A

- Abderrahmani A, Niederhauser G, Plaisance V, Roehrich ME, Lenain V, Coppola T, Regazzi R, Waeber G (2004) Complexin I regulates glucose-induced secretion in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 117:2239-2247.
- Agashe VR, Hartl FU (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 11:15-25.
- Akabas MH (2000) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 275:3729-3732.
- Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G, Lindau M (1997) The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 389:509-512.
- Alvarez de Toledo G, Fernandez-Chacon R, Fernandez JM (1993) Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 363:554-558.
- Angleson JK, Betz WJ (1997) Monitoring secretion in real time: capacitance, amperometry and fluorescence compared. *Trends Neurosci* 20:281-287.
- Archer DA, Graham ME, Burgoyne RD (2002) Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 277:18249-18252.
- Arkhammar P, Nilsson T, Rorsman P, Berggren PO (1987) Inhibition of ATP-regulated K⁺ channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 262:5448-5454.
- Ashcroft FM, Rorsman P (2004) Molecular defects in insulin secretion in type-2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 5:135-142.
- Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ (1984) Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312:446-448.

B

- Bai J, Chapman ER (2004) The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. *Trends Biochem Sci* 29:143-151.
- Bai J, Tucker WC, Chapman ER (2004a) PIP₂ increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat Struct Mol Biol* 11:36-44.
- Bai J, Wang CT, Richards DA, Jackson MB, Chapman ER (2004b) Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin**t*-SNARE interactions. *Neuron* 41:929-942.
- Bailey CJ (2000) Potential new treatments for type 2 diabetes. *Trends Pharmacol Sci* 21:259-265.
- Balch WE, Rothman JE (1985) Characterization of protein transport between successive compartments of the Golgi apparatus: asymmetric properties of donor and acceptor activities in a cell-free system. *Arch Biochem Biophys* 240:413-425.
- Barclay JW, Craig TJ, Fisher RJ, Ciufo LF, Evans GJ, Morgan A, Burgoyne RD (2003) Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J Biol Chem* 278:10538-10545.
- Barg S (2003) Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. *Pharmacol Toxicol* 92:3-13.
- Barg S, Olofsson CS, Schriever-Abeln J, Wendt A, Gebre-Medhin S, Renstrom E, Rorsman P (2002) Delay between fusion pore opening and peptide release from large dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *Neuron* 33:287-299.
- Bataille D (2002) [Molecular mechanisms of insulin secretion]. *Diabetes Metab* 28:4S7-13.

- Bayer MJ, Reese C, Buhler S, Peters C, Mayer A (2003) Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel. *J Cell Biol* 162:211-222.
- Bernal-Mizrachi E, Fatrai S, Johnson JD, Ohsugi M, Otani K, Han Z, Polonsky KS, Permutt MA (2004) Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet beta cells. *J Clin Invest* 114:928-936.
- Betz WJ, Mao F, Smith CB (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:365-371.
- Blatch GL, Lassel M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21:932-939.
- Block MR, Glick BS, Wilcox CA, Wieland FT, Rothman JE (1988) Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7852-7856.
- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH (2001) A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409:839-841.
- Bollmann JH, Sakmann B, Borst JG (2000) Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science* 289:953-957.
- Bommert K, Charlton MP, DeBello WM, Chin GJ, Betz H, Augustine GJ (1993) Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature* 363:163-165.
- Borge PD, Moibi J, Greene SR, Trucco M, Young RA, Gao Z, Wolf BA (2002) Insulin receptor signaling and sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in beta-cells. *Diabetes* 51 Suppl 3:S427-433.
- Bradbury NA (2000) Focus on "Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR". *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C257-258.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Braun JE, Scheller RH (1995) Cysteine string protein, a DnaJ family member, is present on diverse secretory vesicles. *Neuropharmacology* 34:1361-1369.
- Braun JE, Wilbanks SM, Scheller RH (1996) The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase. *J Biol Chem* 271:25989-25993.
- Braun M, Wendt A, Birnir B, Broman J, Eliasson L, Galvanovskis J, Gromada J, Mulder H, Rorsman P (2004) Regulated exocytosis of GABA-containing synaptic-like microvesicles in pancreatic beta-cells. *J Gen Physiol* 123:191-204.
- Brazil DP, Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26:657-664.
- Broadie K, Prokop A, Bellen HJ, O'Kane CJ, Schulze KL, Sweeney ST (1995) Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*. *Neuron* 15:663-673.
- Brown H, Larsson O, Branstrom R, Yang SN, Leibiger B, Leibiger I, Fried G, Moede T, Deeney JT, Brown GR, Jacobsson G, Rhodes CJ, Braun JE, Scheller RH, Corkey BE, Berggren PO, Meister B (1998) Cysteine string protein (CSP) is an insulin secretory granule-associated protein regulating beta-cell exocytosis. *Embo J* 17:5048-5058.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
- Burgoyne RD, Morgan A (2003) Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83:581-632.

C

- Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG (1993) Eukaryotic homologues of Escherichia coli dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol Biol Cell* 4:555-563.
- Ceccarelli B, Hurlbut WP, Mauro A (1973) Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57:499-524.
- Chamberlain LH, Burgoyne RD (1996) Identification of a novel cysteine string protein variant and expression of cysteine string proteins in non-neuronal cells. *J Biol Chem* 271:7320-7323.
- Chamberlain LH, Burgoyne RD (1997a) The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins. *J Biol Chem* 272:31420-31426.
- Chamberlain LH, Burgoyne RD (1997b) Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine-string protein. *Biochem J* 322:853-858.
- Chamberlain LH, Burgoyne RD (1998a) The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting. *Biochem J* 335:205-209.
- Chamberlain LH, Burgoyne RD (1998b) Cysteine string protein functions directly in regulated exocytosis. *Mol Biol Cell* 9:2259-2267.
- Chamberlain LH, Burgoyne RD (2000) Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *J Neurochem* 74:1781-1789.
- Chamberlain LH, Henry J, Burgoyne RD (1996) Cysteine string proteins are associated with chromaffin granules. *J Biol Chem* 271:19514-19517.
- Chamberlain LH, Graham ME, Kane S, Jackson JL, Maier VH, Burgoyne RD, Gould GW (2001) The synaptic vesicle protein, cysteine-string protein, is associated with the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes and interacts with syntaxin 4. *J Cell Sci* 114:445-455.
- Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123:383-396.
- Chanturiya A, Chernomordik LV, Zimmerberg J (1997) Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14423-14428.
- Chapman ER (2002) Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:498-508.
- Chapman ER, Jahn R (1994) Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *J Biol Chem* 269:5735-5741.
- Chapman ER, Hanson PI, An S, Jahn R (1995) Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 270:23667-23671.
- Cheatham B, Kahn CR (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16:117-142.
- Chen S, Zheng X, Schulze KL, Morris T, Bellen H, Stanley EF (2002) Enhancement of presynaptic calcium current by cysteine string protein. *J Physiol* 538:383-389.
- Cheviet S, Coppola T, Regazzi R (2005) Functional assays for the investigation of the role of Rab GTPase effectors in dense core granule release. *Methods Enzymol* 403:57-71.
- Chieriegatti E, Chicka MC, Chapman ER, Baldini G (2004) SNAP-23 functions in docking/fusion of granules at low Ca²⁺. *Mol Biol Cell* 15:1918-1930.
- Clary DO, Griff IC, Rothman JE (1990) SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61:709-721.

Cziepluch C, Kordes E, Poirey R, Grewenig A, Rommelaere J, Jauniaux JC (1998) Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. *J Virol* 72:4149-4156.

D

Dalle S, Longuet C, Costes S, Broca C, Faruque O, Fontes G, Hani el H, Bataille D (2004) Glucagon promotes cAMP-response element-binding protein phosphorylation via activation of ERK1/2 in MIN6 cell line and isolated islets of Langerhans. *J Biol Chem* 279:20345-20355.

D'Andrea LD, Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28:655-662.

Davalli AM, Biancardi E, Pollo A, Socci C, Pontiroli AE, Pozza G, Clementi F, Sher E, Carbone E (1996) Dihydropyridine-sensitive and -insensitive voltage-operated calcium channels participate in the control of glucose-induced insulin release from human pancreatic beta cells. *J Endocrinol* 150:195-203.

Davletov BA, Sudhof TC (1993) A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J Biol Chem* 268:26386-26390.

De Haro L, Quetglas S, Iborra C, Leveque C, Seagar M (2003) Calmodulin-dependent regulation of a lipid binding domain in the v-SNARE synaptobrevin and its role in vesicular fusion. *Biol Cell* 95:459-464.

Dean PM (1973) Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell. *Diabetologia* 9:115-119.

Debuyser A, Drews G, Henquin JC (1991) Adrenaline inhibition of insulin release: role of cyclic AMP. *Mol Cell Endocrinol* 78:179-186.

Dickson LM, Rhodes CJ (2004) Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E192-198.

Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB, Myers MG, Jr., Rhodes CJ (2001) Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 276:21110-21120.

Dodson G, Steiner D (1998) The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* 8:189-194.

Donelan MJ, Morfini G, Julyan R, Sommers S, Hays L, Kajio H, Briaud I, Easom RA, Molkentin JD, Brady ST, Rhodes CJ (2002) Ca²⁺-dependent dephosphorylation of kinesin heavy chain on beta-granules in pancreatic beta-cells. Implications for regulated beta-granule transport and insulin exocytosis. *J Biol Chem* 277:24232-24242.

Duman JG, Forte JG (2003) What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C237-249.

E

Eberhard DA, Cooper CL, Low MG, Holz RW (1990) Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. *Biochem J* 268:15-25.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.

- Elferink LA, Trimble WS, Scheller RH (1989) Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *J Biol Chem* 264:11061-11064.
- Elferink LA, Peterson MR, Scheller RH (1993) A role for synaptotagmin (p65) in regulated exocytosis. *Cell* 72:153-159.
- Elghazi L, Balcazar N, Bernal-Mizrachi E (2006) Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. *Int J Biochem Cell Biol* 38:157-163.
- Eliasson L, Renstrom E, Ding WG, Proks P, Rorsman P (1997) Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca(2+)-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 503 (Pt 2):399-412.
- Ellis S, Killender M, Anderson RL (2000) Heat-induced alterations in the localization of HSP72 and HSP73 as measured by indirect immunohistochemistry and immunogold electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 48:321-332.
- Evans GJ, Morgan A (2002) Phosphorylation-dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagmin I. *Biochem J* 364:343-347.
- Evans GJ, Morgan A (2005) Phosphorylation of cysteine string protein in the brain: developmental, regional and synaptic specificity. *Eur J Neurosci* 21:2671-2680.
- Evans GJ, Morgan A, Burgoyne RD (2003) Tying everything together: the multiple roles of cysteine string protein (CSP) in regulated exocytosis. *Traffic* 4:653-659.
- Evans GJ, Wilkinson MC, Graham ME, Turner KM, Chamberlain LH, Burgoyne RD, Morgan A (2001) Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis. *J Biol Chem* 276:47877-47885.
- Evans GJ, Barclay JW, Prescott GR, Jo SR, Burgoyne RD, Birnbaum MJ, Morgan A (2006) Protein kinase B/Akt is a novel cysteine string protein kinase that regulates exocytosis release kinetics and quantal size. *J Biol Chem* 281:1564-1572.
- Eybalin M, Renard N, Aure F, Safieddine S (2002) Cysteine-string protein in inner hair cells of the organ of Corti: synaptic expression and upregulation at the onset of hearing. *Eur J Neurosci* 15:1409-1420.

F

- Fasshauer D (2003) Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1641:87-97.
- Fasshauer D, Eliason WK, Brunger AT, Jahn R (1998a) Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry* 37:10354-10362.
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R (1998b) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15781-15786.
- Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, Jahn R, Brunger AT (1997) Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* 272:28036-28041.
- Fergestad T, Davis WS, Broadie K (1999) The stoned proteins regulate synaptic vesicle recycling in the presynaptic terminal. *J Neurosci* 19:5847-5860.
- Fernandez I, Arac D, Ubach J, Gerber SH, Shin O, Gao Y, Anderson RG, Sudhof TC, Rizo J (2001) Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32:1057-1069.
- Fernandez-Chacon R, Wolfel M, Nishimune H, Tabares L, Schmitz F, Castellano-Munoz M, Rosenmund C, Montesinos ML, Sanes JR, Schneggenburger R, Sudhof TC (2004)

- The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. *Neuron* 42:237-251.
- Fiebig KM, Rice LM, Pollock E, Brunger AT (1999) Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol* 6:117-123.
- Fink AL (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79:425-449.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Fishburn CS, Pollitt SK, Bourne HR (2000) Localization of a peripheral membrane protein: Gbetagamma targets Galpha(Z). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1085-1090.
- Fisher TE, Bourque CW (2001) The function of Ca(2+) channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. *Prog Biophys Mol Biol* 77:269-303.
- Fletcher S, Bowden SE, Marrion NV (2003) False interaction of syntaxin 1A with a Ca(2+)-activated K(+) channel revealed by co-immunoprecipitation and pull-down assays: implications for identification of protein-protein interactions. *Neuropharmacology* 44:817-827.
- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93:97-102.
- Fukasawa M, Varlamov O, Eng WS, Sollner TH, Rothman JE (2004) Localization and activity of the SNARE Ykt6 determined by its regulatory domain and palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4815-4820.
- Fukuda M (2004) RNA interference-mediated silencing of synaptotagmin IX, but not synaptotagmin I, inhibits dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Biochem J* 380:875-879.

G

- Gagescu R, Demaurex N, Parton RG, Hunziker W, Huber LA, Gruenberg J (2000) The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell* 11:2775-2791.
- Galli T, Zahraoui A, Vaidyanathan VV, Raposo G, Tian JM, Karin M, Niemann H, Louvard D (1998) A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9:1437-1448.
- Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, Takei K, De Camilli P, Hammer RE, Südhof TC (1994) The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 369:493-497.
- Gerich JE (2002) Is reduced first-phase insulin release the earliest detectable abnormality in individuals destined to develop type 2 diabetes? *Diabetes* 51 Suppl 1:S117-121.
- Gerona RR, Larsen EC, Kowalchuk JA, Martin TF (2000) The C terminus of SNAP25 is essential for Ca(2+)-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J Biol Chem* 275:6328-6336.
- Gerst JE (2003) SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim Biophys Acta* 1641:99-110.
- Gilon P, Henquin JC (2001) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 22:565-604.
- Gleave TL, Beechey RB, Burgoyne RD (2001) Cysteine string protein expression in mammary epithelial cells. *Pflugers Arch* 441:639-649.

- Gonelle-Gispert C, Costa M, Takahashi M, Sadoul K, Halban P (2002) Phosphorylation of SNAP-25 on serine-187 is induced by secretagogues in insulin-secreting cells, but is not correlated with insulin secretion. *Biochem J* 368:223-232.
- Gonelle-Gispert C, Halban PA, Niemann H, Palmer M, Catsicas S, Sadoul K (1999) SNAP-25a and -25b isoforms are both expressed in insulin-secreting cells and can function in insulin secretion. *Biochem J* 339 (Pt 1):159-165.
- Gonzalo S, Greentree WK, Linder ME (1999) SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. *J Biol Chem* 274:21313-21318.
- Gorczyca M, Augart C, Budnik V (1993) Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. *J Neurosci* 13:3692-3704.
- Graham ME, Burgoyne RD (2000) Comparison of cysteine string protein (Csp) and mutant alpha-SNAP overexpression reveals a role for csp in late steps of membrane fusion in dense-core granule exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 20:1281-1289.
- Grigliatti TA, Hall L, Rosenbluth R, Suzuki DT (1973) Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol Gen Genet* 120:107-114.
- Gromada J, Holst JJ, Rorsman P (1998) Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Pflugers Arch* 435:583-594.
- Gundersen CB, Umbach JA (1992) Suppression cloning of the cDNA for a candidate subunit of a presynaptic calcium channel. *Neuron* 9:527-537.
- Gundersen CB, Mastrogiacomo A, Umbach JA (1995) Cysteine-string proteins as templates for membrane fusion: models of synaptic vesicle exocytosis. *J Theor Biol* 172:269-277.
- Gundersen CB, Mastrogiacomo A, Faull K, Umbach JA (1994) Extensive lipidation of a Torpedo cysteine string protein. *J Biol Chem* 269:19197-19199.
- Gut A, Kiraly CE, Fukuda M, Mikoshiba K, Wollheim CB, Lang J (2001) Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* 114:1709-1716.

H

- Hata Y, Slaughter CA, Sudhof TC (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366:347-351.
- Hay JC, Martin TF (1992) Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. *J Cell Biol* 119:139-151.
- Hay JC, Fiset PL, Jenkins GH, Fukami K, Takenawa T, Anderson RA, Martin TF (1995) ATP-dependent inositolide phosphorylation required for Ca²⁺-activated secretion. *Nature* 374:173-177.
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Sudhof TC, Niemann H (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *Embo J* 13:5051-5061.
- Henquin JC (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49:1751-1760.
- Hepp R, Cabaniols JP, Roche PA (2002) Differential phosphorylation of SNAP-25 in vivo by protein kinase C and protein kinase A. *FEBS Lett* 532:52-56.
- Heymann JB, Iwasaki K, Yim YI, Cheng N, Belnap DM, Greene LE, Eisenberg E, Steven AC (2005) Visualization of the binding of Hsc70 ATPase to clathrin baskets: implications for an uncoating mechanism. *J Biol Chem* 280:7156-7161.

- Hill RB, Flanagan JM, Prestegard JH (1995) ^1H and ^{15}N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of *Escherichia coli* DnaJ(1-78). *Biochemistry* 34:5587-5596.
- Hohfeld J, Cyr DM, Patterson C (2001) From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* 2:885-890.
- Holz RW, Bittner MA, Peppers SC, Senter RA, Eberhard DA (1989) MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. *J Biol Chem* 264:5412-5419.
- Hommelgaard AM, Roepstorff K, Vilhardt F, Torgersen ML, Sandvig K, van Deurs B (2005) Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization. *Traffic* 6:720-724.
- Hsu CC, Davis KM, Jin H, Foos T, Floor E, Chen W, Tyburski JB, Yang CY, Schloss JV, Wu JY (2000) Association of L-glutamic acid decarboxylase to the 70-kDa heat shock protein as a potential anchoring mechanism to synaptic vesicles. *J Biol Chem* 275:20822-20828.
- Hsu SC, Hazuka CD, Foletti DL, Scheller RH (1999) Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol* 9:150-153.
- Hsu SC, Ting AE, Hazuka CD, Davanger S, Kenny JW, Kee Y, Scheller RH (1996) The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* 17:1209-1219.
- Hu K, Carroll J, Rickman C, Davletov B (2002) Action of complexin on SNARE complex. *J Biol Chem* 277:41652-41656.
- Huang X, Kang YH, Pasyk EA, Sheu L, Wheeler MB, Trimble WS, Salapatek A, Gaisano HY (2001) Ca^{2+} influx and cAMP elevation overcame botulinum toxin A but not tetanus toxin inhibition of insulin exocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C740-750.
- Huang XF, Arvan P (1995) Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J Biol Chem* 270:20417-20423.
- Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B (2000) How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* 82:427-446.
- Huypens P, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F (2000) Glucagon receptors on human islet cells contribute to glucose competence of insulin release. *Diabetologia* 43:1012-1019.

I

- Iezzi M, Kouri G, Fukuda M, Wollheim CB (2004) Synaptotagmin V and IX isoforms control Ca^{2+} -dependent insulin exocytosis. *J Cell Sci* 117:3119-3127.
- Iezzi M, Escher G, Meda P, Charollais A, Baldini G, Darchen F, Wollheim CB, Regazzi R (1999) Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells. *Mol Endocrinol* 13:202-212.
- In't Veld PA, Pipeleers-Marichal M, Pipeleers DG (1990) Les îlots de Langerhans. *Traité de diabétologie*.

J

- Jacobsson G, Bean AJ, Scheller RH, Juntti-Berggren L, Deeney JT, Berggren PO, Meister B (1994) Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12487-12491.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.

- Jarousse N, Kelly RB (2001) Endocytotic mechanisms in synapses. *Curr Opin Cell Biol* 13:461-469.
- Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, Sha D, Floor E, Hsu CC, Kopke RD, Wu JY (2003) Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4293-4298.
- Jing X, Li DQ, Olofsson CS, Salehi A, Surve VV, Caballero J, Ivarsson R, Lundquist I, Pereverzev A, Schneider T, Rorsman P, Renstrom E (2005) CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* 115:146-154.
- Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schurmann A, Seino S, Thorens B (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E974-976.

K

- Kang Y, Huang X, Pasyk EA, Ji J, Holz GG, Wheeler MB, Tsushima RG, Gaisano HY (2002) Syntaxin-3 and syntaxin-1A inhibit L-type calcium channel activity, insulin biosynthesis and exocytosis in beta-cell lines. *Diabetologia* 45:231-241.
- Kasai K, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Mizutani S, Zhao S, Kikuta T, Kasai H, Nagamatsu S, Gomi H, Izumi T (2005) Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J Clin Invest* 115:388-396.
- Kelly RB (1985) Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230:25-32.
- Kennedy ED, Maechler P, Wollheim CB (1998) Effects of depletion of mitochondrial DNA in metabolism secretion coupling in INS-1 cells. *Diabetes* 47:374-380.
- Klenchin VA, Martin TF (2000) Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* 82:399-407.
- Kohan SA, Pescatori M, Brecha NC, Mastrogiacomo A, Umbach JA, Gundersen CB (1995) Cysteine string protein immunoreactivity in the nervous system and adrenal gland of rat. *J Neurosci* 15:6230-6238.
- Kosaka T, Ikeda K (1983) Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J Cell Biol* 97:499-507.
- Kuliawat R, Kalinina E, Bock J, Fricker L, McGraw TE, Kim SR, Zhong J, Scheller R, Arvan P (2004) Syntaxin-6 SNARE involvement in secretory and endocytic pathways of cultured pancreatic beta-cells. *Mol Biol Cell* 15:1690-1701.

L

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lajus S, Vacher P, Huber D, Dubois M, Benassy MN, Ushkaryov Y, Lang J (2005) alpha - Latrotoxin induces exocytosis by inhibition of voltage-dependent K⁺ channels and by stimulation of L-type Ca²⁺ channels via full-length latrophilin in beta -cells. *J Biol Chem*.
- Lakey JR, Burridge PW, Shapiro AM (2003) Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int* 16:613-632.
- Lang J (2003) PIPs and pools in insulin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 14:297-299.

- Lang J, Regazzi R, Wollheim CB (1997a) Clostridial toxins and endocrine secretion: their use in insulin-secreting cells. Ed K Aktories, Chapman & Hall (Weinheim).
- Lang J, Fukuda M, Zhang H, Mikoshiba K, Wollheim CB (1997b) The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. *Embo J* 16:5837-5846.
- Lang J, Zhang H, Vaidyanathan VV, Sadoul K, Niemann H, Wollheim CB (1997c) Transient expression of botulinum neurotoxin C1 light chain differentially inhibits calcium and glucose induced insulin secretion in clonal beta-cells. *FEBS Lett* 419:13-17.
- Lang J, Nishimoto I, Okamoto T, Regazzi R, Kiraly C, Weller U, Wollheim CB (1995) Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases Gi and G(o) or by the expression of their active G alpha subunits. *Embo J* 14:3635-3644.
- Leveque C, Boudier JA, Takahashi M, Seagar M (2000) Calcium-dependent dissociation of synaptotagmin from synaptic SNARE complexes. *J Neurochem* 74:367-374.
- Leveque C, Pupier S, Marqueze B, Geslin L, Kataoka M, Takahashi M, De Waard M, Seagar M (1998) Interaction of cysteine string proteins with the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *J Biol Chem* 273:13488-13492.
- Levi A, Eldridge JD, Paterson BM (1985) Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* 229:393-395.
- Li J, Smith GP, Walker JC (1999) Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7821-7826.
- Ligon B, Boyd AE, 3rd, Dunlap K (1998) Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J Biol Chem* 273:13905-13911.
- Lindau M, Alvarez de Toledo G (2003) The fusion pore. *Biochim Biophys Acta* 1641:167-173.
- Link E, Edelmann L, Chou JH, Binz T, Yamasaki S, Eisel U, Baumert M, Sudhof TC, Niemann H, Jahn R (1992) Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1017-1023.
- Littleton JT, Barnard RJ, Titus SA, Slind J, Chapman ER, Ganetzky B (2001) SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12233-12238.

M

- Magga JM, Jarvis SE, Arnot MI, Zamponi GW, Braun JE (2000) Cysteine string protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels. *Neuron* 28:195-204.
- Mankovsky BN, Ziegler D (2004) Stroke in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 20:268-287.
- Martin TF (1989) Cell cracking: permeabilizing cells to macromolecular probes. *Methods Enzymol* 168:225-233.
- Martin TF, Walent JH (1989) A new method for cell permeabilization reveals a cytosolic protein requirement for Ca²⁺-activated secretion in GH3 pituitary cells. *J Biol Chem* 264:10299-10308.
- Martin TF, Kowalchuk JA (1997) Docked secretory vesicles undergo Ca²⁺-activated exocytosis in a cell-free system. *J Biol Chem* 272:14447-14453.
- Martinez-Padron M, Ferrus A (1997) Presynaptic recordings from *Drosophila*: correlation of macroscopic and single-channel K⁺ currents. *J Neurosci* 17:3412-3424.
- Mastrogiacomo A, Gundersen CB (1995) The nucleotide and deduced amino acid sequence of a rat cysteine string protein. *Brain Res Mol Brain Res* 28:12-18.

- Mastrogriacomo A, Kornblum HI, Umbach JA, Gundersen CB (1998a) A *Xenopus* cysteine string protein with a cysteine residue in the J domain. *Biochim Biophys Acta* 1401:239-241.
- Mastrogriacomo A, Kohan SA, Whitelegge JP, Gundersen CB (1998b) Intrinsic membrane association of *Drosophila* cysteine string proteins. *FEBS Lett* 436:85-91.
- Mastrogriacomo A, Parsons SM, Zampighi GA, Jenden DJ, Umbach JA, Gundersen CB (1994) Cysteine string proteins: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca²⁺ channels. *Science* 263:981-982.
- Matos MF, Rizo J, Sudhof TC (2000) The relation of protein binding to function: what is the significance of munc18 and synaptotagmin binding to syntaxin 1, and where are the corresponding binding sites? *Eur J Cell Biol* 79:377-382.
- Matschinsky FM (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39:647-652.
- Matthew WD, Tsavaler L, Reichardt LF (1981) Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *J Cell Biol* 91:257-269.
- Mayer A (2001) What drives membrane fusion in eukaryotes? *Trends Biochem Sci* 26:717-723.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870-876.
- McMahon HT, Sudhof TC (1995) Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site. *J Biol Chem* 270:2213-2217.
- McMahon HT, Missler M, Li C, Sudhof TC (1995) Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* 83:111-119.
- Mehta PP, Battenberg E, Wilson MC (1996) SNAP-25 and synaptotagmin involvement in the final Ca²⁺-dependent triggering of neurotransmitter exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10471-10476.
- Melloul D, Marshak S, Cerasi E (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45:309-326.
- Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P (2004) Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145:667-678.
- Michael DJ, Geng X, Cawley NX, Loh YP, Rhodes CJ, Drain P, Chow RH (2004) Fluorescent cargo proteins in pancreatic beta-cells: design determines secretion kinetics at exocytosis. *Biophys J* 87:L03-05.
- Miller JN (2005) Fluorescence energy transfer methods in bioanalysis. *Analyst* 130:265-270.
- Miller LC, Swayne LA, Kay JG, Feng ZP, Jarvis SE, Zamponi GW, Braun JE (2003a) Molecular determinants of cysteine string protein modulation of N-type calcium channels. *J Cell Sci* 116:2967-2974.
- Miller LC, Swayne LA, Chen L, Feng ZP, Wacker JL, Muchowski PJ, Zamponi GW, Braun JE (2003b) Cysteine string protein (CSP) inhibition of N-type calcium channels is blocked by mutant huntingtin. *J Biol Chem* 278:53072-53081.
- Minami K, Yano H, Miki T, Nagashima K, Wang CZ, Tanaka H, Miyazaki JI, Seino S (2000) Insulin secretion and differential gene expression in glucose-responsive and -unresponsive MIN6 sublines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E773-781.
- Misura KM, Scheller RH, Weis WI (2000) Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404:355-362.
- Molinete M, Irminger JC, Tooze SA, Halban PA (2000) Trafficking/sorting and granule biogenesis in the beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* 11:243-251.

- Moller DE (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414:821-827.
- Monterrat C, Boal F, Grise F, Hemar A, Lang J (2006) Synaptotagmin 8 is expressed both as a calcium-insensitive soluble and membrane protein in neurons, neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* 1763:73-81.
- Moore JM, Papke JB, Cahill AL, Harkins AB (2006) Stable Gene Silencing of Synaptotagmin I in Rat PC12 Cells Inhibits Ca²⁺-Evoked Release of Catecholamine. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Morales M, Ferrus A, Martinez-Padron M (1999) Presynaptic calcium-channel currents in normal and csp mutant *Drosophila* peptidergic terminals. *Eur J Neurosci* 11:1818-1826.
- Morgan A, Burgoyne RD (1995) Is NSF a fusion protein? *Trends Cell Biol* 5:335-339.
- Morgan A, Burgoyne RD (2004) Membrane traffic: controlling membrane fusion by modifying NSF. *Curr Biol* 14:R968-970.
- Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377:1-16.
- Muchowski PJ (2002) Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? *Neuron* 35:9-12.
- Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2000) Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7841-7846.
- Mundigl O, Matteoli M, Daniell L, Thomas-Reetz A, Metcalf A, Jahn R, De Camilli P (1993) Synaptic vesicle proteins and early endosomes in cultured hippocampal neurons: differential effects of Brefeldin A in axon and dendrites. *J Cell Biol* 122:1207-1221.

N

- Nagy G, Reim K, Matti U, Brose N, Binz T, Rettig J, Neher E, Sorensen JB (2004) Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41:417-429.
- Nam SH, Walsh MK (2002) Affinity purification and characterization of the *Escherichia coli* molecular chaperones. *Protein Expr Purif* 24:282-291.
- Neher E, Marty A (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:6712-6716.
- Nesher R, Cerasi E (2002) Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* 51 Suppl 1:S53-59.
- Nesher R, Anteby E, Yedovizky M, Warwar N, Kaiser N, Cerasi E (2002) Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. *Diabetes* 51 Suppl 1:S68-73.
- Nicoll WS, Boshoff A, Ludewig MH, Hennessy F, Jung M, Blatch GL (2006) Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones. *Protein Expr Purif* 46:1-15.
- Nie Z, Ranjan R, Wenniger JJ, Hong SN, Bronk P, Zinsmaier KE (1999) Overexpression of cysteine-string proteins in *Drosophila* reveals interactions with syntaxin. *J Neurosci* 19:10270-10279.
- Norris EH, Giasson BI, Lee VM (2004) Alpha-synuclein: normal function and role in neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol* 60:17-54.
- Novick P, Schekman R (1979) Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1858-1862.

Novick P, Field C, Schekman R (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21:205-215.

O

Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-867.

Olofsson CS, Gopel SO, Barg S, Galvanovskis J, Ma X, Salehi A, Rorsman P, Eliasson L (2002) Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 444:43-51.

Olsen HL, Hoy M, Zhang W, Bertorello AM, Bokvist K, Capito K, Efanov AM, Meister B, Thams P, Yang SN, Rorsman P, Berggren PO, Gromada J (2003) Phosphatidylinositol 4-kinase serves as a metabolic sensor and regulates priming of secretory granules in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5187-5192.

Orci L, Amherdt M, Malaisse-Lagae F, Rouiller C, Renold AE (1973) Insulin release by emiocytosis: demonstration with freeze-etching technique. *Science* 179:82-84.

P

Pabst S, Margittai M, Vainius D, Langen R, Jahn R, Fasshauer D (2002) Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis. *J Biol Chem* 277:7838-7848.

Pallanck L, Ordway RW, Ganetzky B (1995) A *Drosophila* NSF mutant. *Nature* 376:25.

Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1998) ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *Embo J* 17:4829-4836.

Pereira-Leal JB, Seabra MC (2000) The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol* 301:1077-1087.

Perin MS, Brose N, Jahn R, Sudhof TC (1991) Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem* 266:623-629.

Peters C, Mayer A (1998) Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* 396:575-580.

Peters C, Bayer MJ, Buhler S, Andersen JS, Mann M, Mayer A (2001) Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409:581-588.

Pfanner N, Orci L, Glick BS, Amherdt M, Arden SR, Malhotra V, Rothman JE (1989) Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell* 59:95-102.

Philippe J, Pacheco I, Meda P (1994) Insulin gene transcription is decreased rapidly by lowering glucose concentrations in rat islet cells. *Diabetes* 43:523-528.

Poitout V, Olson LK, Robertson RP (1996) Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications. *Diabetes Metab* 22:7-14.

Possenti R, Rinaldi AM, Ferri GL, Borboni P, Trani E, Levi A (1999) Expression, processing, and secretion of the neuroendocrine VGF peptides by INS-1 cells. *Endocrinology* 140:3727-3735.

Poulain B, Humeau Y (2003) [Mode of action of botulinum neurotoxin: pathological, cellular and molecular aspect]. *Ann Readapt Med Phys* 46:265-275.

- Pratley RE, Weyer C (2001) The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 44:929-945.
- Proks P, Eliasson L, Ammala C, Rorsman P, Ashcroft FM (1996) Ca²⁺- and GTP-dependent exocytosis in mouse pancreatic beta-cells involves both common and distinct steps. *J Physiol* 496 (Pt 1):255-264.
- Pupier S, Leveque C, Marqueze B, Kataoka M, Takahashi M, Seagar MJ (1997) Cysteine string proteins associated with secretory granules of the rat neurohypophysis. *J Neurosci* 17:2722-2727.

Q

- Quetglas S, Leveque C, Miquelis R, Sato K, Seagar M (2000) Ca²⁺-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9695-9700.
- Quetglas S, Iborra C, Sasakawa N, De Haro L, Kumakura K, Sato K, Leveque C, Seagar M (2002) Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *Embo J* 21:3970-3979.

R

- Ranjan R, Bronk P, Zinsmaier KE (1998) Cysteine string protein is required for calcium secretion coupling of evoked neurotransmission in drosophila but not for vesicle recycling. *J Neurosci* 18:956-964.
- Regazzi R, Wollheim CB, Lang J, Theler JM, Rossetto O, Montecucco C, Sadoul K, Weller U, Palmer M, Thorens B (1995) VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for Ca²⁺-but not for GTP gamma S-induced insulin secretion. *Embo J* 14:2723-2730.
- Richter K, Buchner J (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* 188:281-290.
- Rickman C, Davletov B (2003) Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs. *J Biol Chem* 278:5501-5504.
- Rickman C, Craxton M, Osborne S, Davletov B (2004) Comparative analysis of tandem C2 domains from the mammalian synaptotagmin family. *Biochem J* 378:681-686.
- Ritossa F (1996) Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1:97-98.
- Rorsman P, Renstrom E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1029-1045.
- Rorsman P, Eliasson L, Renstrom E, Gromada J, Barg S, Gopel S (2000) The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 15:72-77.
- Rudiger S, Schneider-Mergener J, Bukau B (2001) Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *Embo J* 20:1042-1050.

S

- Sadoul K, Lang J, Montecucco C, Weller U, Regazzi R, Catsicas S, Wollheim CB, Halban PA (1995) SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. *J Cell Biol* 128:1019-1028.
- Sakahira H, Breuer P, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2002) Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4:16412-16418.

- Sakisaka T, Meerlo T, Matteson J, Plutner H, Balch WE (2002) Rab-alphaGDI activity is regulated by a Hsp90 chaperone complex. *Embo J* 21:6125-6135.
- Salton SR, Ferri GL, Hahm S, Snyder SE, Wilson AJ, Possenti R, Levi A (2000) VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 21:199-219.
- Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101:199-210.
- Schiavo G, Stenbeck G, Rothman JE, Sollner TH (1997) Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:997-1001.
- Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, Scheller RH, Montecucco C (1995) Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* 270:10566-10570.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359:832-835.
- Schimmoller F, Simon I, Pfeffer SR (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* 273:22161-22164.
- Schneggenburger R, Neher E (2000) Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature* 406:889-893.
- Schuit F, Flamez D, De Vos A, Pipeleers D (2002) Glucose-regulated gene expression maintaining the glucose-responsive state of beta-cells. *Diabetes* 51 Suppl 3:S326-332.
- Seagar M, Leveque C, Charvin N, Marqueze B, Martin-Moutot N, Boudier JA, Boudier JL, Shoji-Kasai Y, Sato K, Takahashi M (1999) Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:289-297.
- Sha B, Lee S, Cyr DM (2000) The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1. *Structure* 8:799-807.
- Shi Y, Kanaani J, Menard-Rose V, Ma YH, Chang PY, Hanahan D, Tobin A, Grodsky G, Baekkeskov S (2000) Increased expression of GAD65 and GABA in pancreatic beta-cells impairs first-phase insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E684-694.
- Shigematsu S, Watson RT, Khan AH, Pessin JE (2003) The adipocyte plasma membrane caveolin functional/structural organization is necessary for the efficient endocytosis of GLUT4. *J Biol Chem* 278:10683-10690.
- Shimazaki Y, Nishiki T, Omori A, Sekiguchi M, Kamata Y, Kozaki S, Takahashi M (1996) Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release. *J Biol Chem* 271:14548-14553.
- Shin OH, Maximov A, Lim BK, Rizo J, Sudhof TC (2004) Unexpected Ca²⁺-binding properties of synaptotagmin 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2554-2559.
- Sivaram MV, Saporita JA, Furgason ML, Boettcher AJ, Munson M (2005) Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry* 44:6302-6311.

- Snyder SE, Peng B, Pintar JE, Salton SR (2003) Expression of VGF mRNA in developing neuroendocrine and endocrine tissues. *J Endocrinol* 179:227-235.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993a) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409-418.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993b) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318-324.
- Stahl B, Tobaben S, Sudhof TC (1999) Two distinct domains in hsc70 are essential for the interaction with the synaptic vesicle cysteine string protein. *Eur J Cell Biol* 78:375-381.
- Steyer JA, Almers W (2001) A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:268-275.
- Sutton RB, Ernst JA, Brunger AT (1999) Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. *J Cell Biol* 147:589-598.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347-353.
- Sutton RB, Davletov BA, Berghuis AM, Sudhof TC, Sprang SR (1995) Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* 80:929-938.

T

- Takei K, Haucke V (2001) Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol* 11:385-391.
- Taniguchi H, Okada Y, Shimada C, Baba S (1977) GABA in pancreatic islets. *Arch Histol Jpn* 40 Suppl:87-97.
- Thomas-Reetz AC, De Camilli P (1994) A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic beta cells and from chromaffin cells. *Faseb J* 8:209-216.
- Tiedge M, Lenzen S (1991) Regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose-transporter gene expression in pancreatic B-cells. *Biochem J* 279 (Pt 3):899-901.
- Tobaben S, Varoqueaux F, Brose N, Stahl B, Meyer G (2003) A brain specific isoform of small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein (SGT) binds to Hsc70 and the cysteine string protein. *J Biol Chem* 278:23232-23240.
- Tobaben S, Thakur P, Fernandez-Chacon R, Sudhof TC, Rettig J, Stahl B (2001) A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* 31:987-999.
- Toutain CM, Clarke DJ, Leeds JA, Kuhn J, Beckwith J, Holland IB, Jacq A (2003) The transmembrane domain of the DnaJ-like protein Dj1A is a dimerisation domain. *Mol Genet Genomics* 268:761-770.
- Tsuboi T, Ravier MA, Xie H, Ewart MA, Gould GW, Baldwin SA, Rutter GA (2005) Mammalian exocyst complex is required for the docking step of insulin vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 280:25565-25570.

U

- Ullrich S, Wollheim CB (1988) GTP-dependent inhibition of insulin secretion by epinephrine in permeabilized RINm5F cells. Lack of correlation between insulin secretion and cyclic AMP levels. *J Biol Chem* 263:8615-8620.

- Umbach JA, Gundersen CB (1997) Evidence that cysteine string proteins regulate an early step in the Ca²⁺-dependent secretion of neurotransmitter at *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci* 17:7203-7209.
- Umbach JA, Saitoe M, Kidokoro Y, Gundersen CB (1998) Attenuated influx of calcium ions at nerve endings of *msp* and *shibire* mutant *Drosophila*. *J Neurosci* 18:3233-3240.
- Umbach JA, Zinsmaier KE, Eberle KK, Buchner E, Benzer S, Gundersen CB (1994) Presynaptic dysfunction in *Drosophila msp* mutants. *Neuron* 13:899-907.
- Ushkaryov YA, Volynski KE, Ashton AC (2004) The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon* 43:527-542.

V

- Vaidyanathan VV, Yoshino K, Jahnz M, Dorries C, Bade S, Nauenburg S, Niemann H, Binz T (1999) Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J Neurochem* 72:327-337.
- Vallar L, Biden TJ, Wollheim CB (1987) Guanine nucleotides induce Ca²⁺-independent insulin secretion from permeabilized RINm5F cells. *J Biol Chem* 262:5049-5056.
- van de Goor J, Kelly RB (1996) Association of *Drosophila* cysteine string proteins with membranes. *FEBS Lett* 380:251-256.
- van Tilburg J, van Haften TW, Pearson P, Wijmenga C (2001) Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus. *J Med Genet* 38:569-578.
- Varadi A, Tsuboi T, Rutter GA (2005) Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. *Mol Biol Cell* 16:2670-2680.
- Veit M (2000) Palmitoylation of the 25-kDa synaptosomal protein (SNAP-25) in vitro occurs in the absence of an enzyme, but is stimulated by binding to syntaxin. *Biochem J* 345 Pt 1:145-151.
- Vogel K, Cabaniols JP, Roche PA (2000) Targeting of SNAP-25 to membranes is mediated by its association with the target SNARE syntaxin. *J Biol Chem* 275:2959-2965.

W

- Waheed AA, Jones TL (2002) Hsp90 interactions and acylation target the G protein Galpha 12 but not Galpha 13 to lipid rafts. *J Biol Chem* 277:32409-32412.
- Walch-Solimena C, Takei K, Marek KL, Midyett K, Sudhof TC, De Camilli P, Jahn R (1993) Synaptotagmin: a membrane constituent of neuropeptide-containing large dense-core vesicles. *J Neurosci* 13:3895-3903.
- Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, Jackson MB (2001) Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 294:1111-1115.
- Wang H, Shen H, Wang Y, Li Z, Yin H, Zong H, Jiang J, Gu J (2005) Overexpression of small glutamine-rich TPR-containing protein promotes apoptosis in 7721 cells. *FEBS Lett* 579:1279-1284.
- Wang P, Wang CT, Bai J, Jackson MB, Chapman ER (2003) Mutations in the effector binding loops in the C2A and C2B domains of synaptotagmin I disrupt exocytosis in a nonadditive manner. *J Biol Chem* 278:47030-47037.
- Washbourne P, Cansino V, Mathews JR, Graham M, Burgoyne RD, Wilson MC (2001) Cysteine residues of SNAP-25 are required for SNARE disassembly and exocytosis, but not for membrane targeting. *Biochem J* 357:625-634.

- Waters MG, Hughson FM (2000) Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* 1:588-597.
- Welsh M, Brunstedt J, Hellerstrom C (1986) Effects of D-glucose, L-leucine, and 2-ketoisocaproate on insulin mRNA levels in mouse pancreatic islets. *Diabetes* 35:228-231.
- Wheeler MB, Sheu L, Ghai M, Bouquillon A, Grondin G, Weller U, Beaudoin AR, Bennett MK, Trimble WS, Gaisano HY (1996) Characterization of SNARE protein expression in beta cell lines and pancreatic islets. *Endocrinology* 137:1340-1348.
- Wiedemann C, Schafer T, Burger MM (1996) Chromaffin granule-associated phosphatidylinositol 4-kinase activity is required for stimulated secretion. *Embo J* 15:2094-2101.
- Wilson J, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (1998) *Williams Textbook Of Endocrinology*. Ed WB Saunders Company.
- Winnefeld M, Rommelaere J, Cziepluch C (2004) The human small glutamine-rich TPR-containing protein is required for progress through cell division. *Exp Cell Res* 293:43-57.

X

- Xu J, Paquet M, Lau AG, Wood JD, Ross CA, Hall RA (2001) beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95. *J Biol Chem* 276:41310-41317.

Y

- Yamada WM, Zucker RS (1992) Time course of transmitter release calculated from simulations of a calcium diffusion model. *Biophys J* 61:671-682.
- Yap KL, Ames JB, Swindells MB, Ikura M (1999) Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins* 37:499-507.
- Young JC, Obermann WM, Hartl FU (1998) Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J Biol Chem* 273:18007-18010.
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154:267-273.
- Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F (2003) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* 28:541-547.
- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:781-791.

Z

- Zenisek D, Steyer JA, Feldman ME, Almers W (2002) A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron* 35:1085-1097.
- Zhang H, Kelley WL, Chamberlain LH, Burgoyne RD, Lang J (1999) Mutational analysis of cysteine-string protein function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* 112:1345-1351.
- Zhang H, Kelley WL, Chamberlain LH, Burgoyne RD, Wollheim CB, Lang J (1998a) Cysteine-string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes. *FEBS Lett* 437:267-272.

- Zhang H, Peters KW, Sun F, Marino CR, Lang J, Burgoyne RD, Frizzell RA (2002) Cysteine string protein interacts with and modulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277:28948-28958.
- Zhang L, Zhang K, Prandl R, Schoffl F (2004) Detecting DNA-binding of proteins in vivo by UV-crosslinking and immunoprecipitation. *Biochem Biophys Res Commun* 322:705-711.
- Zhang W, Efanov A, Yang SN, Fried G, Kolare S, Brown H, Zaitsev S, Berggren PO, Meister B (2000) Munc-18 associates with syntaxin and serves as a negative regulator of exocytosis in the pancreatic beta -cell. *J Biol Chem* 275:41521-41527.
- Zhang X, Rizo J, Sudhof TC (1998b) Mechanism of phospholipid binding by the C2A-domain of synaptotagmin I. *Biochemistry* 37:12395-12403.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787.
- Zinsmaier KE, Bronk P (2001) Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis. *Biochem Pharmacol* 62:1-11.
- Zinsmaier KE, Eberle KK, Buchner E, Walter N, Benzer S (1994) Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*. *Science* 263:977-980.
- Zinsmaier KE, Hofbauer A, Heimbeck G, Pflugfelder GO, Buchner S, Buchner E (1990) A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of *Drosophila*. *J Neurogenet* 7:15-29.

RESUME

Les cellules β -pancréatiques sécrètent l'insuline par exocytose et ceci nécessite une co-chaperonne, la Csp (*Cysteine-string protein*) localisée sur les granules sécrétoires. Cette protéine contient un domaine J, homologue à la co-chaperonne bactérienne DnaJ, un domaine charnière, un domaine central riche en cystéines et souvent palmitoylé, et un domaine C-terminal, très variable entre les espèces. Pour mieux comprendre le rôle de la Csp dans le contrôle de la sécrétion d'insuline, nous avons recherché à caractériser ses partenaires protéiques. Nous avons mis en évidence ses interactions avec le complexe chaperon Hsc70/SGT, le senseur calcique synaptotagmine 9 ainsi que avec les protéines SNARE VAMP et SNAP25 et défini les domaines impliqués. En utilisant une nouvelle isoforme de la Csp nous avons pu également mettre en évidence le rôle potentiel de la palmitoylation dans son adressage sous-cellulaire. L'ensemble de ce travail améliore la connaissance globale du rôle de la Csp dans la sécrétion d'insuline et permet de proposer un modèle de sa fonction.

Mots clés : insuline, cellules β -pancréatiques, exocytose, calcium, *Cysteine-string protein*, SNARE, synaptotagmines, interactions protéiques.

SUMMARY

Insulin secretion from pancreatic β -cells proceeds by exocytosis, an event requiring a chaperon protein, the cysteine-string protein (Csp), which is localized on secretory granules. Csp contains a J-domain homologous to bacterial chaperon DnaJ protein, a linker region, a central palmitoylated cysteine-rich domain and a C-terminus that differs among splice variants. To understand the role of Csp in insulin secretion via large dense core vesicles, we have investigated its interactions with target proteins in pancreatic β -cells. We show here that Csp interacts directly with the chaperon complex Hsc70/SGT, the SNARE protein VAMP and indirectly with the SNARE SNAP25 via the calcium sensor synaptotagmin 9. Moreover, we could define the distinct domains of Csp implicated in the different interactions and the calcium sensitivity of interactions. In addition, we have demonstrated the potential role of palmitoylation in the targeting of Csp using a novel isoform. This work provides the framework for a molecular explanation of the role of Csp in insulin exocytosis and allows proposing a model for its function.

Keywords : insulin, pancreatic β -cells, exocytosis, calcium, *Cysteine-string protein*, SNARE, synaptotagmins, protein-protein interactions.