

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

---

**Couplages moléculaires à l'origine de la dépendance au  
potentiel des canaux KCNQ1 et hERG**

---

THESE DE DOCTORAT

**Ecole doctorale BIOLOGIE-SANTE de NANTES**

**Discipline :** Sciences de la vie et de la santé  
**Spécialité :** Biophysique et Physiologie

*présentée  
et soutenue publiquement par*

***Frank CHOVEAU***

Le 29 septembre 2009, devant le jury ci-dessous

|                           |                                                                                                                                                                         |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Rapporteurs</b>        | <b>M. COULOMBE Alain</b> , Directeur de recherche, INSERM<br>UMRS 956, Paris 6<br><b>M. FAIVRE Jean-François</b> , Professeur, Université de Poitiers,<br>CNRS UMR 6187 |
| <b>Examineurs</b>         | <b>M BENDAHHOU Saïd</b> , Chargé de recherche, Laboratoire FRE<br>3093, Nice<br><b>M LE MAREC Hervé</b> , PU-PH, l'institut du thorax, Nantes                           |
| <b>Directeur de thèse</b> | <b>M. LOUSSOUARN Gildas</b> , Chargé de Recherche CNRS,<br>INSERM U915, Nantes                                                                                          |

# SOMMAIRE

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>SOMMAIRE .....</b>                                                                              | <b>1</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES.....</b>                                                                      | <b>3</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>                                                                    | <b>4</b>  |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>                                                                | <b>5</b>  |
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                                                          | <b>6</b>  |
| <b>I. LE SYNDROME DU QT LONG : IMPLICATION DES CANAUX KCNQ1 ET HERG .....</b>                      | <b>7</b>  |
| <b>A. LE SYNDROME DU QT LONG CONGENITAL.....</b>                                                   | <b>7</b>  |
| <b>B. LE SYNDROME DU QT LONG ACQUIS .....</b>                                                      | <b>9</b>  |
| <b>II. COUPLAGE MOLECULAIRE ENTRE LES DOMAINES S4 ET S6.....</b>                                   | <b>10</b> |
| <b>A. GENERALITES SUR LE MOUVEMENT DU DOMAINE S4 ET L'OUVERTURE DE LA PORTE D'ACTIVATION .....</b> | <b>12</b> |
| 1. Mouvements du domaine S4 à l'origine de l'activation des canaux .....                           | 12        |
| a) « voltage-sensor paddle » .....                                                                 | 12        |
| b) Modèle à vis hélicoïdale .....                                                                  | 14        |
| c) Modèle de transporteur .....                                                                    | 15        |
| d) Vers un mouvement unique du « voltage-sensor » ?.....                                           | 17        |
| 2. Mécanisme d'ouverture de la porte d'activation.....                                             | 18        |
| a) Modèle de charnière liée à la présence d'une glycine .....                                      | 18        |
| b) Modèle de coude lié au motif PVP .....                                                          | 19        |
| <b>B. COMMENT LE MOUVEMENT DU S4 EST-IL COUPLE A L'OUVERTURE DU PORE ?.....</b>                    | <b>20</b> |
| 1. Parties du canal permettant le couplage entre le S4 et le pore .....                            | 20        |
| 2. Mécanismes de couplage entre le domaine S4 et la porte d'activation .....                       | 22        |
| a) Couplage permanent entre les domaines S4 et S6.....                                             | 22        |
| b) Couplage labile entre les domaines S4 et S6.....                                                | 23        |

|                                                                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>C. NOUVELLE VOIE THERAPEUTIQUE DES CARDIOPATHIES .....</b>                                                                                           | <b>24</b>  |
| <b>III. COUPLAGE ENTRE L'ACTIVATION ET L'INACTIVATION : HERG... 25</b>                                                                                  |            |
| <b>A. MECANISMES MOLECULAIRES DE L'INACTIVATION .....</b>                                                                                               | <b>25</b>  |
| 1. Inactivation de type N.....                                                                                                                          | 25         |
| 2. Inactivation de type C .....                                                                                                                         | 26         |
| a) Mécanismes moléculaires de l'inactivation de type C .....                                                                                            | 26         |
| b) Inactivation de hERG vis-à-vis des autres canaux K <sub>v</sub> .....                                                                                | 27         |
| <b>B. COUPLAGE ENTRE LES PROCESSUS D'ACTIVATION ET D'INACTIVATION .....</b>                                                                             | <b>27</b>  |
| 1. Couplage activation/inactivation indirect <i>via</i> le domaine S4.....                                                                              | 28         |
| a) Résultats obtenus par la technique de FRET .....                                                                                                     | 28         |
| b) Résultats obtenus en courant de porte .....                                                                                                          | 29         |
| c) Mutations des résidus du domaine S4 .....                                                                                                            | 30         |
| 2. Couplage direct entre l'activation et l'inactivation .....                                                                                           | 31         |
| 3. Couplage contrôlé par une porte unique permettant l'activation et l'inactivation ...                                                                 | 31         |
| <b>C. APPLICATION PHARMACOLOGIQUE POTENTIELLE D'UN CANAL MUTANT DE hERG .....</b>                                                                       | <b>32</b>  |
| <b>RESULTATS .....</b>                                                                                                                                  | <b>33</b>  |
| <b>ARTICLE 1 : les canaux KCNQ1 sont stabilisés à l'état fermé par leur boucle S4-S5 .....</b>                                                          | <b>33</b>  |
| Introduction .....                                                                                                                                      | 33         |
| Résultats .....                                                                                                                                         | 35         |
| Discussion .....                                                                                                                                        | 55         |
| <b>ARTICLE 2 : le transfert de la boucle S3-S4 du canal rolf chez hERG abolit le processus d'activation sans modifier le processus d'inactivation..</b> | <b>61</b>  |
| Introduction .....                                                                                                                                      | 61         |
| Résultats .....                                                                                                                                         | 63         |
| Discussion .....                                                                                                                                        | 94         |
| <b>DISCUSSION GENERALE .....</b>                                                                                                                        | <b>99</b>  |
| <b>REFERENCES .....</b>                                                                                                                                 | <b>106</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>                                                                                                                                    | <b>116</b> |

# LISTE DES FIGURES

|                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Syndrome du QT long. ....                                                                         | 7   |
| Figure 2 : Mécanisme de rétention des molécules pharmacologiques dans le pore du canal hERG. ....            | 9   |
| Figure 3 : Représentation schématique d'un canal potassique dépendant du potentiel. ....                     | 10  |
| Figure 4 : Représentation schématique du déplacement des ions $K^+$ au sein du pore. ....                    | 11  |
| Figure 5 : Structure de $K_vAP$ dans le modèle « voltage-sensor paddle ». ....                               | 12  |
| Figure 6 : Représentation schématique du modèle à vis hélicoïdale. ....                                      | 14  |
| Figure 7 : Représentation schématique de la rotation du domaine S4. ....                                     | 14  |
| Figure 8 : Représentation schématique du modèle de transporteur. ....                                        | 16  |
| Figure 9 : Représentation schématique du FRET dans l'étude du mouvement du domaine S4. ....                  | 16  |
| Figure 10 : Comparaison des structures transmembranaires des canaux KcsA et MthK. ....                       | 19  |
| Figure 11 : Comparaison entre les deux modèles du domaine S6. ....                                           | 20  |
| Figure 12 : Modification de la dépendance au potentiel. ....                                                 | 21  |
| Figure 13 : Interaction entre le domaine S4 et la porte d'activation. ....                                   | 22  |
| Figure 14 : Représentation schématique du processus d'inactivation de type N. ....                           | 25  |
| Figure 15 : Mécanismes de couplage entre l'activation et l'inactivation. ....                                | 27  |
| Figure 16 : La composante rapide du domaine S4 chez le mutant S631A est similaire à hERG. ....               | 29  |
| Figure 17 : Modèle d'inactivation du canal $K_v4.2$ . ....                                                   | 32  |
| Figure 18 : Homologie fonctionnelle entre un canal ligand dépendant et un canal dépendant du potentiel. .... | 34  |
| Figure 19 : Représentation schématique du mécanisme ligand-récepteur chez KCNQ1. ....                        | 34  |
| Figure 20 : Modèle structural du canal KCNQ1. ....                                                           | 58  |
| Figure 21 : Structure des canaux $K_v$ . ....                                                                | 62  |
| Figure 22 : Représentation schématique du pore du canal hERG. ....                                           | 96  |
| Figure 23 : Représentation schématique de la structure des canaux dépendant du potentiel. ..                 | 100 |

# LISTE DES TABLEAUX

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tableau 1 : Mutations modifiant la dépendance au potentiel de KCNQ1 dans le LQT1. ....</b>     | <b>8</b>  |
| <b>Tableau 2 : Mutations gain de fonction modifiant la dépendance au potentiel de KCNQ1. ....</b> | <b>24</b> |
| <b>Tableau 3 : Mutations modifiant le mouvement du domaine S4. ....</b>                           | <b>30</b> |

# LISTE DES ABREVIATIONS

DTT : dithiothréitol

EAG : Ether-à-go-go K<sub>v</sub> channel

ECG : Electrocardiogramme

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

hERG : human Ether-à-go-go Related Gene

KAT1 : K<sub>v</sub> channel *Arabidopsis thaliana*

LQT2 : syndrome du QT Long de type 2

MTSET : méthaneethiosulfonate éthyltriméthylammonium

TEA<sup>+</sup> : tétraéthylammonium

spHCN1 : sea urchin Hyperpolarization-activated Cyclic-Nucleotide-gated

# INTRODUCTION

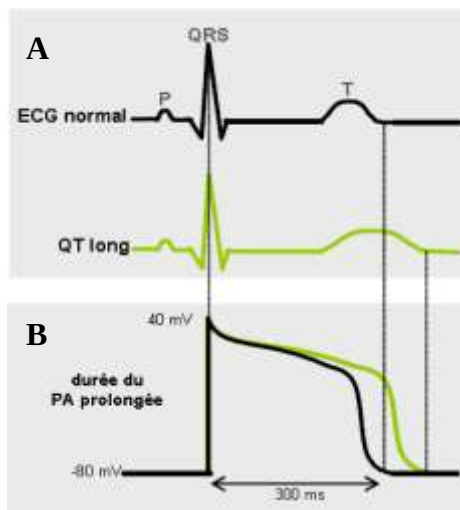
La mort subite cause près de 40.000 décès chaque année en France représentant 10 % des décès toutes causes confondues. Elle est souvent associée à différents troubles du rythme ou de la conduction. Compte tenu de l'incidence de la mort subite, il apparaît primordial de proposer un traitement efficace aux troubles du rythme ou de la conduction. Des études montrent l'implication des canaux ioniques tels que KCNQ1 dans certaines cardiopathies caractérisées par des troubles du rythme : le syndrome du QT long, du QT court et la fibrillation auriculaire. A l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires des canaux ioniques entraînant ces cardiopathies sont mal connus. Mon travail de thèse a consisté à étudier ces mécanismes moléculaires pour mieux comprendre les origines de ces maladies et développer potentiellement de nouvelles voies thérapeutiques.

Afin que le lecteur dispose de l'état actuel des connaissances sur les mécanismes moléculaires des canaux ioniques à l'origine des troubles du rythme, l'introduction est développée selon 3 axes :

- la **première partie** de l'introduction présente l'implication des canaux KCNQ1 et hERG dans le syndrome du QT long.
- la **seconde partie** de l'introduction se focalise sur les mécanismes d'activation dépendant du potentiel des canaux tels que KCNQ1. Près de la moitié des mutations de KCNQ1 induisant le syndrome du QT long congénital provoque une modification de la dépendance au potentiel du canal. Une meilleure connaissance des mécanismes de dépendance au potentiel de KCNQ1 permettrait peut-être de développer de nouvelles thérapies. Dans cette optique, mon premier projet avait pour objectif d'étudier les mécanismes de dépendance au potentiel et, plus précisément, le couplage entre le mouvement du senseur au potentiel et l'ouverture du pore.
- la **troisième partie** de l'introduction présente les mécanismes de couplage entre l'activation et l'inactivation des canaux tels que hERG. Ces 2 processus semblent jouer un rôle prépondérant dans la sensibilité de hERG à de nombreux agents pharmacologiques. Mon second projet avait pour but de caractériser l'implication des 2 processus dans cette sensibilité et, plus particulièrement, la présence ou non d'un couplage entre l'activation et l'inactivation du canal hERG.

# I. Le syndrome du QT long : implication des canaux KCNQ1 et hERG

Le syndrome du QT long est caractérisé par un allongement de l'intervalle  $QT_C$  (intervalle QT corrigé par la fréquence cardiaque) correspondant à la durée séparant le début de la dépolarisation et la fin de la repolarisation des ventricules (figure 1A). Cet allongement de l'intervalle QT est dû à une élévation de la durée de la phase de repolarisation du potentiel d'action ventriculaire (figure 1B).



**Figure 1 : Syndrome du QT long.**

(A) Représentation schématique des ECG. Le tracé vert correspond à l'intervalle QT allongé dans le cas du syndrome du QT long. (B) Représentation schématique du potentiel d'action ventriculaire. Le tracé vert représente l'allongement de la durée de repolarisation dans le syndrome du QT long.

Une personne est atteinte de ce syndrome lorsque le  $QT_C$  est supérieur à 450 ms chez l'homme et 470 ms chez la femme (Goldenberg et Moss 2008).

Le syndrome du QT long est divisé en deux types : congénital et acquis.

## A. Le syndrome du QT long congénital

Le syndrome du QT long congénital est une maladie rare transmise de façon récessive ou dominante. Selon le mode de transmission, deux syndromes ont été décrits : le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen transmis de façon autosomique récessive associant une repolarisation retardée à une surdité bilatérale (Neyroud *et coll.*, 1997). Le syndrome de Romano-Ward, forme autosomique dominante, est caractérisé par une repolarisation cardiaque retardée et une incidence élevée de mort subite (Wang *et coll.*, 1996). Les formes les plus fréquentes de ce syndrome sont le syndrome du QT long de type 1 ou LQT1 (50%) induit par des mutations du gène *KCNQ1* et le LQT2 (35 à 40%) dû à des mutations du gène *KCNH2*. Les gènes *KCNQ1* et *KCNH2* codent respectivement pour les canaux potassiques cardiaques dépendant du potentiel *KCNQ1* et *hERG*, responsables de la repolarisation tardive du potentiel d'action ventriculaire.

Les mutations des gènes *KCNQ1* et *KCNH2* provoquent une perte de fonction des canaux *KCNQ1* et *hERG* induisant une réduction des courants potassiques repolarisants tardifs  $I_{Ks}$  (*KCNE1-KCNQ1*) et  $I_{Kr}$  (*hERG*) et donc une augmentation de la durée de la repolarisation du potentiel d'action. Le principal mécanisme moléculaire impliqué dans la perte de fonction de ces canaux est la **modification de leurs propriétés biophysiques**. En effet, **19 des 44 mutations** étudiées en électrophysiologie **induisant le LQT1**, entraînent **un décalage de la dépendance au potentiel du canal *KCNQ1* (reflétée par le potentiel de demi-activation ou  $V_{0.5}$ )** vers les potentiels positifs par rapport au canal *KCNQ1* sauvage (tableau 1).

| Mutations | Région du canal   | Décalage de la $V_{0.5}$ (mV) |
|-----------|-------------------|-------------------------------|
| R190Q     | S4                | 2.7                           |
| S225L     | Boucle S4-S5      | 11                            |
| R243C     | Boucle S4-S5      | 16                            |
| R243H     | Boucle S4-S5      | 66.2                          |
| W248R     | Boucle S4-S5      | 50                            |
| L251P     | Boucle S4-S5      | 15                            |
| V254M     | Boucle S4-S5      | 39.7                          |
| L272F     | Boucle S4-S5      | 5                             |
| V310I     | Pore              | 34                            |
| T311I     | Pore              | 10                            |
| G314S     | Pore              | 3.4                           |
| 339delF   | S6                | 25                            |
| A344V     | S6                | 30.2                          |
| Q357R     | Queue C-terminale | 19.6                          |
| S373P     | Queue C-terminale | 37.9                          |
| V417M     | Queue C-terminale | 9.4                           |
| R533W     | Queue C-terminale | 13.9                          |
| R539W     | Queue C-terminale | 33.9                          |
| R555C     | Queue C-terminale | 31.5                          |

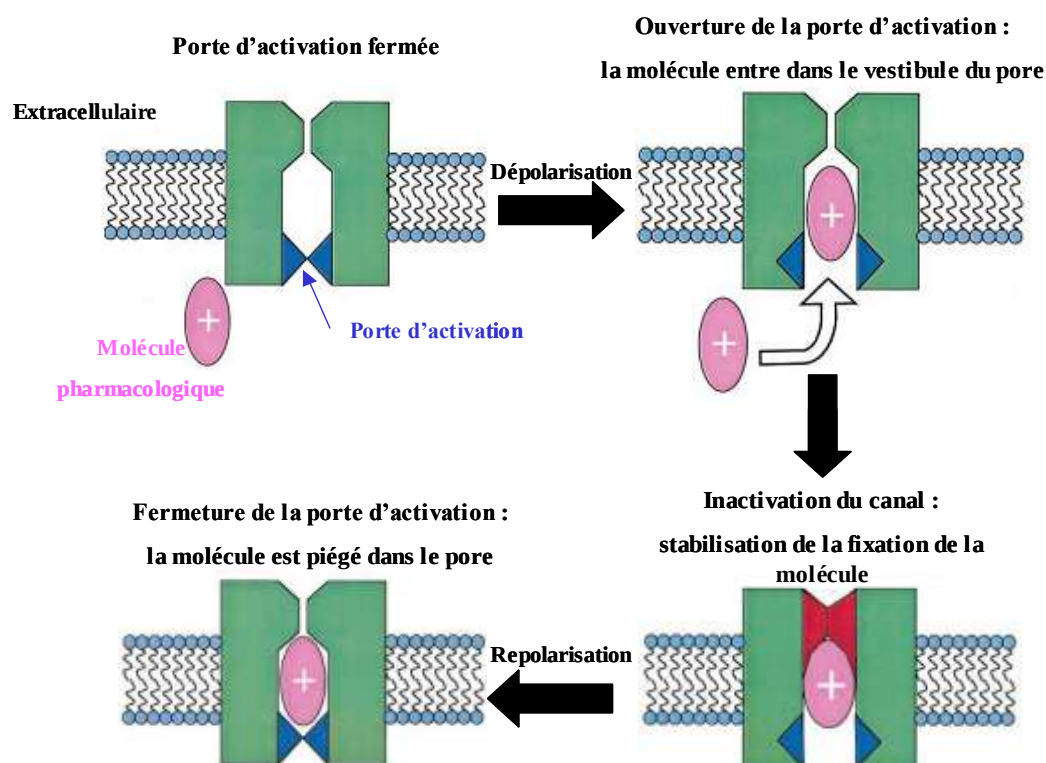
**Tableau 1 : Mutations modifiant la dépendance au potentiel de *KCNQ1* dans le LQT1.**

A l'heure actuelle, les seuls outils pharmacologiques contre le LQT1 sont les  $\beta$ -bloquants tels que le propranolol ou nadolol (Moss *et coll.*, 2000). Les  $\beta$ -bloquants sont des inhibiteurs compétitifs qui se fixent spécifiquement sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques empêchant ainsi leur activation par les catécholamines. L'administration de  $\beta$ -bloquants permet de limiter la survenue de troubles du rythme mais ils ne ciblent pas directement le canal *KCNQ1*. En effet, les  $\beta$ -bloquants abolissent l'activation par la voie  $\beta$ -adrénergique du courant  $I_f$ , **courant entrant** responsable de la dépolarisation diastolique (ou pente diastolique) du potentiel d'action et **conduisant à la dépolarisation rapide du potentiel d'action** (Accili *et coll.*, 1997). L'absence d'activation du courant  $I_f$  ralentit le rythme cardiaque évitant ainsi la situation où la mutation est délétère : un rythme cardiaque rapide.

Ces molécules ne permettent donc pas de corriger directement la modification de la dépendance au potentiel de KCNQ1 induite par la mutation. Une meilleure connaissance des **mécanismes moléculaires régissant la dépendance au potentiel** de ce canal permettrait potentiellement de **développer de nouvelles voies thérapeutiques spécifiques de cette arythmie**. Le premier objectif de ma thèse était de caractériser les mécanismes moléculaires de dépendance au potentiel du canal KCNQ1 et, plus particulièrement, le couplage entre le mouvement du domaine S4 et l'ouverture du pore.

## B. Le syndrome du QT long acquis

Le syndrome du QT long acquis peut être consécutif à un traitement médicamenteux. En effet, de nombreuses molécules pharmacologiques à visée cardiaque ou non cardiaque induisent un allongement de l'intervalle QT et peuvent être à l'origine de mort subite (Escande 2000). Ces molécules appartiennent à diverses classes de médicaments telles que les anti-arythmiques, les antihistaminiques ou les antidépresseurs. De nombreuses études se sont intéressées à déterminer pourquoi autant de substances structurellement différentes inhibent le canal hERG contrairement aux autres canaux dépendant du potentiel. Les études de Mitcheson (Mitcheson *et coll.*, 2000a) et Tristani-Firouzi (Tristani-Firouzi *et coll.*, 2001) suggèrent que la sensibilité accrue de hERG vis-à-vis des agents pharmacologiques est principalement due à un mécanisme de rétention de ces molécules comme décrit dans la figure 2.



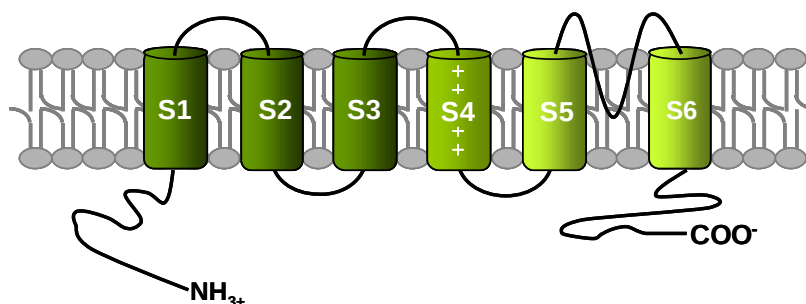
**Figure 2 : Mécanisme de rétention des molécules pharmacologiques dans le pore du canal hERG. D'après Tristani-Firouzi *et coll.*, 2001.**

Ce mécanisme de rétention suggère que la fermeture de la porte d'activation piège la molécule pharmacologique dans le pore du canal prolongeant son effet inhibiteur. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de bloquer la porte d'activation en configuration ouverte et d'évaluer si l'effet inhibiteur des molécules pharmacologiques est réduit. Cependant une réduction de l'inhibition de hERG ne signifiera pas forcément que la fermeture de la porte d'activation soit le mécanisme à l'origine de l'inhibition prolongée de hERG. En effet, des études révèlent que les processus d'activation et d'inactivation sont couplés chez le canal hERG (Piper *et coll.*, 2003; Smith et Yellen 2002). La modification du processus d'activation pourrait modifier le processus d'inactivation, processus connu pour modifier l'affinité des inhibiteurs de hERG (McPate *et coll.*, 2008).

Mon second projet de thèse a consisté à déterminer l'implication des processus d'activation et d'inactivation du canal hERG dans sa sensibilité aux agents pharmacologiques et, plus précisément, l'existence ou non d'un couplage entre l'activation et l'inactivation.

## II. Couplage moléculaire entre les domaines S4 et S6

Les canaux potassiques dépendant du potentiel (ou  $K_v$ ) tels que KCNQ1 sont fonctionnels sous forme d'un tétramère constitué de quatre sous-unités  $\alpha$ . Chacune de ces sous-unités est formée de six domaines transmembranaires (S1 à S6) divisés en deux modules fonctionnels distincts : un «voltage-sensor» formé des domaines S1 à S4 et un pore constitué des domaines S5 et S6 (figure 3).

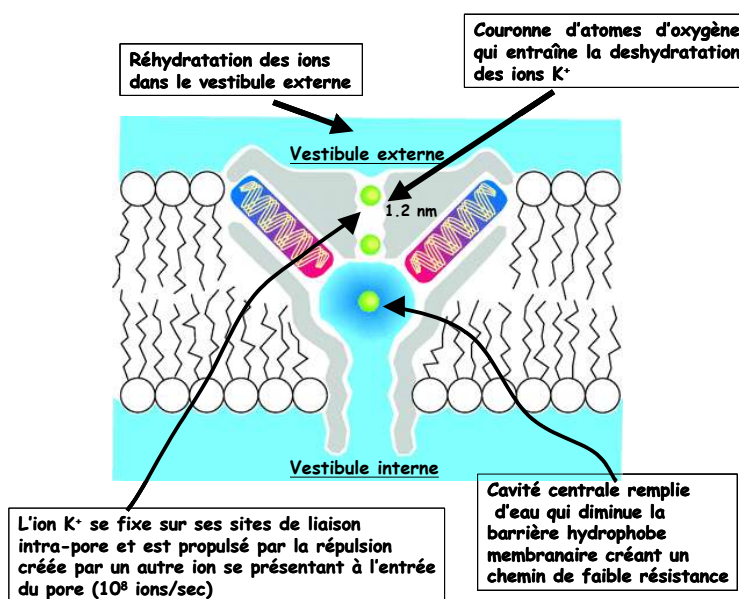


**Figure 3 : Représentation schématique d'un canal potassique dépendant du potentiel.**

Dès 1991, un élément clé dans le mécanisme de régulation par le potentiel des canaux potassiques a été identifié : le **domaine transmembranaire S4** sensible au potentiel (Papazian *et coll.*, 1991). En effet, la neutralisation des résidus chargés positivement du domaine S4 dans le canal Shaker modifie la dépendance au potentiel de ce canal suggérant que la sensibilité au potentiel du domaine S4 est conférée par la présence de ces charges positives.

Une étude a évalué l'effet de la neutralisation une à une des 7 charges positives du domaine S4 du canal Shaker sur le courant de porte (courant généré par le mouvement des charges positives du domaine S4). Les données obtenues révèlent que seulement les quatre premières charges positives sont impliquées dans le mouvement du domaine S4 (Aggarwal et MacKinnon 1996). Cependant, la nature du **mouvement** de ces charges et par conséquent du **domaine S4** lors de la dépolarisation de la membrane plasmique reste un sujet très **controversé** (partie II A 1).

Le **second élément clé** de la régulation par le potentiel des canaux potassiques est la **porte d'activation (domaine S6)** du canal. La cristallisation du canal bactérien KcsA (canal à deux domaines transmembranaires équivalent aux domaines S5 et S6 des canaux dépendant du potentiel) et plus récemment des canaux dépendant du potentiel K<sub>v</sub>AP et K<sub>v</sub>1.2 (Jiang *et coll.*, 2003a; Long *et coll.*, 2005a; Long *et coll.*, 2005b) ont permis de mieux définir la structure du pore et de la porte d'activation. Le pore est compartimenté en deux vestibules externe et interne séparés par une cavité centrale aqueuse (figure 4).



**Figure 4 : Représentation schématique du déplacement des ions K<sup>+</sup> au sein du pore.**

Les hélices  $\alpha$  et les boucles P délimitent une cavité centrale aqueuse. Les ions se déplacent en “file indienne” et sont stabilisés au sein de la cavité par des interactions électrostatiques établies avec les dipôles que constituent les hélices  $\alpha$  du pore. *D’après Doyle et coll., 1998.*

Ces structures cristallographiques montrent que les extrémités C-terminales du domaine S6 adoptent une structure en forme de « tepee » inversé du côté intracellulaire du pore appelé **porte d'activation**. A l'état fermé, les quatre extrémités C-terminales s'entrecroiseraient empêchant le passage des ions potassiques à travers le pore. Les **mécanismes d'ouverture et de fermeture de la porte d'activation restent encore mal compris** (partie II A 2).

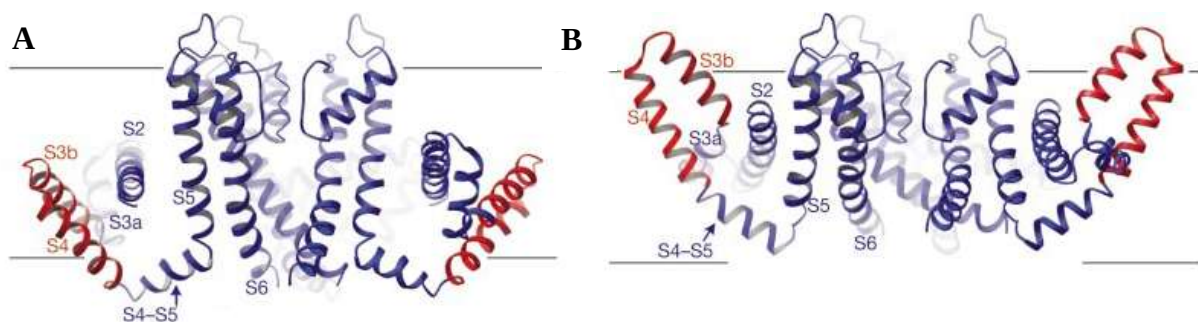
## A. Généralités sur le mouvement du domaine S4 et l'ouverture de la porte d'activation

### 1. Mouvements du domaine S4 à l'origine de l'activation des canaux

Il est maintenant bien établi que la sensibilité au potentiel des canaux  $K_v$  est due au domaine S4. Cette sensibilité aux variations du potentiel membranaire se traduit par un mouvement du domaine S4 qui permet le changement de conformation du canal de l'état fermé à l'état ouvert. De nombreuses études se sont focalisées sur la nature du mouvement transmembranaire du domaine S4. A partir de ces études, trois modèles différents de mouvement du domaine S4 ont été proposés. Ces trois modèles ont été décrits chez différents canaux en utilisant diverses techniques telles que le FRET, la cristallographie ou l'accessibilité des charges positives du domaine S4.

#### a) « voltage-sensor paddle »

Le modèle « voltage-sensor paddle » proposé par la cristallisation à l'état ouvert du canal bactérien  $K_vAP$  est le modèle le plus récent (Jiang *et coll.*, 2003a). Selon ce modèle, le domaine S4 et la partie extracellulaire du domaine S3 (S3b) forment une sorte de rame hélicoïdale appelée « voltage-sensor paddle ». Au potentiel de repos, le domaine S4 est localisé à l'intérieur de la membrane, du côté intracellulaire alors que le domaine S3 est positionné au sommet du S4. Suite à une dépolarisation, les domaines S3 et S4 traversent la bicouche lipidique jusqu'à la surface externe de la membrane (figure 5).



**Figure 5 : Structure de  $K_vAP$  dans le modèle « voltage-sensor paddle ».**

**(A)** Structure de  $K_vAP$  à l'état fermé. L'hélice rouge représente les domaines S4 et S3b. **(B)** Structure de  $K_vAP$  à l'état ouvert. D'après Jiang *et coll.*, 2003a.

Le modèle « voltage-sensor paddle » révèle un mouvement de l'ordre de 20 Å du domaine S4 (Jiang *et coll.*, 2003a). Cette amplitude de mouvement du domaine S4 est nettement supérieure à celle estimée chez le canal  $K_v1.2$  en utilisant une toxine de tarentule, l'hanatoxine (Phillips *et coll.*, 2005).

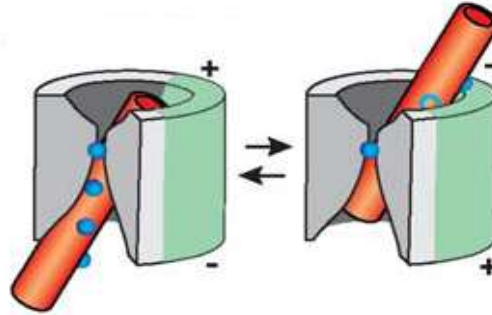
Dans ce travail, l'amplitude de mouvement du domaine S4 a été évaluée en déterminant la localisation dans la bicouche lipidique de l'hanatoxine appliquée du côté extracellulaire de la membrane plasmique. Cette toxine possède un résidu tryptophane émettant une fluorescence entre 300 et 400 nm. La localisation dans la membrane plasmique de cet acide aminé a été estimée en étudiant le degré **d'extinction de la fluorescence du résidu tryptophane par des atomes de bromes** liés de façon covalente à différentes **positions le long de la chaîne hydrocarbonée des lipides**. **A l'état ouvert**, l'hanatoxine est **localisée** sur la boucle entre les domaines S3b et S4 **à la surface extracellulaire de la membrane**. Au contraire, à l'état fermé, l'hanatoxine, toujours fixée au S4, pénètre dans la membrane permettant ainsi l'extinction de la fluorescence émise par le résidu tryptophane. L'extinction de fluorescence la plus importante a été obtenue avec des atomes de bromes localisés à environ 8.5 Å du centre de la bicouche lipidique. L'épaisseur de la membrane plasmique étant de 15 Å à partir du centre de la bicouche lipidique, la toxine semble pénétrer d'environ 6.5 Å dans la membrane, signifiant que le domaine S4 se déplace d'environ 6.5 Å.

Cette différence d'amplitude entre le canal K<sub>v</sub>1.2 (6.5 Å) et K<sub>v</sub>AP (20 Å) peut s'expliquer par une **structure différente des canaux**. En effet, la longueur du domaine S4 chez K<sub>v</sub>1.2 est plus importante d'environ deux tours d'hélices (équivalent à 10 Å) par rapport à celui de K<sub>v</sub>AP (basé sur la cristallographie de K<sub>v</sub>1.2, (Long *et coll.*, 2005b)). Ces résultats indiquent que les résidus du domaine S4 sur lesquels l'hanatoxine se fixe sont plus accessibles chez K<sub>v</sub>1.2 que chez K<sub>v</sub>AP minimisant ainsi l'amplitude de mouvement du domaine S4 de K<sub>v</sub>1.2. Un modèle structural de K<sub>v</sub>1.2 (Yarov-Yarovoy *et coll.*, 2006) suggère que le mouvement du domaine S4 de ce canal est encore plus minime (entre 2 et 4 Å) que celui déterminé par l'hanatoxine. Dans cette étude, la distance parcourue par le domaine S4 a été obtenue en comparant la localisation du S4 dans la membrane entre l'état fermé et ouvert de K<sub>v</sub>1.2.

La différence d'amplitude entre le canal K<sub>v</sub>1.2 (6.5 Å) et K<sub>v</sub>AP (20 Å) peut s'expliquer aussi par l'**utilisation de fragments Fab**, anticorps monoclonaux, pour la cristallisation de la protéine K<sub>v</sub>AP (Jiang *et coll.*, 2003a). Un fragment Fab est fixé sur chacun des motifs « voltage-sensor paddle » entre les domaines S3b et S4 afin de stabiliser la structure de K<sub>v</sub>AP en conformation ouverte. La structure de K<sub>v</sub>AP imposée par les fragments Fab peut modifier la position des domaines S3b et S4 dans la membrane plasmique vis-à-vis de la protéine native entraînant une estimation erronée de l'amplitude du mouvement du domaine S4.

b) Modèle à vis hélicoïdale

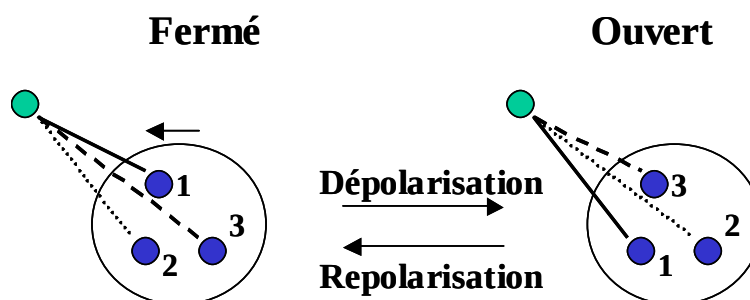
Dans ce modèle, l'hélice  $\alpha$  du **domaine S4** fait **simultanément une rotation et une translation** le long de son axe permettant le mouvement des charges du domaine S4. Suite à une dépolarisation, les charges du domaine S4 modifient leur exposition, migrant de la face intracellulaire à la face extracellulaire de la membrane (figure 6).



**Figure 6 : Représentation schématique du modèle à vis hélicoïdale.**

Le cylindre rouge représente le domaine S4 avec les lipides entourant le domaine S4 en vert. Les quatre premières charges positives (arginines) sont représentées par des sphères bleues lorsqu'elles sont devant le domaine S4 et par des cercles lorsqu'elles sont derrière. *D'après Tombola et coll., 2006.*

**La rotation du domaine S4** a été suggérée par la technique de FRET (Glauner *et coll.*, 1999). Cette technique permet de déterminer la distance entre un fluorophore « donneur » et un fluorophore « accepteur » en mesurant le transfert d'énergie entre les deux fluorophores. Dans cette étude, le transfert d'énergie a été mesuré entre un donneur situé sur une partie supposée fixe de la protéine et un accepteur attaché à 7 positions différentes du domaine S4. Si le **mouvement** du domaine **S4 résulte d'une rotation** (figure 7), la distance (symbolisée par les traits pleins ou pointillés) entre le donneur (cercle vert) et les accepteurs (cercle bleu) **augmentera** (exemple : résidus 1 et 2) ou **diminuera** (résidu 3) selon leur **position sur la même hélice S4**.



**Figure 7 : Représentation schématique de la rotation du domaine S4.**

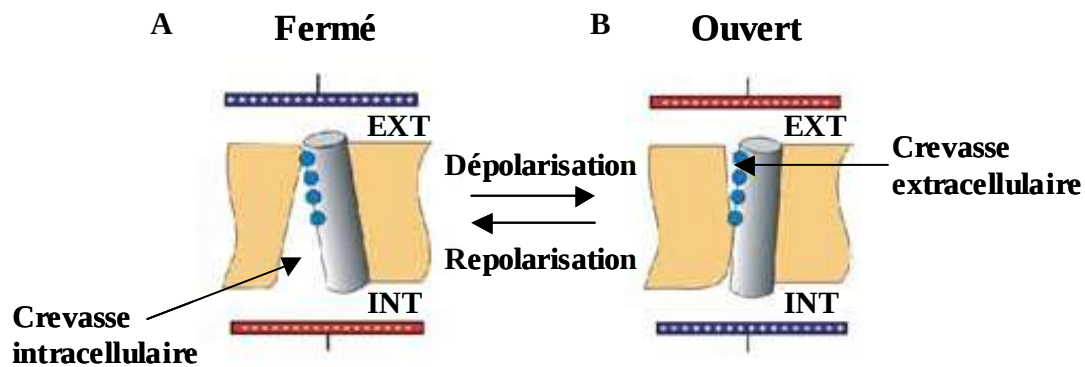
Le cercle vert représente le donneur et les cercles bleus correspondent à différents accepteurs présents sur le domaine S4. Le sens de rotation du domaine S4 est indiqué par la petite flèche.

Les résultats de cette étude sont cohérents avec une rotation du domaine S4 lors de la dépolarisation de la membrane. Cependant, ces données obtenues par FRET dans le canal Shaker semblent incohérentes avec la structure cristallographique du canal K<sub>v</sub>1.2. En effet, la distance mesurée entre deux résidus du domaine S4 situés sur des sous-unités adjacentes par FRET est en désaccord avec la structure cristallographique de K<sub>v</sub>1.2. Dans le canal Shaker, les résidus V363 sont distants de 32 Å alors que les résidus équivalents chez K<sub>v</sub>1.2 sont distants de 48 Å (Long *et coll.*, 2005b) révélant un manque de sensibilité de la technique de FRET pour détecter le mouvement du domaine S4.

**Le mouvement de translation du domaine S4** a été mis en évidence en étudiant l'accessibilité au MTSET des charges positives du domaine S4 aux états fermé et ouvert chez le canal Shaker (Larsson *et coll.*, 1996). Le MTSET étant incapable de traverser la membrane plasmique, seules les charges situées dans le milieu extracellulaire seront accessibles au MTSET appliqué du côté extracellulaire et inversement du côté intracellulaire. Si une charge positive est accessible au MTSET intra ou extracellulaire, le MTSET se fixera sur la charge positive préalablement substituée par une cystéine et modifiera l'activité de Shaker. La localisation des charges positives du domaine S4 a été déterminée en comparant l'activité de Shaker en absence et en présence de MTSET appliqué du côté intra et extracellulaire à l'état fermé et ouvert. Suite à la dépolarisation de la membrane, des charges positives du domaine S4 accessibles au MTSET du côté intracellulaire de la membrane (état fermé du canal) deviennent accessibles du côté extracellulaire (état ouvert du canal). Ces résultats suggèrent que **le domaine S4 traverse entièrement la membrane plasmique lors d'une dépolarisation membranaire et donc que le mouvement du S4 est d'environ 30 Å**. Cependant, l'accessibilité au MTSET des charges positives du domaine S4 peut aussi être expliquée par un mécanisme différent donnant naissance à un nouveau modèle : le modèle de transporteur.

### c) Modèle de transporteur

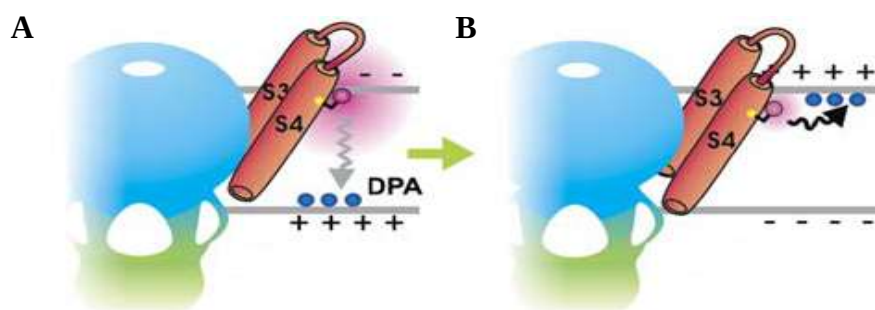
Ce modèle est cohérent avec le fait que les charges du domaine S4 accessibles au MTSET appliqué du côté intracellulaire à l'état fermé (figure 8A) peuvent être accessibles à l'état ouvert au MTSET extracellulaire (figure 8B). Mais dans ce modèle de transporteur, **le mouvement du domaine S4 est nettement inférieur à 30 Å**. Cette double contrainte est satisfaite si le domaine S4 migre **d'une crevasse** en contact avec le milieu intracellulaire **vers une seconde crevasse** en contact avec le milieu extracellulaire (figure 8).



**Figure 8 : Représentation schématique du modèle de transporteur.**

Le cylindre correspond au domaine S4 avec les quatre premières charges positives représentées par des sphères bleues. Les faces intracellulaire et extracellulaire de la membrane sont indiquées respectivement par INT et EXT. *D'après Chanda et coll., 2005.*

Ce modèle **avec un mouvement mimine du S4** est, par exemple, suggéré par la technique de FRET dans le canal Shaker (Chanda *et coll.*, 2005). Dans cette étude, la distance parcourue par le S4 a été estimée en étudiant les variations de fluorescence émise par un fluorophore « donneur » attaché à une cystéine à différentes positions du domaine S4 en présence d'un fluorophore « accepteur », le dipicrylamine (DPA). Le DPA est un anion hydrophobe dont la localisation dans la bicouche lipidique est dépendante du potentiel. Au potentiel de repos, la présence de molécules de DPA dans le feuillet externe de la membrane plasmique entraîne l'extinction de la fluorescence émise par le donneur (figure 9B). Lors de la dépolarisation, la fluorescence du donneur augmente, suggérant que seul le DPA migre vers le côté intracellulaire de la membrane (figure 9A). A l'opposé, si le domaine **S4 traversait entièrement la membrane** comme décrit dans les modèles « voltage-sensor paddle » et à vis hélicoïdale (figures 5 et 6), le donneur et le DPA seraient situés à l'opposé l'un de l'autre au sein de la membrane, aussi bien au potentiel de repos, que lors de la dépolarisation, empêchant l'extinction de la fluorescence du donneur par le DPA.



**Figure 9 : Représentation schématique du FRET dans l'étude du mouvement du domaine S4.** FRET aux potentiels dépolarisés (A) et hyperpolarisés (B). Le FRET se produit entre un « donneur » (magenta) et un « accepteur » (le DPA en bleu) dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique. *D'après Tombola et coll., 2005.*

Cependant, il faut rester prudent dans l'interprétation des données de FRET. La caractéristique fondamentale du modèle « voltage-sensor paddle », suggérée par la structure cristallographique de K<sub>v</sub>1.2, est l'hétérogénéité de l'exposition des charges positives du domaine S4 à l'état fermé et ouvert, ce qui complique l'interprétation des expériences de FRET. En effet, les deux premières charges positives du domaine S4 sont entourées de lipides. A l'inverse, la troisième et la quatrième ont un environnement protéique (domaine S1 et S2). Cet environnement différent des charges positives du domaine S4 peut modifier l'accessibilité du donneur situé sur ces charges positives vis-à-vis de l'accepteur entraînant une mauvaise estimation de l'amplitude de mouvement du domaine S4.

#### d) Vers un mouvement unique du « voltage-sensor » ?

Selon les études décrites précédemment, le mouvement du domaine S4 au sein de la membrane varierait de 2 Å (Chanda *et coll.*, 2005) à 30 Å (Larsson *et coll.*, 1996). Un modèle unique peut-il expliquer l'ensemble des données obtenues sur le mouvement du domaine S4 ?

Deux aspects peuvent expliquer cette différence d'amplitude de mouvement du domaine S4.

**Premièrement**, l'utilisation de diverses techniques, dont les sensibilités de détection du mouvement du domaine S4, ont été remises en question précédemment. **Deuxièmement**, l'existence de différences structurales majeures entre les canaux procaryotes (K<sub>v</sub>AP) et eucaryotes (Shaker, K<sub>v</sub>1.2). L'homologie de séquence est seulement de 20 % pour les domaines transmembranaires entre les canaux K<sub>v</sub>AP et K<sub>v</sub>1.2. Outre la différence de longueur du domaine S4 mentionnée auparavant (page 15), une autre différence concerne le mécanisme d'ouverture de la porte d'activation. Contrairement au canal K<sub>v</sub>AP, le canal K<sub>v</sub>1.2 présente un motif Pro-X-Pro au niveau du domaine S6 qui participe à la constitution de la porte d'activation. Ce motif permet la courbure de l'hélice S6 qui favoriserait son interaction avec le domaine S4. Cette interaction serait à l'origine de la constriction plus ou moins importante de l'entrée du pore (Long *et coll.*, 2005a). Une courbure différente de l'hélice S6 entre les canaux K<sub>v</sub>1.2 et K<sub>v</sub>AP pourrait modifier l'interaction avec le domaine S4 limitant son mouvement.

Une étude récente propose un **modèle unifié** dans lequel l'activation de K<sub>v</sub>AP passerait par un état intermédiaire dont la structure serait similaire à l'état ouvert du canal K<sub>v</sub>1.2 (Yarov-Yarovoy *et coll.*, 2006). Dans ce cas, le mouvement des charges positives du domaine S4 impliqué dans l'activation des canaux serait analogue dans les canaux K<sub>v</sub>1.2 et K<sub>v</sub>AP, mais une translation supplémentaire serait nécessaire aux canaux K<sub>v</sub>AP pour atteindre l'état ouvert.

Ce modèle implique **une translation et une rotation du domaine S4 comparables au modèle à vis hélicoïdale** avec un **mouvement des domaines S1-S3 autour du domaine S4 similaire au modèle de transporteur**.

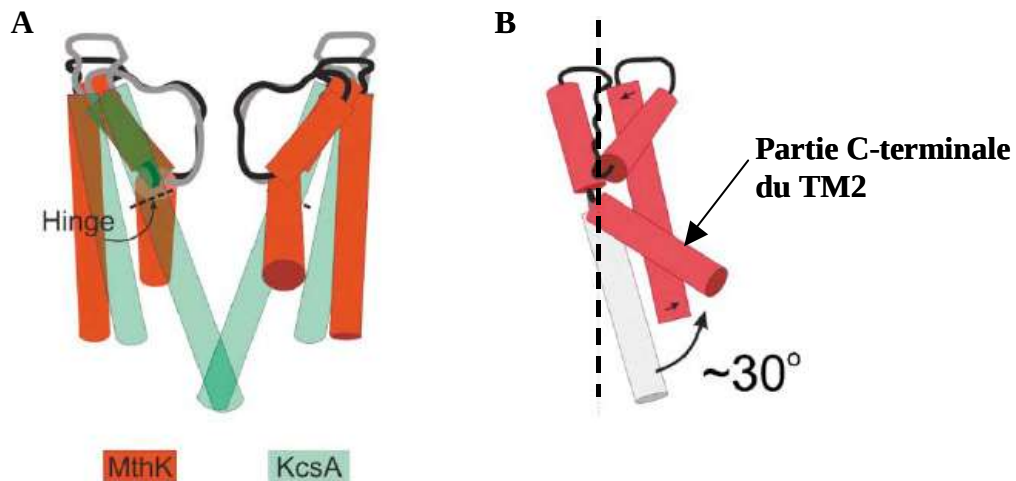
A l'heure actuelle, les études tentent de réconcilier l'ensemble des données expérimentales obtenues sur le **mouvement du domaine S4, postulant** que celui-ci **est généralisable à l'ensemble des canaux dépendant du potentiel**. Cependant, il n'est toujours pas exclu que le **domaine S4 se déplace différemment dans la membrane selon les canaux et qu'un modèle moléculaire unique n'existe finalement pas, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant**.

## 2. Mécanisme d'ouverture de la porte d'activation

Chez les canaux dépendant du potentiel, l'ouverture et la fermeture du pore du canal se produisent par le mouvement de la porte d'activation en réponse à une variation du potentiel de membrane. Cette porte est probablement localisée du côté intracellulaire de la membrane et a une forme de « tepee » inversé due au croisement des 4 extrémités C-terminales du domaine S6. Le mécanisme exact d'ouverture et de fermeture de la porte d'activation reste encore inconnu. Néanmoins, plusieurs observations ont conduit à deux modèles d'ouverture/fermeture de la porte d'activation.

### a) Modèle de charnière liée à la présence d'une glycine

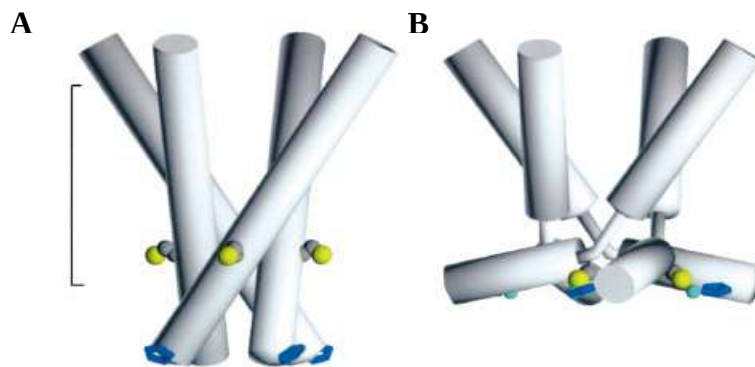
La comparaison des structures cristallographiques des canaux bactériens à deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2 équivalents aux domaines S5 et S6 des canaux K<sub>v</sub>) KcsA à l'état fermé et de MthK à l'état ouvert a permis d'identifier un mécanisme d'ouverture des canaux potassiques. Cette comparaison suggère que le processus d'ouverture de la porte d'activation est dû à un mouvement de rotation vers l'extérieur des hélices S6 (figure 10). Ce mouvement entraîne un élargissement du diamètre du pore du canal permettant le passage des ions à travers celui-ci. Le canal s'ouvrirait par un mouvement de rotation autour d'une articulation flexible (hinge) formée par un résidu glycine (Gly 86) situé au niveau du second domaine transmembranaire ou TM2 (figure 10A). Cette rotation de l'extrémité C-terminale du second domaine transmembranaire serait d'environ 30° (figure 10B). Ce mouvement provoque l'élargissement du pore du canal permettant le passage des ions (Perozo 2002).



**Figure 10 : Comparaison des structures transmembranaires des canaux KcsA et MthK.** (A) Superposition de KcsA (vert) et MthK (rouge). Le filtre de sélectivité est utilisé comme point de référence. Seules deux sous-unités sont représentées pour plus de clarté. (B) Vue comparative d'une sous-unité par rapport à l'axe central de symétrie du tétramère (ligne pointillée noire). *D'après Perozo 2002.*

#### b) Modèle de coude lié au motif PVP

Le modèle décrit ci-dessus basé sur la comparaison entre l'état ouvert et l'état fermé de 2 canaux est contestable. La structure du canal KcsA à l'état ouvert peut être très différente de celle de MthK et par conséquent le mécanisme d'ouverture de la porte d'activation également. Des études sur le canal Shaker révèlent l'existence d'une structure de S6 à l'état ouvert très différente de celle de KcsA, introduisant l'idée d'une variété de structures ouvertes selon les canaux. Des travaux de l'équipe de Gary Yellen montrent la proximité entre le résidu V476C (en jaune) et l'histidine en position 486 (en bleu foncé), car seulement ces deux résidus interagissent avec un ion cadmium unique à l'état ouvert (del Camino *et coll.*, 2000; del Camino et Yellen 2001). Cette proximité est incohérente avec le modèle de KcsA à l'état ouvert. En effet, les résidus équivalents chez le canal KcsA sont trop distants à l'état ouvert (figure 11A). L'interaction V476-cadmium-H486 à l'état ouvert suggère un nouveau mécanisme d'ouverture de la porte d'activation, impliquant un coude rigide dans les hélices S6 (figure 11B) au niveau du motif Pro-Val-Pro (PVP).



**Figure 11 : Comparaison entre les deux modèles du domaine S6.**

**(A)** Modèle de Shaker issu de KcsA. Dans ce modèle, le résidu H486 (bleu foncé) est trop loin du résidu V476 (sphère jaune) pour coordonner le cadmium (sphère bleue). **(B)** Modèle de coude lié au motif PVP chez Shaker. Dans ce modèle, le résidu H486 (bleu foncé) est assez proche du résidu V476 (sphère jaune) pour coordonner le cadmium (sphère bleue). Le crochet correspond à la position de la membrane plasmique. *D'après del Camino et coll., 2000.*

La cristallisation récente de  $K_v1.2$  a confirmé l'implication du motif PVP dans l'ouverture de la porte d'activation. Selon la structure cristallographique de  $K_v1.2$ , les acides aminés constituant ce motif permettent la courbure de l'hélice S6. Cette courbure favoriserait l'interaction entre les domaines S4 et S6 à l'origine de la constriction plus ou moins importante de l'entrée du pore (Long *et coll.*, 2005a).

En conclusion, le **mécanisme d'ouverture du pore chez les canaux procaryotes et eucaryotes peut être différent** : l'ouverture du pore nécessiterait une courbure de l'hélice S6, mais cette courbure serait flexible chez les procaryotes et rigide chez les eucaryotes.

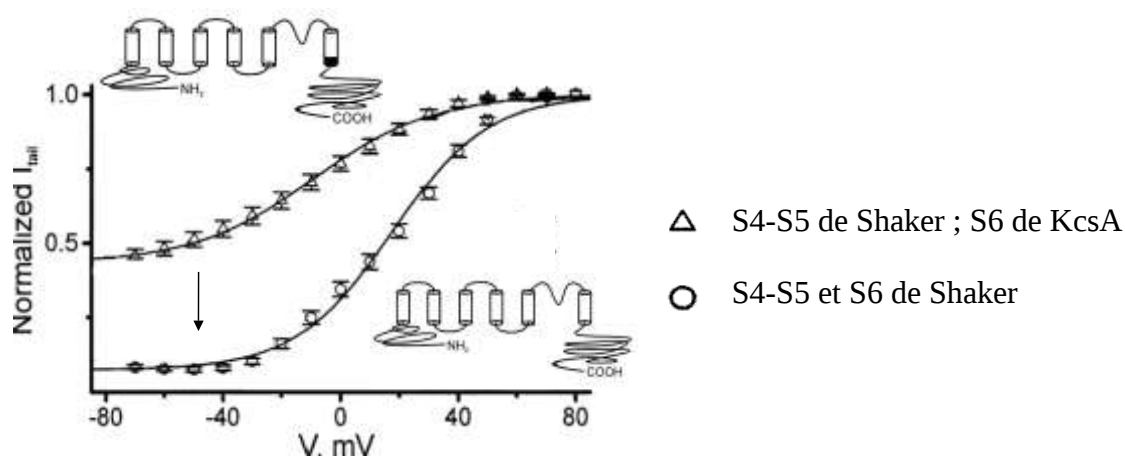
## B. Comment le mouvement du S4 est-il couplé à l'ouverture du pore ?

Si les mécanismes de mouvement du domaine S4 sensible au potentiel et d'ouverture de la porte d'activation sont maintenant mieux connus, une question reste encore à élucider : comment le mouvement du domaine S4 est-il couplé à l'ouverture de la porte d'activation ? Les premières études se sont employées à déterminer quelles parties du canal étaient impliquées dans ce couplage.

### 1. Parties du canal permettant le couplage entre le S4 et le pore

Plusieurs études sur des canaux dépendant du potentiel suggèrent que la boucle S4-S5 serait impliquée dans le couplage entre le mouvement du domaine S4 et l'ouverture de la porte d'activation. Lu et son équipe (Lu *et coll.*, 2001; Lu *et coll.*, 2002) ont réalisé des chimères de Shaker avec KcsA. Lorsque la boucle S4-S5 et la partie C-terminale du domaine S6 n'appartiennent pas au même canal, il y a perte partielle de la dépendance au potentiel car le canal ne se ferme plus complètement.

Par contre, la dépendance au potentiel est restaurée lorsque la boucle S4-S5 et la partie C-terminale du domaine S6 appartiennent au même canal renforçant l'idée d'une complémentarité entre les deux domaines (figure 12).



**Figure 12 : Modification de la dépendance au potentiel.**

En noir, canal KcsA et en blanc, canal Shaker. D'après Lu et coll., 2001; Lu et coll., 2002.

L'importance de la boucle S4-S5 dans ce couplage a aussi été mise en évidence chez le canal hERG. La fermeture du canal hERG est perturbée par la mutation D540K située sur la boucle S4-S5. Le canal mutant D540K est alors capable de s'ouvrir en réponse à l'hyperpolarisation membranaire pour des valeurs de potentiels où le canal hERG sauvage est à l'état fermé (Sanguinetti et Xu 1999). L'insertion de la mutation R665A localisée sur la partie C-terminale du domaine S6 du canal hERG restaure une activité normale au canal mutant D540K (Tristani-Firouzi et coll., 2002). Ces résultats suggèrent une interaction électrostatique entre l'aspartate (D540) situé sur la boucle S4-S5 et l'arginine (R665) située sur la partie C-terminale du domaine S6 stabilisant le canal hERG à l'état fermé. L'association entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 a été renforcée par la structure cristallographique de  $K_v1.2$ . Cette structure montre que la distance entre la boucle S4-S5 et l'hélice S6 est compatible avec une interaction entre ces deux zones (Long et coll., 2005b).

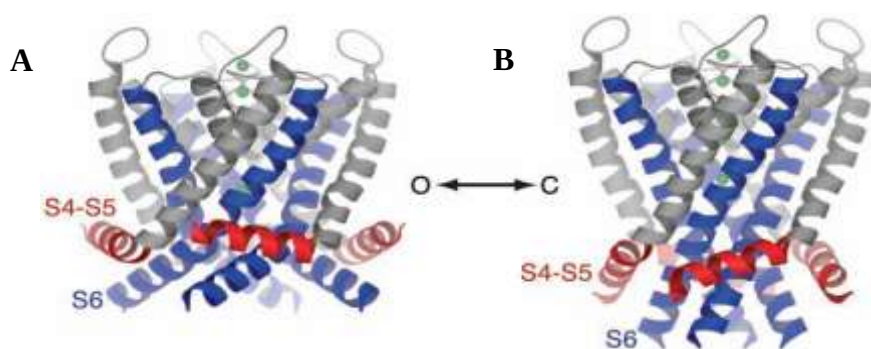
Selon ces études, la boucle S4-S5 est impliquée dans le couplage entre le domaine S4 et la partie C-terminale du domaine S6 (porte d'activation) en stabilisant le canal à l'état fermé. De nombreuses questions restent encore en suspens : quelle est la nature de l'interaction entre ces deux zones ? Cette interaction est-elle permanente quel que soit l'état dans lequel se trouve le canal ou plutôt labile ?

## 2. Mécanismes de couplage entre le domaine S4 et la porte d'activation

Nos connaissances actuelles sur le couplage entre le domaine S4 et la porte d'activation (S6) suggèrent deux mécanismes distincts de couplage : un couplage permanent quel que soit l'état dans lequel se trouve le canal et un couplage labile, les domaines S4 et S6 interagissant uniquement à l'état fermé pour certains canaux et ouvert pour d'autres.

### a) Couplage permanent entre les domaines S4 et S6

La structure cristallographique de K<sub>v</sub>1.2 correspond à l'**état ouvert** du canal (Long *et coll.*, 2005b). Deux aspects de cette structure sont cohérents avec cette idée. **Premièrement**, les résidus chargés du domaine S4 sont situés à proximité de la face extracellulaire de la membrane ce qui suppose que la membrane est dépolarisée, et donc le canal ouvert. Néanmoins, cet argument reste faible puisqu'une étude suggère que le S4 pourrait aussi être proche du côté extracellulaire à l'état fermé du canal (Yarov-Yarovoy *et coll.*, 2006). **Deuxièmement**, un argument plus fort est le diamètre du pore au niveau de la porte d'activation, diamètre compatible avec le passage des ions potassiums. Selon cette structure, la boucle S4-S5 forme une hélice  $\alpha$  amphipathique positionnée sur la partie C-terminale du domaine S6 de la même sous-unité. Suite à un changement du potentiel membranaire, le domaine S4 migre vers la face intracellulaire de la membrane. Le domaine S4 vient alors pousser sur la boucle S4-S5 agissant comme un levier exerçant une force mécanique au niveau des quatre hélices S6 (porte d'activation). Ce mécanisme électromécanique entraînerait la fermeture du pore (figure 13B). Lors de la dépolarisation de la membrane, la boucle S4-S5 est tirée vers la face extracellulaire de la membrane par le domaine S4 et n'exercerait plus de force mécanique au niveau du pore permettant son ouverture (figure 13A).



**Figure 13 : Interaction entre le domaine S4 et la porte d'activation.** D'après Long *et coll.*, 2005b.

Dans ce modèle, le domaine S4 et la porte d'activation interagissent *via* la boucle S4-S5 à l'état fermé et ouvert du canal.

Cette idée a été renforcée par le modèle structural de K<sub>v</sub>1.2 qui montre que la boucle S4-S5 interagit avec le domaine S6 à l'état fermé et ouvert (Yarov-Yarovoy *et coll.*, 2006).

### b) Couplage labile entre les domaines S4 et S6

Les résultats de plusieurs études semblent incompatibles avec une liaison permanente entre la boucle S4-S5 et la partie C-terminale du domaine S6 du canal suggérant plutôt un couplage labile. Ferrer et ses collaborateurs (Ferrer *et coll.*, 2006) ont construit des chimères du canal hERG avec EAG (canal à 6 domaines transmembranaires dépendant du potentiel). Lorsque ces deux régions n'appartiennent pas au même canal, le canal est activé pour des potentiels hyperpolarisés induisant un défaut de fermeture du canal. Ces résultats révèlent une stabilisation de l'état fermé via l'association entre la boucle S4-S5 et de la partie C-terminale du domaine S6. Pour vérifier cette hypothèse, des cystéines ont été introduites au niveau du résidu D540 (boucle S4-S5) et du résidu A665 ou L666 (domaine S6). La formation d'un pont disulfure entre ces deux régions stabilise le canal dans un seul état : l'état fermé. Si l'interaction entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 existe à l'état ouvert et fermé, comment expliquer qu'une liaison covalente entre ces deux régions stabilise la fermeture du canal hERG ? Ces résultats sont plutôt cohérents avec une association labile entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 qu'avec le mécanisme de levier proposé par l'équipe de MacKinnon. Cette association labile a aussi été suggérée pour des canaux activés par l'hyperpolarisation tels que spHCN1 (Prole et Yellen 2006) et KAT1 (Grabe *et coll.*, 2007). L'étude sur le canal KAT1 a identifié des mutations dans les domaines S1 et S4 affectant la conduction des ions potassiums à l'état ouvert. L'effet de ces mutations a été reversé en mutant des acides aminés des domaines S2 et S5. Cette technique a permis de mettre en évidence 6 interactions entre les différents domaines. Basé sur ces 6 interactions et sur la structure cristallographique de K<sub>v</sub>1.2, un modèle structural à l'état ouvert de KAT1 a été construit. Ce modèle propose **qu'une interaction électrostatique entre la boucle S4-S5 (acide aspartique en position 188) et le domaine S6 (arginine en position 310) induit l'ouverture du canal KAT1**. Ce modèle est cohérent avec les récents résultats sur un autre canal : spHCN1. Dans l'étude sur spHCN1, un pont disulfure est formé entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 forçant le couplage entre ces deux régions. Ce couplage forcé empêche la fermeture du canal aux potentiels dépolarisés suggérant que l'association entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 stabilise l'état ouvert du canal.

En résumé, la nature du couplage entre les domaines S4 et S6 *via* la boucle S4-S5 a été suggérée comme étant permanente par la cristallisation et le modèle structural du canal K<sub>v</sub>1.2. Cependant, ce couplage permanent est incompatible avec plusieurs études décrites ci-dessus.

La **nature du couplage entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 semble être différente entre le canal  $K_v1.2$  et les canaux Shaker, hERG, KAT1 et spHCN1**. Nous avons aussi supposé une différence de mouvement du domaine S4 et d'ouverture de la porte d'activation selon les canaux dépendant du potentiel. L'activation dépendante du potentiel pourrait donc résulter de mécanismes distincts en fonction du canal. Mon premier travail de thèse a consisté à déterminer quel mécanisme moléculaire est à l'origine **du couplage entre le mouvement du senseur au potentiel (S4) et l'ouverture de la porte d'activation (S6) chez KCNQ1**.

### C. Nouvelle voie thérapeutique des cardiopathies

De nombreuses mutations du canal KCNQ1 induisent le syndrome du QT long en modifiant la dépendance au potentiel de ce canal (tableau 1, page 8). Comme nous l'avons vu dans la partie I A, les seuls outils pharmacologiques contre le syndrome du QT long de type 1 sont les  $\beta$ -bloquants, cependant, ils ne ciblent pas spécifiquement le canal KCNQ1. Une thérapie potentielle serait l'utilisation de **régulateurs spécifiques** du canal KCNQ1 permettant de limiter voire de corriger les effets des mutations induisant une modification de la dépendance au potentiel de KCNQ1. Dans le cas du **syndrome du QT long**, ces **régulateurs** devront avoir un effet **activateur** en augmentant l'amplitude du courant et en décalant la dépendance au potentiel des canaux mutants vers les potentiels négatifs.

D'autres mutations pathogènes provoquent un gain de fonction du canal KCNQ1 (tableau 2).

| Mutations | Phénotype                                        | Région du canal | Décalage de la $V_{0.5}$ (mV)       |
|-----------|--------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| S140G     | Fibrillation auriculaire                         |                 | $V_{0.5}$ non mesurable             |
| V141M     | Fibrillation auriculaire<br>Syndrome du QT court | Boucle S1-S2    | Perte de la dépendance au potentiel |
| V307L     | Syndrome du QT court                             | Pore            | 15                                  |

**Tableau 2 : Mutations gain de fonction modifiant la dépendance au potentiel de KCNQ1.**

Dans le cas des mutations **gain de fonction** du canal KCNQ1 décrites ci-dessus, l'utilisation de **régulateurs spécifiques inhibiteurs** (diminution de l'amplitude du courant et décalage de la dépendance au potentiel vers les potentiels positifs) pourrait restaurer une activité normale aux canaux mutants entraînant un gain de fonction.

Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires de dépendance au potentiel du canal KCNQ1 permettrait d'identifier des régulateurs spécifiques du canal KCNQ1 et ainsi développer de nouvelles voies thérapeutiques potentielles contre les arythmies cardiaques. Cette idée a été à l'origine de mon premier projet.

### III. Couplage entre l'activation et l'inactivation : hERG

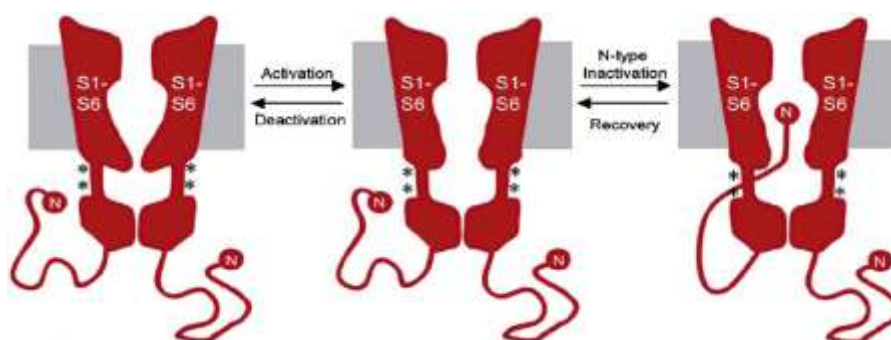
Des études révèlent un couplage entre l'activation et l'inactivation chez des canaux dépendant du potentiel. Plusieurs mécanismes de couplage ont été décrits en fonction des canaux étudiés et du type d'inactivation. **Chez hERG, la nature de ce couplage reste controversée.**

#### A. Mécanismes moléculaires de l'inactivation

Deux principaux types d'inactivation existent : N et C. Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'inactivation de type N sont maintenant bien établis. L'inactivation de type C semble résulter de la constriction du pore au niveau du filtre de sélectivité. Cependant, les mécanismes moléculaires permettant cette constriction restent encore sujets à discussion.

##### 1. Inactivation de type N

L'inactivation de type N est fréquemment décrite comme un mécanisme d'inactivation « ball and chain » dans lequel des acides aminés situés sur la partie N-terminale du canal obstruent le pore empêchant le passage des ions. L'inactivation de type N est un processus très rapide chez les canaux Shaker,  $K_v1.4$  et  $K_v3.4$ . Une de ces caractéristiques est sa sensibilité à des bloqueurs intracellulaires du pore tels que le  $TEA^+$  et ses dérivés (Choi *et coll.*, 1991). L'inactivation de type N est dépendante de l'ouverture du canal et agit tel un bloqueur à l'état ouvert qui se fixe à la cavité intracellulaire du canal, ce qui est cohérent avec la présence de la porte d'activation du côté intracellulaire de la membrane. L'ouverture du canal expose la cavité intracellulaire qui est alors accessible à la queue N-terminale. Les boucles situées entre le domaine T1 et le premier domaine transmembranaire (S1) forment quatre ouvertures latérales (indiquées en astérisques dans la figure 14) constituant un parcours obligatoire pour que la partie N-terminale du canal atteigne la cavité interne du pore. L'interaction entre les résidus chargés positivement de la queue N-terminale et ceux chargés négativement situés dans les boucles entre les domaines T1 et S1 favoriserait l'entrée de la queue N-terminale dans le pore du canal et stabiliserait sa fixation (Gulbis *et coll.*, 2000) (figure 14).



**Figure 14 : Représentation schématique du processus d'inactivation de type N.**  
D'après Kurata et Fedida 2006.

## 2. Inactivation de type C

L'inactivation de type C est facilement distinguable de l'inactivation de type N puisqu'elle n'est pas abolie par la délétion de résidus de la queue N-terminale ni inhibée par le TEA<sup>+</sup> intracellulaire. Par contre, elle est inhibée par le TEA<sup>+</sup> extracellulaire ainsi que l'élévation de la concentration extracellulaire en potassium. Ces inhibitions ont suggéré un mécanisme de « foot in the door » dans lequel la fixation du TEA<sup>+</sup> ou des ions K<sup>+</sup> sur le côté extracellulaire du canal ralentit ou empêche les changements conformationnels nécessaires à l'inactivation de type C (Rasmusson *et coll.*, 1998). Une autre distinction entre l'inactivation de type N et de type C provient de leur mode de fonctionnement. Dans le cas de l'inactivation de type N, les domaines d'inactivation fonctionnent indépendamment les uns des autres et un seul de ces domaines est suffisant pour permettre l'inactivation. Au contraire, des études sur le canal Shaker suggèrent que l'inactivation de type C résulte d'un réarrangement simultané des quatre sous-unités  $\alpha$  du canal (Larsson et Elinder 2000).

### a) Mécanismes moléculaires de l'inactivation de type C

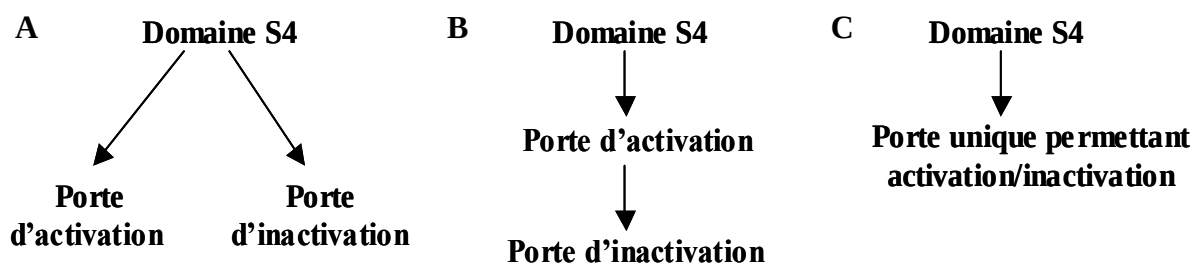
De nombreuses études supposent que l'inactivation de type C implique une constriction du pore du canal au niveau du filtre de sélectivité. Une étude récente sur Shaker a démontré l'importance du résidu E418 (domaine S5) dans l'inactivation de type C (Larsson et Elinder 2000). L'insertion d'une cystéine au niveau du résidu 418 se traduit par une déstabilisation de l'état ouvert au profit de l'état inactivé. Dans la structure de KcsA, le résidu équivalent à E418 est en contact avec plusieurs résidus situés dans la boucle entre les domaines S5 et S6, équivalent aux résidus 451-452 chez Shaker. Pour vérifier si l'inactivation est due à une liaison entre les résidus 418 et 451 ou 452, des cystéines ont été insérées en position 451 et 452. **La formation d'un pont disulfure entre les résidus 418 et 451 stabilise l'état inactivé suggérant que l'inactivation de type C serait due à la formation d'une liaison entre le résidu E418 et le résidu V451.** Basé sur la structure du canal KcsA, les auteurs de cette étude supposent que lors de l'inactivation, la formation de la liaison entre le domaine S5 (résidu E418) et la boucle du pore (résidu 451) entraînerait la constriction du filtre de sélectivité et la fermeture du pore.

b) Inactivation de hERG vis-à-vis des autres canaux  $K_v$ 

Le ralentissement de la cinétique d'inactivation de hERG par l'élévation du potassium extracellulaire et le  $TEA^+$  extracellulaire révèle que l'inactivation de hERG est de type C (Smith *et coll.*, 1996). Cependant, contrairement à l'inactivation de type C du canal Shaker, l'inactivation de hERG est beaucoup plus rapide. La différence de cinétique d'inactivation peut être due notamment à la nature des résidus aromatiques situés au niveau du filtre de sélectivité et de l'hélice du pore. Le filtre de sélectivité du canal hERG contient la séquence GFG au contraire de la majorité des canaux  $K_v$ , dans lesquels la phénylalanine est remplacée par un résidu tyrosine (GYG). Dans le canal Shaker, il a été montré que la mutation du résidu tyrosine en phénylalanine accélérerait la cinétique d'inactivation du canal Shaker (Ranganathan *et coll.*, 1996). Ces résultats suggèrent que le résidu phénylalanine joue un rôle dans la cinétique d'inactivation du canal hERG. Enfin, une étude suppose que la présence du résidu phénylalanine dans le filtre de sélectivité associée à l'absence de résidu tryptophane dans l'hélice du pore du canal hERG rend son pore plus étroit que celui du canal Shaker (Fan *et coll.*, 1999). Cette largeur plus faible du pore permettrait une constriction plus rapide du filtre de sélectivité chez hERG à l'origine de la différence de cinétique d'inactivation entre le canal hERG et la plupart des canaux  $K_v$ .

B. Couplage entre les processus d'activation et d'inactivation

De nombreuses études se sont intéressées à déterminer l'existence d'un couplage entre le processus d'activation et d'inactivation de type C. Selon les études, l'activation et l'inactivation sont contrôlées soit séparément *via* le domaine S4 (figure 15A), soit *via* un couplage direct entre l'activation et l'inactivation (figure 15B). Un mécanisme de couplage particulier a été proposé pour certains canaux : une porte unique permettrait l'activation et l'inactivation (figure 15C).



**Figure 15 : Mécanismes de couplage entre l'activation et l'inactivation.**

**(A)** Couplage indirect entre l'activation et l'inactivation *via* le domaine S4. **(B)** Couplage direct entre l'activation et l'inactivation. **(C)** Couplage *via* une porte unique contrôlant l'activation et l'inactivation.

## 1. Couplage activation/inactivation indirect via le domaine S4

Rasmusson et ses collaborateurs (Rasmusson *et coll.*, 1995) ont étudié le rôle du domaine S4 dans le contrôle de l'inactivation chez le canal  $K_v1.4$ . La neutralisation de la quatrième charge positive de S4 provoque un décalage de la courbe d'inactivation du canal FK1Δ2-146 vers les potentiels négatifs suggérant **l'implication du domaine S4 dans l'inactivation**. Cependant, les mécanismes à l'origine du couplage entre les processus d'activation et d'inactivation via le domaine S4 sont mal connus.

### a) Résultats obtenus par la technique de FRET

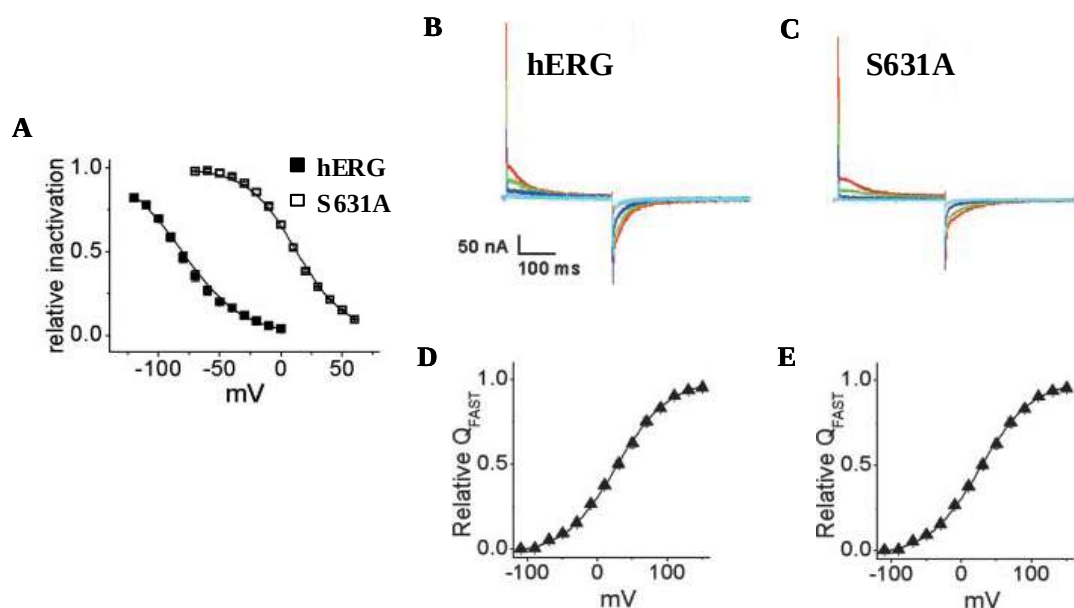
L'existence d'un couplage direct entre le domaine S4 et l'inactivation a été suggérée pour le canal Shaker. Lors de la dépolarisation, un fluorophore introduit en position A359 (boucle S3-S4) a permis de révéler un mouvement rapide du domaine S4 correspondant à l'activation et un mouvement lent dont la cinétique est cohérente avec la cinétique d'inactivation du canal Shaker. Ces résultats suggèrent que le domaine S4 contrôle séparément l'activation et l'inactivation (figure 15A) (Loots et Isacoff 2000). Des résultats comparables ont été obtenus sur le canal hERG en utilisant la même technique (Smith et Yellen 2002). Dans cette étude, le mouvement du domaine S4 serait composé de deux cinétiques : une lente et une rapide, **la composante rapide correspondant à l'inactivation de hERG**. Cependant, ce résultat ne démontre pas formellement le rôle du domaine S4 dans le contrôle de l'inactivation : si le domaine S4 est couplé à l'inactivation chez hERG, la suppression du processus d'inactivation devrait modifier la composante rapide du domaine S4. Il a été montré que la double mutation G628C/S631C qui abolit l'inactivation de hERG (Smith *et coll.*, 1996) ne modifie pas la composante rapide du signal de fluorescence, empêchant de conclure que **la composante rapide du S4 est responsable de l'inactivation**.

De plus, cette technique indique un mouvement du domaine S4 **relatif** à son environnement : il reste possible que cette composante rapide ne soit pas due à un mouvement du domaine S4, mais à un **changement d'environnement du fluorophore comme, par exemple, le changement de structure du pore** lors de l'inactivation. Pour vérifier si la composante rapide correspond à un mouvement du S4, il est intéressant d'utiliser une **technique alternative pour étudier spécifiquement le mouvement du domaine S4 : la mesure du courant de porte par la technique de patch-clamp**.

b) Résultats obtenus en courant de porte

La caractérisation du courant de porte chez hERG a révélé l'existence de deux composantes de mouvement du domaine S4 : une lente et une rapide dont les cinétiques sont compatibles respectivement avec l'activation et l'inactivation du canal hERG (Piper *et coll.*, 2003). La mise en évidence de ces deux cinétiques du domaine S4 confirme les résultats précédents obtenus avec des sondes fluorescentes. Le **domaine S4 contrôlerait séparément l'activation et l'inactivation.**

Pour déterminer si la cinétique rapide de mouvement du domaine S4 contrôle l'inactivation de hERG, Piper et ses collaborateurs ont caractérisé le courant de porte du canal mutant hERG S631A. La mutation S631A (pore) entraîne un décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation de 100 mV vers les potentiels positifs (Zou *et coll.*, 1998). Si la composante rapide est associée à l'inactivation, le changement de la dépendance au potentiel de l'inactivation du mutant hERG S631A devrait se répercuter sur la dépendance au potentiel de la composante rapide du courant de porte. **Contrairement à l'hypothèse, la dépendance au potentiel de la composante rapide n'est pas modifiée par la mutation S631A** (figure 16).



**Figure 16 : La composante rapide du domaine S4 chez le mutant S631A est similaire à hERG.** (A) Dépendance au potentiel de l'inactivation chez le canal hERG et le canal S631A. (B), (C) Courant de porte représentatif enregistré chez des oocytes de Xénope exprimant le canal hERG (A) et le canal mutant S631A à différents potentiels : +10 mV (rouge), -10 mV (vert), -30 mV (bleu) et -50 mV (cyan) à partir d'un potentiel de repos de -110 mV. (C), (D) Dépendance au potentiel du mouvement des charges de la composante rapide ( $Q_{FAST}$ ) chez le canal hERG (C) et le canal S631A (D). D'après Piper *et coll.*, 2003.

L'absence de modification de la dépendance au potentiel de la composante rapide du S4 chez le canal mutant S631A indique que cette **composante rapide ne correspond pas à l'inactivation du canal hERG**. Mais on ne peut pas conclure définitivement puisque l'effet de cette mutation résulte peut-être d'un découplage entre le mouvement du S4 (qui bouge toujours, donc la composante rapide du courant de porte est toujours présente) et la constriction du pore.

**Pour vérifier si activation et inactivation relèvent du domaine S4, il était intéressant de tester l'effet de la neutralisation des résidus chargés du domaine S4.**

### c) Mutations des résidus du domaine S4

Pour montrer que le domaine S4 contrôle directement l'inactivation du canal hERG, des mutations affectant l'inactivation sans changer l'activation seraient un bon argument. Dans cette logique, Piper et ses collaborateurs ont réalisé une mutation systématique des résidus du domaine S4. Pour chacune des mutations, la dépendance au potentiel des processus d'activation, d'inactivation et du mouvement des charges du S4 a été déterminée (tableau 3). Les mutations (R534A, V535A, L539A et E544A) affectant le mouvement du domaine S4 et le processus d'inactivation (en bleu) ne semblent pas modifier l'activation (en rouge). Seule la mutation V535A change simultanément la dépendance au potentiel de l'activation et l'inactivation.

La différence de résidus du domaine S4 affectant l'activation et l'inactivation suggère que le couplage entre l'activation et l'inactivation chez hERG est indirect *via* le domaine S4 (Piper *et coll.*, 2005).

|           | Mouvement de charges  | Inactivation          | Activation            |
|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Mutations | V <sub>0.5</sub> (mV) | V <sub>0.5</sub> (mV) | V <sub>0.5</sub> (mV) |
| hERG      | -21.9 +/- 1.9         | -87.2 +/- 0.9         | -17.7 +/- 1.2         |
| R531A     | 22.4 +/- 2.6          | -83.8 +/- 4.1         | <b>40.9 +/- 0.8</b>   |
| R534A     | -30.5 +/- 2.5         | <b>-62.5 +/- 2.8</b>  | -17.9 +/- 0.7         |
| V535A     | -49.9 +/- 3.6         | <b>-75.4 +/- 2.2</b>  | <b>-41.5 +/- 1.2</b>  |
| A536A     | -42.1 +/- 0.8         | -88.3 +/- 2.3         | <b>-34.8 +/- 0.8</b>  |
| K538A     | -39.4 +/- 2.0         | -88.9 +/- 3.6         | <b>-39.6 +/- 0.6</b>  |
| L539A     | -30.1 +/- 1.1         | <b>-79.2 +/- 3.5</b>  | -19.2 +/- 0.8         |
| D540A     | -84.2 +/- 2.6         | -91.6 +/- 4.3         | <b>-5.0 +/- 1.1</b>   |
| E544A     | -33.0 +/- 0.8         | <b>-72.6 +/- 2.5</b>  | -22.4 +/- 1.4         |

**Tableau 3 : Mutations modifiant le mouvement du domaine S4.**

Pour résumer, les résultats des différentes techniques utilisées sur hERG (FRET, courant de porte, mutagénèse) semblent plutôt indiquer que le domaine S4 contrôle séparément la porte d'activation et d'inactivation, et donc **qu'activation et inactivation sont indirectement couplées** (via S4). Mais un argument plus fort pour montrer que l'inactivation n'est pas directement couplée à l'activation serait l'obtention d'un canal chez lequel la porte d'activation est ouverte en permanence et l'inactivation intégralement conservée. C'était le **but de mon deuxième projet**.

## 2. Couplage direct entre l'activation et l'inactivation

L'étude de Panyi et Deutsch sur le canal Shaker suggère que l'inactivation est tributaire de l'état d'activation du canal (Panyi et Deutsch 2006). Etant donné qu'il n'y a pas de courant à l'état inactivé, l'état d'ouverture du canal a été mesuré indirectement par deux méthodes : cinétique de modification par le MTSET **et cinétique de libération du césium**, toutes deux utilisées comme rapporteur de l'état de la porte d'activation (ouverte ou fermée). Les résultats de cette étude indiquent que **le mouvement de la porte d'activation dépendrait de la conformation de la porte d'inactivation** révélant un couplage direct entre la porte d'activation et d'inactivation. Néanmoins, les résultats de cette étude restent discutables, car il est difficile de garantir que l'ensemble des changements conformationnels dus à l'inactivation est sans effet sur ces rapporteurs.

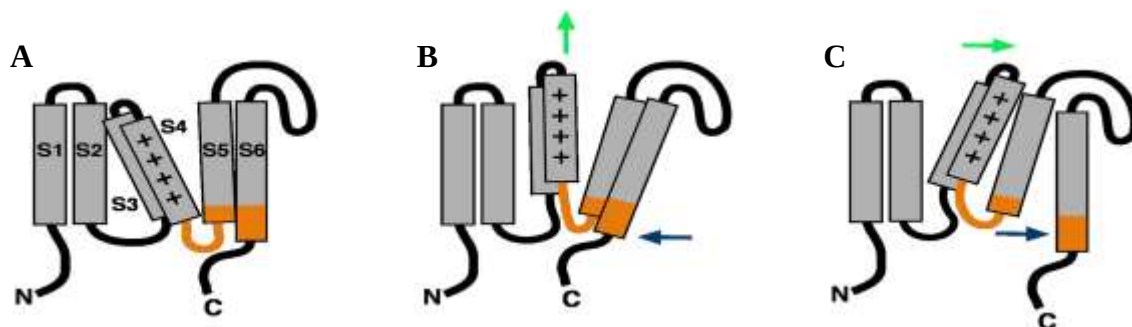
## 3. Couplage contrôlé par une porte unique permettant l'activation et l'inactivation

Les processus d'activation et d'inactivation sont-ils contrôlés par une porte unique ? Deux études récentes sur le canal spHCN (Shin *et coll.*, 2004) et K<sub>v</sub>4.2 (Barghaan et Bähring 2009) suggèrent que le couplage entre l'activation et l'inactivation résulte d'une porte unique permettant l'activation et l'inactivation.

Shin et ses collaborateurs ont mis en évidence **l'existence d'une seule porte en bloquant la porte intracellulaire du canal en configuration ouverte**. En effet, le canal spHCN mutant L466C-H462C est bloqué à l'état ouvert en présence de cadmium (Rothberg *et coll.*, 2003) et ce blocage entraîne la suppression de l'inactivation. **La porte située du côté intracellulaire du pore semble donc régir ces deux processus dans le canal spHCN**.

Une seconde étude sur le canal K<sub>v</sub>4.2 propose que **l'inactivation soit due à un découplage entre le domaine S4 et la porte intracellulaire du canal** (figure 17). Les mutations des résidus G323 (boucle S4-S5) et V404 (domaine S6) décalent la dépendance au potentiel de l'inactivation vers des potentiels plus négatifs.

De plus, des mutations dans le domaine S6 (S6) peuvent compenser les effets de mutations dans la boucle S4-S5 (S4-S5). D'après ces résultats, l'interaction S4-S5/S6 serait impliquée dans le contrôle de la porte d'inactivation, en plus du contrôle démontré de la porte d'activation (Long *et coll.*, 2005b). Les auteurs ont alors proposé un modèle selon lequel le mouvement du S4 entraîne celui du S6 (activation, figure 17B) grâce à l'interaction S4-S5/S6, la perte de cette interaction provoquant l'inactivation (figure 17C). Dans ce canal au moins, **l'inactivation résulterait donc d'un découplage entre le domaine S4-S5 et la porte intracellulaire S6.**



**Figure 17 : Modèle d'inactivation du canal Kv4.2.**

(A) Représentation du canal Kv4.2 au repos. (B) Etat activé du canal Kv4.2. Le mouvement du domaine S4 est représenté par la flèche verte et la porte intracellulaire par la flèche bleue. (C) Etat inactivé du canal Kv4.2. D'après Barghaan et Bähring 2009.

### C. Application pharmacologique potentielle d'un canal mutant de hERG

De nombreuses molécules pharmacologiques induisent le syndrome du QT long acquis en inhibant le canal hERG. Des études ont révélé que l'inhibition du canal hERG par des agents pharmacologiques est due à un mécanisme de rétention de ces molécules dans le pore du canal (Mitcheson *et coll.*, 2000a; Tristani-Firouzi *et coll.*, 2001). Selon ces études, la fermeture de la porte d'activation piégerait les molécules pharmacologiques dans le pore du canal favorisant son inhibition. Si l'effet inhibiteur des molécules est favorisé par la fermeture de la porte d'activation, la modification du processus d'activation devrait limiter l'inhibition du canal hERG par les molécules pharmacologiques.

Pour mieux comprendre l'interaction entre les processus d'activation et d'inactivation, mais aussi pour mieux comprendre le rôle de ces deux processus dans la sensibilité de hERG aux agents pharmacologiques, nous avons construit un canal mutant de hERG chez lequel le processus d'activation a été supprimé. L'étude de ce canal mutant constituait mon deuxième projet.

# RESULTATS

## Article 1 : les canaux KCNQ1 sont stabilisés à l'état fermé par leur boucle S4-S5

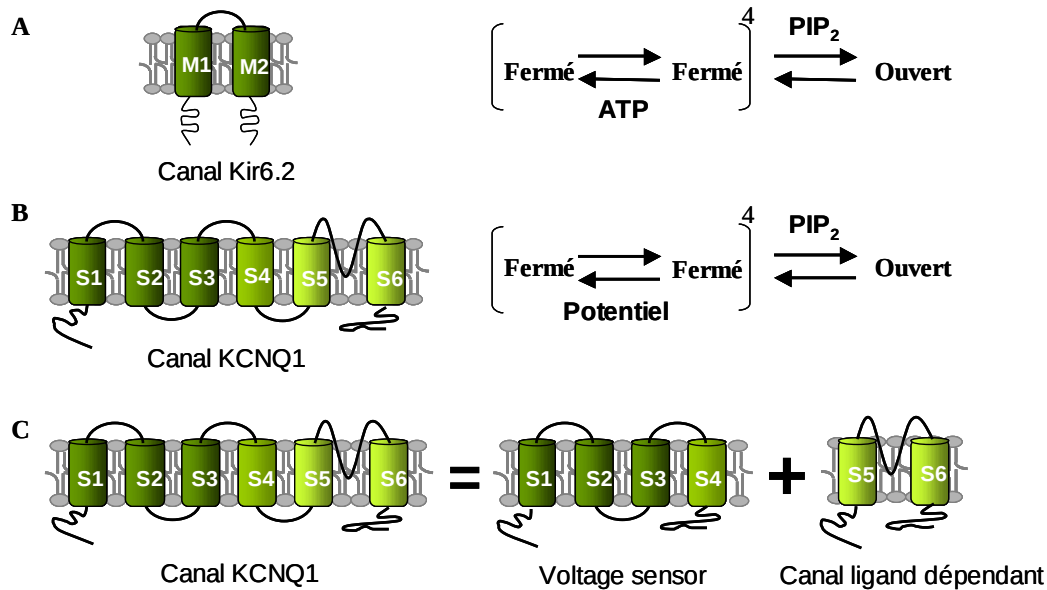
### Introduction

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de la dépendance au potentiel des canaux. Dans l'introduction de ma thèse, plusieurs observations ont suggéré que l'activation dépendante du potentiel pourrait résulter de mécanismes distincts en fonction du canal. En effet, différents modèles de mouvement du domaine S4 et d'ouverture de la porte d'activation ont été mis en évidence selon les canaux. De plus, la nature du couplage entre le mouvement du domaine S4 et l'ouverture de la porte d'activation semble être différente entre le canal K<sub>v</sub>1.2 (couplage permanent) et les canaux hERG, KAT1 et spHCN1 (couplage labile). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au canal KCNQ1. Plusieurs arguments nous ont conduit à supposer que le **canal KCNQ1 fonctionne de façon similaire à un canal ligand dépendant** tel que Kir6.2, canal ATP dépendant à deux domaines transmembranaires. **Premièrement**, la structure du **canal ligand dépendant** Kir6.2 est comparable à celle des domaines S5 et S6 des canaux dépendant du potentiel tels que KCNQ1. **Deuxièmement**, les modèles cinétiques utilisés pour le canal Kir6.2 (figure 18A) et KCNQ1 (figure 18B) sont similaires :

- leur activité est simulée en utilisant un nombre identique d'états fermés.
- leur ouverture est stabilisée par un phospholipide membranaire, le PIP<sub>2</sub> (Baukrowitz *et coll.*, 1998; Loussouarn *et coll.*, 2003).

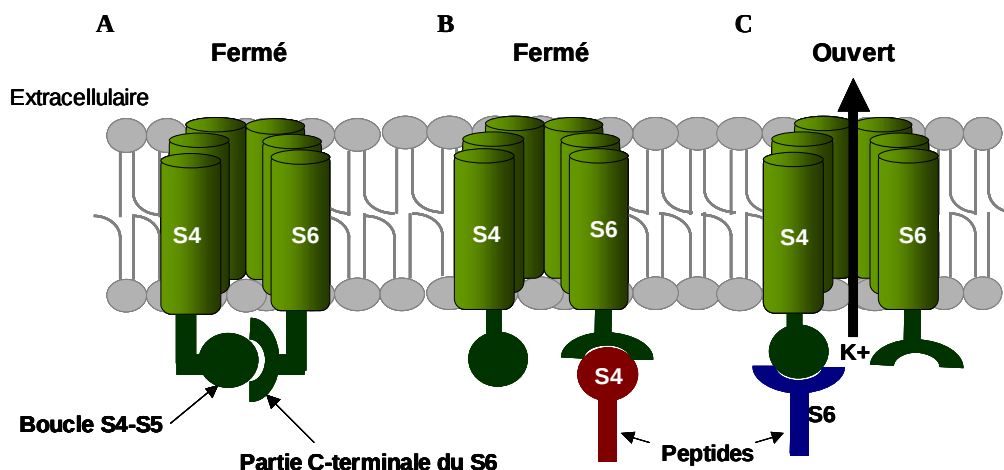
Par contre, la fermeture du canal Kir6.2 est dépendante d'un ligand, l'ATP, tandis que celle du canal KCNQ1 est dépendante du potentiel membranaire. Cette différence peut être réconciliée si on suppose qu'une région dans le « voltage-sensor » est comparable à **un ligand dépendant du potentiel chez KCNQ1**.

L'ensemble de ces données nous a conduit à supposer que le canal KCNQ1 est composé de deux parties fusionnées : un « voltage-sensor » formé du domaine S1 à S4 et d'un canal ligand dépendant constitué des domaines S5 et S6. Nous avons émis l'hypothèse que **la boucle S4-S5 est comparable à un ligand dépendant du potentiel qui se fixe sur la partie C-terminale du domaine S6 stabilisant la fermeture du canal KCNQ1 (figure 19)**.



**Figure 18 : Homologie fonctionnelle entre un canal ligand dépendant et un canal dépendant du potentiel.** Fonctionnement du canal ligand dépendant Kir6.2 (A) et du canal dépendant du potentiel, KCNQ1 (B). (C) Mécanisme d'action supposé du canal KCNQ1. D'après Loussouarn et coll., 2003.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons construit des peptides correspondant à la boucle S4-S5 et à la partie C-terminale du domaine S6. Le but de cette étude a été d'évaluer l'effet des peptides mimant la boucle S4-S5 et la partie C-terminale du domaine S6 sur l'activité du canal KCNQ1 par la technique de patch-clamp. L'expression du **peptide correspondant à la boucle S4-S5** devrait stabiliser la fermeture du canal se traduisant par **une perte de fonction (figure 19B)**. Au contraire, le **peptide correspondant à la partie C-terminale du domaine S6** devrait stabiliser l'ouverture du canal KCNQ1 en leurrant la boucle S4-S5 du canal KCNQ1. Ce peptide devrait donc déstabiliser la fermeture du canal KCNQ1 se traduisant par **un gain de fonction (figure 19C)**.



**Figure 19 : Représentation schématique du mécanisme ligand-récepteur chez KCNQ1.**

Résultats

## KCNQ1 CHANNELS ARE LOCKED CLOSED BY THEIR S4-S5 LINKER

Frank Choveau<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Rodriguez (coauthor)<sup>1,2,3</sup>, Thierry Rose<sup>6</sup>, Shehrazade Dahimène<sup>1,2,3</sup>, Hélène Boudin<sup>3,4,5</sup>, Carole Le Hénaff<sup>6</sup>, Denis Escande<sup>1,2,3</sup>, Flavien Charpentier<sup>1,2,3</sup>, Jean Mérot<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Baró<sup>1,2,3</sup> and Gildas Loussouarn<sup>1,2,3</sup>

### Co-soumis dans JBC avec le papier :

**alpha-helical structure of the S4-S5 linker region: structural scaffold for critical protein interactions in the KCNQ1 channel.**

Inge R. Boulet\*, Alain J. Labro\*, Thierry Rose, Evy Mayeur, Adam L. Raes, and Dirk J. Snyders

From INSERM<sup>1</sup>, U915, Nantes, F-44000, France; CNRS<sup>2</sup>, ERL3147, Nantes F-44035, France; Université de Nantes<sup>3</sup>, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, F-44000, France; INSERM<sup>4</sup>, U643, Nantes, F-44000 France; CHU Nantes<sup>5</sup>, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F-44000 France; Institut Pasteur<sup>6</sup>, PFBMI, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France; present address : Institut des vaisseaux et du sang<sup>7</sup>, Hôpital Lariboisière, 8 rue Guy Patin 75475 Paris cedex 10, France;

Running Head: Molecular mechanism of KCNQ1 channel voltage dependency

Voltage-dependent potassium channels are tetramers of six transmembrane domain (S1-S6) proteins. Crystallographic data demonstrate that the tetrameric pore (S5-S6) is surrounded by four voltage sensor domains (S1-S4). One key question remains: how do the voltage sensors (S4) regulate the pore gating? An interaction between the S4-S5 linker (L45) and the S6 C-terminus (S6<sub>T</sub>) seems critical but the mechanism remains elusive. Here, we designed plasmid-encoded peptides corresponding to portions of L45 and S6<sub>T</sub> of the voltage-gated potassium channel KCNQ1 and evaluated their effects on the channel activity in presence and absence of the ancillary subunit KCNE1. We show that L45 of KCNQ1 acts as a ligand that completely and reversibly inhibits the channel activity through specific interaction with S6<sub>T</sub>. Our results suggest a mechanistic model in which L45 acts as a voltage-dependent key whose interaction with S6 is favored at the resting potential. This interaction locks the channel in a closed state. Upon depolarization of the plasma membrane, S4 pulls L45, unlocking the channel.

Voltage-gated ion channels are ubiquitously expressed in human tissues where they play diverse physiological functions such as generation and modulation of the electrical activity in excitable tissues, myocyte contraction, modulation of neurotransmitter and hormone release, and electrolyte transport in epithelia.

Crystallization and X-ray diffraction of both a prokaryote and a mammalian voltage-gated potassium (Kv) channels revealed a lot of information on the structure of Kv channels (Jiang *et coll.*, 2003b; Jiang *et coll.*, 2003a; Long *et coll.*, 2005b). Even though these data initiated controversies on the dynamics of the voltage sensor, S4 (Ahern *et Horn* 2004), they provided a new template for investigations on Kv channels molecular characteristics. For example, the structure of the Kv pore domain (S5-S6) turned out to be similar to the pore domain of 2-transmembrane domain potassium channels like KcsA (Doyle *et coll.*, 1998) and KirBac1.1 (Kuo *et coll.*, 2003). Besides structure, the crystallographic analyses of KvAP and Kv2.1 gave insights on the dynamics of channels voltage dependency. Notably, this crystal structure is believed to represent the channel in an open state (Long *et*

*coll.*, 2005b) and, in this conformation, the S4-S5 linker (L45) is interacting with the S6 C-terminus (S6<sub>T</sub>). The authors used homology modeling to infer a closed state structure from the open state structure. In the closed state, the model shows that L45 and S6<sub>T</sub> are also in contact. Those results pointed to a mechanism by which L45 linkers are acting as mechanical levers to transfer the voltage sensor movement into gate opening or closure (Long *et coll.*, 2005b).

In a few other channels, the L45/S6<sub>T</sub> interaction seems rather state dependent. Regarding the hyperpolarization-activated channel KAT1, Grabe and coworkers presented results suggesting that L45 and S6<sub>T</sub> are interacting only in the channel open state (Grabe *et coll.*, 2007). In another hyperpolarization-activated channel, crosslinking of L45 and S6<sub>T</sub> prevented channel deactivation (Prole *et Yellen* 2006), suggesting that in HCN too, L45 and S6<sub>T</sub> are interacting only when the channel is open. In hERG also, a crosslinking study suggested a state-dependent L45 and S6<sub>T</sub> interaction, but, this time in the closed state (Ferrer *et coll.*, 2006). In the cited studies, the state-dependent interaction between L45 and S6<sub>T</sub> suggests that this interaction may stabilize the open state of hyperpolarization-activated channels (KAT1, HCN) and the closed state of depolarization-activated channels (hERG). In other word, L45 would be comparable to a ligand binding to S6<sub>T</sub> only when S4 is in the permissive (KAT1, HCN) or non permissive state (hERG).

The similarity between the kinetic models used for the ligand-gated potassium channel K<sub>ATP</sub> and the voltage-gated channel KCNQ1, including the stabilization of the open state by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, suggests a comparable gating mechanism between the two channels (Loussouarn *et coll.*, 2003). For KCNQ1, L45 should either stabilize the channel in the closed state (like ATP in the K<sub>ATP</sub> channel) or stabilize the channel in the open state. To test the ligand/receptor hypothesis on KCNQ1, we have designed plasmids coding for the potential ligand (L45, 16 amino acids) and receptor (S6<sub>T</sub>, 13 amino acids) of the cardiac voltage-gated potassium channel KCNQ1 (Barhanin *et coll.*, 1996; Sanguinetti *et coll.*, 1996), and tested their effects on channel function. Our results suggest that L45 stabilizes the channel in a closed conformation by interacting with S6<sub>T</sub>.

Upon depolarization of the plasma membrane, S4 pulls L45, unlocking the channel.

### Experimental Procedures

**Plasmid constructs.** Complementary DNAs encoding KCNQ1 peptides were amplified by polymerase chain reaction using specific primers corresponding to KCNQ1 S4-S5 linker (L45) or S6 C-terminus (S6<sub>T</sub>). The PCR products were cloned into pCRII-TOPO, sequenced and then cloned into pIRES2-EGFP (Clontech). The 5'-end of the forward primers contained a kozak consensus sequence followed by an initiation codon (ATG) and a glycine (GGA) to protect the ribosome binding site (Gilchrist *et coll.*, 2002).

**Cell culture and transfection.** The African green monkey kidney-derived cell line COS-7 was obtained from the American Type Culture Collection (CRL-1651) and cultured in Dubelcco's modified Eagle's medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) at 5% CO<sub>2</sub> and 95% air, at 37°C in a humidified incubator. Cells were transfected in 35 mm plates when the culture reaches 60-80% confluence, with DNA (2 to 5 µg total DNA as described below) complexed with Eugene-6 (Roche Molecular Biochemical) according to the standard protocol recommended by the manufacturer. For experiments with WT or S140G KCNE1-KCNQ1, pIRES-GFP plasmids encoding L45, S6<sub>T</sub>, or pEGFP plasmids for control cells (1.8 µg per plate) were cotransfected with the human pCDNA3.1 KCNE1-KCNQ1 (0.2 µg per plate) concatemer. In pIRES-GFP plasmids, the second cassette (GFP) is less expressed than the first cassette, guaranteeing high levels of peptides expression in fluorescent cells. The concatemer is the human KCNE1 linked to the N terminus of the human KCNQ1 (a kind gift of Dr Robert S. Kass, Department of Pharmacology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY). The green fluorescence protein (GFP) allows the detection of the cells expressing the peptide. For experiments with WT/V254L KCNQ1, the same pIRES-GFP plasmids (4µg per plate) were cotransfected with the human pCB6 KCNQ1 (1µg per plate). In experiments in which two peptides are simultaneously expressed (figure 6), DNA composition was

0.2 µg S140G KCNE1-KCNQ1, 0.9 µg L45 peptide and 0.9 µg pCB6-CD4 (Le Maout *et coll.*, 2001) for control cells or S6<sub>T</sub> pIRES-GFP plasmids. In hERG experiments, COS-7 cells were co-transfected with 0.4 µg pSI hERG (Bellocq *et coll.*, 2004a) and 1.6 µg pEGFP (control) or pIRES-GFP plasmids encoding a peptide (L45 or S6<sub>T</sub>).

**Electrophysiology.** Twenty-four to 72 hours after transfection, COS-7 cells were mounted on the stage of an inverted microscope and constantly perfused at a rate of 2 ml/min. The bath temperature was maintained at 24.0 ± 1.0°C. Stimulation, data recording, and analysis were performed by Acquis1 (Bio-Logic Science Instruments) through an analog-to-digital converter (Tecmar TM100 Labmaster; Scientific Solution). Electrodes were connected to a patch-clamp amplifier (RK-400; Bio-Logic Science Instruments). Currents were recorded in the whole-cell configuration. For KCNE1-KCNQ1 and KCNQ1 experiments, the membrane potential was stepped, in 20 mV decrements, from a holding potential of -80 mV to various voltages between +80 mV and -60 mV (4000 ms), and then stepped back to -40 mV (1000 ms), every 7 s. The activation curve was constructed from the tail current and fitted by a Boltzmann equation. KCNE1-KCNQ1 activation and deactivation kinetics were obtained by a monoexponential fit. The delay in channel activation was represented by the time of depolarization at +80 mV at which the monoexponential fit equals the initial current amplitude. For calculation of hERG half-activation potential, the membrane potential was stepped in 20 mV decrements from a holding potential of -80 mV to various voltages between +80 mV and -80 mV (2000 ms), and then stepped back to -40 mV (2000 ms), every 6 s. To observe the reversion of the peptides effect, the membrane potential was stepped from a holding potential of -80 mV to +40 mV (1000 ms) and then back to -40 mV (500 ms), every 5 s.

**Solutions.** In ruptured patch experiments, pipettes (Kimble; Vineland, NJ) were filled with the following solution (in mM): 150 KCl, 10 HEPES, 5 EGTA and 0.5 MgCl<sub>2</sub>, pH 7.2 with KOH. In permeabilized-patch experiments, the pipette solution contained (in mM): 120 K-gluconate, 25 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA, 0.8 µg/ml Amphotericin B (pH 7.2 with KOH). The standard Tyrode perfusion solution contained (in mM): 145 NaCl, 4 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES and 5 glucose, pH 7.4 with NaOH.

**Kinetic model.** KCNE1-KCNQ1 kinetic model is derived from Rudy's model (Silva et Rudy 2005). This model has been optimized using Model Maker 4.0 (AP Benson) to fit our experimental data, with an additional constraint: Po is less than 0.65 at potentials where the channel is full-activated (control model). This constraint comes from the observation that S6 peptide I346-K358 can increase the maximal current by 50% (figure 2). Two other models were designed, with either L45 or S6<sub>T</sub> peptide bound to the last closed state before channel opening, when endogenous L45 linkers are completely removed from the binding site. The three models (control, L45, S6<sub>T</sub>) were simultaneously optimized for current density, half-activation potential, activation and deactivation kinetics using Mathematica (Wolfram research). Optimized transition rates are presented in table 1.

**Statistics.** All data are expressed as means ± S.E.M. Statistical differences between samples were determined using a Student t-test for half-activation potential, activation and deactivation rate and using a rank-sum test for current densities because they were not normally distributed (SigmaStat 2.03, SPSS Inc.).

## RESULTS

**L45 linker peptides inhibit KCNE1-KCNQ1 channels.** L45 and S6<sub>T</sub> plasmids were designed based on sequence alignment with Shaker (figure 1), in which interacting areas in S4-S5 (L45) and the S6 C-terminus (S6<sub>T</sub>) were suggested (Lu *et coll.*, 2001; Lu *et coll.*, 2002). For each region, three different plasmids were designed, with the same length but different starting positions, to compensate for the inaccuracy of the alignment

due to the poor similarity between KCNQ1 and Shaker sequences. To study the effect of peptides on channel activity, the cDNA coding for a peptide was cotransfected with the KCNE1-KCNQ1 fusion protein cDNA (Wang *et coll.*, 1998). This fusion protein limits variability in the current characteristics caused by variable KCNQ1/KCNE1 expression ratio (Park *et coll.*, 2005).

If the endogenous L45 peptide is acting like a ligand modulating channel gating, then the exogenous L45 peptide should also modulate the channel activity. We examined the peptide effects using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique, right after patch rupture. We show that two of the three L45 peptides (W248-I263 and L251-L266) significantly reduced the WT KCNE1-KCNQ1 current (figure 2A,C). Moreover, activation was slowed by both peptides (figure 2E) but deactivation was unaffected (figure 2F). The absence of effect of peptide V254-G269 suggests that residues that are critical for the interaction are located in the L251-V254 region.

**S6 C-terminus peptides activate KCNE1-KCNQ1 channels.** If the S6 C-terminus is the receptor for L45, then the S6<sub>T</sub> peptides should decoy the endogenous L45 linker, prevent its binding to S6<sub>T</sub>, and increase the channel activity. Indeed, two of them (P343-V355 and I346-K358) up-regulated the WT channel and shifted the half-activation potential toward negative values (figure 2B-D). Activation was accelerated (figure 2E) but deactivation was unaffected (figure 2F). The absence of effect of peptide F340-A352 suggests that residues that are critical for the interaction are located in the F340- P343 region.

**State-dependent reversibility of the peptides effects.** In the following experiments, we studied the most potent inhibiting peptide L251-L266 and the most potent activating peptide I346-K358 in greater details. We first analyzed the reversibility of the effects, as peptides were diffusing out of the cytosol and into the pipette, after patch rupture. In cell expressing the KCNE1-KCNQ1 alone, the current was quite stable, with a slight rundown (Loussouarn *et coll.*, 2006). In cell co-expressing the channel and the L251-L266 peptide, the current density increased to reach control values measured in absence of peptide.

Conversely, in cell co-expressing the channel and the I346-K358 peptide, the current density decreased to reach control values measured in absence of peptide. (figure 3A-B). This suggests that both peptides do not act on channel trafficking but strictly on gating.

If the peptide binding modulates the gate conformation, it is likely that, *vice-versa*, the peptide binding/unbinding is state-dependent. To test this, depolarization every 20 s (instead of 2 s) were used to favor channel closure state. In this condition, no current recovery was observed suggesting that peptide unbinding is favored by channel opening and demonstrating the state-dependent channel-peptide interaction (figure 3C-D). Altogether, these results are in agreement with the hypothesis that L45 is acting like a ligand and S6<sub>T</sub> the target. The inhibiting effect of L45 suggests that its role is to lock the channel closed state.

*Peptides effect on KCNQ1 without KCNE1.* To evaluate the role of KCNE1 in the ligand/receptor mechanism, we coexpressed the most potent peptides (L251-L266 for L45 and I346-K358 for S6<sub>T</sub>) with KCNQ1 alone. Like in the presence of KCNE1, we observed an inhibition by L251-L266 and an activation by I346-K358 in its absence (figure 4A,C). These results suggest the L45/S6<sub>T</sub> state-dependent interaction is independent of the presence/absence of KCNE1.

*Mutations that decrease S4-S5 and S6<sub>T</sub> interaction also alter the peptide effect.* Altogether, all the data presented above support the hypothesis that L45 peptides target the channel S6 C-terminal domain and *vice-versa*. To further address the specific interaction between the peptides and the channel, we evaluated the effect of the peptides bearing mutations known to decrease L45 and S6<sub>T</sub> interaction. Boulet et al have shown that the V254L mutation in L45 and the L353A mutation in S6<sub>T</sub> lead to the apparition of an instantaneous current component, suggesting that L45 and S6<sub>T</sub> interaction is weakened by the mutation (cf co-submitted paper). We introduced the V254L mutation onto the L45 peptide L251-L266, and L353A onto the S6<sub>T</sub> peptide I346-K358 and evaluated their effects on KCNQ1. Both peptides effects were abolished (figure 4B,C), further supporting the idea that the L45 peptides are specifically targeting S6<sub>T</sub>, and *vice-versa*. Moreover, on the double mutant V254L/L353A, Boulet et al

have observed a rescue of the partial open phenotype provoked by each mutation in the channel, suggesting that mutation L353A in S6<sub>T</sub> is compensating for the mutation V254L in L45. If the S6<sub>T</sub> peptide is specifically interacting with the channel, then the mutant peptide L353A should interact with and upregulate the mutant channel V254L. Indeed, the peak current measured when the S6<sub>T</sub> peptide L353A and the mutant channel V254L were coexpressed, was significantly greater compared to the mutant channel expressed alone (from  $6.3 \pm 0.8$ ,  $n=10$  to  $11.8 \pm 2.2$ ,  $n=13$ ;  $p<0.05$ ). This result is strongly suggesting a specific interaction between the channel and the peptide.

*L45 peptides effect on a voltage independent mutant.* The KCNE1-KCNQ1 mutant S140G does not show any voltage dependency in the -80 to +80 mV range (Chen et coll., 2003). If L45 peptides bind to S6<sub>T</sub> to stabilize the closed state, they should inhibit the mutant channel as well. Figure 5 shows that coexpression of the KCNE1-KCNQ1-S140G mutant channel with the L45 peptides (W248-I263 or L251-L266) leads to an almost complete inhibition of the current (figure 5A-B), whereas the activating peptides had no effect on the already fully activated S140G channel. In cells expressing the inhibitory L45 peptides, patch rupture leads to a gradual increase in current density, which reaches control values measured in absence of peptide (figure 5C-E), consistent with the peptide dilution into the patch pipette, as for the WT channel. The current recovery did not occur when peptide dilution was prevented using the permeabilized-patch configuration (figure 5C-D). It is worth noting that the current increased toward values similar to that observed in the absence of peptide indicating that the peptides affect channel gating but not trafficking. Importantly, the reversion of the peptide effects we observed indicates a loose peptide/channel association consistent with a loose L45/S6<sub>T</sub> interaction in the channel.

*L45 and S6<sub>T</sub> peptides interact with each other.* Our observations suggest an interaction between L45 and S6<sub>T</sub> in the channel protein. Accordingly, when the two peptides are co-expressed, they should bind to each other and annihilate their respective effect. To confirm this, we used the KCNE1-KCNQ1 S140G mutant, which is sensitive to the L45 but not the S6<sub>T</sub> peptides. When both a L45 (W248-I263 or L251-L266) and a S6<sub>T</sub> peptide (I346-K358) were coexpressed with the channel, the inhibition of S140G KCNE1-KCNQ1 by a L45 peptide was not observed (figure 6). This loss of inhibition is consistent with the idea that the S6<sub>T</sub> peptide I346-K358 associates with the L45 peptide and competitively prevents L45 peptide association with the channel S6<sub>T</sub>. Hence L45 and S6<sub>T</sub> peptides that bind the WT channel can also bind to each other. Interestingly, the effects of L45 peptides are not prevented by the S6<sub>T</sub> peptide F340-A352 that does not upregulate the WT channel either. This suggests that the S6<sub>T</sub> peptide that does not bind the WT channel cannot bind the L45 peptide either, further confirming the specificity of the L45/S6<sub>T</sub> interaction.

*L45 and S6<sub>T</sub> interaction is channel-specific.* To establish the channel-specificity of the L45 peptide L251-L266 and the S6<sub>T</sub> peptide I346-K358 for KCNE1-KCNQ1, we tested their potential effects on hERG, another voltage-gated potassium channel. As shown in figure 7A-C, KCNQ1 L45 and S6<sub>T</sub> peptides had no effect on hERG current amplitude and half-activation potential confirming that L45 peptide binds to the S6<sub>T</sub> in a channel-specific manner.

*A kinetic model describes the observed data for all the peptides.* To test the consistency between the hypothesis and the altered biophysical parameters in the presence of the peptide, we developed a kinetic model to describe the peptides-induced alterations in KCNE1-KCNQ1 channel properties (Silva et Rudy 2005). We deliberately made the peptides bind only the closed state immediately preceding the concerted opening (figure 8A) because, in the other closed states, the proximity of the endogenous L45 and S6<sub>T</sub> is supposed to prevent peptides access. In the model, the L45 peptide mimics the endogenous L45 linker and locks the channel in a closed state. Conversely, the S6<sub>T</sub> peptide decoys the

endogenous L45 peptide and limits this locking. This theoretical model fits the observed data: the peptides affect not only the current amplitude but also the half activation potential and the activation kinetics, and they do not affect the deactivation kinetics (figure 8B-C). Moreover, the kinetic model suggests that the peptide should alter the delay in channel activation, by reducing the transition into the closed lock states 1 and 2.

## DISCUSSION

Altogether, our results show that L45 acts as an inhibiting ligand binding with low affinity to S6<sub>T</sub> only at negative potentials, locking the S5-S6 pore domain in a closed state. The state-dependent interaction between L45 and S6<sub>T</sub> has already been proposed by Ferrer and collaborators for hERG, another delayed rectifier potassium channel. This idea was suggested by the fact that a covalent link between L45 and S6<sub>T</sub> stabilizes hERG closed state (Ferrer *et coll.*, 2006). If L45 and S6<sub>T</sub> interact in both the closed and open states, a covalent interaction should not lead to channel closure. If conversely, L45 interacts with S6 only in the closed state, one expects that forcing L45 interaction with S6 closes the channel.

In the present study, we unveiled a similar state-dependent interaction between L45 and S6<sub>T</sub> in KCNQ1 channels, and provide a mechanistic scheme in which a ligand attached to S4 (L45) interacts with the pore and locks it closed in a voltage dependent fashion. This mechanism supports the functional model in which the 6-transmembrane domain KCNQ1 channels may be regarded as the fusion of a voltage sensor domain (S1-S4) and a ligand-gated channel (S5-S6) very similar to a 2-transmembrane domain channel.

In this model, the vicinity between L45 and S6<sub>T</sub> in the closed state suggests that the interaction between L45 and S6<sub>T</sub> is loose to allow L45/S6<sub>T</sub> unbinding upon depolarization. We tried to confirm this by biochemical methods using synthetic MG-L251-L266 and MG-I346-K358 peptides, but we could not solubilize the peptides at concentrations greater than 100 µM and did not observe any interaction using differential ultracentrifugation and native gels.

One possibility is that the cytosol provides an environment to solubilize the peptide in the millimolar range, and that this range must be reached to uncover the peptide-peptide or peptide-channel interaction. Noteworthy, protein expressed under the control of a CMV promoter can reach expression level in the millimolar range (Lin *et coll.*, 1999; Rex *et coll.*, 2005). Yeast two hybrid technique was also used to probe the L45 and S6<sub>T</sub> peptides interaction in a “cytosolic” environment but no interaction between L251-L266 and I346-K358 could be detected. The later result is probably because of the weakness of the interaction and the poor sensitivity of the technique. Nevertheless, although chemical and biochemical approaches failed to demonstrate direct L45-S6<sub>T</sub> interaction, our experiments analyzing the effects of V254L and L353A point mutations (Figure 4), the L45/S6<sub>T</sub> peptides interaction (Figure 6), and channel specificity (Figure 7) strongly support this notion. Importantly, all these results are consistent with a loose interaction between L45 and S6<sub>T</sub>.

Interestingly, the ligand/receptor mechanism we unveiled in this study may explain the surprising observation that hyperpolarization-activated channels have a similar voltage sensor S4 as depolarization-activated channels but an opposite response to depolarization. In the hyperpolarization-activated channel KAT1 (Grabe *et coll.*, 2007) and HCN (Chen *et coll.*, 2001), L45 has also been suggested to couple voltage sensing and pore opening by a labile binding (Chen *et coll.*, 2001). In mirror to our model where L45 binds S6<sub>T</sub> in the closed state, L45/S6 interaction seems present only in the open state of KAT1 and HCN (Grabe *et coll.*, 2007; Prole et Yellen 2006). This would explain why the latter channels are closed by membrane depolarization. The state-dependent interaction between L45 and S6<sub>T</sub> observed in hERG, KAT1, HCN, and now in KCNQ1 channels suggest that the mechanism described here may be applied to other voltage-gated potassium channels, and probably sodium and calcium channels which share the same overall structure with Kv tetramers.

In summary, the activation mechanism presented here describes the pore domain as spontaneously opening and closing, but locked closed by the L45 ligand in a

voltage-dependent manner. This new mechanistic model is in contrast with the model associated with the crystal structure of Kv1.2 (Long *et coll.*, 2005b), which suggests at least two mechanisms (mechanical lever and ligand/receptor) may underlies the channels voltage dependency. Moreover, other molecular mechanisms will have to be taken into account to fully understand the complex voltage dependency, like the molecular events accompanying the concerted channel opening triggered by S4 movement (Soler-Llavina *et coll.*, 2006).

More generally, application of the ligand/receptor mechanism to voltage-gated ion channels may lead to the design of peptides specifically down- or upregulating one specific type of ion channel. This may open new therapeutic avenues to treat channelopathies.

## REFERENCES

1. Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R. (2003a) *Nature* **423**, 42-48
2. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003b) *Nature* **423**, 33-41
3. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005b) *Science* **309**, 903-908
4. Ahern, C. A. and Horn, R. (2004) *Trends Neurosci.* **27**, 303-307
5. Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69-77
6. Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A. (2003) *Science* **300**, 1922-1926
7. Grabe, M., Lai, H. C., Jain, M., Nung, J. Y., and Yeh, J. L. (2007) *Nature* **445**, 550-553
8. Prole, D. L. and Yellen, G. (2006) *J.Gen.Physiol* **128**, 273-282
9. Ferrer, T., Rupp, J., Piper, D. R., and Tristani-Firouzi, M. (2006) *J.Biol.Chem.* **281**, 12858-12864
10. Loussouarn, G., Park, K. H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F., and Escande, D. (2003) *EMBO J.* **22**, 5412-5421
11. Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996) *Nature* **384**, 78-80
12. Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., and Keating, M. T. (1996) *Nature* **384**, 80-83
13. Gilchrist, A., Li, A., and Hamm, H. E. (2002) *Sci.STKE*. **2002**, L1
14. Le Maout, S., Welling, P. A., Brejon, M., Olsen, O., and Merot, J. (2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 10475-10480
15. Bellocq, C., Wilders, R., Schott, J. J., Louerat-Oriou, B., Boisseau, P., Le Marec, H., Escande, D., and Baro, I. (2004a) *Mol.Pharmacol.* **66**, 1093-1102
16. Silva, J. and Rudy, Y. (2005) *Circulation* **112**, 1384-1391
17. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001) *Nature* **413**, 809-813
18. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002) *J.Gen.Physiol* **120**, 663-676
19. Wang, W., Xia, J., and Kass, R. S. (1998) *J.Biol.Chem.* **273**, 34069-34074
20. Park, K. H., Piron, J., Dahimene, S., Merot, J., Baro, I., Escande, D., and Loussouarn, G. (2005) *Circ.Res.* **96**, 730-739
21. Loussouarn, G., Baro, I., and Escande, D. (2006) *Methods Mol.Biol.* **337**, 167-183

22. Chen, Y. H., Xu, S. J., Bendahhou, S., Wang, X. L., Wang, Y., Xu, W. Y., Jin, H. W., Sun, H., Su, X. Y., Zhuang, Q. N., Yang, Y. Q., Li, Y. B., Liu, Y., Xu, H. J., Li, X. F., Ma, N., Mou, C. P., Chen, Z., Barhanin, J., and Huang, W. (2003) *Science* **299**, 251-254
23. Lin, P., Luby-Phelps, K., and Stull, J. T. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 5987-5994
24. Rex, T. S., Peet, J. A., Surace, E. M., Calvert, P. D., Nikonov, S. S., Lyubarsky, A. L., Bendo, E., Hughes, T., Pugh, E. N., Jr., and Bennett, J. (2005) *Mol.Vis.* **11**, 1236-1245
25. Chen, J., Mitcheson, J. S., Tristani-Firouzi, M., Lin, M., and Sanguinetti, M. C. (2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 11277-11282
26. Soler-Llavina, G. J., Chang, T. H., and Swartz, K. J. (2006) *Neuron* **52**, 623-634

### FOONOTES.

We thank Béatrice Leray, Marie-Joseph Louérat and Agnès Carcouët for expert technical assistance. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), from the Agence Nationale de la Recherche (ANR -05-JCJC-0160-01) to GL and from Vaincre La Mucoviscidose to JM. IB, JM and GL are recipients of a tenure position supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). HB is recipient of a tenure position supported by the Inserm. FC is supported by Génavie, the « Fondation pour la recherche Médicale » and « the Fédération Française de Cardiologie ». SD was the recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche.

## FIGURE LEGENDS.

**Fig. 1.** Determination of the hypothetical voltage-dependent ligand and its binding site. Alignment with Shaker sequence. Bold: interacting area in L45 and the S6 C-terminal part as suggested by Lu and coworkers (Lu *et coll.*, 2001; Lu *et coll.*, 2002). Black bars represent the peptides selected to probe the ligand/binding site hypothesis. Positively and negatively charged residues are presented in red and yellow, respectively.

**Fig. 2.** Effects of “L45 linker” or the “S6 C-terminus” peptides on KCNE1-KCNQ1 currents. **A, B**, representative whole-cell recordings of the WT KCNE1-KCNQ1 current in the absence (Control) and in the presence of L45 peptides (A) or S6<sub>T</sub> peptides (B). Inset: voltage protocol used in A and B. **C, D, E, F** KCNE1-KCNQ1 tail current density at -40 mV after a prepulse at +80 mV (C), half-activation potential ( $V_{1/2}$  act, D), activation time constant at potential from 0 to +80 mV ( $\tau_{act}$ , E) and deactivation time constant at -40 mV ( $\tau_{deact}$ , F) in the absence and in the presence of various L45 or S6<sub>T</sub> peptides (n = 15-58). Statistics: \*: p < 0.01 for one peptide; \*\*: p < 0.01 for two peptides.

**Fig. 3.** Reversibility of the peptides effects. **A, C** KCNE1-KCNQ1 tail current density measured at -40 mV after a 1s prepulse at +80 mV, as a function of time after patch rupture, in representative cells expressing no peptide (control) and or one of the peptides (L251-L266 or I346-K358). Two different acquisition frequencies were used (A: a depolarization every 2 s; C: a depolarization every 20 s). Resting potential: -80 mV. **B, D** average tail density current right after patch rupture (0) and at the steady state (stab) for a depolarization every 2 s (B; n= 8-10) or a depolarization every 20 s (D; n= 7-10). Statistics: \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01.

**Fig. 4.** Effects of WT and mutant L45 or S6<sub>T</sub> peptides on KCNQ1 currents. **A**, representative whole-cell recordings of not transfected cells (NT), WT KCNQ1 current in the absence (Control) and in the presence of the L45 peptide (L251-L266) or the S6<sub>T</sub> peptide (I346-K358). Inset: voltage protocol used. **B**, representative whole-cell recordings of the WT KCNQ1 current in the absence (Control) and in the presence of a mutant L45 peptide (L251-L266 V254L) or a mutant S6 C-terminus peptide (I346-K358 L353A). **C**, KCNE1-KCNQ1 peak current density at +80 mV, half activation potential ( $V_{1/2}$ ) and slope (K) in the conditions shown in A and B (n = 5 for NT, 7-10 otherwise). Statistics: \*: p < 0.05.

**Fig. 5.** Effects of L45 or the S6 C-terminus peptides on S140G KCNE1-KCNQ1 currents. **A**, representative ruptured patch recordings of the S140G KCNE1-KCNQ1 current in the absence (S140G) and in the presence of L45 peptides (W248-I263 or L251-L266) or a S6<sub>T</sub> peptide (I346-K358). Same voltage protocol as in figure 2. **B**, S140G KCNE1-KCNQ1 current density measured on the late current (n = 9-21). **C**, S140G KCNE1-KCNQ1 tail current density measured at -40 mV after a prepulse at +40 mV during dilution of L45 peptides and in permeabilized configuration (perm) (n = 8) in representative cells. **D**, mean tail-current density measured as in C, immediately after patch rupture/permeabilization (0) and after current stabilization (stab). **E**, reversion time constant ( $\tau_{reversion}$ ) determined from a monoexponential fit of the run-up in the conditions presented in (C) (n = 6-8). Statistics: \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01.

**Fig. 6.** Interaction between L45 and S6<sub>T</sub> peptides probed by S140G. KCNE1-KCNQ1 S140G tail current densities in the absence (S140G) and in the presence of various L45 or/and S6 C-terminus peptides suggesting interactions between L251-L266 and I346-K358, W248-I263 and I346-K358 and the lack of interaction between L251-L266 and F340-A352, and between W248-I263 and F340-A352 (n = 9-13). Statistics: \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01.

**Fig 7.** Specificity of peptides effects on KCNQ1. **A**, representative whole-cell recordings of WT hERG current in the absence (hERG) and in the presence of L45 (L251-L266) or S6<sub>T</sub> peptide (I346-K358). Inset: voltage protocol. **B, C**, hERG tail current density at -40 mV after a prepulse at +80 mV (B), half activation potential (C) in the same conditions (n = 14-22).

**Fig. 8.** Kinetic model of KCNE1-KCNQ1 and its interactions with L45 or S6<sub>T</sub> peptide. **A**, kinetic model scheme. This model is based on Rudy's model for the KCNE1-KCNQ1 tetramer (Silva et Rudy 2005). We hypothesize that the unbinding of the L45 and S6<sub>T</sub> domains unlocks the channel and corresponds to the last transition of the closed channel (closed locked 1 state to closed unlocked state). Peptides are likely to interact with each monomer in the unlocked states. The model covers three experimental conditions: absence of peptide (condition 1, white box), presence of L45 peptides (condition 2, pink box) and presence of S6<sub>T</sub> peptides (condition 3, green box). Optimized transition rates are presented in table 1. **B**, simulated currents during step protocols in the absence (control) or the presence of L45 or S6<sub>T</sub> peptide. **C**, comparison between simulated and measured half-activation potential, activation kinetics, delay of activation, and deactivation kinetics versus current density. The changes of these parameters driven by the peptides are well described by the model. The continuum of simulated results in presence of peptides (solid lines) is obtained by varying the binding rates of the peptides.

Figure 1

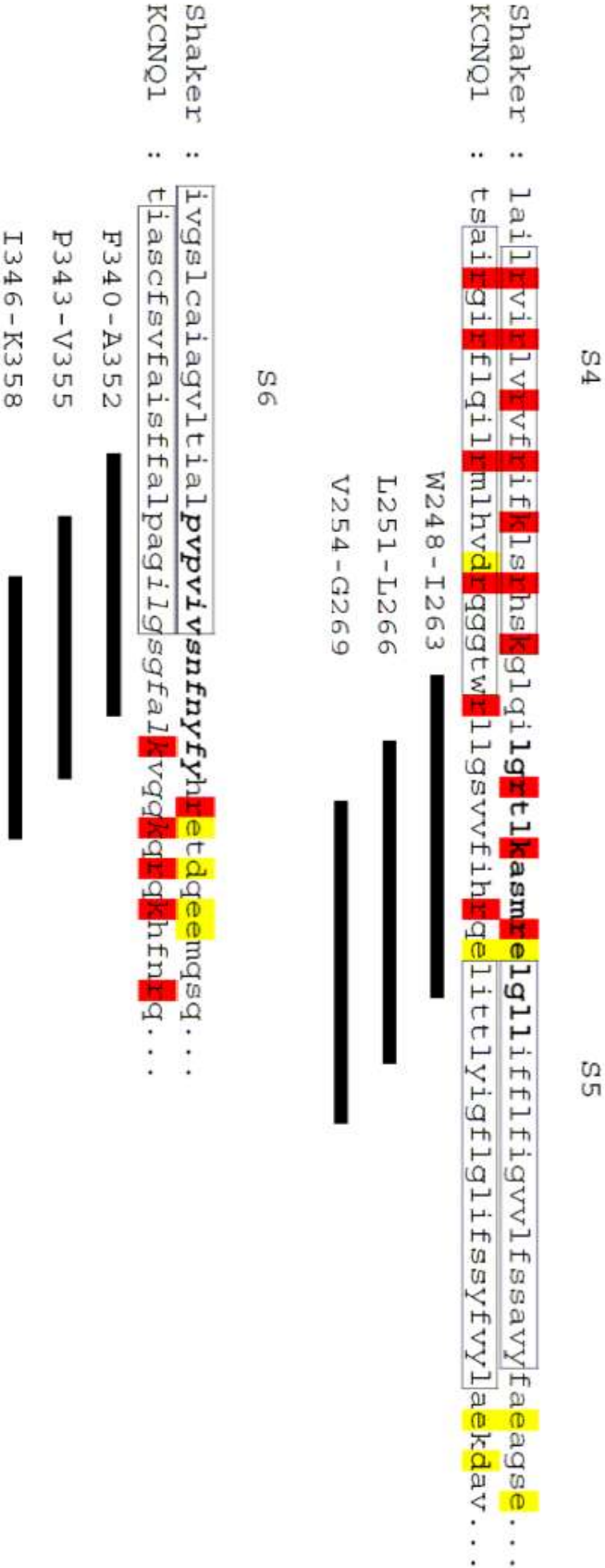


Figure 2

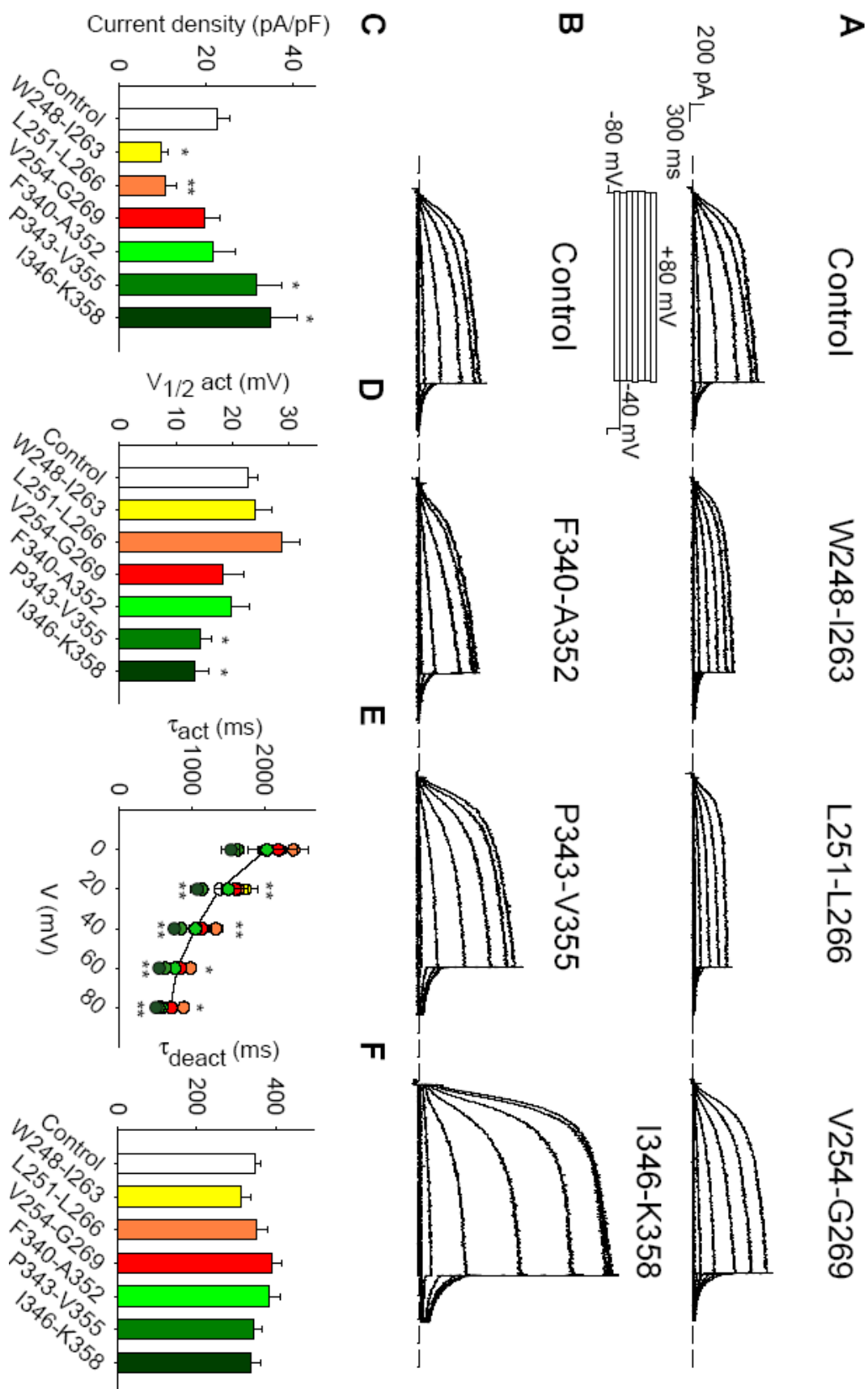


Figure 3

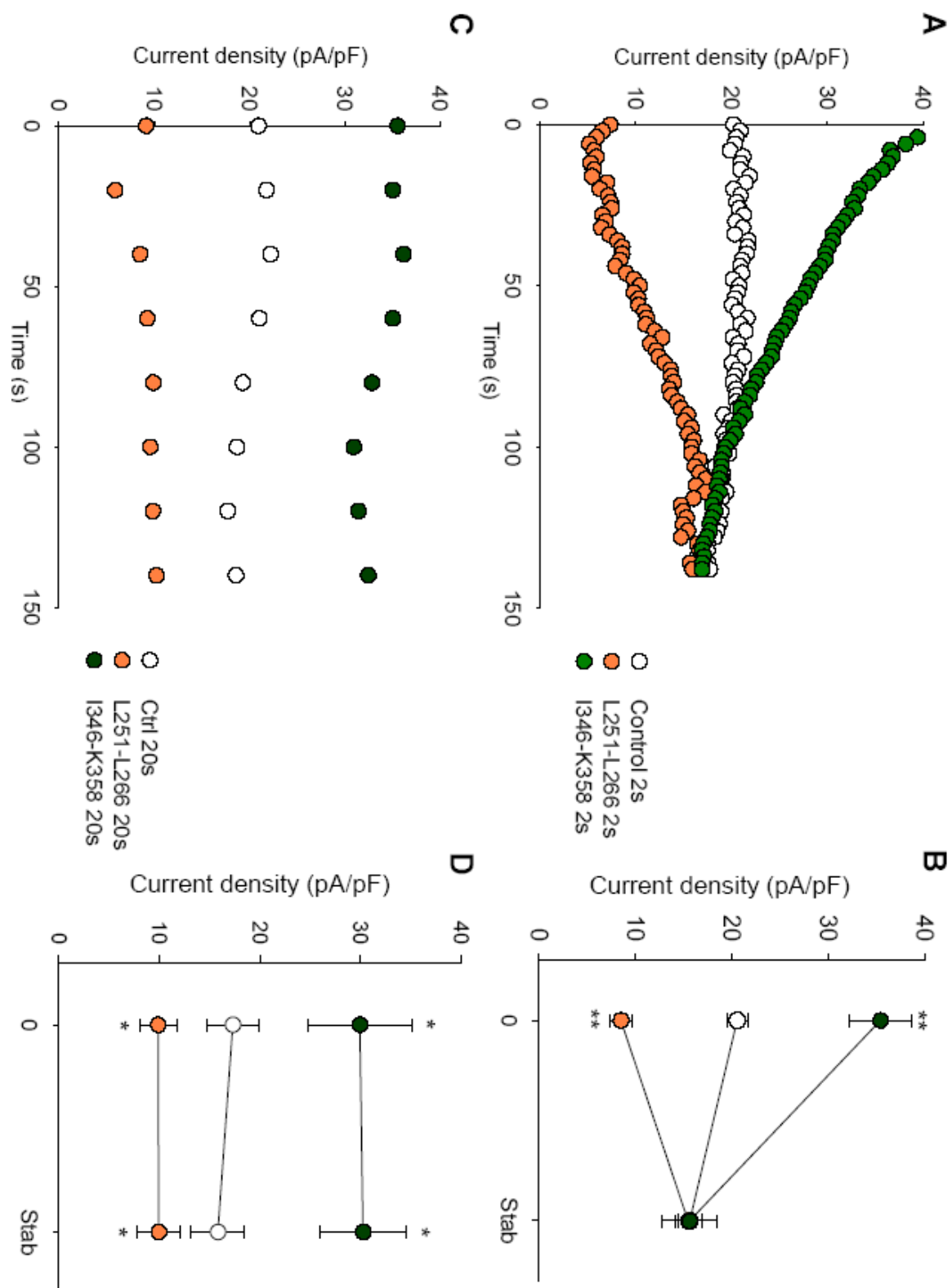


Figure 4

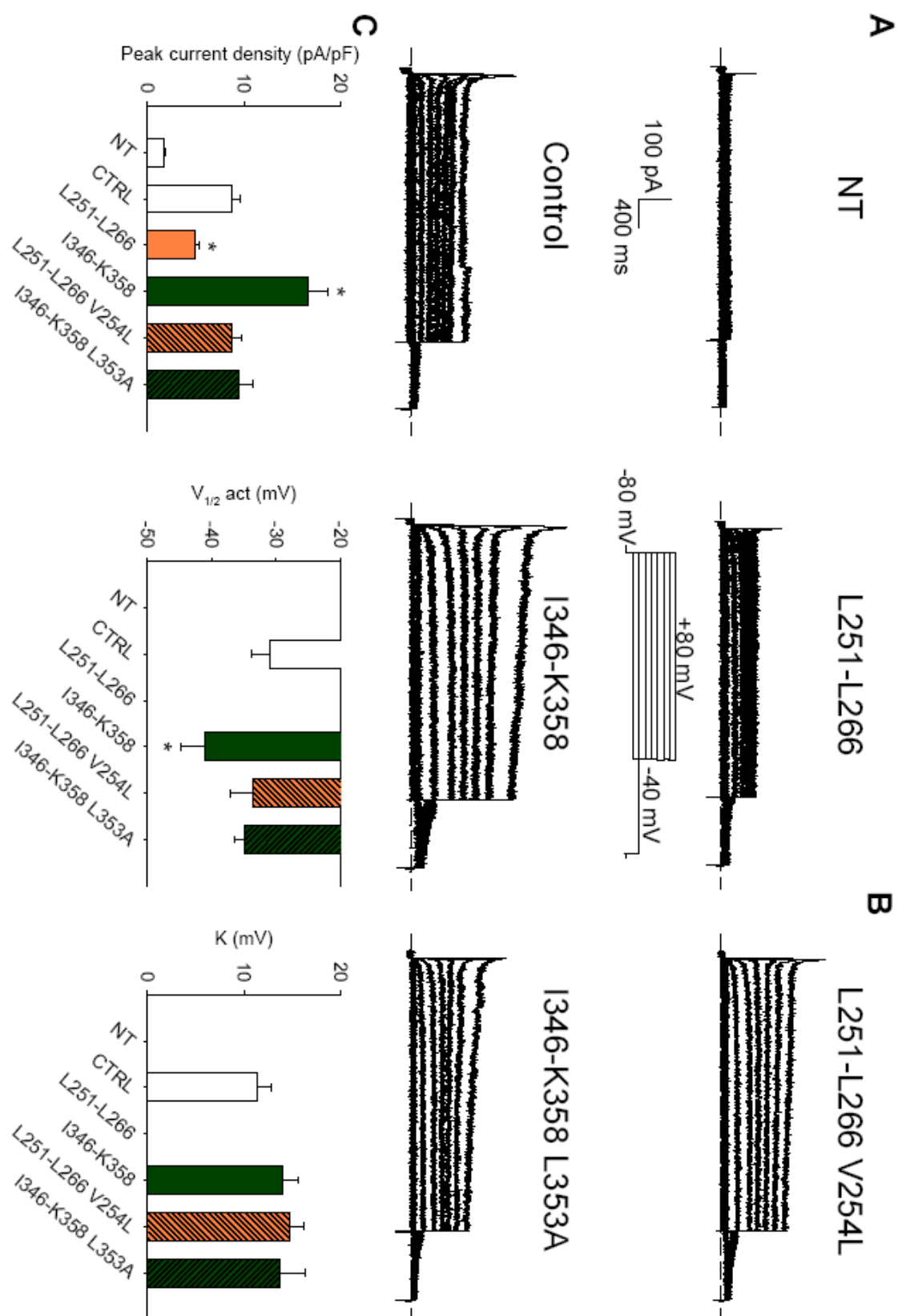


Figure 5

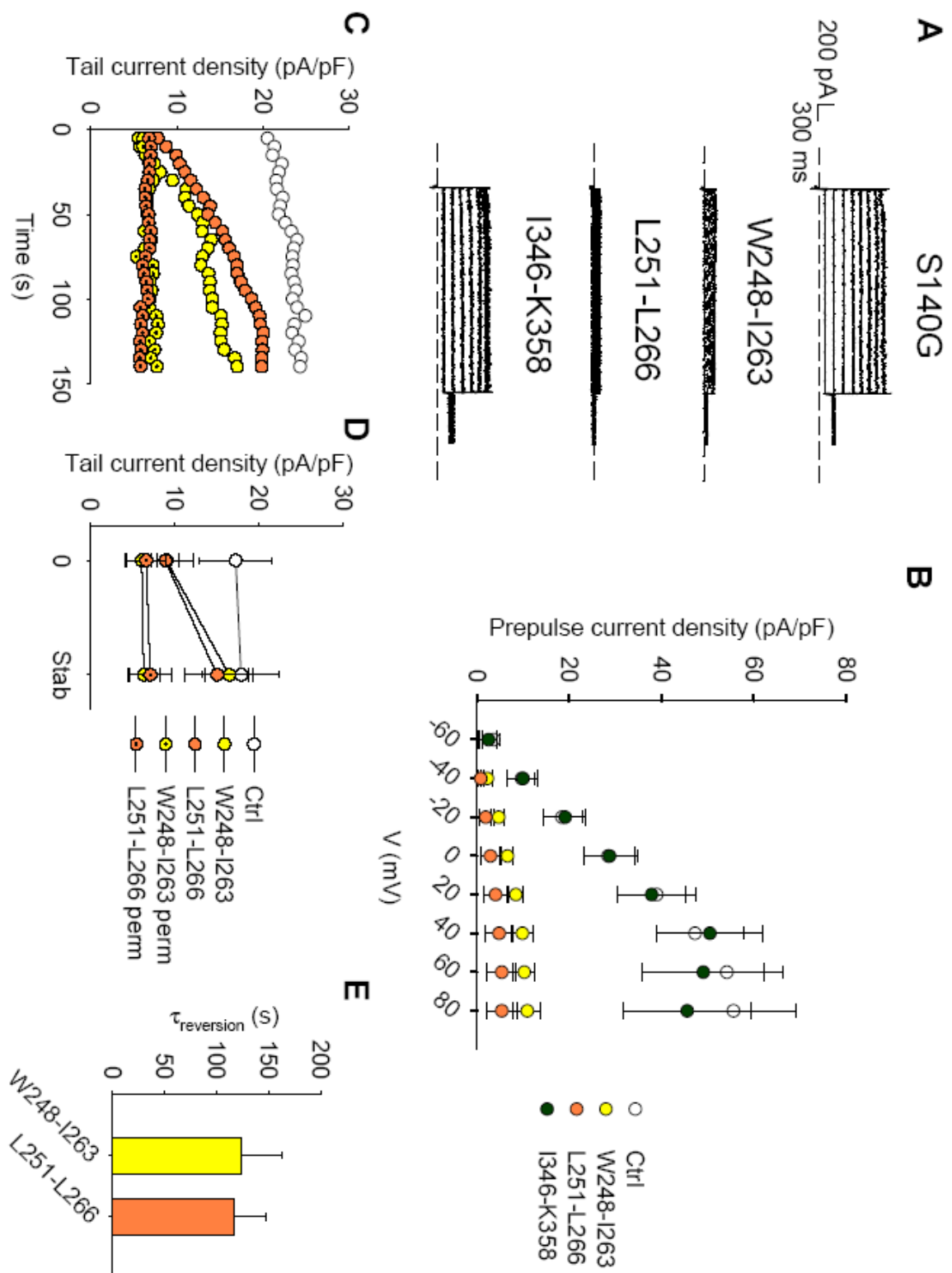


Figure 6

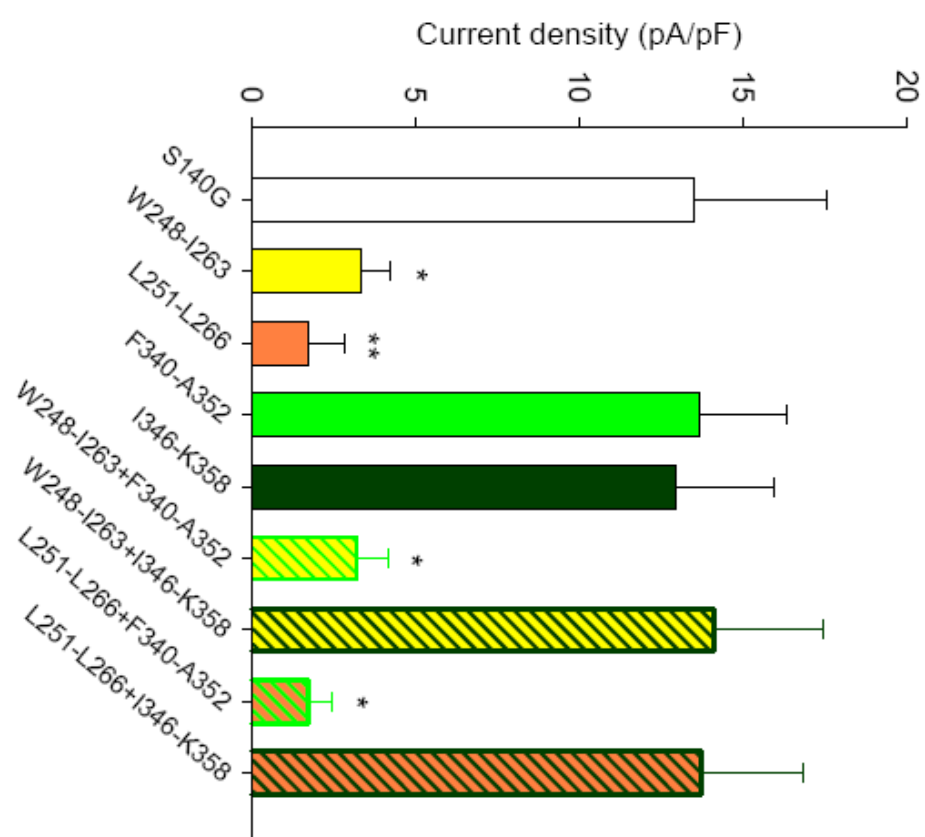


Figure 7

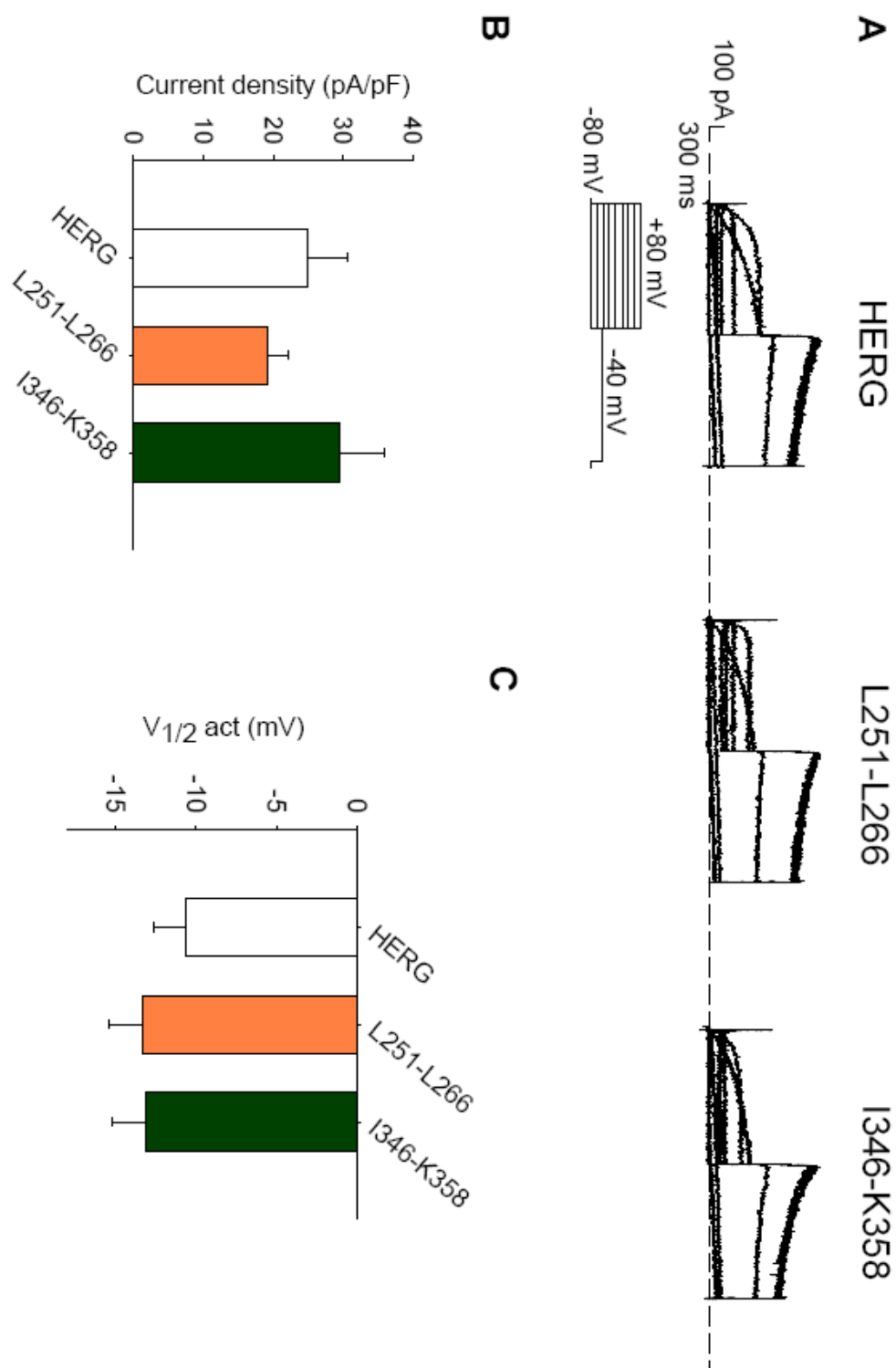


Figure 8

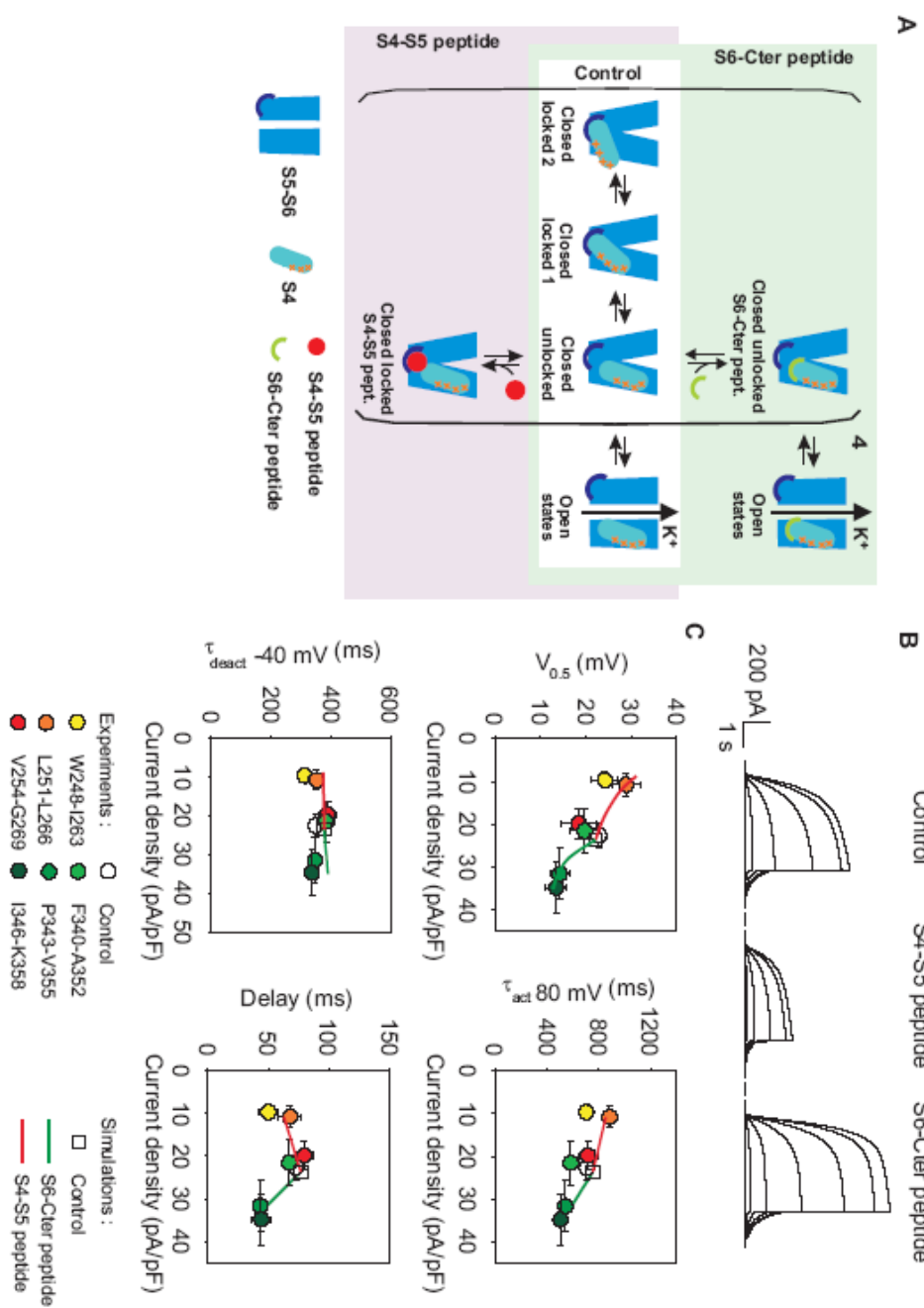


Table 1

| Transition description                           | Rudy's<br>model<br>notation(19) | Transition rate (ms <sup>-1</sup> )                                                                 |
|--------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Voltage sensor transition rates                  |                                 |                                                                                                     |
| Closed Locked 2 (CL2) →<br>Closed Locked 1 (CL1) | $\alpha$                        | $6.31 \cdot 10^{-5}$                                                                                |
| CL1 → CL2                                        | $\beta$                         | $2.182 \cdot 10^{-5} \cdot \exp\left(-0.776 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{V \cdot F}{R \cdot T}\right)$ |
| CL1 → Closed unlock (CU)                         | $\gamma$                        | $3.94 \cdot 10^{-3} \cdot \exp\left(0.339 \cdot \frac{V \cdot F}{R \cdot T}\right)$                 |
| CU → CL1                                         | $\delta$                        | $1.487 \cdot 10^{-3} \cdot \exp\left(-0.117 \cdot \frac{V \cdot F}{R \cdot T}\right)$               |
| Peptide binding/unbinding transition rates       |                                 |                                                                                                     |
| CU → Closed locked pept. S4-S5<br>(CLP4)         |                                 | $2.881 \cdot 10^{-5}$                                                                               |
| CLP4 → CU                                        |                                 | $4.038 \cdot 10^{-5}$                                                                               |
| CU → Closed unlock pept. S6-Cter<br>(CUP6)       |                                 | $2.798 \cdot 10^{-2}$                                                                               |
| CUP6 → CU                                        |                                 | $9.502 \cdot 10^{-3}$                                                                               |
| Concerted opening transition rates               |                                 |                                                                                                     |
| 4 monomers CU or CUP6 → Open<br>state 1 (O1)     | $\theta$                        | $2.985 \cdot 10^{-3}$                                                                               |
| O1 → 4 monomers CU or CUP6                       | $\eta$                          | $8.902 \cdot 10^{-2} \cdot \exp\left(-1.027 \cdot \frac{V \cdot F}{R \cdot T}\right)$               |
| O1 → Open state 2 (O2)                           | $\psi$                          | $2.084 \cdot 10^{-2} \cdot \exp\left(7.243 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{V \cdot F}{R \cdot T}\right)$  |
| O2 → O1                                          | $\omega$                        | $1.587 \cdot 10^{-3} \cdot \exp\left(0.376 \cdot \frac{V \cdot F}{R \cdot T}\right)$                |

$F = 96485 \text{ C.mol}^{-1}$  (Faraday constant);  $R = 8.314 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$  (Gas constant);  $T = 297 \text{ K}$ ;  $V$  (membrane potential)

## Discussion

### Cohérence des résultats avec le mécanisme ligand-récepteur

Notre étude précise la nature du couplage entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 **de KCNQ1 en suggérant que la boucle S4-S5 agit comme un ligand inhibiteur dépendant du potentiel qui se fixe sur la partie C-terminale du domaine S6 stabilisant la fermeture de ce canal**. Ce mécanisme a été mis en évidence en étudiant l'effet de peptides correspondant à la boucle S4-S5 et à la partie C-terminale du domaine S6 sur les paramètres biophysiques du canal KCNQ1. En résumé, **la présence de deux** peptides S4-S5 (W248-I263 et L251-L266) engendre une **perte de fonction** de KCNQ1 (diminution de l'amplitude du courant et ralentissement de l'activation), **en simulant l'association de la boucle S4-S5 endogène avec S6**. A l'inverse, **deux peptides S6** (P343-V355 et I346-K358) entraînent un **gain de fonction** (augmentation de l'amplitude du courant, diminution du potentiel de demi-activation et accélération de l'activation) **en empêchant l'association du ligand S4-S5 endogène sur le récepteur S6**. Les peptides V254-G269 (boucle S4-S5) et F340-A352 (domaine S6) ne modifient pas les caractéristiques de KCNQ1. Nos résultats montrent qu'uniquement **deux des trois peptides S4-S5** (W248-I263 et L251-L266) et **S6** (P343-V355 et I346-K358) modulent l'activité du canal KCNQ1. Les 3 peptides S4-S5 et S6 ont été synthétisés en décalant leur séquence de trois acides aminés à chaque fois. Ce décalage de trois acides aminés semble suffire à empêcher leur fixation sur la boucle S4-S5 ou sur le domaine S6 de KCNQ1 suggérant une association spécifique entre la boucle S4-S5 et le domaine S6.

Le mécanisme ligand-récepteur est renforcé par plusieurs corrélations. **Première corrélation**, les effets des peptides sont identiques sur le canal KCNQ1 en présence et en absence de sa sous-unité régulatrice, KCNE1, révélant la spécificité de leurs effets sur le canal KCNQ1. **Deuxième corrélation**, les mêmes peptides S4-S5 et S6 sont impliqués dans l'association peptide-canal et peptide-peptide. Seul un peptide S4-S5 (W248-I263 ou L251-L266) et un peptide S6 (P343-V355 ou I346-K358), modulant l'activité de KCNQ1, s'associent. Cette association n'a pas lieu lorsqu'un peptide S4-S5 (W248-I263 ou L251-L266), modulant l'activité de KCNQ1, est en présence du peptide S6 (F340-A352), ne la modulant pas et inversement. **Troisième corrélation**, les effets des mutations V254L et L353A sont identiques dans le canal KCNQ1 et dans les peptides : elles déstabilisent l'association S4-S5/S6 empêchant la fermeture du canal KCNQ1 et la fixation des peptides sur leur site respectif. Ce défaut d'association entraîne une augmentation de l'activité de KCNQ1 et supprime les effets des peptides sur KCNQ1.

### Limites de notre étude

L'ensemble des résultats de notre étude est cohérent avec un mécanisme ligand-récepteur via l'association entre la boucle S4-S5 (S4-S5) et le domaine S6 (S6). Néanmoins, la spécificité des effets des peptides reste à démontrer. En effet, aucun de nos résultats ne permet d'exclure définitivement la possibilité que les effets des peptides résultent de leur interaction avec un domaine autre que le S6 et que la boucle S4-S5. Pour déterminer cette spécificité d'association, l'interaction physique directe entre la boucle S4-S5 et la partie C-terminale du domaine S6 a été évaluée par différentes méthodes de biochimie : l'ultracentrifugation analytique et le gel natif. Pour chacune des techniques citées ci-dessus, nous avons testé l'interaction S4-S5 et S6 en utilisant des peptides synthétiques (en opposition aux peptides synthétisés par les cellules COS-7) L251-L266 (boucle S4-S5) et I346-K358 (partie C-terminale du domaine S6). Aucune de ces techniques n'a permis de montrer l'association entre les peptides synthétiques L251-L266 et I346-K358. Cette absence d'effet peut s'expliquer par **une forte hydrophobicité des peptides synthétiques empêchant leur solubilisation à des concentrations de l'ordre du millimolaire**. Des études ont quantifié la concentration de protéine recombinante dans le cytosol (Lin *et coll.*, 1999; Rex *et coll.*, 2005) et suggèrent que les peptides exprimés dans les cellules peuvent atteindre des concentrations de l'ordre du millimolaire. Le couplage S4-S5/S6 étant très faible, la concentration des peptides S4-S5 et S6 dans la cellule doit probablement être de l'ordre du millimolaire. Les solutions utilisées dans l'ultracentrifugation analytique et le gel natif ne permettent pas de solubiliser de telle concentration de protéines. Les peptides synthétiques seraient sous forme d'agrégats et, donc ne pourraient pas interagir entre eux. La différence entre les peptides transfectés et les peptides synthétiques pourrait provenir d'**une solubilisation augmentée des peptides dans le cytosol des cellules COS-7**. Un argument en faveur de cette explication est la mise en évidence de l'association entre les peptides S4-S5 (L251-L266) et S6 (I346-K358) lorsqu'ils sont transfectés dans la cellule, autrement dit présents dans le cytosol (figure 6 dans l'article). L'hydrophobicité des peptides transfectés (cellules COS-7) et des peptides synthétiques (ultracentrifugation analytique et gel natif) est identique. Seul le milieu dans lequel les peptides sont solubilisés est différent : le cytosol pour les peptides transfectés et une solution de chlorure ou sulfate de césium pour les peptides synthétiques dans l'ultracentrifugation analytique. Ces données suggèrent que le cytosol favorise la solubilisation des peptides.

Pour tester l'interaction S4-S5/S6 (peptide-peptide et peptide-canal) dans un environnement de composition plus proche du cytosol des cellules, nous avons utilisé la technique de double hybride qui s'effectue dans des levures, mais cette méthode n'a pas non plus permis de la révéler. Cette absence de mise en évidence de l'association S4-S5/S6 et peptide-canal par les techniques de biochimie peut également s'expliquer par un couplage S4-S5/S6 transitoire peut être trop faible pour être décelé par les techniques de biochimie. L'association S4-S5/S6 n'ayant pu être montrée par des techniques de biochimie, nous avons essayé de la préciser en développant deux stratégies : une stratégie de mutagenèse **en collaboration avec l'équipe de Dirk Snyders** et un modèle structural de KCNQ1 **en collaboration avec l'équipe de Thierry Rose**.

- Stratégie de mutagenèse :

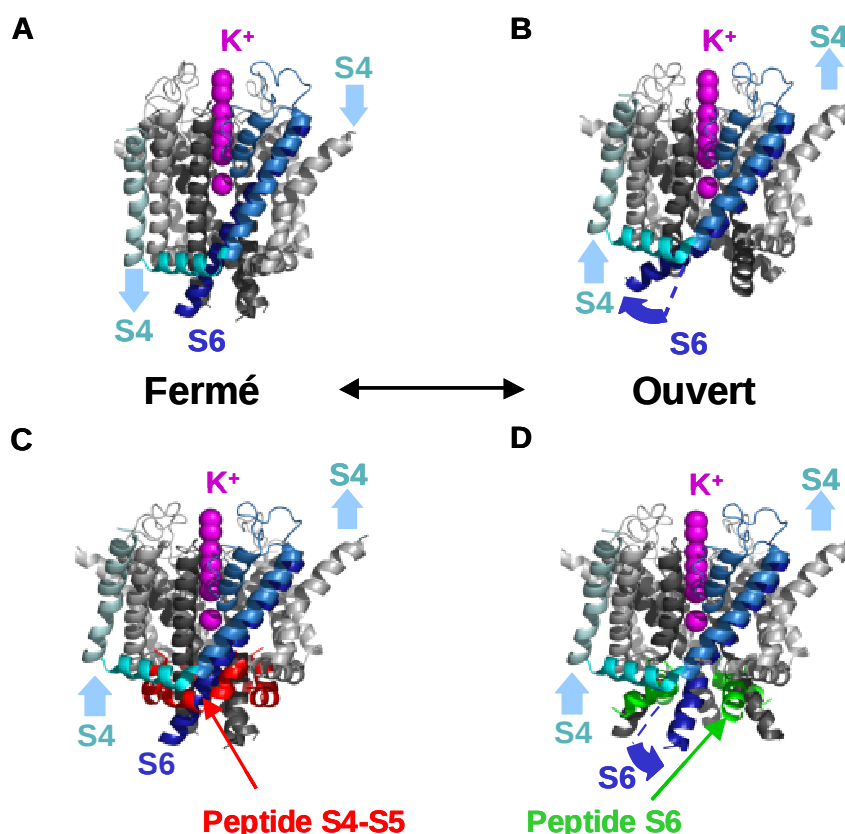
L'équipe de Dirk Snyders a identifié des résidus impliqués dans le couplage entre la boucle S4-S5 et la partie C-terminale du domaine S6 chez le canal KCNQ1. En effet, la mutation du résidu L353 situé dans le domaine S6 entraîne une augmentation de l'activité de KCNQ1, effet cohérent avec une déstabilisation de l'association S4-S5/S6 (Boulet *et coll.*, 2007). Des résultats préliminaires montrent un effet similaire de la mutation de l'acide aminé V254 (boucle S4-S5). Ces résultats laissent supposer que ces deux résidus interagissent pour stabiliser le canal KCNQ1 à l'état fermé.

Pour confirmer cette hypothèse, nous allons forcer le couplage entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 en construisant un double mutant KCNQ1 V254C-L353C **en collaboration avec l'équipe de Dirk Snyders**. La formation d'un pont disulfure devrait stabiliser l'association endogène S4-S5/S6 entraînant une diminution de l'activité du canal KCNQ1. L'application en configuration « inside-out » de DTT, un agent réducteur, devrait rompre ce pont disulfure restaurant une activité normale au canal KCNQ1. De façon similaire, le couplage peptide-canal sera évalué en formant un pont disulfure entre le peptide S4-S5 et le domaine S6 endogène après insertion d'une cystéine en position V254 (peptide S4-S5) et L353 (domaine S6 de KCNQ1).

- Modèle structural :

Le modèle structural de KCNQ1 est basé sur la structure cristallographique de K<sub>v</sub>1.2 à l'état ouvert et de KcsA à l'état fermé (figure 20). Dans ce modèle, la surface de contact entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 est augmentée à l'état fermé vis-à-vis de l'état ouvert révélant une interaction renforcée entre ces 2 domaines à l'état fermé, ce qui est cohérent avec une interaction stabilisant la fermeture du canal.

Pour déterminer si les effets observés des peptides résultent de l'association S4-S5/S6, nous avons évalué dans le modèle si les peptides S4-S5 et S6 peuvent accéder à leur site de fixation et stabiliser respectivement la fermeture et l'ouverture du pore du canal. Les effets des peptides S4-S5 ont été simulés en insérant 4 peptides S4-S5 dans un état intermédiaire, état dans lequel KCNQ1 est fermé mais la boucle S4-S5 et le domaine S6 sont découplés (équivalent au dernier état fermé avant l'ouverture du canal, figure 8A de l'article). Le modèle suggère que le **peptide S4-S5 (L251-L266) interagit, à l'état fermé, avec le domaine S6 de deux sous-unités adjacentes. Cette interaction bloque les domaines S6 en configuration fermée stabilisant la fermeture du canal KCNQ1** (figure 20C). De la même façon, les effets des peptides S6 ont été évalués en insérant 4 peptides S6 (I346-L358). Le **peptide S6 affaiblit l'interaction endogène entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 stabilisant l'état ouvert du canal**. La stabilisation de l'état ouvert, en présence du peptide S6, résulte d'une modification du mouvement de l'hélice S6 endogène (figure 20D).



**Figure 20 : Modèle structural du canal KCNQ1.**

Structure de KCNQ1 sous forme de tétramère à l'état fermé (A) et à l'état ouvert (B). Modèle de KCNQ1 sous forme de tétramère en présence des peptides S4-S5 (C) ou S6 (D). La structure du canal KCNQ1 est représentée depuis l'intérieur de la membrane sous forme d'hélice : le domaine S4 est en bleu clair, la boucle S4-S5 en bleu turquoise et le domaine S6 en bleu foncé. Les 3 autres sous-unités  $\alpha$  sont en gris. La position des ions potassium dans le vestibule est symbolisée par les sphères magenta. La courbure du domaine S6 endogène est représentée par la flèche bleue.

En résumé, le modèle structural de KCNQ1 suggère que la boucle S4-S5 et le domaine S6 interagissent de façon endogène à l'état fermé et que les effets observés du peptide S4-S5 (L251-L266) et du peptide S6 (I346-K358) sont dus à l'interaction respectivement avec le domaine S6 et la boucle S4-S5 endogène au canal KCNQ1. Cependant, le modèle structural reste un argument faible puisqu'il a été réalisé par homologie avec le canal K<sub>v</sub>1.2, canal dans lequel la boucle S4-S5 et le domaine S6 semblent couplés en permanence (Long *et coll.*, 2005b). La nature différente du couplage S4-S5/S6 entre K<sub>v</sub>1.2 et KCNQ1 laisse supposer que la structure de ces canaux est différente et donc les mécanismes moléculaires à l'origine de ce couplage également. Une seconde possibilité, est que ces mécanismes moléculaires soient identiques chez KCNQ1 et K<sub>v</sub>1.2, suggérant que l'activation dépendante du potentiel de K<sub>v</sub>1.2 résulte d'un mécanisme ligand-récepteur plutôt que d'un mécanisme de levier (Long *et coll.*, 2005b). Pour vérifier cette hypothèse, une étude comparable à celle menée sur KCNQ1 pourrait être réalisée sur K<sub>v</sub>1.2.

Un argument en faveur d'une structure différente entre le canal KCNQ1 et K<sub>v</sub>1.2 est la distance séparant les acides aminés L353 et V254 (résidus suggérés être essentiels dans le couplage S4-S5/S6, page 58) qui est incompatible avec une interaction entre ces deux résidus dans le modèle structural de KCNQ1.

### Généralisation du mécanisme ligand-récepteur aux canaux dépendant du potentiel

Dans l'introduction, nous avons indiqué que la nature du couplage entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 semble être différente selon les canaux suggérant que les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation dépendante du potentiel peuvent également l'être.

En effet, il a été montré que le couplage S4-S5/S6 des canaux hERG, KAT1 et spHCN1 est labile plutôt que permanent comme chez K<sub>v</sub>1.2 (Long *et coll.*, 2005b). Ce couplage labile est cohérent avec le mécanisme ligand-récepteur mis en évidence chez KCNQ1. Plusieurs aspects suggèrent que la boucle S4-S5 est comparable à un ligand chez les canaux hERG, KAT1 et spHCN1 :

- une **structure similaire** chez tous ces canaux (4 sous-unités  $\alpha$  constituées chacune de 6 domaines transmembranaires).
- l'existence d'un **couplage labile entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 chez KCNQ1 comme chez les canaux hERG, spHCN1 et KAT1**. En effet, nous avons montré que les effets des peptides S4-S5 et S6 sont réversibles sur KCNQ1 (figure 3A, B dans l'article) laissant supposer une association S4-S5/S6 faible.

- la **stabilisation du canal KCNQ1 dans un état** (fermé) par le couplage S4-S5/S6. En effet, il a été montré que le canal hERG est stabilisé à l'état fermé *via* l'interaction entre la boucle S4-S5 et le domaine S6 tandis que d'autres canaux le sont à l'état ouvert (KAT1 et spHCN1).

Le **mécanisme ligand-récepteur permet également d'expliquer que les canaux activés par l'hyperpolarisation (HCN et KAT1) possèdent un domaine S4 similaire aux canaux activés par la dépolarisation mais ont une réponse inverse à une dépolarisation membranaire.** Chez les canaux KAT1 (Grabe *et coll.*, 2007) et HCN (Chen *et coll.*, 2001), il a été suggéré que la boucle S4-S5 interagit avec le domaine S6 stabilisant leur ouverture. A l'inverse chez KCNQ1 et hERG, cette interaction stabilise la fermeture du canal. La réponse contraire à la dépolarisation entre ces canaux pourrait s'expliquer par un effet opposé de la boucle S4-S5, **ligand inhibiteur chez KCNQ1 et hERG contre activateur chez les canaux KAT1 et HCN.**

En résumé, les résultats obtenus suggèrent que la boucle S4-S5 serait un ligand dépendant du potentiel qui se fixerait sur la partie C-terminale du domaine S6 stabilisant la fermeture du canal KCNQ1. Des expériences complémentaires sont à effectuer pour démontrer la spécificité d'interaction des peptides avec leur site de fixation respectif mais également l'association endogène entre la boucle S4-S5 et le domaine S6.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement permettant de guérir le syndrome du QT long de type 1 qui entraîne une perte de fonction due à des mutations sur le canal KCNQ1. Or, nous avons observé un gain de fonction en présence des peptides (P343-V355 et I346-K358) correspondant à la partie C-terminale du domaine S6. Ces peptides pourraient présenter un avantage thérapeutique, pour les mutations du complexe KCNE1-KCNQ1, engendrant une diminution de l'activité du canal à l'origine du syndrome du QT long.

## Article 2 : le transfert de la boucle S3-S4 du canal rolf chez hERG abolit le processus d'activation sans modifier le processus d'inactivation

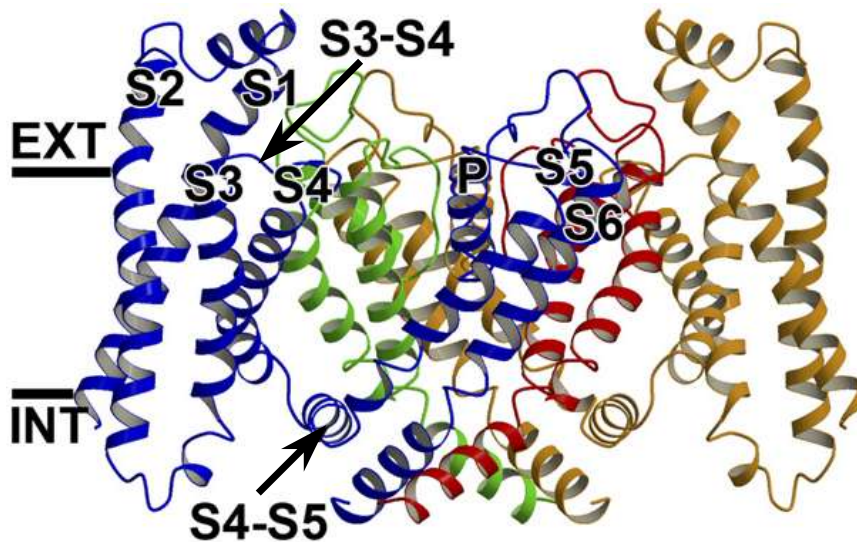
### Introduction

Dans l'introduction, nous avons mis en évidence que la nature du couplage entre l'activation et l'inactivation reste controversée chez hERG. La nature de ce couplage a été étudiée de deux manières différentes :

- en évaluant l'impact sur le processus d'activation de mutations qui modifient l'inactivation. Une des mutations modifiant de manière drastique l'inactivation est la mutation S631A qui provoque un décalage de la dépendance au potentiel de 100 mV vers les potentiels négatifs. Cependant, cette mutation n'affecte pas le processus d'activation (Zou *et coll.*, 1998) suggérant que **l'inactivation n'est pas déclenchée par l'activation chez hERG**.
- en étudiant le mouvement du domaine S4 par deux méthodes, le FRET et le courant de porte, toutes deux utilisées comme rapporteur de l'état du domaine S4. **Ces études suggèrent que ces deux processus sont couplés indirectement via le domaine S4** (Piper *et coll.*, 2003; Smith et Yellen 2002). Ces études révèlent que le mouvement du domaine S4 possède deux composantes : une lente et une rapide. Les auteurs suggèrent que la composante lente correspond à l'activation et la composante rapide à l'inactivation. Néanmoins, la double mutation (G628C/S631C) abolissant l'inactivation ne modifie pas la composante rapide remettant en question l'existence d'un couplage indirect *via* le domaine S4.

En résumé, l'étude du mouvement du domaine S4 et l'impact sur l'activation de mutations affectant l'inactivation n'ont pas permis de déterminer la nature du couplage entre ces deux processus chez hERG. Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier le mécanisme inverse : **l'impact sur l'inactivation de la modification de l'activation, en utilisant un canal mutant de hERG ouvert en permanence**. Un candidat potentiel serait le canal hERG mutant D540K. La mutation D540K (boucle S4-S5) stabilise le canal hERG à l'état ouvert aux potentiels hyperpolarisés et est aussi associée à un léger changement des propriétés d'inactivation (Sanguinetti et Xu 1999). Ces données suggèrent un couplage faible entre le processus d'activation et d'inactivation.

Cependant, cette mutation n'est pas la plus pertinente pour tester ce couplage puisqu'elle modifie la structure du pore pouvant induire des changements dans les propriétés de l'inactivation (Mitcheson *et coll.*, 2000a). Pour stabiliser le canal à l'état ouvert sans modifier la structure du pore, nous avons effectué une mutation dans la boucle S3-S4, région du canal plus lointaine du pore que la boucle S4-S5 (figure 21).



**Figure 21 : Structure des canaux K<sub>v</sub>.**

La position du pore est indiquée par la lettre P. D'après Pathak *et coll.*, 2007.

En 1997, l'équipe de Papazian a montré que la substitution de la boucle S3-S4 du canal eag par celle du canal rolf stabilise la conformation ouverte du canal mutant aux potentiels hyperpolarisés (Tang et Papazian 1997). Nous avons émis l'hypothèse que **la substitution de la boucle S3-S4 du canal hERG par celle du canal rolf stabiliserait la porte d'activation à l'état ouvert chez le canal mutant de hERG**. Si l'activation et l'inactivation sont couplées alors la modification du processus d'activation devrait affecter le processus d'inactivation.

**L'objectif de cet article était de caractériser l'effet de la modification du processus d'activation sur les paramètres biophysiques de l'inactivation.** Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'activation du canal était effectivement indépendante du potentiel puis nous avons étudié les paramètres biophysiques de l'inactivation.

Résultats

**Transfer of rolf S3-S4 linker to hERG eliminates activation gating  
but spares inactivation.**

Frank S Choveau<sup>1,2,3,\*</sup>, Aziza El Harchi<sup>1,2,3,\*†</sup>, Nicolas Rodriguez<sup>1,2,3</sup>, Bénédicte  
Louérat-Oriou<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Baró<sup>1,2,3</sup>, Sophie Demolombe<sup>1,2,3</sup>, Flavien  
Charpentier<sup>1,2,3,4</sup> and Gildas Loussouarn<sup>1,2,3</sup>.

**Accepté dans Biophysical Journal**

<sup>1</sup>INSERM, UMR915, Nantes, F-44035, France; <sup>2</sup>CNRS, ERL3147, Nantes F-44035,  
France ; <sup>3</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes,  
F-44035, France; <sup>4</sup>CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, F-44000, France ;

Running title: Properties of a two-state HERG mutant.

Footnotes :

\* Both authors contributed equally to this work<sup>†</sup>. Present address. Department of  
Physiology and Pharmacology, School of Medical Sciences, University of Bristol,  
Bristol BS8 1TD, UK

**Abstract**

A recent study in Shaker, a voltage-dependent potassium channel, suggests a coupling between activation and inactivation. This coupling is controversial in hERG, a fast-inactivating voltage-dependent potassium channel. To address this question, we transferred to hERG the S3-S4 linker of the voltage-independent channel, rKv1.2, in order to selectively disrupt the activation process. This chimera shows an intact voltage-dependent inactivation process consistent with a weak coupling, if any, between both processes. Kinetic models suggest that the chimera presents only an open and an inactivated states, with identical transition rates as in hERG. The lower sensitivity of the chimera to BeKm-1, a hERG preferential closed-state inhibitor, also suggests that the chimera presents mainly open and inactivated conformations. This chimera allows determining the mechanism of action of hERG blockers, as exemplified by the test on ketoconazole.

*Key words:* Kv channels, voltage sensor, kinetic models, activation and inactivation coupling

## Introduction

The human ether-à-go-go-related gene *KCNH2* encodes the  $\alpha$ -subunit of the ion channel (hERG) underlying the cardiac delayed rectifier  $K^+$  current,  $I_{Kr}$  (Sanguinetti et Tristani-Firouzi 2006). hERG is a member of the voltage-gated  $K^+$  (Kv) channel family. Similar to other Kv, its  $\alpha$ -subunit contains six putative transmembrane segments (S1-S6), a P-loop, several charged residues in segments S2 and S3, and positively charged residues in S4 that are conserved among voltage-gated channels (Wei *et coll.*, 1996). The presence of a cyclic nucleotide binding site in its C-terminal end suggests that it derives from a common evolutionary ancestor with the superfamily of cyclic nucleotide-gated (CNG) channels (Jan et Jan 1992). In the human heart,  $I_{Kr}$  plays a prominent role in the phase 3 of the action potential and not during the phase 1 or 2 when fast inactivation limits the contribution of  $I_{Kr}$  to repolarization. This profile is due to the unusual kinetics of hERG gating, with slow activation and fast inactivation (Sanguinetti et Tristani-Firouzi 2006). Despite its unusual kinetic properties and intrinsic voltage dependence, hERG inactivation is termed C-type because of its sensitivity to TEA<sup>+</sup> (Smith *et coll.*, 1996).

Hoshi and collaborators studied the properties of the C-type inactivation process in Shaker, another voltage-dependent  $K^+$  channel. They have shown that the time constant of C-type inactivation is voltage independent between -25 and +50 mV. They concluded that if this voltage independence is maintained at lower voltages, C-type inactivation is not intrinsically voltage-dependent and must be partially coupled to activation (Hoshi *et coll.*, 1991). More recently, Panyi and Deutsch have shown in Shaker that the rate of activation depends on the state of the inactivation gate, suggesting that activation and inactivation are coupled (Panyi et Deutsch 2006). For hERG, the coupling of activation and inactivation processes remains controversial (Piper *et coll.*, 2003; Zou *et coll.*, 1998). One way to address this question would be to use a mutant of hERG stabilized in the activated configuration and to study the impact on the inactivation process. The mutation D540K in the S4-S5 linker of the hERG channel causes a stabilization in the open state at negative voltages (Sanguinetti et Xu 1999). The drastic changes in its activation properties are accompanied with a moderate change in its inactivation properties, suggesting a weak coupling between activation and inactivation processes. But the D540K mutation is not the most relevant to test this coupling since the S4-S5 linker interacts with the pore domain (Ferrer *et coll.*, 2006). Since hERG inactivation results from a modification of the pore conformation, the observed effect of the mutation on inactivation may be direct, and not through activation.

Consistent with this, the D540K channel shows a decreased sensitivity to MK-499, a blocker of hERG, known to interact with the pore lining S6 domain (Mitcheson *et coll.*, 2000a). Thus, stabilizing hERG in the open configuration without directly modifying the pore structure may require modifying a region further from the pore. In an attempt to prevent a direct effect on inactivation and to specifically target the S4 functionality, by supposedly constraining its movement, we mutated the S3-S4 region which is far from the pore domain, based on the Kv1.2 structure (Long *et coll.*, 2005a).

In 1997, a study showed that the voltage independence of the CNG channel rolf (“rat olfactory channel”) can be transferred to drosophila eag, the ether-à-go-go channel, by replacing the eag S3-S4 loop by the corresponding rolf S3-S4 loop (Tang et Papazian 1997). When transferred into eag, the S3-S4 loop of rolf increases the stability of the open conformation and shifts the voltage dependence of activation to very hyperpolarized potentials. We hypothesized that replacing the hERG S3-S4 loop by the rolf S3-S4 loop would stabilize the channel in the same manner as in the eag chimera channel. We made such a chimera and the channel obtained barely deactivates, consistent with the hypothesis. The modification of the activation process does not modify the voltage dependence and the kinetics of inactivation. These results suggest a weak coupling, if any, between activation and inactivation in hERG channels. In the physiological range of the cardiac action potential (-90 to + 30 mV), the chimeric channel seems to present only two conformations: open and inactivated.

This chimera may be useful to accurately characterize the state-dependent block of hERG inhibitors and discriminate possible affinity for the closed state. The mechanism of hERG inhibition by ketoconazole remains controversial (Dumaine *et coll.*, 1998; Ridley *et coll.*, 2006; Yao *et coll.*, 2005). We took the opportunity of this chimeric channel to study the inhibition by ketoconazole. This drug has successively been described as a preferential closed-state blocker (Dumaine *et coll.*, 1998; Yao *et coll.*, 2005) and as a preferential open or inactivated-state blocker (Ridley *et coll.*, 2006). The use of the chimera shows that ketoconazole preferentially inhibits open and inactivated hERG channels.

## Methods

**Molecular biology.** The chimera was constructed by three-step PCR. The DNA sequence encoding the hERG S3-S4 linker (NH<sub>2</sub>-SGSEELIGLL-COOH) was replaced by that of rolf (rat olfactory potassium channel) (NH<sub>2</sub>-AVGIHSPEV-COOH) using the following primers (5'-GCAGTAGGAATTCATTCACCAGAAGTAAAGACTGCGCGGCTGCTGCGGCTGGTGC GC-3'; 5'-GGGAGATCTTCTCTGAGTTGGTGTGG-3').

The PCR product was purified by agarose gel electrophoresis (DNA extraction kit, Qiagen, Courtaboeuf, France), sequenced and then cloned into pIRES-CD8.

**Cell culture and transfection.** African green monkey kidney fibroblast-like cell line (COS-7) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cultured as previously described (Loussouarn *et coll.*, 2003). Cells were transfected with DNA (2 µg/ml of culture medium) complexed to JetPEI (Polyplus-transfection, Strasbourg, France) according to the manufacturer's instructions. Eight hours later, the cells were isolated, diluted, and seeded in 35-mm Petri dishes. In hERG experiments, COS-7 cells were co-transfected with 0.8 µg of hERG (pSI hERG) (Chevalier *et coll.*, 2001) and 1.2 µg of pEGFP (Clontech, USA) coding for the green fluorescence protein. In chimera experiments, COS-7 cells were transfected with 2 µg of pIRES-chimera-CD8. Dynabeads CD8 (Invitrogen Dynal AS, Norway) were used to identify the cells expressing the chimera. hERG and the chimeric channel densities at the sarcolemma were probably equivalent, since the current densities were not significantly different (unpaired t-test; hERG:  $22 \pm 7$  pA/pF, n=8; chimera:  $19 \pm 6$  pA/pF, n=8).

**Patch-clamp recordings.** Ion currents from hERG- and chimera-transfected COS-7 cells were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Cells were placed on the stage of an inverted microscope and continuously superfused with the standard extracellular medium. Patch pipettes with a tip resistance of 2.5 to 5 MΩ were electrically connected to a patch-clamp amplifier (Axopatch 200A, Axon Instruments, Foster City, CA). Stimulation, data recording, and analysis were performed through an A/D converter (Tecmar TM100 Labmaster, Scientific Solutions, Solon, OH) and using Acquis1 software (Bio-Logic, Claix, France). A microperfusion system allowed local application and rapid change of the different experimental solutions. The cell capacitance was determined by analyzing the capacitive current recorded during a step to -70 mV applied for 50 ms from a holding potential of -60 mV. Current values were normalized using cell capacitance. For inactivation and recovery from inactivation studies, capacitance and series resistance were electronically compensated.

To study the voltage dependence of hERG and the chimera activation, membrane potential was stepped, in 10-mV decrements, from a holding potential of -80 mV to various voltages between +50 mV and -130 mV, and then back to -60 mV, every 3500 ms (Fig. 1).

The voltage dependence of hERG activation was determined by fitting the normalized tail current (Itail) vs. prepulse voltage (Vpp) relationship with a Boltzmann equation:

$$I_{tail}/I_{tail\ max} = 1/(1+\exp(-(V_{pp}-V_{0.5})/k)) \quad (1)$$

where  $I_{tail\ max}$  is the maximum tail current,  $V_{0.5}$  is the half-activation potential and  $k$ , the slope factor. The time constants of deactivation ( $\tau_1$  and  $\tau_2$ ) were determined by a two-exponential fit to the tail current using the following equation:

$$I/I_p = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + I_{ss} \quad (2)$$

where  $I$  represents the current amplitude at time  $t$ ,  $I_p$  is the peak tail current,  $\tau_1$  and  $\tau_2$  are the time constants for the fast and slow components of the deactivating current,  $A_1$  and  $A_2$  are the relative amplitude of each component and  $I_{ss}$  the relative residual current component.

hERG inactivation was studied with two different three-pulse protocols (Fig. 2). In the first protocol (Fig 2A), hERG-expressing cells were repolarized (2<sup>nd</sup> pulse) for 5 ms to allow recovery from inactivation, with minimum deactivation. Voltage dependence of hERG or chimera inactivation was observed during the 3<sup>rd</sup> voltage pulse. This protocol allowed measuring the inactivation rate constant at various membrane potentials, and to establish the inactivation curve, but only at potentials at which deactivation is slow ( $>-60$  mV). The second protocol (ref. 8 and Fig. 2C) enables to compensate for the fraction of deactivation at potentials lower than  $-60$  mV during the second step. During this step, recovery from inactivation is faster and distinguishable from deactivation. Deactivation is thus evaluated from the decreasing part of the current during this step, and compensated. The voltage dependence of inactivation was determined by fitting the relative inactivating currents at  $+60$  mV vs. voltage with a Boltzmann equation similar as (1).

Recovery from inactivation was evaluated using a two-pulse protocol (Fig. 3).

The time constant of inactivation ( $\tau_{inact}$ ) and recovery from inactivation ( $\tau_{rec\ inact}$ ) were measured using a single-exponential fit to the tail current using the following equation:

$$I = A \exp(-t/\tau) + C \quad (3)$$

where  $I$  represents current amplitude at time  $t$ ,  $\tau$  is the time constant of inactivation or recovery from inactivation,  $C+A$  represents the initial current amplitude and  $C$  describes the current amplitude following inactivation/recovery from inactivation. Kinetics of recovery from inactivation were fitted on the first 2-10 ms.

All experiments were performed at 35°C. Patch-clamp data are presented as mean ± S.E.M. Statistical significance of the observed effects was assessed by means of unpaired or paired Student t-tests, one-way or two-way analysis of variance with a Tukey test when needed. A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

E-4031 dose-response curves were fitted using the modified Hill equation:

$$y = 1-d + d/(1+(x/IC_{50})^h) \quad (4)$$

where  $d$  is the fraction of current that is sensitive to E-4031,  $x$  is the drug concentration,  $h$  the Hill coefficient,  $IC_{50}$  is the concentration at which the half-maximal peak tail currents were obtained and  $y$  is the fraction of current remaining at concentration  $x$  of E-4031.

**Solutions and drugs.** The standard extracellular medium contained 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 5 mM HEPES, 5 mM glucose, pH adjusted to 7.4 with NaOH. The intracellular medium contained 74.5 mM KCl, 70.5 mM K-aspartate, 5 mM HEPES, 2 mM EGTA, 2 mM  $K_2ATP$ , 0.3 mM  $MgCl_2$  pH 7.2 with KOH. All products are from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

Ketoconazole (Sigma-Aldrich Chimie) was dissolved in DMSO to produce a 10 mM stock solution stored at -20 °C and further diluted in extracellular medium. Recombinant BeKm-1 toxin (rBeKm-1, Alomone, Israel) was dissolved in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6 to produce a 25  $\mu$ M stock solution stored at -20 °C. Final experimental concentration was reached by dilution in the locally perfused extracellular medium: 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 5 mM HEPES, 5 mM glucose, 30 mM mannitol, pH adjusted to 7.4 with NaOH. In 100 mM  $[K^+]_o$  solution, 96 mM NaCl was replaced by KCl.

E-4031 (Sigma-Aldrich Chimie) was dissolved in water to produce a 10 mM stock solution stored at -20°C and further diluted in the locally perfused extracellular medium for final experimental concentration.

**Kinetic model.** The Markov state model for hERG (Fig. 4B) was adapted from Clancy and Rudy (Clancy et Rudy 2001). The single open state was named O, the inactivated state I, and closed states C1 to C3. Currents were computed according to  $I = N \cdot g \cdot P_O \cdot (V_m - V_i)$ , where  $I$  is the current,  $N \cdot g$  represents the maximal conductance of the membrane, and  $P_O$ , the open probability. The parameter  $N \cdot g$  and the transition constants were optimized to simulate a representative recording. The inversion potential  $V_i$  was set to -80 mV. Optimization was performed with ModelMaker v4.0 (AP Benson, United Kingdom) using the Marquardt method.

## Results

### The rolf-hERG S3-S4 chimera is activated at negative potentials.

Upon transfection with hERG cDNA, COS-7 cells expressed a large  $K^+$  current with biophysical properties reminiscent of the rapid component of the human cardiac delayed rectifier  $K^+$  current (Fig. 1A) (Wang *et coll.*, 1994). A slowly activating  $K^+$  current developed during depolarizations above -40 mV with a maximum at a potential between +10 and +20 mV in hERG-expressing cells (Fig. 1A and C). With further depolarization, the current amplitude decreased progressively. This inward rectification of hERG is due to the channel voltage-dependent inactivation (Smith *et coll.*, 1996; Spector *et coll.*, 1996a). Analysis of the tail current allowed us to characterize the half-maximum activation voltage ( $V_{0.5}$ ) and slope factor ( $k$ ), giving  $-4.9 \pm 2.3$  mV and  $8.9 \pm 0.6$  mV ( $n=8$ ), respectively (Fig. 1D). The hERG deactivation time course was obtained by fitting the decay of tail current at -60 mV after full activation at +20 mV, by a two-exponential function. Time constants were  $\tau_1 = 86 \pm 8$  ms and  $\tau_2 = 490 \pm 60$  ms and the relative amplitude of the two components were  $A_1 = 0.56 \pm 0.06$  and  $A_2 = 0.41 \pm 0.05$ , respectively. The relative residual current component was  $I_{ss} = 0.03 \pm 0.01$  ( $n=8$ ).

The same study was undertaken on COS-7 cells expressing the chimera. Unlike hERG channels, chimeric channels produced an instantaneous  $K^+$  current that was observed during hyperpolarized potentials as well as depolarized potentials (Fig. 1B and C). The tail current displayed no deactivation (Fig. 1B) and the activation curve was voltage independent (Fig. 1D). These results clearly show that the chimera deactivation process is impaired, as it is in the case of the rolf-eag chimera (Tang et Papazian 1997). However, an inward rectification was still detected at more positive potentials with a maximum current recorded at more negative potentials (about -30 mV) than for hERG current (between +10 and +20 mV) (Fig. 1C).

### Voltage-dependent inactivation is conserved in the rolf-hERG S3-S4 chimera.

Alteration of the activation process would not necessarily be expected to affect inactivation. This is suggested by the preservation of an inward rectification in the chimera. To accurately check for a potential modification of the inactivation process, the voltage dependence of hERG and chimeric channel inactivation were compared. Since it is difficult to measure steady state inactivation on hERG, because of concomitant deactivation, two three-pulse protocols were used (Fig. 2; cf. methods) (Spector *et coll.*, 1996a; Wang *et coll.*, 1997a; Zou *et coll.*, 1998).

In the first protocol (Fig. 2A), hERG currents were activated by a 200-ms depolarizing step to +60 mV. The cell was then repolarized to -100 mV for 5 ms to allow recovery from inactivation. Finally, a test step was applied to different voltages to observe the current inactivation kinetics. Figure 2 shows hERG and the chimera voltage dependence of inactivation. hERG currents recorded during the test step were of large amplitude and rapidly inactivated. For depolarizations, similar inactivating currents were observed in COS-7 cells expressing the chimera (Fig. 2A). For hyperpolarizations, deactivation was detected only in cells expressing hERG. The half-inactivation potential ( $V_{0.5}$ ) was evaluated from the remaining current ratio ( $I_{ss}/I_0$ ) after 20 ms of inactivation. For hERG, the fit of the inactivation curve was done only with the data measured at potentials greater than -60 mV. For these potentials, deactivation after 20 ms is small since the fast component time constant of deactivation ( $\tau_1$ ), which represents 56% of the deactivation process, is at least four times greater than 20 ms. For the chimera, the fit was also done only with the data measured at potentials greater than -60 mV, even though there is no deactivation at lower potentials. However, it can be noticed that the data measured at potentials lower than -60 mV (Fig. 2B, grey circles) are well fitted by the Boltzmann curve.  $V_{0.5}$  were  $-50 \pm 4$  mV ( $n=7$ ) and  $-47 \pm 5$  mV ( $n=8$ ; unpaired t-test: NS) for hERG and the chimera, respectively. The corresponding  $k$  values were  $k = 29 \pm 1$  mV ( $n=7$ ) and  $k = 25 \pm 2$  mV ( $n=8$ ; unpaired t-test: NS) for hERG and the chimera, respectively. To circumvent the bias on inactivation measurement due to fast deactivation at potentials lower than -60 mV, we used another three-pulse protocol (Fig 2C, D). The second step at various potentials (+70 to -130 mV) allows the recovery from inactivation and the measurement of the fraction of deactivation (see Methods). The initial current of the third step at +60 mV is proportional to the degree of inactivation at the end of the second step (after correction of deactivation). The half-inactivation potential ( $V_{0.5}$ ) was evaluated from the fit of the inactivating current recorded during the third step.  $V_{0.5}$  were  $-71 \pm 4$  mV ( $n=6$ ) and  $-74 \pm 2$  mV ( $n=7$ ; unpaired t-test: NS) for hERG and the chimera, respectively. The corresponding  $k$  values were  $k = 23 \pm 1$  mV ( $n=6$ ) and  $k = 21 \pm 1$  mV ( $n=7$ ; unpaired t-test: NS) for hERG and the chimera currents respectively. The two protocols used did not give similar  $V_{0.5}$  values. One reason is that the second protocol does not allow measurements of steady-state inactivation at several potentials: at -10 to -50 mV, recovery from inactivation is slightly too slow (fig. 3C) to reach a steady state during the 5-ms pulse. Nevertheless, our results show that the voltage dependences of hERG and the chimera currents are similar, whatever protocol was used.

The first three-pulse protocol allowed us to compare the time constant of inactivation for hERG and the chimera.

The averaged data are plotted in figure 3C. The superimposition of the results shows that the voltage dependence of inactivation kinetics is not modified in the chimera.

For hERG, the prepulse used for recovery from inactivation can not exceed 5 ms at -100 mV to have minimal deactivation while almost complete recovery from inactivation. The absence of deactivation in the chimera allowed us to test whether a longer prepulse (30 ms) impacts inactivation. The value of  $V_{0.5}$  as well as the inactivation kinetics values were not modified and were identical to hERG values (supplementary Fig 1). It can also be noticed that a weak deactivation could be detected for the chimera current at very negative potentials only (-130 mV; Fig. 2A and supplementary Fig 1.) indicating a large shift of the activation curve toward very negative potentials. The decrease in the tail current cannot be a consequence of extracellular  $K^+$  depletion due to large  $K^+$  influxes during the very negative prepulses (between -130 mV and -110 mV). Such extracellular  $K^+$  depletion would cause a shift of  $E_K$  to potential more negative than -80 mV, leading to an increase (and not a decrease) of the tail current measured at -60 mV (Fig 1D).

Recovery from inactivation was studied using a two-pulse protocol (Fig. 3) (Snyders et Chaudhary 1996; Spector *et coll.*, 1996a). This protocol generated the rapid recovery of hERG current followed by deactivation. As for inactivation, chimera and hERG recoveries from inactivation were similar (Fig. 3C). Again, a slight deactivation of the chimera current could be detected at -130 mV only.

Several studies have shown that a high  $[K^+]_o$  strongly slowed the inactivation kinetics in hERG channel (Wang *et coll.*, 1997b; Yang *et coll.*, 1997). If the inactivation process is not modified in the chimera, increasing  $[K^+]_o$  should lead to the same effect as in WT hERG. To check this hypothesis, we compared the effect of 100 mM  $[K^+]_o$  on the chimera and hERG inactivation. We observed that increasing  $[K^+]_o$  from 4 to 100 mM strongly slowed the inactivation kinetics of hERG, as previously showed (n=8-9, two-way ANOVA, with a Tukey test,  $p < 0.05$ ). We observed similar effects on the chimera (n=8-9, two-way ANOVA, with a Tukey test,  $p < 0.05$ ). There was no significant difference between the effects of  $[K^+]_o$  on hERG and the chimera (n=8, two-way ANOVA, NS).

Several studies showed that a high  $[K^+]_o$  caused a shift of the voltage-dependence of inactivation towards positive potentials (Wang *et coll.*, 1997b; Zou *et coll.*, 1998). We did not observe such a modification, probably because of difference in the temperature and cellular models used.

The absence of effect was also observed in the chimera (supplementary Fig. 2). Altogether, the results with 100 mM  $[K^+]_o$  reinforce the idea that the chimera has an intact inactivation process.

### **A kinetic model also supports an intact inactivation in the chimera.**

A more comprehensive way to compare hERG and the chimeric channel inactivation are kinetic models. These models allowed discriminating the effect of the S3-S4 linker substitution on the inactivation and activation processes. First, we optimized a kinetic model of the hERG channel bearing 3 closed states, one open state and one inactivated state (Fig. 4) (Clancy et Rudy 2001; Kiehn *et coll.*, 1999; Wang *et coll.*, 1997a). A comparison between measured and simulated currents (Fig. 4A) and biophysical parameters (Supplementary Fig. 3) shows that this model accounts very well for our experimental data. Transition rate values are listed in Table 1. Noticing that the chimera currents can be roughly modeled with a two-state model, we checked whether the transition between these two states might correspond to the O-I transition of the hERG channel. Simulated currents for the chimera were obtained with the chimera model (Fig. 4C) using the values of the transition rates ( $\alpha_i$  and  $\beta_i$ ) derived from hERG model optimization. Measured chimera currents and biophysical parameters were rather well fitted by this prediction in the range of physiological voltages, without further optimization (Fig. 4A and supplementary Fig. 3). This result reinforces the proposition of an intact inactivation transition in the chimera, identical to that of the hERG channel. To get an accurate determination of the transition rates, we imposed as many constraints as possible by fitting both the current recordings and the biophysical parameters. However it is inherent to a 15 free parameters optimization that its solution is not unambiguous and cannot be easily distinguished from others that also give good fits of the data. In the framework of the model of hERG transitions that we used, it is noteworthy that the O-I transition rates strongly determine the inactivation kinetics. The very good fits of the inactivation and recovery from inactivation time constants (supplementary Fig. 3) suggest that the determination of O-I transition rates for hERG is reasonably accurate. The conclusion regarding the conservation of the O-I transition rates between hERG and the chimera should thus be robust despite uncertainties coming from the optimization process.

### **Chimera inhibition by BeKm-1 is voltage-independent.**

The chimera kinetic model suggests that the chimera exists in two conformations: open and inactivated. To test this hypothesis, we studied BeKm-1 effects on the chimera and hERG (Fig. 5).

BeKm-1 binds to the external face of the hERG channel and has been shown to exhibit preferential closed-state blockade (Korolkova *et coll.*, 2004; Milnes *et coll.*, 2003a). A 12 second ascending voltage ramp was applied in baseline conditions. In these conditions, hERG current developed from -40 mV with maximum amplitude at around 0 mV. With further depolarization, the current amplitude decreased progressively (Fig. 5A). The chimera was already activated at the beginning of the ramp (-80 mV), generating a maximum current at around -40 mV, which declined due to inactivation (Fig. 5B). Then, ramp stimulation was stopped, membrane potential was clamped at -80 mV, and 25 nM BeKm-1 was applied. After 3 min of exposure to the toxin, the stimulation was applied again and the 1<sup>st</sup> recorded current ramp was used to evaluate BeKm-1 effects (Ridley *et coll.*, 2006). As summarized in figure 5C, inhibition of hERG by BeKm-1 was higher at negative voltages and declined at more positive voltages. ANOVA analysis of BeKm-1 inhibition at the different voltages showed a significant voltage-dependence of the block (n=6, one-way Repeated Measures ANOVA;  $p < 0.001$ ). To check whether the ramp was slow enough to look at the steady state block, 5 second steps at -30, 0 or +40 mV were also applied from a holding potential of -80 mV in the same conditions (Milnes *et coll.*, 2003a). The steady-state fractional block measured with the step protocol was similar (Fig. 5C) showing that the ramp was slow enough to get the steady-state block. As opposed to hERG, the chimera was weakly inhibited by BeKm-1 and this inhibition was voltage-independent (NS). Fractional block of the chimera significantly differed from WT at potentials between -30 mV and +20 mV (two-way ANOVA, with a Tukey test) and were similar at higher potential, when both channels are inactivated (Fig. 5C). The persistence of a fractional block (around 20%) suggests that the toxin can bind not only to closed but also to open and inactivated channels (although with a lower affinity). An alternative hypothesis would be the persistence of a closed state in the chimeric channel, allowing toxin binding. A direct measurement of channel open probability by using single channel methods will be necessary to discriminate one of the two hypotheses.

### **Sensitivity to E-4031 suggests an intact pore in the chimera.**

In the introduction, we described a hERG mutant (D540K) that was activated at hyperpolarizing potentials. This mutant may not be relevant to study the coupling between activation and inactivation because the mutation is close to the pore domain, in which conformational changes are associated with both activation and inactivation (Sanguinetti *et Xu* 1999). This is confirmed by the use of méthanesulfonanilide blockers such as MK-499 and E-4031.

Since these blockers are known to target the hERG pore (Sanguinetti et Jurkiewicz 1990; Spector *et coll.*, 1996b), the altered sensitivity to MK-499 confirms the effect of the mutation on the pore domain. We tested the effect of E-4031 to determine if the chimera pore was affected similarly to the D540K mutant. In these experiments, hERG and the chimera currents were elicited by a 500-ms depolarizing pulse to +10 mV from a holding potential of -80 mV and the tail current was recorded at -60 mV. Depolarizing steps were applied every 3 seconds. The dose-response curve for E-4031 inhibition of the tail current showed an  $IC_{50}$  of  $46 \pm 29$  nM and a Hill coefficient of  $0.72 \pm 0.17$  for hERG (n=6, data not shown). For the chimera, the  $IC_{50}$  was  $36 \pm 18$  nM and the Hill coefficient was  $0.89 \pm 0.24$  (n=7). There was no difference between hERG and the chimera sensitivity to E-4031 (Student t-test, NS). This result confirms that only deactivation is altered in the chimera and that the inactivation and pore are intact.

### **The chimera indicates that ketoconazole binds preferentially to the open and inactivated states.**

This preliminary validation of the chimera model to study hERG pharmacology allowed us to evaluate the mechanism of hERG inhibition by ketoconazole. Several studies suggest that ketoconazole inhibits hERG preferentially in the closed state (Dumaine *et coll.*, 1998; Yao *et coll.*, 2005). However, a recent study has shown that this drug binds preferentially to the open state (Ridley *et coll.*, 2006). To determine the mechanism of action of ketoconazole, we tested its effects on hERG and the chimera. The same protocol as with BeKm-1 was applied. The ramp was slow enough to obtain the steady-state block, since ketoconazole block is much faster than BeKm-1 block (Ridley *et coll.*, 2006). If ketoconazole binds preferentially the closed state, we should observe a higher hERG inhibition at negative voltages, which declines at more positive voltages and a weak inhibition of the chimera in the presence of the drug. Contrarily to this hypothesis, but in agreement with Ridley and co-workers, hERG inhibition increased progressively with the potential, reaching a maximum at 0 mV (One-way Repeated Measures ANOVA;  $p < 0.001$ ) (Fig. 6A, C). The difficulty with hERG is that small current amplitude prevents an accurate measurement of the fractional block, particularly at -40 or -30 mV in some cells due to low activation. Because of its full activation, the chimera allowed a more accurate estimation of this fractional block at negative voltages. The chimera was strongly inhibited whatever the voltage was (Fig. 6B, C). Fractional block of the chimera significantly differed from hERG at potentials between -30 mV and -10 mV (Two-way ANOVA, with a Tukey test).

The much lower ketoconazole block of hERG at negative potentials indicates that ketoconazole binds less to hERG closed state than open and inactivated ones.

## Discussion

### Transfer of voltage independence from rolf to hERG.

In the present study, we described the biophysical properties of a rolf-hERG S3-S4 chimera. Our results show that only the activation process is impaired. The voltage dependence of inactivation is conserved since the chimera has the same inactivation and recovery from inactivation properties as the hERG channel. These results show that the modification of the activation process does not modify the inactivation. It seems that activation is not necessary to trigger inactivation. Otherwise, we would observe a change of the inactivation biophysical parameters. To evaluate the effects of the impaired activation on the inactivation process, we optimized the Markov model developed by Clancy and Rudy for hERG kinetics (Clancy et Rudy 2001). In this model, we convincingly simulated the chimera properties by conserving only the transitions between the open and inactivated states of hERG. We found that the chimera currents are well fitted by this two-state model, reinforcing the hypothesis of a two-state channel. These models are consistent with a weak, if any, relationship between the conformational changes associated with inactivation and those associated with activation since the alteration of the latter in the chimera does not seem to alter the former. However, the models do not exclude that activation and inactivation are indirectly coupled by being both controlled by the movement of the voltage sensor, since the hERG model suggests a movement of the voltage sensor (early transitions) followed by movements of the activation and inactivation gates (late transitions). Several studies are consistent with this idea. Loots and Isacoff proposed that, in Shaker, activation produces an interaction between S4 and the pore domain. This interaction disrupts the coupling between S5 and S6 domains and leads to inactivation (Loots et Isacoff 2000). Regarding hERG, two studies (Piper *et coll.*, 2003; Smith et Yellen 2002) suggest that the coupling between the activation and inactivation is mediated by the S4 domain. To probe the voltage-sensor movements, Smith and Yellen used a fluorescence technique to examine the conformational changes of hERG S4. Fluorescent probes attached to three different residues on S3-S4 (E518C, E519C and L520C) reported both fast and slow voltage-dependent changes in fluorescence (Smith et Yellen 2002). The authors suggested that the fast component corresponds to inactivation, and the slow component to activation. Consequently, it seems that voltage-dependent inactivation is linked to the voltage sensor.

However, Hill and collaborators recently showed that neutralization of the first 3 charges in the hERG S4 domain (K525Q, R528Q, R531Q) shifts the voltage-dependent activation of 87 mV towards negative potentials but does not modify the voltage-dependent inactivation. These results suggest that unlike activation, hERG inactivation is independent of the S4 movement and reinforce the hypothesis that activation and inactivation are two distinct mechanisms (Hill et Vandenberg 2008). The same group also performed an alanine scan of S5 of hERG. Mapping of the functional effect of the mutations on a hERG homology domain clearly shows distinct areas. The residues pointing towards S6 are associated with a altered inactivation process, whereas many residues pointing away and most of the S4-S5 linker are associated with a altered activation process (Ju *et coll.*, 2009). This is also consistent with uncoupled activation and inactivation processes.

Besides an intact inactivation mechanism, the chimera conserves an intact pore as suggested by the comparison of hERG and the chimera blockade by drugs. We tested the sensitivity of the chimera to E-4031, (Sanguinetti et Jurkiewicz 1990) and found that the chimera exhibits the same sensitivity as hERG. The hERG D540K mutant is also activated at hyperpolarized potentials but conserves the ability to activate and inactivate in response to membrane depolarization (Sanguinetti et Xu 1999). However, unlike the chimera, this mutant has modified inactivation and a lower sensitivity to MK-499, another méthanesulfonanilide (Mitcheson *et coll.*, 2000a). The differences between the chimera and the D540K mutant may find their origin in the impairment of distinct mechanisms. In hERG channels, the interaction between the S4-S5 linker (containing D540) and the C-terminal end of the S6 domain allows the coupled movements between the voltage sensor and the activation gate (Ferrer *et coll.*, 2006). In the D540K mutant, the altered interaction between the voltage sensor and the activation gate may promote channel reopening at hyperpolarized potentials (Tristani-Firouzi *et coll.*, 2002). In the chimera, the mechanism involved in the voltage independence of activation may arise from constrained movements of the voltage sensor, upstream of S4-pore coupling. In other words, the S3-S4 substitution would impair the S4 movement but not the coupling between the voltage sensor and the pore. To confirm this hypothesis, gating current measurements will be helpful in order to determine whether or not the role of S3-S4 linker limits the movements of the S4 segment in the chimera.

The role of the S3-S4 linker has been widely studied in the Shaker channel (Gonzalez *et coll.*, 2000; Mathur *et coll.*, 1997; Sorensen *et coll.*, 2000). The large deletion of amino acids 333-357 in the S3-S4 linker has only minor effects on the voltage dependence of activation (Mathur *et coll.*, 1997). However, amino acids 330-360 deletion leads to a +45-mV shift (Gonzalez *et coll.*, 2000).

These results suggest that it is probably not the length of the linker that critically constrains the S4 segment displacement but rather the nature of its amino-acid sequence. We replaced 10 amino acids of hERG S3-S4 linker by 9 amino acids of rolf and observed a major effect on activation. Interestingly, this replacement includes amino acid E246 in rolf: substitution of this amino acid to the equivalent position in eag (A345E) has been shown to stabilize the activation gate of the eag (Tang et Papazian 1997). To further explore the role of S3-S4 loop in the hERG voltage sensor, a scanning mutagenesis of the S3-S4 loop in the hERG-rolf chimera will allow identifying the specific residues involved in the alteration of the chimera activation.

### **Use of the chimera as a pharmacological model.**

Our results show that the chimera has a lower sensitivity to BeKm-1, a blocker which binds preferentially to the channel closed-state. This observation reinforces the idea that the chimera exists mostly in two conformations: open or inactivated. We have used this chimera property to study the mechanism of ketoconazole action. Two mechanisms have been suggested: a block in the closed state (Dumaine *et coll.*, 1998; Yao *et coll.*, 2005) or a block in the open or inactivated state (17). We have shown that ketoconazole binds preferentially to the open and inactivated states. This conclusion relies on the assumption that the drug effect on the chimera can be extrapolated to hERG. Two arguments suggest that the binding of ketoconazole to hERG is not modified by the S3-S4 substitution. First, the binding site of ketoconazole does not implicate the S3-S4 linker since it is located in the intracellular part of S6 (Ridley *et coll.*, 2006). The second argument is that the effects of ketoconazole on hERG and the chimera are similar at potentials (+20 to +40 mV) at which both channels reside in the same states (open and inactivated).

Focusing on the chimera, fractional block decreased significantly between -40 mV and potentials +20, +30 and +40 mV (One-way repeated measures ANOVA, with a Tukey test), reminiscent of the voltage dependent block observed with miconazole (Kikuchi *et coll.*, 2005). This may suggest that ketoconazole binds the open channels with a higher affinity than the inactivated channels. However, the voltage dependence of the chimera block does not parallel that of inactivation: the potential for half fractional block is around 0 mV, which is much closer to the half-activation potential (-4.9 mV) than the half-inactivation potential (-50 to -70 mV depending on the protocol used). This lead to the hypothesis that some structural rearrangements linked to the normal activation process are conserved in the chimera despite the absence of activation gating, and that these rearrangements are responsible for the voltage dependent interaction of ketoconazole with the chimeric channel.

The mechanism of hERG block by several drugs associated with the acquired long QT syndrome remains unclear. Indeed, moxifloxacin (Alexandrou *et coll.*, 2006), fluvoxamine (Milnes *et coll.*, 2003b) and, recently, doxepin (Duncan *et coll.*, 2007) have been reported to inhibit hERG with a mixed state-dependence of inhibition (with components of both closed- and open-channel block, including a very rapid open-channel block). Altogether the results presented in here suggest that hERG-rolf chimera is a valuable pharmacological model to characterize the state-dependent block and more generally, to identify the mechanism of action of hERG blockers.

### **Acknowledgements**

We thank Béatrice Leray, Marie-Joseph Louerat, Sylvie Leroux and Agnes Carcouët for expert technical assistance. AEH was the recipient of a grant from INSERM/Pays-de-Loire. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-JCJC-0160-01) to GL and to IB (ANR COD/A05045GS). FSC is supported by Génavie, the « Fondation pour la Recherche Médicale », and the « Fédération Française de Cardiologie ».

## References

1. Sanguinetti, M.C. and M. Tristani-Firouzi. 2006. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440:463-469.
2. Wei, A., T. Jegla, and L. Salkoff. 1996. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* 35:805-829.
3. Jan, L.Y. and Y.N. Jan. 1992. Tracing the roots of ion channels. *Cell* 69:715-718.
4. Smith, P.L., T. Baukrowitz, and G. Yellen. 1996. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379:833-836.
5. Hoshi, T., W.N. Zagotta, and R.W. Aldrich. 1991. Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7:547-556.
6. Panyi, G. and C. Deutsch. 2006. Cross talk between activation and slow inactivation gates of Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol* 128:547-559.
7. Piper, D.R., A. Varghese, M.C. Sanguinetti, and M. Tristani-Firouzi. 2003. Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:10534-10539.
8. Zou, A., Q.P. Xu, and M.C. Sanguinetti. 1998. A mutation in the pore region of HERG K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes reduces rectification by shifting the voltage dependence of inactivation. *J. Physiol* 509 (Pt 1):129-137.
9. Sanguinetti, M.C. and Q.P. Xu. 1999. Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol* 514 (Pt 3):667-675.
10. Ferrer, T., J. Rupp, D.R. Piper, and M. Tristani-Firouzi. 2006. The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 281:12858-12864.
11. Mitcheson, J.S., J. Chen, and M.C. Sanguinetti. 2000a. Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J. Gen. Physiol* 115:229-240.
12. Long, S.B., E.B. Campbell, and R. MacKinnon. 2005a. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309:897-903.
13. Tang, C.Y. and D.M. Papazian. 1997. Transfer of voltage independence from a rat olfactory channel to the *Drosophila* ether-a-go-go K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol* 109:301-311.
14. Dumaine, R., M.L. Roy, and A.M. Brown. 1998. Blockade of HERG and Kv1.5 by ketoconazole. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286:727-735.

15. Ridley,J.M., J.T.Milnes, R.S.Duncan, M.J.McPate, A.F.James, H.J.Witchel, and J.C.Hancox. 2006. Inhibition of the HERG K<sup>+</sup> channel by the antifungal drug ketoconazole depends on channel gating and involves the S6 residue F656. *FEBS Lett.* 580:1999-2005.
16. Yao,J.A., X.Du, D.Lu, R.L.Baker, E.Daharsh, and P.Atterson. 2005. Estimation of potency of HERG channel blockers: impact of voltage protocol and temperature. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 52:146-153.
17. Loussouarn,G., K.H.Park, C.Bellocq, I.Baro, F.Charpentier, and D.Escande. 2003. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP<sub>2</sub>, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *EMBO J.* 22:5412-5421.
18. Chevalier,P., C.Rodriguez, L.Bontemps, M.Miquel, G.Kirkorian, R.Rousson, F.Potet, J.J.Schott, I.Baro, and P.Touboul. 2001. Non-invasive testing of acquired long QT syndrome: evidence for multiple arrhythmogenic substrates. *Cardiovasc. Res.* 50:386-398.
19. Clancy,C.E. and Y.Rudy. 2001. Cellular consequences of HERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death. *Cardiovasc. Res.* 50:301-313.
20. Wang,Z., B.Fermini, and S.Nattel. 1994. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc. Res.* 28:1540-1546.
21. Spector,P.S., M.E.Curran, A.Zou, M.T.Keating, and M.C.Sanguinetti. 1996a. Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J. Gen. Physiol* 107:611-619.
22. Wang,S., M.J.Morales, S.Liu, H.C.Strauss, and R.L.Rasmusson. 1997a. Modulation of HERG affinity for E-4031 by [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> and C-type inactivation. *FEBS Lett.* 417:43-47.
23. Snyders,D.J. and A.Chaudhary. 1996. High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol. Pharmacol.* 49:949-955.
24. Wang,S., S.Liu, M.J.Morales, H.C.Strauss, and R.L.Rasmusson. 1997b. A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol* 502 (Pt 1):45-60.
25. Yang,T., D.J.Snyders, and D.M.Roden. 1997. Rapid inactivation determines the rectification and [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> dependence of the rapid component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cardiac cells. *Circ. Res.* 80:782-789.
26. Kiehn,J., A.E.Lacerda, and A.M.Brown. 1999. Pathways of HERG inactivation. *Am. J. Physiol* 277:H199-H210.
27. Korolkova,Y.V., G.N.Tseng, and E.V.Grishin. 2004. Unique interaction of scorpion toxins with the hERG channel. *J. Mol. Recognit.* 17:209-217.
28. Milnes,J.T., C.E.Dempsey, J.M.Ridley, O.Crociani, A.Arcangeli, J.C.Hancox, and H.J.Witchel. 2003a. Preferential closed channel blockade of HERG potassium currents by chemically synthesised BeKm-1 scorpion toxin. *FEBS Lett.* 547:20-26.

29. Sanguinetti, M.C. and N.K.Jurkiewicz. 1990. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J. Gen. Physiol* 96:195-215.
30. Spector, P.S., M.E.Curran, M.T.Keating, and M.C.Sanguinetti. 1996b. Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfonamides. *Circ. Res.* 78:499-503.
31. Loots, E. and E.Y.Isacoff. 2000. Molecular coupling of S4 to a K(+) channel's slow inactivation gate. *J. Gen. Physiol* 116:623-636.
32. Smith, P.L. and G.Yellen. 2002. Fast and slow voltage sensor movements in HERG potassium channels. *J. Gen. Physiol* 119:275-293.
33. Hill, A. P. and Vandenberg, J. I. Investigating the origin of the voltage-sensitivity of inactivation in hERG potassium channels. 2008 Biophysical Society Meetings Abstracts. Biophysical journal, Abstract 94[1342-pos]. 2008.
34. Ju, P., G.Pages, R.P.Riek, P.C.Chen, A.M.Torres, P.S.Bansal, S.Kuyucak, P.W.Kuchel, and J.I.Vandenberg. 2009. The pore domain outer helix contributes to both activation and inactivation of the HERG K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 284:1000-1008.
35. Tristani-Firouzi, M., J.Chen, and M.C.Sanguinetti. 2002. Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 277:18994-19000.
36. Gonzalez, C., E.Rosenman, F.Bezanilla, O.Alvarez, and R.Latorre. 2000. Modulation of the Shaker K(+) channel gating kinetics by the S3-S4 linker. *J. Gen. Physiol* 115:193-208.
37. Mathur, R., J.Zheng, Y.Yan, and F.J.Sigworth. 1997. Role of the S3-S4 linker in Shaker potassium channel activation. *J. Gen. Physiol* 109:191-199.
38. Sorensen, J.B., A.Cha, R.Latorre, E.Rosenman, and F.Bezanilla. 2000. Deletion of the S3-S4 linker in the Shaker potassium channel reveals two quenching groups near the outside of S4. *J. Gen. Physiol* 115:209-222.
39. Kikuchi, K., T.Nagatomo, H.Abe, K.Kawakami, H.J.Duff, J.C.Makielski, C.T.January, and Y.Nakashima. 2005. Blockade of HERG cardiac K<sup>+</sup> current by antifungal drug miconazole. *Br. J. Pharmacol.* 144:840-848.
40. Alexandrou, A.J., R.S.Duncan, A.Sullivan, J.C.Hancox, D.J.Leishman, H.J.Witchel, and J.L.Leane. 2006. Mechanism of hERG K<sup>+</sup> channel blockade by the fluoroquinolone antibiotic moxifloxacin. *Br. J. Pharmacol.* 147:905-916.
41. Milnes, J.T., O.Crociani, A.Arcangeli, J.C.Hancox, and H.J.Witchel. 2003b. Blockade of HERG potassium currents by fluvoxamine: incomplete attenuation by S6 mutations at F656 or Y652. *Br. J. Pharmacol.* 139:887-898.
42. Duncan, R.S., M.J.McPate, J.M.Ridley, Z.Gao, A.F.James, D.J.Leishman, J.L.Leane, H.J.Witchel, and J.C.Hancox. 2007. Inhibition of the HERG potassium channel by the tricyclic antidepressant doxepin. *Biochem. Pharmacol.* 74:425-437.

## Figure legends

**Fig. 1 :** Voltage dependence of hERG and the chimera activation. **A-B**, representative whole-cell current recordings from COS-7 cells expressing wild-type hERG (A) or chimeric (B) channels. Inset: voltage stimulation, every 3.5 s. **C**, current density measured at the end of the prepulse vs. voltage in cells expressing hERG (n=8) or chimeric (n=8) channels. **D**, relative tail current measured at -60 mV vs. prepulse potential in cells expressing hERG (n=8) or chimeric (n=8) channels. hERG steady-state activation was determined by fitting hERG data with a Boltzmann function (solid line).

**Fig. 2 :** hERG and the chimera have identical inactivation. **A, C**, representative inactivating current recordings of cells expressing hERG or chimeric channels recorded with two protocols. Inset: three-pulse voltage protocol from holding potential -80 mV, pulses duration: 1<sup>st</sup>: 200 ms, 2<sup>nd</sup>: 5 ms, 3<sup>rd</sup>: 200 ms, every 3 s (A) or 1<sup>st</sup>: 1000 ms, 2<sup>nd</sup>: 5 ms, 3<sup>rd</sup>: 50 ms, every 3 s (C). **B**, steady-state current ( $I_{ssi}$  measured 20 ms after the beginning of the pulse) relative to the peak current ( $I_0$ ) recorded during the third pulse vs. voltage in cells expressing hERG (n=8) or chimeric (n=7) channels. Steady-state inactivation was determined by fitting the data (black circle for WT, open circle for the chimera, grey circles are measured values that are not taken into account for the fit) with a Boltzmann function (solid line). **D**, Peak current ( $I_0$ ) relative to maximal peak current ( $I_{0max}$ ) estimated by fitting current traces 1 ms after depolarization and extrapolating to the beginning of the pulse (hERG n=6; chimera n=7). In the case of hERG current,  $I_0$  is corrected from the fraction of deactivation measured during the 2<sup>nd</sup> pulse. Steady-state inactivation was determined by fitting the data as in B.

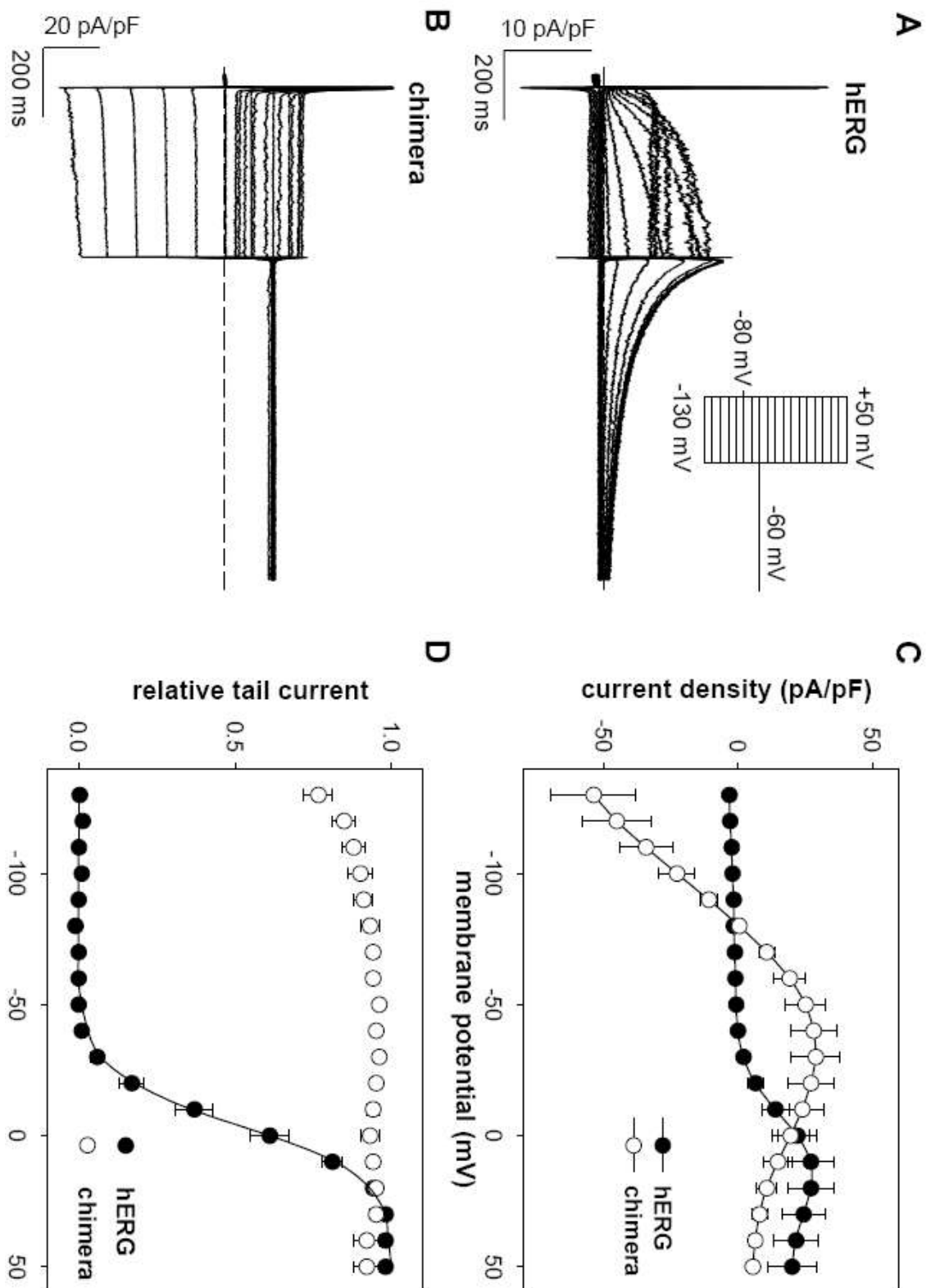
**Fig. 3 :** hERG and the chimera have identical inactivation and recovery from inactivation kinetics. **A-B**, recovery from inactivation current traces of hERG (A) and the chimera (B). Right, time-expanded framed zone. Inset : voltage protocol, every 3 s. **C**, voltage dependence of the time constant of recovery from inactivation for hERG (n=6) and the chimera (n=7) and voltage dependence of the inactivation time constant for hERG (n=9) and the chimera (n=9).

**Fig. 4 :** Kinetic models of hERG and chimeric channels. **A**, top: representative whole-cell current recordings from COS-7 cells expressing hERG or chimeric channels. Inset: corresponding voltage protocols. Bottom: simulated currents obtained with the hERG kinetic model (B) optimized to fit hERG experimental currents. Right, simulated chimera currents were obtained with the chimera kinetic model (C) using the same transition rates as the hERG kinetic model. No further optimization was used or needed.

**Fig. 5 :** Effect of BeKm-1 on hERG and the chimera. **A-B**, representative currents of hERG (A) and the chimera (B) in baseline conditions and after a 3-min exposure to 25 nM BeKm-1 elicited by an ascending voltage ramp (10 mV/s; every 15 s). **C**, mean fractional block [1- (current in the presence of 25 nM BeKm-1/baseline current)] measured at various potentials during the depolarizing ramp in cells expressing hERG (n=6) or chimeric (n=7) channels (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ). Black triangles: mean steady-state fractional block measured at the end of a 5 s step to -30 mV (n=6), 0 mV (n=7) or +40 mV (n=7) in cells expressing hERG.

**Fig. 6** : Effect of ketoconazole (keto) on hERG and the chimera. **A-B**, representative currents of hERG (A) and chimera (B) in baseline conditions and after 3-min exposure to 5  $\mu$ M ketoconazole (keto) elicited by an ascending voltage ramp (10 mV/s; every 15 s). **C**, mean fractional block [1- (current in the presence of 5  $\mu$ M ketoconazole/baseline current)] measured at various potentials during the depolarizing ramp in cells expressing hERG (n=8) or chimeric (n=6) channels (\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ).

Figure 1



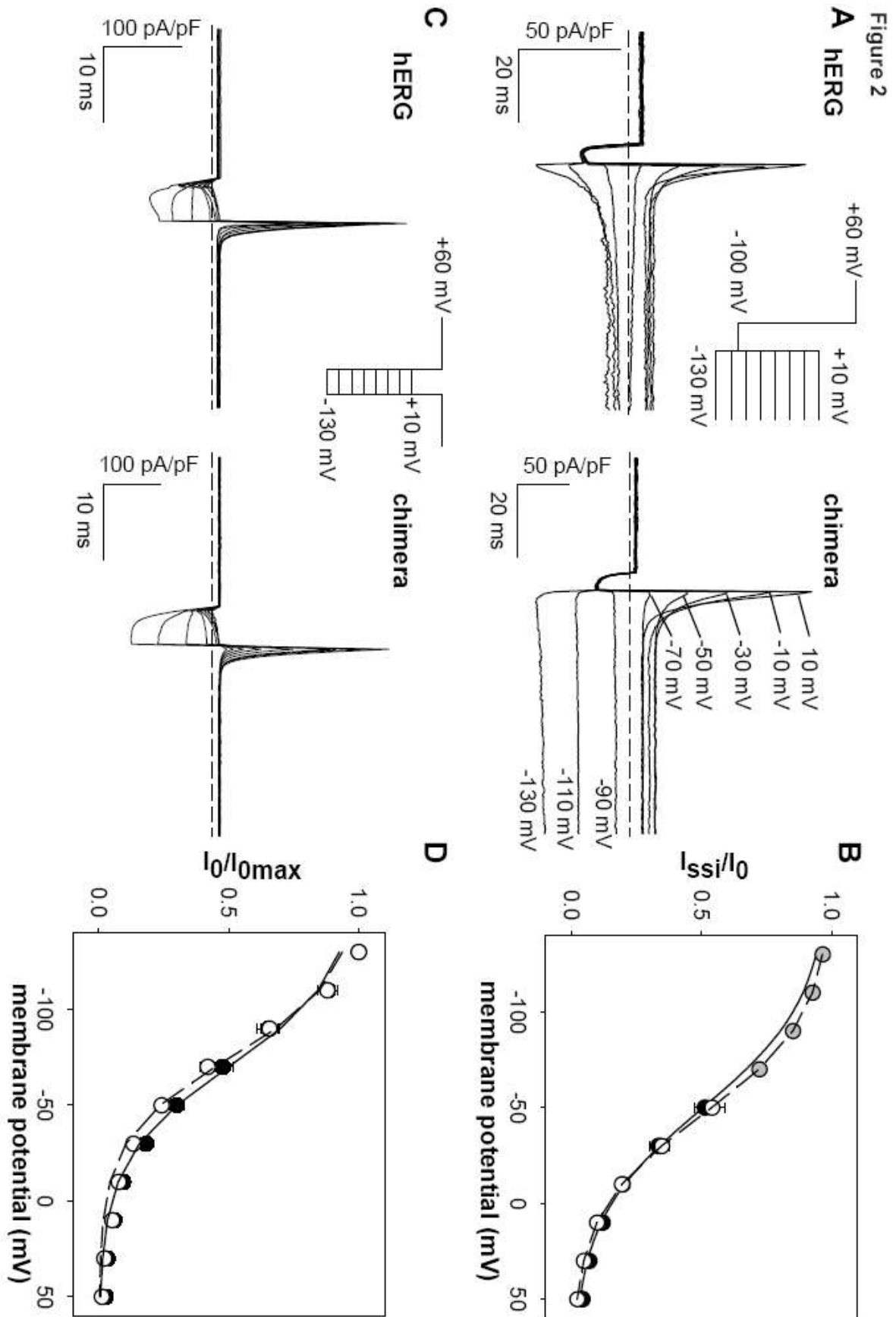


Figure 3

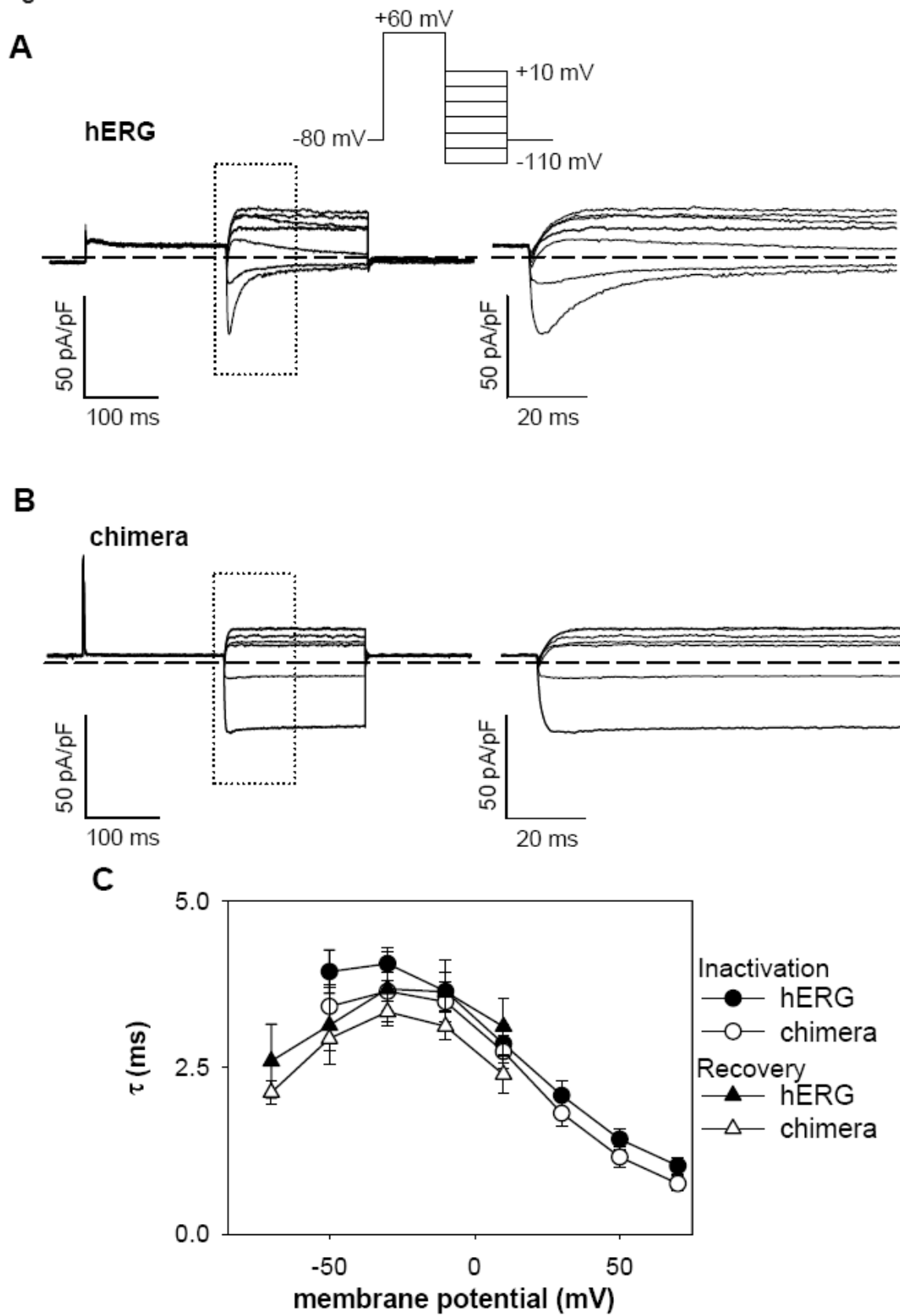


Figure 4

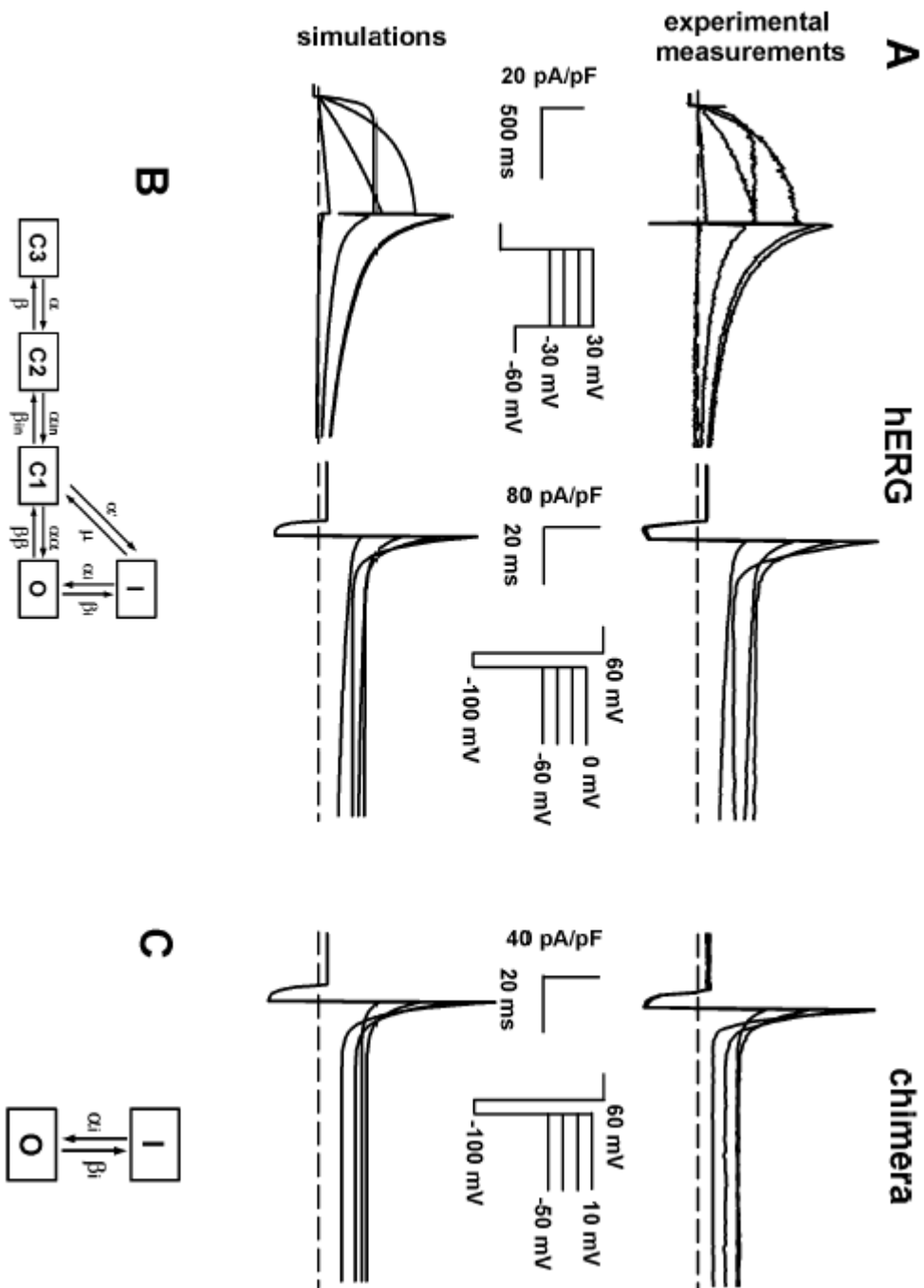
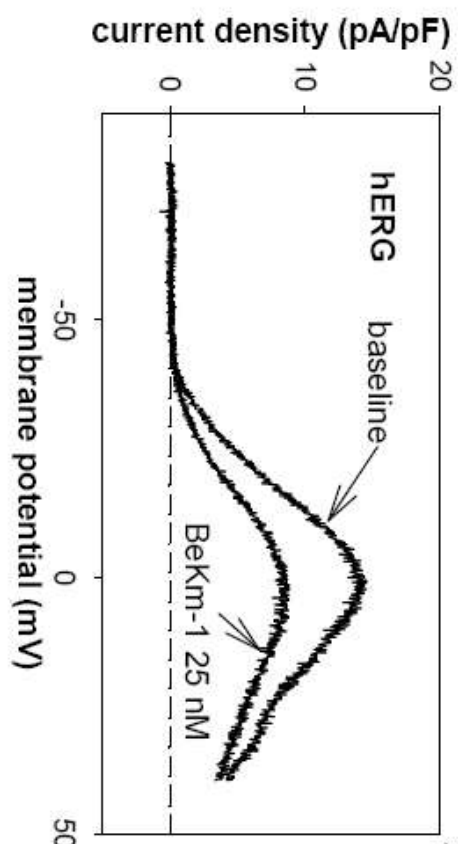
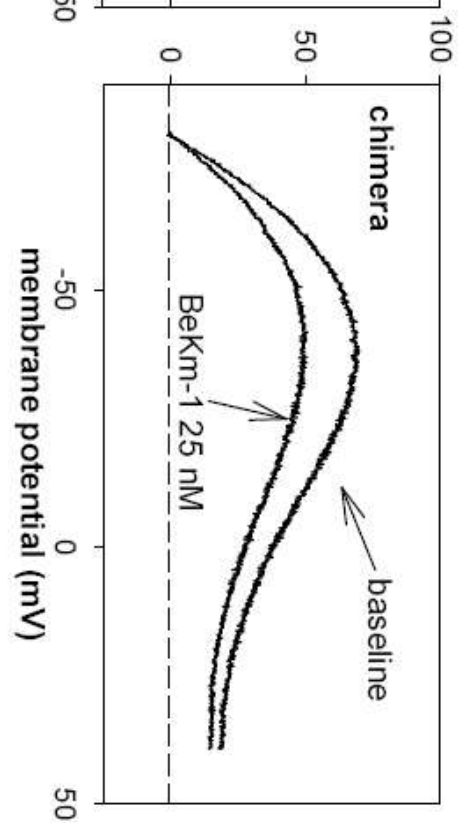


Figure 5  
A



B



C

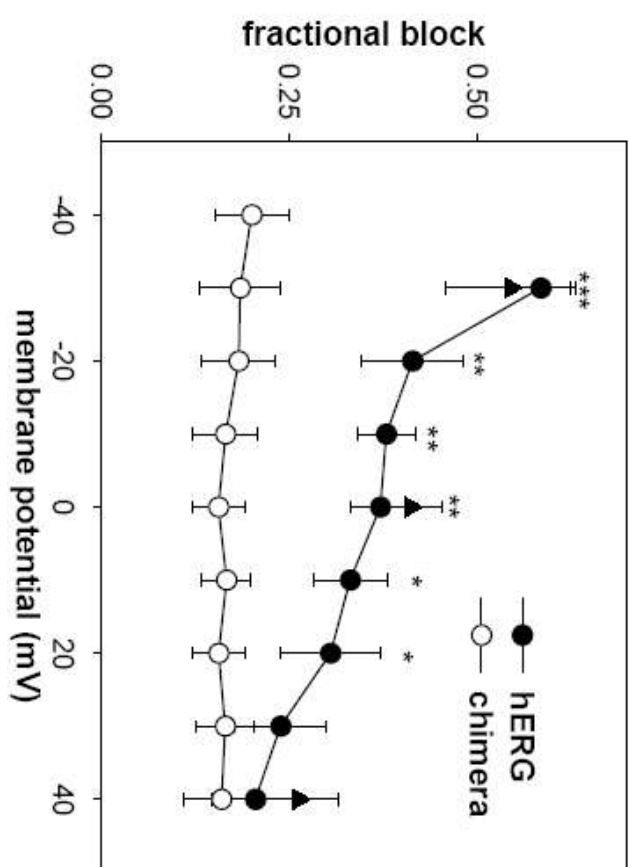
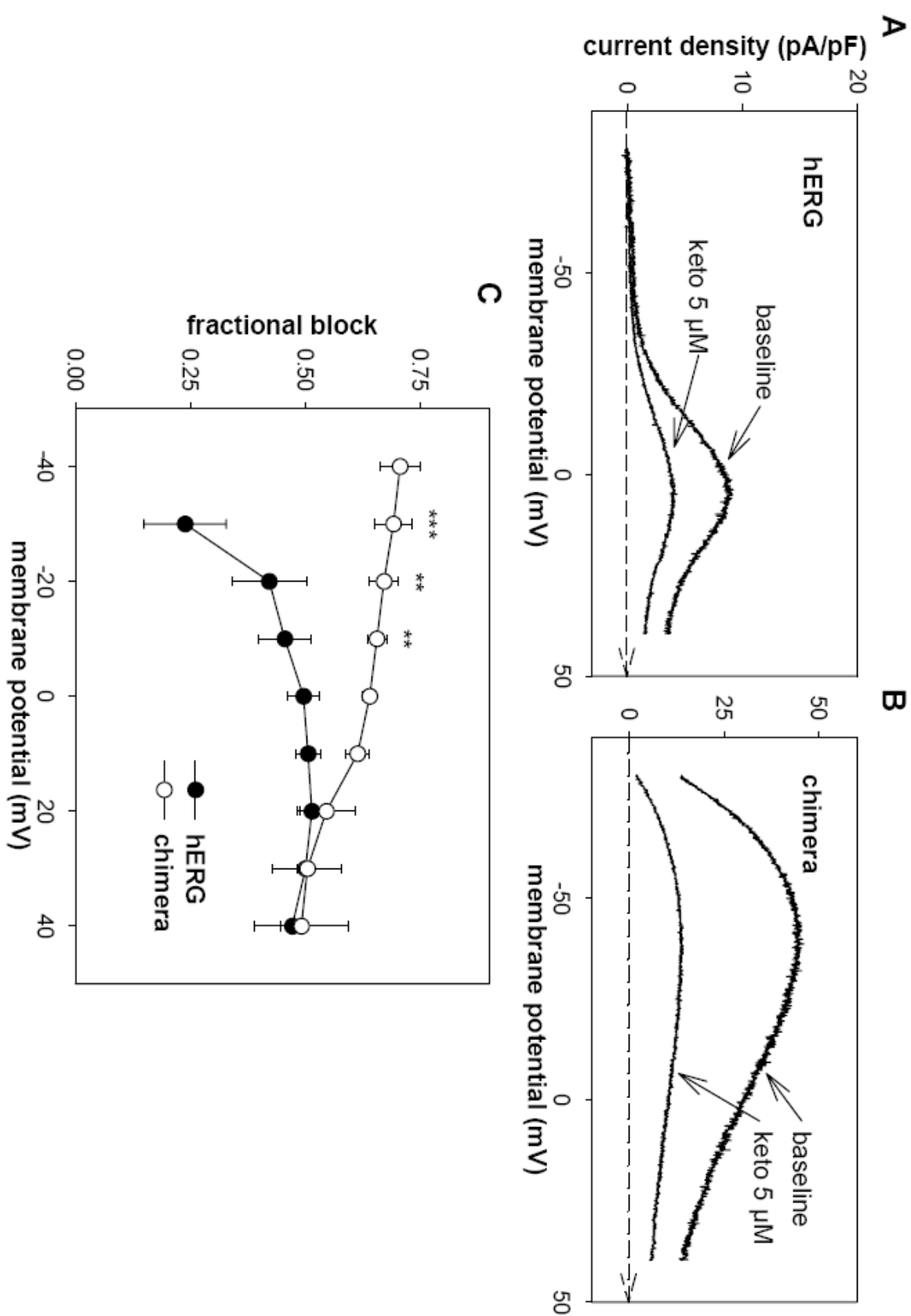
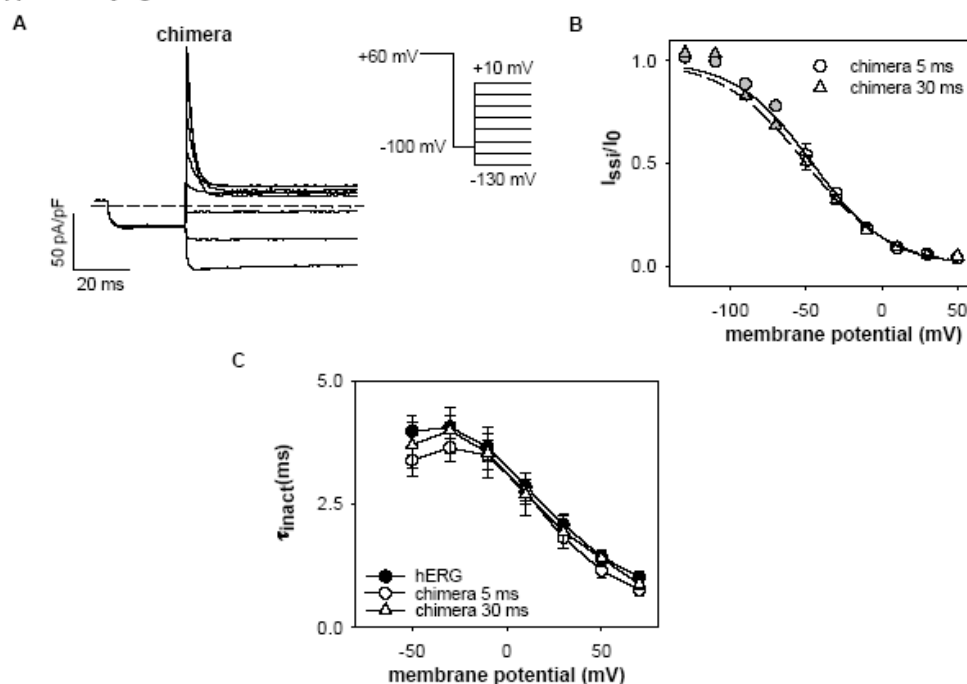


Figure 6

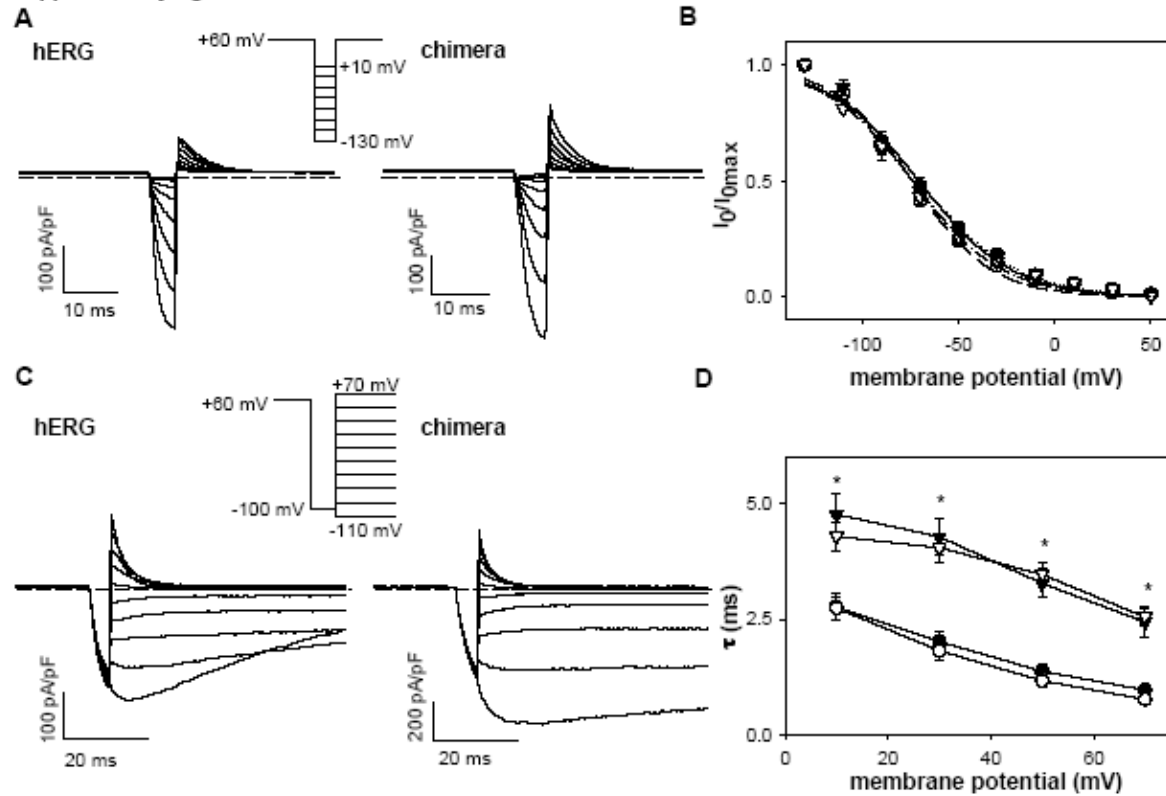


Supplementary figure 1



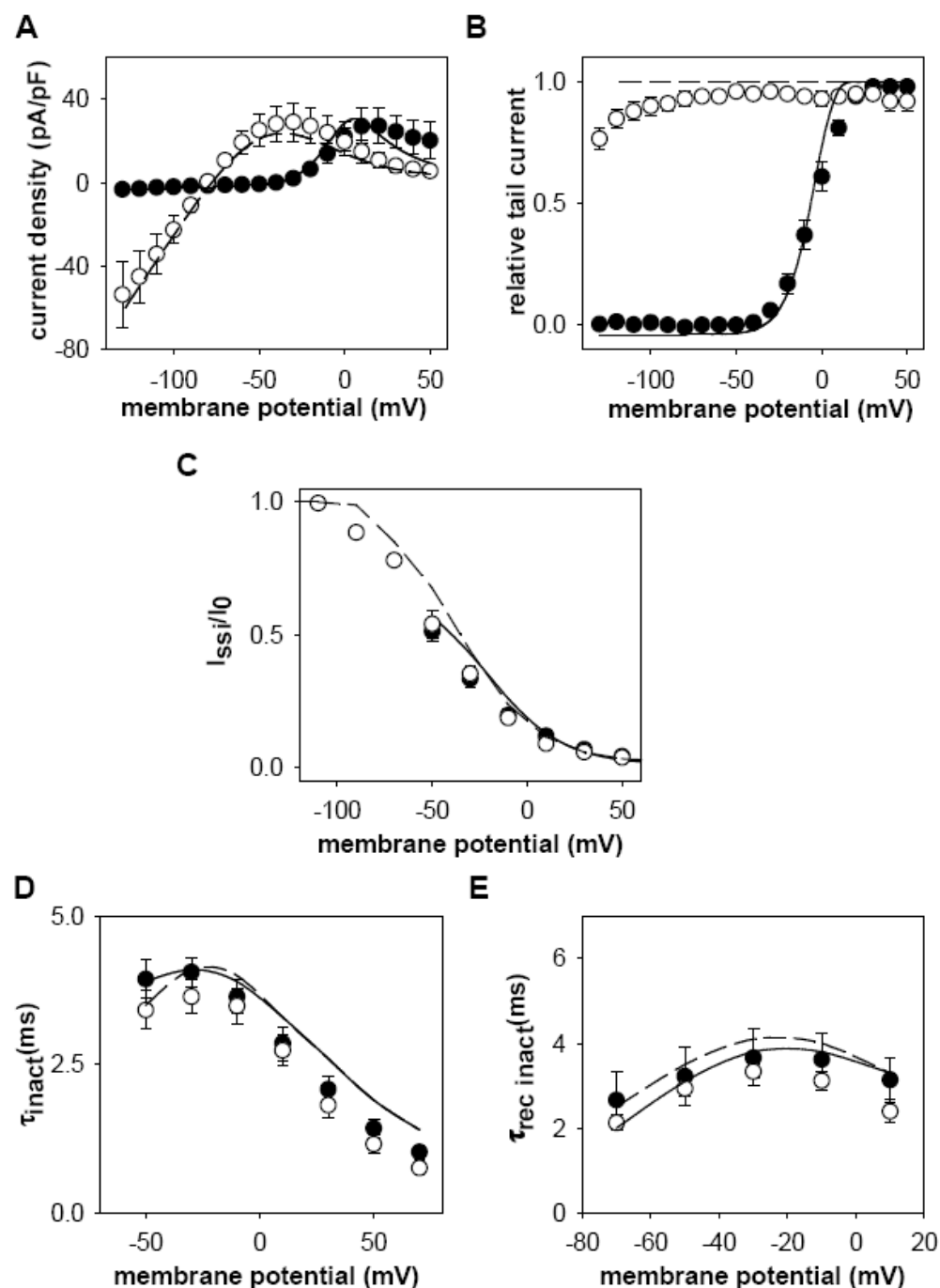
**Supplementary figure 1:** Effect of the inactivation recovery pulse duration on the chimera inactivation. **A**, representative whole-cell current recordings from a COS-7 cell expressing chimeric channel with a 30-ms 2<sup>nd</sup> pulse. Inset: Three-pulse voltage protocol. **B**, steady-state current ( $I_{ss}$  calculated 20 ms after the beginning of the pulse) relative to the peak current ( $I_0$ ) recorded during the third pulse vs. voltage in cells expressing chimeric (D; n=8) channels. Steady-state inactivation was determined by fitting the data with a Boltzmann function (solid line for the 5-ms 2<sup>nd</sup> pulse, dotted line for the 30-ms 2<sup>nd</sup> pulse). **C**, voltage dependence of the inactivation time constant ( $\tau_{inact}$ ) for hERG (n=9) and the chimera, using a 2<sup>nd</sup> pulse of 5 ms (chimera 5 ms; n=9) or 30 ms (chimera 30 ms; n=9).

Supplementary figure 2

Supplementary figure 2: Effects of 100 mM  $K^+_o$  on hERG and the chimera inactivation.

**A, C**, representative whole-cell current recordings from a COS-7 cell expressing hERG and chimeric channels. Inset: Three-pulse voltage protocol. **B**, Steady state inactivation of hERG and the chimera ( $n=7$ ) was determined by fitting the data (black symbols for WT, open symbols for the chimera, circles for 4 mM  $[K^+]_o$  and triangles for 100 mM  $[K^+]_o$ ) with a Boltzmann function (solid line for WT and dashed line for the chimera at 4 mM  $[K^+]_o$ , dotted line for WT and dashed-dotted line for the chimera at 100 mM  $[K^+]_o$ ). **D**, Inactivation time constants of hERG and the chimera (same symbols as in B;  $n=8-9$ , \*:  $p<0.05$ ).

Supplementary figure 3



Supplementary figure 3: Simulation by the kinetic models of the biophysical parameters of hERG and the chimera.

A, Current voltage relationships (see figure 1C). B, Activation curves (see figure 1D). C, Inactivation curves (see figure 2B). D, Inactivation time constants (see figure 3C). E, Recovery from inactivation time constants (see figure 3C). Circles: experimental measures, hERG (black) and chimera (white) Lines: simulation from the kinetic models (figure 3), hERG (solid) and chimera (dashed).

## Discussion

### Résumé des résultats

Pour déterminer la présence ou non d'un couplage entre l'activation et l'inactivation chez hERG, nous avons construit une chimère dans laquelle la boucle S3-S4 du canal hERG a été remplacée par celle d'un canal indépendant du potentiel, le canal rolf. Dans la première partie de cet article, les propriétés biophysiques d'activation et d'inactivation de cette chimère ont été caractérisées. Nos résultats montrent que le processus d'activation seulement est modifié dans la chimère. En effet, le processus d'inactivation est conservé dans la chimère puisque ses propriétés d'inactivation et de levée d'inactivation sont similaires à celle du canal hERG sauvage. La suppression du processus d'activation ne modifie pas l'inactivation suggérant que **ces deux processus ne sont pas couplés directement chez hERG.**

La suppression du processus d'activation indique également l'absence d'état fermé laissant supposer que **la chimère existe que sous deux configurations : ouverte et inactivée.** Pour confirmer cette hypothèse, nous avons développé un modèle cinétique basé sur le modèle de Markov adapté à hERG par Clancy et Rudy (Clancy et Rudy 2001). Ce modèle indique que l'activité de la chimère peut être simulée en conservant uniquement la transition entre l'état ouvert et inactivé de hERG renforçant l'hypothèse d'un canal à deux états. Il confirme également que le processus d'inactivation n'est pas modifié chez la chimère. L'absence d'état fermé a été confirmée par l'étude de la sensibilité de la chimère au BeKm-1, un inhibiteur de hERG se fixant préférentiellement à l'état fermé. En effet, l'inhibition de la chimère par le BeKm-1 est très faible quel que soit le potentiel imposé.

### Nature du couplage activation/inactivation chez hERG

Les résultats de notre étude, associés à l'absence de modification de l'activation par des mutations affectant l'inactivation (Zou *et coll.*, 1998), suggèrent que l'activation et l'inactivation ne sont pas directement couplées dans le canal hERG. Cependant, aucun de nos résultats ne peut exclure la possibilité que le couplage entre l'activation et l'inactivation soit indirect. Comme nous l'avons vu dans l'introduction (paragraphe III A 2 a), la formation d'une liaison entre les domaines S5 et S6 est à l'origine de la constriction du filtre de sélectivité permettant l'inactivation de type C. De plus, il a été montré qu'une interaction entre le domaine S4 et le domaine S5 se crée lors de l'activation du canal Shaker (Loots et Isacoff 2000). Ces données suggèrent l'implication du domaine S5 dans le processus

d'activation et d'inactivation. Une étude récente a évalué le rôle du domaine S5 dans ces 2 processus en mutant chacun des résidus de ce domaine en alanine (Ju *et coll.*, 2009).

Les résidus associés à une modification de l'inactivation sont dirigés vers le domaine S6. A l'inverse, ceux liés à l'activation sont dirigés vers la boucle S4-S5. Ces résultats révèlent que l'activation et l'inactivation ne sont pas couplées indirectement *via* le domaine S5. L'implication du domaine S4 dans le couplage activation/inactivation a également été testée. Hill et ses collaborateurs (Hill et Vandenberg 2008) ont montré que la neutralisation des trois premières charges positives du domaine S4 (K525Q, R528Q et R531Q) entraîne un décalage de la dépendance au potentiel de l'activation de 87 mV vers les potentiels négatifs mais ne modifie pas la dépendance au potentiel de l'inactivation. Ces résultats indiquent que le domaine S4 ne contrôle pas directement l'inactivation. L'absence de couplage indirect *via* le S4 est renforcée par l'étude de la neutralisation une à une des charges positives du domaine S4. Cette étude révèle que la mutation des charges positives modifie uniquement la dépendance au potentiel de l'activation du canal hERG (Zhang *et coll.*, 2004). Ces études, associées à la nôtre, proposent que l'inactivation de hERG est indépendante du domaine S4.

Pour déterminer si le domaine S4 contrôle séparément l'activation et l'inactivation, il serait intéressant d'étudier dans la chimère le mouvement du domaine S4 et l'existence de corrélation entre ses cinétiques et celle de l'inactivation. Si les deux composantes du domaine S4 décrites dans les études de Smith (Smith *et coll.*, 2002) et de Piper (Piper *et coll.*, 2003) correspondent à l'activation et l'inactivation, le processus d'activation étant supprimé dans la chimère, seule la composante rapide liée à l'inactivation devrait subsister. Il serait alors possible d'étudier plus précisément la cinétique rapide de mouvement du domaine S4 et si elle résulte de l'inactivation. Pour cela, l'effet de mutations modifiant (S631A) ou supprimant (G628C-S631C) l'inactivation sera évalué sur le mouvement du domaine S4 dans la chimère en mesurant le courant de porte par la technique de patch-clamp.

Le laboratoire ne possédant pas les installations requises pour mesurer le courant de porte, l'étude du mouvement du domaine S4 dans la chimère s'effectuera **en collaboration avec l'équipe de Dirk Snyders**, équipe dans laquelle j'apprendrai la technique du courant de porte.

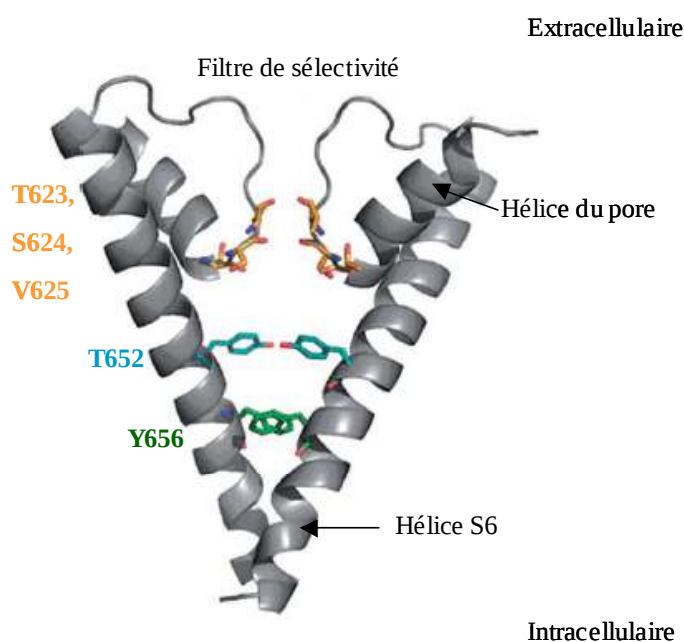
#### Implication des processus d'activation et d'inactivation dans la sensibilité de hERG aux molécules pharmacologiques

D'autres canaux hERG mutants ont été décrits comme ayant la capacité d'être ouverts en permanence. Le canal hERG mutant D540K est également activé aux potentiels hyperpolarisés, mais conserve la capacité à s'activer et s'inactiver suite à une dépolarisation membranaire contrairement à la chimère (Sanguinetti et Xu 1999).

L'activation de hERG aux potentiels hyperpolarisés suite à la mutation d'un acide aminé de la boucle S4-S5 révèle que les canaux  $K_v$  peuvent se comporter de façon similaire aux canaux activés par l'hyperpolarisation tels que KAT1 et HCN décrits dans mon premier projet. Ces données renforcent l'idée d'un mécanisme ligand-récepteur chez certains canaux dépendant du potentiel (KCNQ1, hERG, KAT1 et HCN).

Les études de Mitcheson et de Tristani-Firouzi suggèrent que la fermeture de la porte d'activation piège la molécule pharmacologique au niveau du pore du canal prolongeant son effet inhibiteur (Mitcheson *et coll.*, 2000a; Tristani-Firouzi *et coll.*, 2001). Si ce mécanisme est correct, le blocage de la porte d'activation en configuration ouverte devrait réduire l'effet inhibiteur des molécules pharmacologiques dans la chimère. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'effet d'un méthanesulfonanilide, l'E-4031, sur l'activité de la chimère. Nos résultats révèlent que **la fermeture de la porte d'activation n'est pas impliquée dans la sensibilité de hERG aux molécules pharmacologiques**. Plusieurs études ont montré l'implication du processus d'inactivation. Des mutations réduisant l'inactivation (S620T ; S631A) (McPate *et coll.*, 2008; Perrin *et coll.*, 2008) ou la supprimant (G628C-S631C) diminuent l'effet des inhibiteurs de hERG sans les abolir (Numaguchi *et coll.*, 2000).

D'autres mutations, ne modifiant pas l'inactivation de hERG, diminuent également l'affinité de hERG vis-à-vis des molécules pharmacologiques (Mitcheson *et coll.*, 2000b). L'effet du MK-499 est réduit par la mutation des résidus polaires de l'hélice du pore (T623, S624 et V625) et des résidus aromatiques (Y652 et F656) situés dans le domaine S6 (figure 22).



**Figure 22 : Représentation schématique du pore du canal hERG.** D'après Kramer *et coll.*, 2008.

Ces mêmes résidus semblent jouer un rôle important dans la fixation d'autres molécules telles que le cisapride et la terfénaire (Sanguinetti *et coll.*, 2005). La diminution de l'inhibition chez les canaux hERG mutants Y652 et F656 est similaire à celle observée avec les mutations affectant l'inactivation. Ces résultats révèlent que **l'inactivation n'est peut-être pas directement responsable de la sensibilité des inhibiteurs de hERG mais modifie l'orientation des résidus Y652 et F656** devenant alors moins accessibles. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions évaluer si l'effet des mutations du domaine S6 et celles affectant l'inactivation sont additifs chez la chimère.

#### Rôle de la boucle S3-S4

Dans l'introduction de l'article, nous avons suggéré que la mutation D540K chez hERG n'était pas la plus pertinente pour étudier le couplage activation/inactivation car elle provoquait une modification de la structure du pore. Cette modification de la structure du pore a été confirmée par l'étude de bloqueurs de hERG tels que MK-499 et E-4031 (Sanguinetti et Jurkiewicz 1990; Spector *et coll.*, 1996b).

Dans notre étude, la sensibilité de la chimère vis-à-vis de l'E-4031 est similaire à celle du canal hERG sauvage suggérant que le pore est intact. Cette conclusion a été renforcée par l'absence de modification de l'effet de 4 autres agents pharmacologiques inhibant le canal hERG (astémizole, cisapride, risperidone et fluoxétine) et du mosapride, molécule ne bloquant pas hERG. En résumé, le processus d'inactivation et la structure du pore sont intacts dans la chimère révélant que seule, l'activation est supprimée par la substitution de la boucle S3-S4. Cette boucle semble jouer un rôle dans le processus d'activation du canal hERG. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier les effets de la substitution inverse : remplacer la boucle S3-S4 de rolf par celle de hERG. Si la dépendance au potentiel de l'activation chez hERG est conférée par la boucle S3-S4, son transfert dans le canal rolf devrait rendre ce canal activable par le potentiel.

Dans le cas où le rôle de la boucle S3-S4 dans l'activation dépendante du potentiel est confirmé, une mutation systématique des acides aminés de la boucle S3-S4 de hERG pourrait être réalisée pour identifier quels résidus sont impliqués dans cette dépendance au potentiel de l'activation.

### Utilisation de la chimère comme outil pharmacologique

Le modèle cinétique de hERG suggère que la chimère n'existe que sous deux conformations : ouverte et inactivée. Nous avons utilisé cette propriété de la chimère pour déterminer le mécanisme d'action du ketoconazole, un antifongique. Deux mécanismes d'action du ketoconazole ont été suggérés : une fixation à l'état fermé (Dumaine *et coll.*, 1998; Yao *et coll.*, 2005) ou une fixation à l'état ouvert (Ridley *et coll.*, 2006). Pour déterminer à quel état se fixe cette molécule, nous avons évalué son effet sur la chimère. Nous avons montré que le ketoconazole se fixe préférentiellement à l'état ouvert/inactivé plutôt qu'à l'état fermé.

En conclusion, les résultats de notre étude révèlent que la chimère pourrait être un outil pharmacologique intéressant pour caractériser l'état de fixation des inhibiteurs de hERG (ouvert/inactivé ou fermé) et plus généralement leur mécanisme d'action.

## DISCUSSION GENERALE

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes moléculaires induisant :

- la dépendance au potentiel du canal KCNQ1, principal mécanisme moléculaire impliqué dans le syndrome du QT long de type 1.
- le couplage entre l'activation et l'inactivation chez hERG, deux processus supposés jouer un rôle prépondérant dans la sensibilité de hERG à de nombreuses molécules pharmacologiques à l'origine du syndrome du QT long acquis.

### **Des peptides endogènes au canal KCNQ1 contrôlent sa dépendance au potentiel : utilisation dans les canalopathies cardiaques et musculaires**

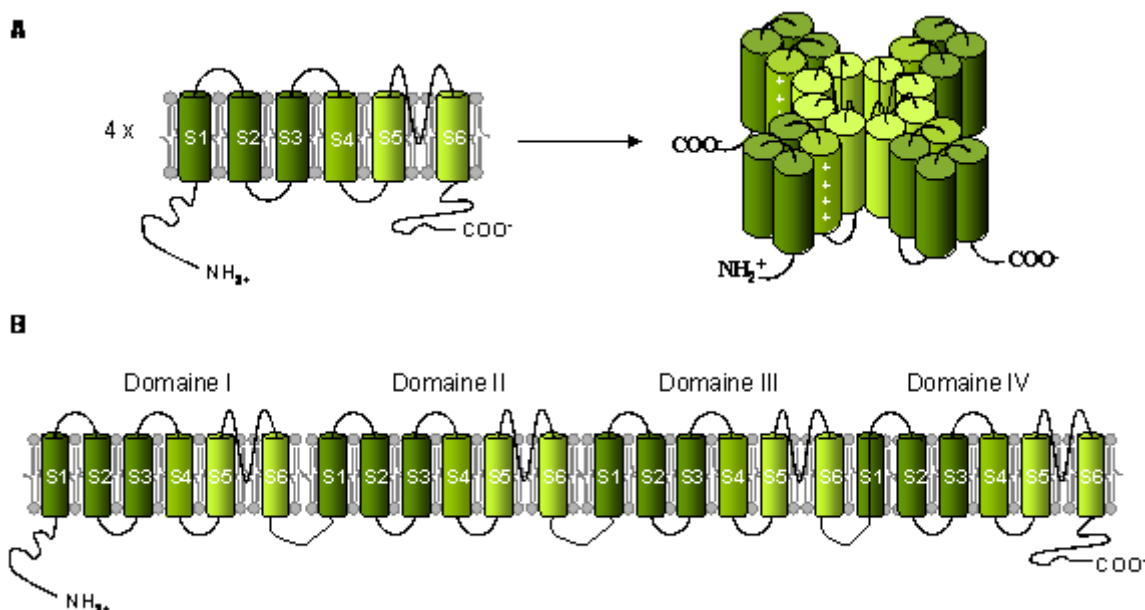
L'étude des mécanismes moléculaires à l'origine de la dépendance au potentiel du canal KCNQ1 présente un double intérêt :

- **un intérêt fondamental** : avec l'étude de la généralisation du mécanisme ligand-récepteur à d'autres canaux dépendant du potentiel (potassique, sodique ou calcique).
- **un intérêt appliqué** : avec l'utilisation potentielle de peptides spécifiques (inhibiteur et activateur) d'un canal pour corriger les effets des mutations modifiant la dépendance au potentiel de ce canal à l'origine de canalopathies graves.

#### **1. Intérêt fondamental :**

Le mécanisme proposé (des peptides S4-S5 et S6 d'un canal régulent l'activité de ce même canal) s'applique-t-il à d'autres canaux dépendant du potentiel, sodique et calcique ?

Les canaux potassiques composés de 6 domaines transmembranaires comme KCNQ1 s'assemblent en tétramère pour composer une unité canal (figure 23A). Les canaux sodique et calcique dépendant du potentiel sont également constitués de 4 fois 6 domaines transmembranaires mais l'unité canal est un monomère similaire à un tétramère fusionné (figure 23B).



**Figure 23 : Représentation schématique de la structure des canaux dépendant du potentiel.**

Structure des canaux potassiques (A), sodiques et calciques (B).

Cette homologie de structure suggère que le mécanisme ligand-récepteur de KCNQ1 peut-être généralisable à d'autres canaux dépendant du potentiel tels que le canal sodique Na<sub>v</sub>1.5. Une différence structurale majeure existe entre les canaux potassiques et les canaux sodiques et calciques dépendant du potentiel. Les canaux potassiques sont constitués de quatre monomères identiques correspondant chacun à un domaine. Chez les canaux sodique et calcique, ces quatre domaines (I à IV) sont fusionnés et les boucles S4-S5 ou les domaines S6 de chaque domaine sont différents. Pour vérifier si le mécanisme de dépendance au potentiel du canal sodique Na<sub>v</sub>1.5 est semblable à celui de KCNQ1, la construction de peptides correspondant à la boucle S4-S5 et à la partie C-terminale du domaine S6 pour **chacun** des domaines du canal Na<sub>v</sub>1.5 devra être réalisée.

## 2. Intérêt Appliqué :

Les peptides S4-S5 et S6 sont-ils efficaces et corrigent-ils les effets des mutations modifiant l'activité de KCNQ1 ?

De nombreuses mutations modifient la dépendance au potentiel du canal KCNQ1 engendrant des cardiopathies congénitales graves telles que le syndrome du QT long de type 1 (tableau 1, page 8). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les seuls outils pharmacologiques contre ce syndrome sont les  $\beta$ -bloquants tels que le propranolol ou nadolol (Moss *et coll.*, 2000).

Cependant, ils ne ciblent pas directement les canaux KCNQ1 mutés et donc ne permettent pas de corriger les effets délétères de ces mutations. En revanche, nous avons montré que les **peptides inhibiteurs S4-S5 et activateurs S6 modulent l'activité du canal KCNQ1 sauvage**. En effet, les **peptides activateurs** augmentent l'amplitude du courant et décalent la dépendance au potentiel vers les potentiels négatifs. Ces propriétés **pourraient permettre de corriger les effets des mutations perte de fonction induisant une modification de la dépendance au potentiel de KCNQ1** (syndrome du QT long de type 1). Les **peptides inhibiteurs** ont des effets inverses et **pourraient potentiellement restaurer une activité normale aux canaux KCNQ1 mutants entraînant un gain de fonction** (syndrome du QT court et/ou fibrillation auriculaire).

Pour évaluer l'intérêt thérapeutique de ces peptides, nous testerons l'effet des peptides activateurs (S6) sur le canal KCNQ1 mutant perte de fonction (par exemple : R243H, R555C, R539W) (Chouabe *et coll.*, 1997), responsable du syndrome du QT long de type 1. Comme lors de ma précédente étude, des cellules COS-7 seront transfectées avec un plasmide codant pour le canal KCNE1-KCNQ1 mutant perte de fonction en absence ou en présence du peptide activateur S6.

De la même façon, nous testerons les effets des peptides inhibiteurs S4-S5 sur les canaux KCNQ1 mutant gain de fonction (V307L) (Bellocq *et coll.*, 2004b) responsable du syndrome du QT court et/ou de la fibrillation auriculaire (par exemple : S140G, V141M) (Chen *et coll.*, 2003; Hong *et coll.*, 2005).

#### Utilisation de peptides inhibiteurs et activateurs dans d'autres canalopathies cardiaques mais aussi musculaires et neuronales ?

La structure comparable des canaux potassique, sodique et calcique dépendant du potentiel (décrit précédemment, page 101-102) suggèrent que le mécanisme de dépendance au potentiel de KCNQ1 peut être généralisable à ces canaux. Il serait intéressant d'évaluer si des peptides similaires, spécifiques du canal étudié, peuvent corriger les effets des mutations **d'autres canaux dépendant du potentiel** tels que le canal sodique **Na<sub>v</sub>1.5**. Dans le cas du canal sodique cardiaque Na<sub>v</sub>1.5, **34% des mutations perte de fonction** (20 sur 59 étudiées en électrophysiologie) induisant **le syndrome de Brugada** et **20%** (4 sur 20) **la maladie de Lenègre**, sont des **mutations entraînant une modification de la dépendance au potentiel du canal Na<sub>v</sub>1.5**. De la même façon, **14% des mutations gain de fonction** (5 sur 35) à l'origine **du syndrome du QT long type 3** provoque **une modification de la dépendance au potentiel du canal Na<sub>v</sub>1.5** (*D'après inherited arrhythmias database 2007 ; Zimmer et Surber 2008*).

Si le mécanisme proposé pour KCNQ1 est applicable au canal  $\text{Na}_v1.5$ , l'utilisation de **peptides activateurs** (syndrome de Brugada et maladie de Lenègre) ou **inhibiteurs** (syndrome du QT long de type 3) spécifiques pourrait permettre de corriger l'effet des mutations du canal  $\text{Na}_v1.5$  induisant une modification de la dépendance au potentiel. Comme dans le cas des canaux KCNQ1 mutés, les effets des différents peptides, préalablement sélectionnés pour leur efficacité à activer le courant sodique, devront être testés sur l'activité des canaux  $\text{Na}_v1.5$  mutés tels que E161K (syndrome de Brugada) (Smits *et coll.*, 2005) et G541C (maladie de Lenègre) (Tan *et coll.*, 2001).

L'utilisation des peptides inhibiteurs et activateurs pourrait être étendue à des canalopathies musculaires et neuronales. En effet, les mutations modifiant la dépendance au potentiel de canaux sodique et calcique sont à l'origine de pathologies musculaires et neuronales telles que :

- la **paralysie périodique hypokaliémique** est un désordre musculaire, d'origine génétique, transmis de façon autosomique dominant. Cette paralysie résulte de mutations du gène *SCN4A* codant pour un canal sodique musculaire dépendant du potentiel,  $\text{Na}_v1.4$ . De nombreuses mutations du canal  $\text{Na}_v1.4$  (R672G, R672H, R672S et R1132Q) entraînent un décalage de la dépendance au potentiel vers les potentiels positifs à l'origine d'une perte de fonction (Bendahhou *et coll.*, 2001; Carle *et coll.*, 2006; Kuzmenkin *et coll.*, 2002). Des mutations du gène *SCN4A* sont également responsables de la **paralysie périodique hyperkaliémique**. Ces mutations provoquent un gain de fonction du canal  $\text{Na}_v1.4$  (Rojas *et coll.*, 1999).

- la **migraine hémiplegique familiale** est une variété rare de migraine avec aura résultant de mutations du gène *CACNA1A* codant pour la sous-unité  $\alpha$  d'un canal calcique neuronal dépendant du potentiel, le canal  $\text{Ca}_v2.1$ . Une des mutations de ce canal à l'origine de cette maladie est la mutation S218L. Cette mutation stabilise le canal  $\text{Ca}_v2.1$  à l'état ouvert, aux potentiels où le canal sauvage est fermé (Tottene *et coll.*, 2005).

## **Sensibilité de hERG vis-à-vis des molécules pharmacologiques**

Le syndrome du QT long acquis est principalement d'origine médicamenteuse. Le nombre de molécules pharmacologiques à visée cardiaque ou non cardiaque induisant le syndrome du QT long acquis est en constante augmentation. A l'heure actuelle, plus de 70 molécules ont été répertoriées (*d'après <http://www.qtsyndrome.ch>, 2008*). Les effets secondaires indésirables de ces molécules ont conduit à étudier **les mécanismes moléculaires à l'origine de la sensibilité de hERG vis-à-vis des molécules pharmacologiques** mais également à **développer des méthodes d'analyses à haut débit pour évaluer leurs risques pro-arythmiques**.

### **Rôle du processus d'activation dans la sensibilité de hERG aux agents pharmacologiques**

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de hERG par les agents pharmacologiques (Mitcheson *et coll.*, 2000a; Tristani-Firouzi *et coll.*, 2001). Ces études suggèrent que la fermeture de la porte d'activation piège les agents pharmacologiques dans le pore du canal prolongeant son effet inhibiteur. Nous avons mis au point une chimère entre le canal hERG et un canal indépendant du potentiel pour s'affranchir de la fermeture de la porte d'activation. Nos résultats montrent que **l'effet de 5 inhibiteurs de hERG n'est pas affecté par le blocage de la porte d'activation en configuration ouverte**, suggérant que les bloqueurs de hERG ne sont pas piégés dans le pore par la fermeture de la porte d'activation. Ceci révèle que d'autres mécanismes que le processus d'activation sont impliqués dans la sensibilité de hERG. Il a été montré que la mutation d'acides aminés du pore (figure 22, page 98) entraînait une diminution de l'effet inhibiteur des molécules pharmacologiques. Actuellement, les études tentent de déterminer quels acides aminés du pore permettent la fixation des molécules pharmacologiques, postulant que leurs effets inhibiteurs sont essentiellement dus à l'obturation du pore. Cependant, il a été montré **qu'une proportion importante d'inhibiteurs de hERG peuvent avoir des effets sur l'expression du canal hERG à la surface cellulaire**, facteur compliquant l'étude des mécanismes moléculaires à l'origine de sa sensibilité aux agents pharmacologiques. En effet, Wible et ses collaborateurs ont évalué l'effet de 50 bloqueurs de hERG sur son expression à la surface cellulaire (Wible *et coll.*, 2005). Les auteurs révèlent que 20 de ces 50 bloqueurs de hERG affectent son trafic à la membrane plasmique (exemple : l'amiodarone). Un des mécanismes entraînant la modification de l'expression de hERG à la membrane serait une perte d'association entre le canal hERG et une protéine chaperonne, la Hsp 90 (Ficker *et coll.*, 2003).

A l'heure actuelle, l'étude de l'innocuité des molécules pharmacologiques en développement sur l'activité de hERG est réalisée par la technique de patch-clamp. Cependant, cette technique ne prend pas en compte les effets de ces molécules sur l'expression de hERG à la surface cellulaire. Pour cette raison, d'autres techniques d'analyses sont développées afin d'évaluer les risques pro-arythmiques des agents pharmacologiques.

#### Méthodes d'analyses des effets pro-arythmiques des molécules pharmacologiques

Une des techniques utilisées est la mesure de l'efflux de rubidium. Cette technique consiste à incuber des cellules exprimant le canal hERG en présence de rubidium afin que celui-ci se substitue au potassium intracellulaire. L'effet des agents pharmacologiques est ensuite évalué sur l'efflux de rubidium en **dépolarisant la membrane des cellules exprimant le canal hERG à l'aide d'une concentration en potassium extracellulaire supérieure à 50 mM**. La dépolarisation de la membrane va alors activer le canal hERG permettant l'efflux de rubidium. Cet efflux est quantifié en mesurant la concentration de rubidium présent dans le milieu extracellulaire par spectrométrie d'absorption atomique.

Contrairement à la technique de patch-clamp, l'efflux de rubidium va prendre en compte les effets de molécules pharmacologiques sur l'expression de hERG à la surface cellulaire, comme décrit dans le paragraphe précédent. En revanche, sa sensibilité pour mesurer l'effet des molécules pharmacologiques s'est révélée être inférieure à la méthode de patch-clamp (Rezazadeh *et coll.*, 2004). En effet, la valeur d'IC<sub>50</sub> de différents bloqueurs de hERG, obtenue en efflux de rubidium, est nettement supérieure à celle obtenue par la technique de patch-clamp. Par exemple, la valeur d'IC<sub>50</sub> du cisapride est augmentée d'un facteur 28 (Sorota *et coll.*, 2005), celle de l'E-4031, d'un facteur 8 (Cheng *et coll.*, 2002).

Cette perte de sensibilité est principalement due à la forte concentration en potassium extracellulaire (supérieur à 50 mM) utilisée pour dépolariser la membrane et activer le canal hERG dans l'efflux de rubidium. Plusieurs études, y compris la nôtre, montrent que l'élévation de la concentration de potassium extracellulaire entraîne une augmentation de la conductance unitaire du canal hERG mais aussi un décalage de la dépendance au potentiel de l'inactivation vers les potentiels positifs (Wang *et coll.*, 1997b; Yang *et coll.*, 1997). La chimère, étant ouverte en permanence, permettrait de s'affranchir de l'augmentation de la concentration en potassium extracellulaire nécessaire à l'activation du canal hERG dans la technique d'efflux de rubidium. Ces efflux pourraient être effectués dans des conditions physiologiques (4 mM de potassium extracellulaire). Pour vérifier cette hypothèse, la valeur d'IC<sub>50</sub> de différentes molécules pharmacologiques telles que l'E-4031, l'astémizole ou la cisapride devra être déterminée en efflux de rubidium dans la chimère.

Des résultats préliminaires révèlent que les efflux de rubidium dans la chimère, avec 5 mM de potassium extracellulaire, sont augmentés seulement d'un facteur 2 par rapport au canal hERG sauvage. Ces résultats suggèrent que le blocage de la porte d'activation en configuration ouverte n'est pas suffisant pour améliorer la technique d'efflux de rubidium. Dans un premier temps, l'efflux de rubidium devra être amélioré dans la chimère. Un moyen d'améliorer cet efflux dans la chimère serait de s'affranchir de l'inactivation, processus limitant le passage du rubidium à travers le pore du canal. Cependant, de nombreuses études ont montré que des mutations réduisant ou supprimant l'inactivation entraînaient une réduction de la sensibilité de hERG vis-à-vis des molécules pharmacologiques (McPate *et coll.*, 2008; Numaguchi *et coll.*, 2000). Par exemple, la mutation S631A, affectant l'inactivation, réduit la sensibilité de hERG à l'amiodarone d'un facteur 19 et au disopyramide d'un facteur 7 (McPate *et coll.*, 2008).

En résumé, mes projets de thèse décrits dans ce manuscrit, présentent un intérêt **fondamental** en précisant la **nature du couplage** entre :

- l'activation et l'inactivation chez hERG.
- la boucle S4-S5 et le domaine S6, régions impliquées dans la dépendance au potentiel des canaux.

Mais également un **intérêt appliqué** avec le développement :

- **d'un outil pharmacologique, la chimère**, pour déterminer le mécanisme d'action des inhibiteurs de hERG à l'origine du syndrome du QT long acquis.
- **d'une nouvelle voie thérapeutique potentielle, des peptides inhibiteurs et activateurs spécifiques d'un canal**, pour corriger les effets de mutations de canaux dépendant du potentiel à l'origine de nombreuses canalopathies graves.

Les études décrites dans cette thèse, associées à nos résultats, laissent supposer que **l'activation dépendante du potentiel et le couplage activation/inactivation pourraient résulter de mécanismes distincts en fonction du canal**. Des arguments (page 60-61) suggèrent que le mécanisme de dépendance au potentiel de KCNQ1, mis en évidence dans notre étude, peut être commun à plusieurs canaux (hERG, HCN, KAT1). D'autres études devront être menées pour déterminer si la dépendance au potentiel résulte de différents mécanismes selon les canaux ou d'un seul et même mécanisme. De façon similaire, la nature du couplage activation/inactivation reste à préciser.

## REFERENCES

1. Accili, E. A., Robinson, R. B., and DiFrancesco, D. (1997) Properties and modulation of If in newborn versus adult cardiac SA node. *Am J Physiol* **272**, H1549-H1552.
2. Aggarwal, S. K. and MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **16**, 1169-1177.
3. Ahern, C. A. and Horn, R. (2004) Stirring up controversy with a voltage sensor paddle. *Trends Neurosci* **27**, 303-307.
4. Alexandrou, A. J., Duncan, R. S., Sullivan, A., Hancox, J. C., Leishman, D. J., Witchel, H. J., and Leaney, J. L. (2006) Mechanism of hERG K<sup>+</sup> channel blockade by the fluoroquinolone antibiotic moxifloxacin. *Br J Pharmacol* **147**, 905-916.
5. Barghaan, J. and Bähring, R. (2009) Dynamic coupling of voltage sensor and gate involved in closed-state inactivation of kv4.2 channels. *J Gen Physiol* **133**, 205-224.
6. Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996) K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**, 78-80.
7. Baukrowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitze, S., Krauter, T., Tucker, S. J., Ruppersberg, J. P., and Fakler, B. (1998) PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* **282**, 1141-1144.
8. Bellocq, C., Wilders, R., Schott, J. J., Louerat-Oriou, B., Boisseau, P., Le Marec, H., Escande, D., and Baro, I. (2004a) A common antitussive drug, clobutinol, precipitates the long QT syndrome 2. *Mol Pharmacol* **66**, 1093-1102.
9. Bellocq, C., van Ginneken, A. C., Bezzina, C. R., Alders, M., Escande, D., Mannens, M. M., Baro, I., and Wilde, A. A. (2004b) Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* **109**, 2394-2397.
10. Bendahhou, S., Cummins, T. R., Griggs, R. C., Fu, Y. H., and Ptacek, L. J. (2001) Sodium channel inactivation defects are associated with acetazolamide-exacerbated hypokalemic periodic paralysis. *Ann Neurol* **50**, 417-420.
11. Boulet, I. R., Labro, A. J., Raes, A. L., and Snyders, D. J. (2007) Role of the S6 C-terminus in KCNQ1 channel gating. *J Physiol* **585**, 325-337.
12. Carle, T., Lhuillier, L., Luce, S., Sternberg, D., Devuyst, O., Fontaine, B., and Tabti, N. (2006) Gating defects of a novel Na<sup>+</sup> channel mutant causing hypokalemic periodic paralysis. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 653-661.
13. Chanda, B., Asamoah, O. K., Blunck, R., Roux, B., and Bezanilla, F. (2005) Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* **436**, 852-856.

14. Chen, J., Mitcheson, J. S., Tristani-Firouzi, M., Lin, M., and Sanguinetti, M. C. (2001) The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11277-11282.
15. Chen, Y. H., Xu, S. J., Bendahhou, S., Wang, X. L., Wang, Y., Xu, W. Y., Jin, H. W., Sun, H., Su, X. Y., Zhuang, Q. N., Yang, Y. Q., Li, Y. B., Liu, Y., Xu, H. J., Li, X. F., Ma, N., Mou, C. P., Chen, Z., Barhanin, J., and Huang, W. (2003) KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* **299**, 251-254.
16. Cheng, C. S., Alderman, D., Kwash, J., Dessaint, J., Patel, R., Lescoe, M. K., Kinrade, M. B., and Yu, W. (2002) A high-throughput HERG potassium channel function assay: an old assay with a new look. *Drug Dev Ind Pharm* **28**, 177-191.
17. Chevalier, P., Rodriguez, C., Bontemps, L., Miquel, M., Kirkorian, G., Rousson, R., Potet, F., Schott, J. J., Baro, I., and Touboul, P. (2001) Non-invasive testing of acquired long QT syndrome: evidence for multiple arrhythmogenic substrates. *Cardiovasc Res* **50**, 386-398.
18. Choi, K. L., Aldrich, R. W., and Yellen, G. (1991) Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5092-5095.
19. Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1997) Properties of KvLQT1 K<sup>+</sup> channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* **16**, 5472-5479.
20. Clancy, C. E. and Rudy, Y. (2001) Cellular consequences of HERG mutations in the long QT syndrome: precursors to sudden cardiac death. *Cardiovasc Res* **50**, 301-313.
21. del Camino, D., Holmgren, M., Liu, Y., and Yellen, G. (2000) Blocker protection in the pore of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel and its structural implications. *Nature* **403**, 321-325.
22. del Camino, D. and Yellen, G. (2001) Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron* **32**, 649-656.
23. Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
24. Dumaine, R., Roy, M. L., and Brown, A. M. (1998) Blockade of HERG and Kv1.5 by ketoconazole. *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 727-735.
25. Duncan, R. S., McPate, M. J., Ridley, J. M., Gao, Z., James, A. F., Leishman, D. J., Leaney, J. L., Witchel, H. J., and Hancox, J. C. (2007) Inhibition of the HERG potassium channel by the tricyclic antidepressant doxepin. *Biochem Pharmacol* **74**, 425-437.
26. Escande, D. (2000) Pharmacogenetics of cardiac K(+) channels. *Eur J Pharmacol* **410**, 281-287.

27. Fan, J. S., Jiang, M., Dun, W., McDonald, T. V., and Tseng, G. N. (1999) Effects of outer mouth mutations on hERG channel function: a comparison with similar mutations in the Shaker channel. *Biophys J* **76**, 3128-3140.
28. Ferrer, T., Rupp, J., Piper, D. R., and Tristani-Firouzi, M. (2006) The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **281**, 12858-12864.
29. Ficker, E., Dennis, A. T., Wang, L., and Brown, A. M. (2003) Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. *Circ Res* **92**, e87-100.
30. Gilchrist, A., Li, A., and Hamm, H. E. (2002) G alpha COOH-terminal minigene vectors dissect heterotrimeric G protein signaling. *Sci STKE* **2002**, L1.
31. Glauner, K. S., Mannuzzu, L. M., Gandhi, C. S., and Isacoff, E. Y. (1999) Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* **402**, 813-817.
32. Goldenberg, I. and Moss, A. J. (2008) Long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* **51**, 2291-2300.
33. Gonzalez, C., Rosenman, E., Bezanilla, F., Alvarez, O., and Latorre, R. (2000) Modulation of the Shaker K(+) channel gating kinetics by the S3-S4 linker. *J Gen Physiol* **115**, 193-208.
34. Grabe, M., Lai, H. C., Jain, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2007) Structure prediction for the down state of a potassium channel voltage sensor. *Nature* **445**, 550-553.
35. Gulbis, J. M., Zhou, M., Mann, S., and MacKinnon, R. (2000) Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Science* **289**, 123-127.
36. Hill, A. P. and Vandenberg, J. I. Investigating the origin of the voltage-sensitivity of inactivation in hERG potassium channels. 2008 Biophysical Society Meetings Abstracts. Biophysical journal, Abstract 94[1342-pos]. 2008.
37. Hong, K., Piper, D. R., Diaz-Valdecantos, A., Brugada, J., Oliva, A., Burashnikov, E., Santos-de-Soto, J., Grueso-Montero, J., Diaz-Enfante, E., Brugada, P., Sachse, F., Sanguinetti, M. C., and Brugada, R. (2005) De novo KCNQ1 mutation responsible for atrial fibrillation and short QT syndrome in utero. *Cardiovasc Res* **68**, 433-440.
38. Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1991) Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**, 547-556.
39. Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1992) Tracing the roots of ion channels. *Cell* **69**, 715-718.
40. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* **423**, 33-41.
41. Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R. (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* **423**, 42-48.

42. Ju, P., Pages, G., Riek, R. P., Chen, P. C., Torres, A. M., Bansal, P. S., Kuyucak, S., Kuchel, P. W., and Vandenberg, J. I. (2009) The pore domain outer helix contributes to both activation and inactivation of the HERG K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **284**, 1000-1008.
43. Kiehn, J., Lacerda, A. E., and Brown, A. M. (1999) Pathways of HERG inactivation. *Am J Physiol* **277**, H199-H210.
44. Kikuchi, K., Nagatomo, T., Abe, H., Kawakami, K., Duff, H. J., Makielski, J. C., January, C. T., and Nakashima, Y. (2005) Blockade of HERG cardiac K<sup>+</sup> current by antifungal drug miconazole. *Br J Pharmacol* **144**, 840-848.
45. Korolkova, Y. V., Tseng, G. N., and Grishin, E. V. (2004) Unique interaction of scorpion toxins with the hERG channel. *J Mol Recognit* **17**, 209-217.
46. Kramer, C., Beck, B., Kriegel, J. M., and Clark, T. (2008) A composite model for HERG blockade. *ChemMedChem* **3**, 254-265.
47. Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A. (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* **300**, 1922-1926.
48. Kurata, H. T. and Fedida, D. (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* **92**, 185-208.
49. Kuzmenkin, A., Muncan, V., Jurkat-Rott, K., Hang, C., Lerche, H., Lehmann-Horn, F., and Mitrovic, N. (2002) Enhanced inactivation and pH sensitivity of Na<sup>(+)</sup> channel mutations causing hypokalaemic periodic paralysis type II. *Brain* **125**, 835-843.
50. Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S., and Isacoff, E. Y. (1996) Transmembrane movement of the shaker K<sup>+</sup> channel S4. *Neuron* **16**, 387-397.
51. Larsson, H. P. and Elinder, F. (2000) A conserved glutamate is important for slow inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **27**, 573-583.
52. Le Maout, S., Welling, P. A., Brejon, M., Olsen, O., and Merot, J. (2001) Basolateral membrane expression of a K<sup>+</sup> channel, Kir 2.3, is directed by a cytoplasmic COOH-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10475-10480.
53. Lin, P., Luby-Phelps, K., and Stull, J. T. (1999) Properties of filament-bound myosin light chain kinase. *J Biol Chem* **274**, 5987-5994.
54. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005a) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* **309**, 897-903.
55. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005b) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**, 903-908.
56. Loots, E. and Isacoff, E. Y. (2000) Molecular coupling of S4 to a K<sup>(+)</sup> channel's slow inactivation gate. *J Gen Physiol* **116**, 623-636.

57. Loussouarn, G., Baro, I., and Escande, D. (2006) KCNQ1 K<sup>+</sup> channel-mediated cardiac channelopathies. *Methods Mol Biol* **337**, 167-183.
58. Loussouarn, G., Park, K. H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F., and Escande, D. (2003) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP<sub>2</sub>, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *EMBO J* **22**, 5412-5421.
59. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* **413**, 809-813.
60. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol* **120**, 663-676.
61. Mathur, R., Zheng, J., Yan, Y., and Sigworth, F. J. (1997) Role of the S3-S4 linker in Shaker potassium channel activation. *J Gen Physiol* **109**, 191-199.
62. McPate, M. J., Duncan, R. S., Hancox, J. C., and Witchel, H. J. (2008) Pharmacology of the short QT syndrome N588K-hERG K<sup>+</sup> channel mutation: differential impact on selected class I and class III antiarrhythmic drugs. *Br J Pharmacol* **155**, 957-966.
63. Milnes, J. T., Dempsey, C. E., Ridley, J. M., Crociani, O., Arcangeli, A., Hancox, J. C., and Witchel, H. J. (2003a) Preferential closed channel blockade of HERG potassium currents by chemically synthesised BeKm-1 scorpion toxin. *FEBS Lett* **547**, 20-26.
64. Milnes, J. T., Crociani, O., Arcangeli, A., Hancox, J. C., and Witchel, H. J. (2003b) Blockade of HERG potassium currents by fluvoxamine: incomplete attenuation by S6 mutations at F656 or Y652. *Br J Pharmacol* **139**, 887-898.
65. Mitcheson, J. S., Chen, J., and Sanguinetti, M. C. (2000a) Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol* **115**, 229-240.
66. Mitcheson, J. S., Chen, J., Lin, M., Culberson, C., and Sanguinetti, M. C. (2000b) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12329-12333.
67. Moss, A. J., Zareba, W., Hall, W. J., Schwartz, P. J., Crampton, R. S., Benhorin, J., Vincent, G. M., Locati, E. H., Priori, S. G., Napolitano, C., Medina, A., Zhang, L., Robinson, J. L., Timothy, K., Towbin, J. A., and Andrews, M. L. (2000) Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **101**, 616-623.
68. Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., and Guicheney, P. (1997) A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat Genet* **15**, 186-189.
69. Numaguchi, H., Mullins, F. M., Johnson, J. P., Jr., Johns, D. C., Po, S. S., Yang, I. C., Tomaselli, G. F., and Balser, J. R. (2000) Probing the interaction between inactivation gating and Dd-sotalol block of HERG. *Circ Res* **87**, 1012-1018.

- 
70. Panyi, G. and Deutsch, C. (2006) Cross talk between activation and slow inactivation gates of Shaker potassium channels. *J Gen Physiol* **128**, 547-559.
  71. Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**, 305-310.
  72. Park, K. H., Piron, J., Dahimene, S., Merot, J., Baro, I., Escande, D., and Loussouarn, G. (2005) Impaired KCNQ1-KCNE1 and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate interaction underlies the long QT syndrome. *Circ Res* **96**, 730-739.
  73. Pathak, M. M., Yarov-Yarovoy, V., Agarwal, G., Roux, B., Barth, P., Kohout, S., Tombola, F., and Isacoff, E. Y. (2007) Closing in on the resting state of the Shaker K(+) channel. *Neuron* **56**, 124-140.
  74. Perozo, E. (2002) New structural perspectives on K(+) channel gating. *Structure* **10**, 1027-1029.
  75. Perrin, M. J., Kuchel, P. W., Campbell, T. J., and Vandenberg, J. I. (2008) Drug binding to the inactivated state is necessary but not sufficient for high-affinity binding to human ether-a-go-go-related gene channels. *Mol Pharmacol* **74**, 1443-1452.
  76. Phillips, L. R., Milescu, M., Li-Smerin, Y., Mindell, J. A., Kim, J. I., and Swartz, K. J. (2005) Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo. *Nature* **436**, 857-860.
  77. Piper, D. R., Hinz, W. A., Tallurri, C. K., Sanguinetti, M. C., and Tristani-Firouzi, M. (2005) Regional specificity of human ether-a'-go-go-related gene channel activation and inactivation gating. *J Biol Chem* **280**, 7206-7217.
  78. Piper, D. R., Varghese, A., Sanguinetti, M. C., and Tristani-Firouzi, M. (2003) Gating currents associated with intramembrane charge displacement in HERG potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10534-10539.
  79. Prole, D. L. and Yellen, G. (2006) Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J Gen Physiol* **128**, 273-282.
  80. Ranganathan, R., Lewis, J. H., and MacKinnon, R. (1996) Spatial localization of the K<sup>+</sup> channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* **16**, 131-139.
  81. Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Castellino, R. C., Zhang, Y., Campbell, D. L., and Strauss, H. C. (1995) C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K<sup>+</sup> channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **489** (Pt 3), 709-721.
  82. Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D. L., Brahmajothi, M. V., and Strauss, H. C. (1998) Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* **82**, 739-750.

83. Rex, T. S., Peet, J. A., Surace, E. M., Calvert, P. D., Nikonov, S. S., Lyubarsky, A. L., Bendo, E., Hughes, T., Pugh, E. N., Jr., and Bennett, J. (2005) The distribution, concentration, and toxicity of enhanced green fluorescent protein in retinal cells after genomic or somatic (virus-mediated) gene transfer. *Mol Vis* **11**, 1236-1245.
84. Rezazadeh, S., Hesketh, J. C., and Fedida, D. (2004) Rb<sup>+</sup> flux through hERG channels affects the potency of channel blocking drugs: correlation with data obtained using a high-throughput Rb<sup>+</sup> efflux assay. *J Biomol Screen* **9**, 588-597.
85. Ridley, J. M., Milnes, J. T., Duncan, R. S., McPate, M. J., James, A. F., Witchel, H. J., and Hancox, J. C. (2006) Inhibition of the HERG K<sup>+</sup> channel by the antifungal drug ketoconazole depends on channel gating and involves the S6 residue F656. *FEBS Lett* **580**, 1999-2005.
86. Rojas, C. V., Neely, A., Velasco-Loyden, G., Palma, V., and Kukuljan, M. (1999) Hyperkalemic periodic paralysis M1592V mutation modifies activation in human skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol* **276**, C259-C266.
87. Rothberg, B. S., Shin, K. S., and Yellen, G. (2003) Movements near the gate of a hyperpolarization-activated cation channel. *J Gen Physiol* **122**, 501-510.
88. Sanguinetti, M. C., Chen, J., Fernandez, D., Kamiya, K., Mitcheson, J., and Sanchez-Chapula, J. A. (2005) Physicochemical basis for binding and voltage-dependent block of hERG channels by structurally diverse drugs. *Novartis Found Symp* **266**, 159-166.
89. Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L., and Keating, M. T. (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**, 80-83.
90. Sanguinetti, M. C. and Jurkiewicz, N. K. (1990) Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* **96**, 195-215.
91. Sanguinetti, M. C. and Tristani-Firouzi, M. (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* **440**, 463-469.
92. Sanguinetti, M. C. and Xu, Q. P. (1999) Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **514** (Pt 3), 667-675.
93. Shin, K. S., Maertens, C., Proenza, C., Rothberg, B. S., and Yellen, G. (2004) Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage. *Neuron* **41**, 737-744.
94. Silva, J. and Rudy, Y. (2005) Subunit interaction determines IKs participation in cardiac repolarization and repolarization reserve. *Circulation* **112**, 1384-1391.
95. Smith, P. L., Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1996) The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* **379**, 833-836.

96. Smith, P. L. and Yellen, G. (2002) Fast and slow voltage sensor movements in HERG potassium channels. *J Gen Physiol* **119**, 275-293.
97. Smits, J. P., Koopmann, T. T., Wilders, R., Veldkamp, M. W., Ophhof, T., Bhuiyan, Z. A., Mannens, M. M., Balser, J. R., Tan, H. L., Bezzina, C. R., and Wilde, A. A. (2005) A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 969-981.
98. Snyders, D. J. and Chaudhary, A. (1996) High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol Pharmacol* **49**, 949-955.
99. Soler-Llavina, G. J., Chang, T. H., and Swartz, K. J. (2006) Functional Interactions at the Interface between Voltage-Sensing and Pore Domains in the Shaker K(v) Channel. *Neuron* **52**, 623-634.
100. Sorensen, J. B., Cha, A., Latorre, R., Rosenman, E., and Bezanilla, F. (2000) Deletion of the S3-S4 linker in the Shaker potassium channel reveals two quenching groups near the outside of S4. *J Gen Physiol* **115**, 209-222.
101. Sorota, S., Zhang, X. S., Margulis, M., Tucker, K., and Priestley, T. (2005) Characterization of a hERG screen using the IonWorks HT: comparison to a hERG rubidium efflux screen. *Assay Drug Dev Technol* **3**, 47-57.
102. Spector, P. S., Curran, M. E., Zou, A., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1996a) Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen Physiol* **107**, 611-619.
103. Spector, P. S., Curran, M. E., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1996b) Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* **78**, 499-503.
104. Tan, H. L., Bink-Boelkens, M. T., Bezzina, C. R., Viswanathan, P. C., Beaufort-Krol, G. C., van Tintelen, P. J., van den Berg, M. P., Wilde, A. A., and Balser, J. R. (2001) A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* **409**, 1043-1047.
105. Tang, C. Y. and Papazian, D. M. (1997) Transfer of voltage independence from a rat olfactory channel to the Drosophila ether-a-go-go K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* **109**, 301-311.
106. Tombola, F., Pathak, M. M., and Isacoff, E. Y. (2005) How far will you go to sense voltage? *Neuron* **48**, 719-725.
107. Tombola, F., Pathak, M. M., and Isacoff, E. Y. (2006) How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 23-52.
108. Tottene, A., Pivotto, F., Fellin, T., Cesetti, T., van den Maagdenberg, A. M., and Pietrobon, D. (2005) Specific kinetic alterations of human CaV2.1 calcium channels produced by mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma. *J Biol Chem* **280**, 17678-17686.

109. Tristani-Firouzi, M., Chen, J., Mitcheson, J. S., and Sanguinetti, M. C. (2001) Molecular biology of K(+) channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med* **110**, 50-59.
110. Tristani-Firouzi, M., Chen, J., and Sanguinetti, M. C. (2002) Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* **277**, 18994-19000.
111. Wang, Q., Curran, M. E., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., de Jager, T., Schwartz, P. J., Toubin, J. A., Moss, A. J., Atkinson, D. L., Landes, G. M., Connors, T. D., and Keating, M. T. (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* **12**, 17-23.
112. Wang, S., Morales, M. J., Liu, S., Strauss, H. C., and Rasmusson, R. L. (1997a) Modulation of HERG affinity for E-4031 by [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> and C-type inactivation. *FEBS Lett* **417**, 43-47.
113. Wang, S., Liu, S., Morales, M. J., Strauss, H. C., and Rasmusson, R. L. (1997b) A quantitative analysis of the activation and inactivation kinetics of HERG expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **502** (Pt 1), 45-60.
114. Wang, W., Xia, J., and Kass, R. S. (1998) MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled IsK channel. *J Biol Chem* **273**, 34069-34074.
115. Wang, Z., Fermini, B., and Nattel, S. (1994) Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* **28**, 1540-1546.
116. Wei, A., Jegla, T., and Salkoff, L. (1996) Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**, 805-829.
117. Wible, B. A., Hawryluk, P., Ficker, E., Kuryshev, Y. A., Kirsch, G., and Brown, A. M. (2005) HERG-Lite: a novel comprehensive high-throughput screen for drug-induced hERG risk. *J Pharmacol Toxicol Methods* **52**, 136-145.
118. Yang, T., Snyders, D. J., and Roden, D. M. (1997) Rapid inactivation determines the rectification and [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> dependence of the rapid component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cardiac cells. *Circ Res* **80**, 782-789.
119. Yao, J. A., Du, X., Lu, D., Baker, R. L., Daharsh, E., and Atterson, P. (2005) Estimation of potency of HERG channel blockers: impact of voltage protocol and temperature. *J Pharmacol Toxicol Methods* **52**, 146-153.
120. Yarov-Yarovoy, V., Baker, D., and Catterall, W. A. (2006) Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7292-7297.
121. Zhang, M., Liu, J., and Tseng, G. N. (2004) Gating charges in the activation and inactivation processes of the HERG channel. *J Gen Physiol* **124**, 703-718.

122. Zimmer, T. and Surber, R. (2008) SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* **98**, 120-136.
123. Zou, A., Xu, Q. P., and Sanguinetti, M. C. (1998) A mutation in the pore region of HERG K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes reduces rectification by shifting the voltage dependence of inactivation. *J Physiol* **509 (Pt 1)**, 129-137.

# ANNEXES

*J Physiol* 586.7 (2008) pp 1785–1789

## SYMPOSIUM REPORT

### Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies

David Peroz<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Rodriguez<sup>1,2,3</sup>, Frank Choveau<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Baró<sup>1,2,3</sup>, Jean Mérot<sup>1,2,3</sup> and Gildas Loussouarn<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U915, Nantes, F-44000, France

<sup>2</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000, France

<sup>3</sup>CNRS, ERL-3147, F-44000, France

KCNQ1 is the pore-forming subunit of a channel complex whose expression and function have been rather well characterized in the heart. Almost 300 mutations of KCNQ1 have been identified in patients and a vast majority of the described mutations are linked to the long QT syndrome. Only a few mutations are linked to other pathologies such as atrial fibrillation and the short QT syndrome. However, a considerable amount of work remains to be done to get a clear picture of the molecular mechanisms responsible for the pathogenesis related to each mutation. The present review gives three examples of recent studies towards this goal and illustrates the diversity of the molecular mechanisms involved.

Biophysics of Ion Channels and Diseases, 2009: 13–39 ISBN: 978-81-7895-390-8  
Editor: H. Duclohier

## 2

### Molecular description of KCNE1/KCNQ1 cardiopathies

Céline S Nicolas, Julien Piron, Nicolas Rodriguez, Frank Choveau  
Shehrazade Dahimène\*, David Péroz, Jean Mérot, Isabelle Baró  
and Gildas Loussouarn

INSERM, UMR915, Nantes, F-44035, France; CNRS, ERL3147  
Nantes F-44035, France; Université de Nantes, Faculté de Médecine  
l'institut du thorax, Nantes, F-44035, France

#### ABSTRACT

*In the heart, KCNQ1 generates the slow component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current, I<sub>Ks</sub>. Since KCNQ1 and its cardiac regulatory protein KCNE1 have been cloned, around 300 pathological mutations were identified on KCNQ1, and more than 20 in KCNE1. The majority of these mutations are loss-of-function mutations, associated to the Long QT syndrome (LQTS), but recently, some gain-of-function mutations have been linked to other cardiopathies: atrial fibrillation (AF), short QT syndrome (SQTS) and the list of pathological mutations is still growing.*

*This chapter reviews what pathological (and sometimes artificial) mutations brought to the knowledge of structure-function relationship. We illustrate the variety of functional effects throughout this chapter, as a demonstration of the complexity of ion channel macrostructures. We also show that the level of understanding of the mechanism underlying each mutation effect is very variable: in some cases it is limited to the absence/decrease of the I<sub>Ks</sub> current, most frequently the macroscopic mechanism (assembly, trafficking, gating...) is delineated, but in recent studies molecular events are more detailed (PIP<sub>2</sub> regulation, assembly domain interaction...)*

**KCNE1-KCNQ1 osmoregulation by phosphatidylinositol-4,5-  
bisphosphate and polycations interaction.**

Julien Piron<sup>1-3,§</sup>, Frank S Choveau<sup>1-3</sup>, Nicolas Rodriguez<sup>1-3</sup>, Flavien Charpentier<sup>1-4</sup>,  
Jean Mérot<sup>1-3</sup>, Isabelle Baró<sup>1-3</sup>, Gildas Loussouarn<sup>1-3</sup>

1 INSERM, UMR 915, l'institut du thorax, Nantes, France;

2 CNRS, ERL 3147, Nantes, France;

3 Université de Nantes, UFR de Médecine, Nantes, France;

4 CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France.

**Running title:** mechanism of KCNE1-KCNQ1 osmoregulation

§ Present address: Julien Piron, INSERM UMRS U930, CNRS FRE2448, CHRU  
Bretonneau, 2 boulevard Tonnellé, 37044 Tours, France

---

**En préparation**

## **Couplages moléculaires à l'origine de la dépendance au potentiel des canaux KCNQ1 et hERG**

Le syndrome du QT long est une anomalie de la repolarisation cardiaque provoquant des troubles du rythme et parfois la mort subite. Il existe sous 2 formes : congénitale et acquise.

La forme congénitale est le plus souvent due à une dysfonction d'un canal potassique à 6 domaines transmembranaires dépendant du potentiel : KCNQ1. Actuellement, les mécanismes moléculaires régissant la sensibilité au potentiel de ce canal ne sont pas clairement identifiés. Nous montrons que la boucle S4-S5 est un ligand qui se fixe sur le domaine S6 stabilisant la fermeture du canal : des peptides mimant la boucle S4-S5 inhibent l'activité de KCNQ1. A l'opposé, ceux mimant le domaine S6 l'activent. L'activité accrue de KCNQ1 induite par les peptides S6 pourrait compenser la dysfonction du canal observée dans le syndrome du QT long et donc représenter une nouvelle thérapie.

L'inhibition du canal potassique hERG par de nombreux médicaments à visée non cardiaque peut induire la forme acquise du QT long. Cette inhibition serait favorisée par le piégeage de ces molécules dans le pore du canal suite à la fermeture de la porte d'activation. Nous avons bloqué la porte d'activation à l'état ouvert pour évaluer cette hypothèse. De plus, si l'activation et l'inactivation sont couplées, une inhibition réduite de hERG pourrait être due à l'inactivation et non pas l'activation. Nous montrons que (i) l'activation et l'inactivation sont deux processus distincts, et que (ii) la sensibilité de hERG n'est pas réduite par le blocage de la porte d'activation, infirmant l'hypothèse du piégeage.

**MOTS CLES:** KCNQ1, syndrome du QT long, peptides, hERG, molécules pharmacologiques.

## **Molecular coupling controlling the voltage-dependency of KCNQ1 and hERG.**

The long QT syndrome is a cardiac abnormality of cardiac leading to altered ventricular repolarization that can lead to arrhythmias, and sudden death. This syndrome exists in 2 forms: congenital and acquired.

The congenital form is mostly due to a dysfunction of the six-transmembrane-domain voltage-gated potassium channel: KCNQ1. Currently, the molecular mechanisms controlling the voltage-dependency of KCNQ1 are not clearly identified. We show that the S4-S5 linker acts as a ligand binding to the S6 and stabilizing the channel closed state: peptides mimicking the S4-S5 linker inhibit KCNQ1 whereas those mimicking the S6 domain increase upregulate KCNQ1 activity. This increase in KCNQ1 activity by S6 peptides could compensate for the channel dysfunction observed in the long QT syndrome and thus represent a new therapytherapeutic approach.

Off target inhibition of hERG potassium channel by many drugs can induce the acquired form of the long QT syndrome. This inhibition may be favored by the trapping of these molecules in the channel pore of the channel following the closure of the gate activation. To check this hypothesis, we blocked this gate in the open state. Moreover, if the activation and inactivation are coupled, a reduced inhibition of hERG may be due to inactivation rather than activation. We show that (i) activation and inactivation are not coupled, and that (ii) stabilizing of the activation gate is responsible for this inhibition.

**Keywords:** KCNQ1, the QT long syndrome, peptides, hERG, drugs.