
N° attribué par la bibliothèque

15

Présentée
et soutenue publiquement par

Directeur de thèse : Dr Gildas LOUSSOUARN

ED :
(Uniquement pour STIM et SPIGA)

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
REMERCIEMENTS	3
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION GENERALE	7
1- Rôles physiologique et physiopathologique des canaux KCNQ1 et Nav1.4.....	9
a) Le canal KCNQ1	9
b) Le canal Nav1.4	13
c) Importance de l'environnement lipidique.....	16
2- Structure modulaire des canaux ioniques voltage-dépendants	20
a) Le module VSD	20
b) Le module PD.....	23
c) Le cas des canaux Hv	26
3- Mécanismes de fonctionnement des modules VSD et PD	28
a) Mouvement du segment S4 et courant de porte	28
b) Ouverture de la porte d'activation	33
4- Couplage entre les modules VSD et PD	36
a) Médiation par la boucle S4-S5.....	36
b) Médiation par le PIP ₂	43
OBJECTIFS	49
RESULTATS.....	50
Projet 1 :.....	50
Etude des mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux potassiques voltage-dépendants par le PIP₂.....	50
Introduction.....	50
Résultats.....	52
Discussion	65
Conclusion.....	70
Projet 2 :.....	71
Etude des mécanismes de régulation du canal potassique cardiaque KCNQ1 par le potentiel membranaire	71
Introduction.....	71
Résultats	73
Discussion	84
Conclusion.....	87

Projet 3 :	88
Généralisation du modèle ligand-récepteur aux canaux sodiques eucaryote (Nav1.4) et procaryote (NavSp1)	88
Introduction.....	88
Matériel et Méthodes	89
Résultats	97
Discussion	105
Perspectives.....	106
Revue d'articles	109
DISCUSSION GENERALE	126
A- conclusion	126
1- Complexité de la régulation de la porte d'activation.....	126
2- Régulation des canaux ioniques par le PIP ₂	128
3- Régulation des canaux ioniques par le potentiel membranaire : de la biophysique à la thérapeutique ?	131
Enjeu fondamental	131
Enjeu thérapeutique	132
B- Perspectives	134
1- Rôle physiologique de l'interaction PIP ₂ -canaux ioniques.....	134
2- Controverses sur la nature de l'interaction entre B4-5 et TS6.....	136
3- Importance des approches structurales	138
BIBLIOGRAPHIE	145
ANNEXE1	163

REMERCIEMENTS

Les Travaux faisant l'objet de ce manuscrit ont été réalisés au sein de :

- l'institut du thorax (Nantes, France), plus précisément dans l'équipe 1 : « Cardiopathies et mort subite » dirigée par Dr Flavien Charpentier.
- Cardiovascular Research Institute (San Francisco, USA), dans le laboratoire du Pr Daniel L. Minor.

Ainsi, je voudrais tout d'abord remercier Flavien et Dan pour leurs excellents leaderships et pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Un grand merci en particulier, à Flavien pour ses conseils et à Dan pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire et d'y poursuivre mes activités de recherche dans le cadre d'un stage postdoctoral.

Mes remerciements s'adressent également aux Drs Alain Coulombe et Florian Lesage qui me font l'honneur de juger ce travail, ainsi qu'aux Drs Michel Roux et Gilles Guihard pour leur disponibilité et leurs précieux conseils prodigués tout au long de ce travail.

J'adresse ma profonde gratitude à mon directeur de thèse, Dr Gildas Loussouarn, pour son encadrement exemplaire, sa bonne humeur, ses brillantes idées, sa disponibilité, la passion pour la recherche qu'il m'a transmise, sa rigueur scientifique, ses très précieux conseils et son attention, tous m'ayant permis d'aboutir à ce travail et de vivre les trois meilleures années de ma vie universitaire. Tous les doctorants devraient avoir un directeur de thèse comme ça.

Gildas, j'espère sincèrement avoir l'occasion de travailler encore avec toi dans le futur.

Un grand merci à Gildas, sa femme Hélène et leurs enfants Quentin et Clara, pour leur accueil chaleureux pendant les premiers jours de mes aventures San-Franciscaines.

Mes années passées à l'institut du thorax ont été pour moi, très enrichissantes, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Par conséquent, je voudrais vivement remercier Dr Isabelle Baró de m'avoir accueilli dans son équipe dans le cadre de mon premier stage à l'institut du thorax il y a six ans car c'est grâce à ce premier stage découverte que j'ai développé ma passion pour la recherche. Aussi, je suis très reconnaissant pour ses conseils et son soutien. Isa, merci pour les moments conviviaux passés avec toi, ton mari Laurent et votre fils Dagim. Je vous adresse mes amitiés.

A tous les membres de l'équipe « Cardiopathies et mort subite », merci pour votre agréable compagnie pendant toutes ces années. Un grand merci particulièrement à Fabien Coyan, Dr Zeineb Es-Salah-Lamoureux, Béatrice Le Ray, Aurore Girardeau, Dr Céline Marionneau, Dr Jean Mérot, Marie-France Le Cunff, Dr Ludovic Martin, Martine Le Cunff, Anne Mychak, Isabelle Rivaud, Vimla Mayoura et Corinne Mandin. Merci Fabien pour la forte et agréable odeur matinale de café.

Je ne saurais oublier ici les personnes de UCSF qui m'ont aidé à bien m'intégrer dans la vie américaine lors de cette dernière année de thèse. J'adresse ma profonde reconnaissance à Kathleen Molnar, Dr Bettina Van Lengerich, Bruk Mensa, Brittany et Matthew Gullege, Shailika Redy Nurva, Dr Ahmed Rohaim, Dr Marco Lolicato, Dr Cristina Arrigoni Dr Hubing Lou et Dr Michelle McCully. I will miss you guys !

Un grand merci à Dr Christopher Kimberlin pour ses commentaires sur ce manuscrit, ainsi qu'à Dr Felix Findeisen et Dr David Shaya, tous membres du Minor Lab, pour leurs réponses à mes nombreuses questions en cristallographie.

Je remercie également tous les anciens et actuels membres de l'institut du thorax à Nantes et ceux du Minor Lab à San Francisco, qui, par leur bonne humeur, leur bon esprit d'équipe et leur humanisme, m'ont permis de travailler dans une ambiance très agréable. Vives les « 48h de l'unité » et les « bureaux de l'avant » à Nantes ainsi que les « happy hour » et les « guitar lunch » à San Francisco!

Ce manuscrit est le fruit d'une collaboration étroite avec des chercheurs extérieurs à mes laboratoires d'accueil et à qui j'adresse mes sincères remerciements. Je pense particulièrement aux Drs Alain Labro (Anvers, Belgique), Thierry Rose (Paris) et Mounir Tarek (Nancy).

Enfin, je dédie ce mémoire à mes amis et aux membres de mes familles (aux Comores, en France et aux Etats-Unis) qui m'ont soutenu dans la réalisation de cette thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement Isabelle et Gérald ainsi que mes parents, pour leurs soutien et encouragements permanents pendant mes huit fascinantes années universitaires.

A ma compagne Yousra pour son soutien permanent et sa tendresse.

Cette thèse a été financée par l'état français dont je suis reconnaissant. Merci également au programme américain Fulbright et à la Fondation Monahan pour le financement de mon séjour de recherche aux Etats-Unis.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Activité électrique membranaire.....	7
Figure 2 : Les différents états d'un canal voltage-dépendant.....	8
Figure 3 : Structure schématique du complexe KCNQ1-KCNE1.....	9
Figure 4 : Modulation de la voltage-dépendance du canal KCNQ1 par le PIP ₂	10
Figure 5 : Potentiel d'action cardiaque avec les différents courants ioniques impliqués.....	11
Figure 6 : Electrocardiogramme (ECG) et potentiel d'action (PA) ventriculaire dans le syndrome du QT long.....	12
Figure 7 : potentiel d'action musculaire avec les types de courants ioniques impliqués.....	13
Figure 8 : Structure schématique du canal Nav1.4.....	13
Figure 9 : Courant de fuite à l'origine de la paralysie périodique hypo-kaliémique.....	16
Figure 10 : Concept d'accessibilité de résidus du module PD à l'agent réducteur MTSET. ..	24
Figure 11 : Structure schématique d'un canal à proton.....	26
Figure 12 : Structure cristallographique de KvAP dans le modèle du « voltage-sensor paddle ».....	29
Figure 13 : Représentation schématique du modèle à vis hélicoïdale.....	30
Figure 14 : Représentation schématique du modèle du transporteur.....	31
Figure 15 : Comparaison entre les structures des canaux KcsA et MthK.....	33
Figure 16 : Comparaison entre KcsA et le module PD de <i>Shaker</i>	35
Figure 17 : Modèle de levier mécanique.....	37
Figure 18 : Mouvement du segment S4 et courant de porte.....	38
Figure 19 : Modèle de ligand-récepteur.....	41
Figure 20 : Modèle de médiation directe du couplage entre les modules VSD et PD par le le PIP ₂	46
Figure 21 : Structure schématique d'une phosphatase voltage-dépendante.....	68
Figure 22 : Modulation inductible de la concentration de PIP ₂ membranaire.....	69
Figure 23 : Modulation de l'activité de KCNQ1 par des peptides exogènes B4-5 et TS6 selon le modèle.....	72
Figure 24 : Export membranaire d'un peptide de façon inductible.....	85
Figure 25 : Structure schématique de la structure des canaux ioniques voltage-dépendants.....	88
Figure 26 : Alignement de séquences en vue d'identifier les séquences des peptides modulateurs.....	90
Figure 27 : Etapes de clonage des minigènes sous le plasmide pIRES2 EGFP.....	91
Figure 28 : Représentation schématique du passage à la configuration cellule-entière.....	93
Figure 29 : Schéma d'une installation de patch-clamp.....	95
Figure 30 : Effets des peptides B4-5 sur la densité du courant.....	98
Figure 31 : Etude des effets des peptides B4-5 sur la voltage-dépendance du canal Nav1.4.....	100
Figure 32 : Effets du peptide TS6 du domaine DI sur la densité du courant.....	101
Figure 33 : Effets des peptides B4-5 de NavSp1 sur la densité du courant.....	103
Figure 34 : Effets des peptides TS6 de NavSp1 sur la densité du courant.....	104
Figure 35 : Modulation du mutant R555C par un peptide activateur TS6.....	133
Figure 36 : Structure du canal sodique NavAb avec le pore fermé et les VSDs activés.....	140

LISTE DES ABREVIATIONS

B4-5 : boucle entre S4 et S5, ce qui est traduit sur l'article comme S4S5_L en référence à linker S4-S5

TS6 : partie C-terminale du segment S6

ECG : Electrocardiogramme

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

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

KAT1 : Kv channel *Arabidopsis thaliana*

LQT1 : syndrome du QT long de type 1

MTSET : méthaneethiosulfonate éthyltriméthylammonium

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

NavAb : Canal sodique voltage-dépendant *Acrobacter butzleri*

NavSp1 : Canal sodique voltage-dépendant *Silicibacter Pomeroyi*

NavMs : Canal sodique voltage-dépendant *Magnetococcus* sp.

PA : potentiel d'action

VSD : Voltage Sensor Domain

PD : Pore Domain

PIP₂ : phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate

VSP : voltage-sensor phosphatase

INTRODUCTION GENERALE

Les canaux ioniques voltage-dépendants sont des protéines membranaires à travers lesquelles les ions passent, de façon sélective, pour assurer les échanges entre les cellules et leur environnement (Figure 1).

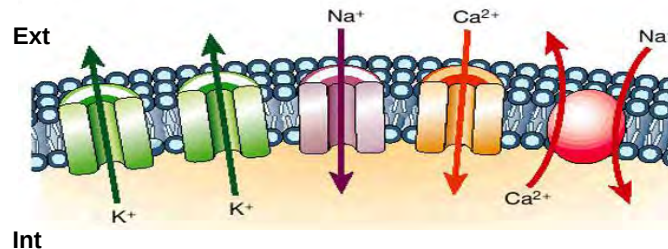


Figure 1 : Activité électrique membranaire.

Sens des courants essentiels à travers les canaux et échangeurs des cellules contractiles.

Ext : extracellulaire. Int : intracellulaire, (d'après Marbán, 2002).

Ces canaux ioniques, dont l'activité dépend du potentiel membranaire, sont répartis en différentes familles en fonction de l'ion pour lequel ils sont sélectifs. Ainsi, il existe quatre principales familles de canaux ioniques voltage-dépendants : les canaux potassiques (Kv), sodiques (Nav), calciques (Cav) et à protons (Hv). A ces familles de canaux, s'ajoutent les canaux HCN qui sont sélectifs pour les cations. Dans chaque famille, il existe plusieurs isoformes, lesquelles sont exprimées différemment d'un tissu à l'autre.

Le passage des ions à travers ces canaux génère des courants ioniques responsables des phénomènes de dépolarisation, repolarisation et hyperpolarisation membranaires. Ces phénomènes électriques sont à la base du potentiel d'action (PA), signal électrique nécessaire à différentes fonctions de l'organisme telles que la régulation hormonale, la sécrétion cellulaire, la stimulation neuronale et la contraction des cellules musculaires squelettiques et cardiaques (Hille, 1992). De façon cohérente avec les rôles physiologiques majeurs des canaux ioniques voltage-dépendants dans les tissus excitables, des mutations dans ces protéines sont responsables de plusieurs maladies humaines appelées canalopathies. Ces pathologies peuvent concerner différents organes tels que les reins, le cœur, les muscles squelettiques et le système nerveux central (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999).

Ces canaux ioniques voltage-dépendants sont régulés par le potentiel membranaire, par des composés membranaires, cytosoliques ou extracellulaires, ainsi que par des facteurs environnementaux (toxines). L'ouverture-fermeture du canal en fonction du potentiel membranaire fait intervenir deux portes qui fonctionnent de façon indépendante: une porte

d'activation et une porte d'inactivation, dont les activités régissent respectivement l'activation et l'inactivation du canal. De cette façon, le canal peut exister sous quatre états principaux (Figure 2). Un état fermé (F) lorsque seule la porte d'activation est fermée, un état ouvert (O) lorsque les deux portes sont ouvertes, un état inactivé (I) lorsque seule la porte d'inactivation est fermée et un état fermé-inactivé (FI) lorsque les deux portes sont fermées.

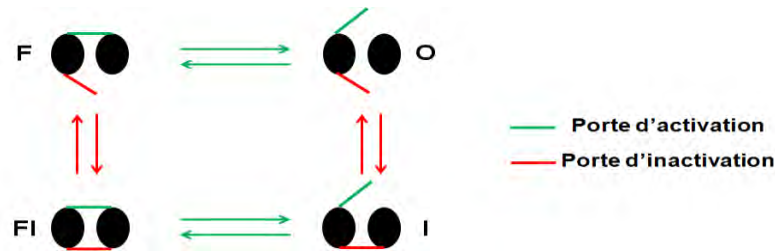


Figure 2 : Les différents états d'un canal voltage-dépendant.

(F) fermé, (O) ouvert, (I) inactivé et (FI) fermé inactivé.

Grâce à des approches structurales comme la cristallographie, nous commençons à avoir une idée un peu plus précise de la structure des canaux ioniques voltage-dépendants. Plusieurs structures cristallographiques de canaux Kv et Nav ont été déterminées (Jiang et al., 2003; Long et al., 2005a; Payandeh et al., 2011a, 2012; Zhang et al., 2012). La comparaison de ces études montre de fortes similarités structurales entre ces deux familles de canaux dont les rôles physiologiques sont très différents : dépolarisation pour les Nav et repolarisation pour les Kv. Dans ce contexte, il est intéressant d'étudier les points communs et les différences de ces canaux. La meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de ces canaux est une étape indispensable pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les canalopathies.

Mon travail de thèse a consisté à étudier les mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux ioniques par le potentiel membranaire et par le phosphatidyl inositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂), en utilisant comme modèles les canaux KCNQ1, Nav1.4, *Shaker* et NavSp1.

Afin que le lecteur dispose de l'état actuel des connaissances sur le fonctionnement et la régulation des canaux ioniques, l'introduction est développée selon quatre axes. Dans un premier temps, seront décrits les rôles physiologiques et pathologiques des canaux ioniques KCNQ1 et Nav1.4 ainsi que l'importance de l'environnement lipidique pour le bon fonctionnement des canaux ioniques en général. Ensuite, les différents composants (ou modules) des canaux ioniques voltages-dépendants seront décrits avant d'exposer leurs mécanismes de fonctionnement. Enfin, les mécanismes de couplage entre ces modules feront l'objet de la dernière partie de cette introduction générale.

1- Rôles physiologiques et physiopathologiques des canaux KCNQ1 et Nav1.4

a) Le canal KCNQ1

KCNQ1 (aussi appelé KvLQT1 ou Kv7.1) est la sous-unité principale (aussi appelée sous-unité α) d'un canal potassique voltage-dépendant codé par le gène *KCNQ1* et exprimé dans différents tissus de l'organisme. Les rôles majeurs de KCNQ1 sont la repolarisation du tissu cardiaque et le transport d'eau et de sels dans les tissus épithéliaux. Dans le cœur, KCNQ1 s'assemble avec la sous-unité β auxiliaire KCNE1 (aussi appelée minK ou IsK) pour former le complexe canalaire KCNQ1-KCNE1 responsable du courant rectifiant retardé I_{Ks} , en partie à l'origine de la terminaison du PA cardiaque (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). Tandis que KCNE1 est formé d'un seul segment transmembranaire, KCNQ1 est composé de six segments transmembranaires (S1-S6) avec S1 à S4 formant le domaine voltage-sensor (VSD) et S5-S6 le domaine du pore (PD) dans lequel se trouve le filtre de sélectivité (Figure 3A). Le canal fonctionnel nécessite l'association de quatre sous-unités KCNQ1 identiques pour former un homotétramère (Figure 3B). Cette topologie de KCNQ1 est cohérente avec les structures cristallographiques des canaux KvAP (Jiang et al., 2003) et Kv1.2 (Long et al., 2005a). L'activité de ce canal KCNQ1 est régulée par des protéines auxiliaires mais aussi par d'autres composés et paramètres cellulaires.

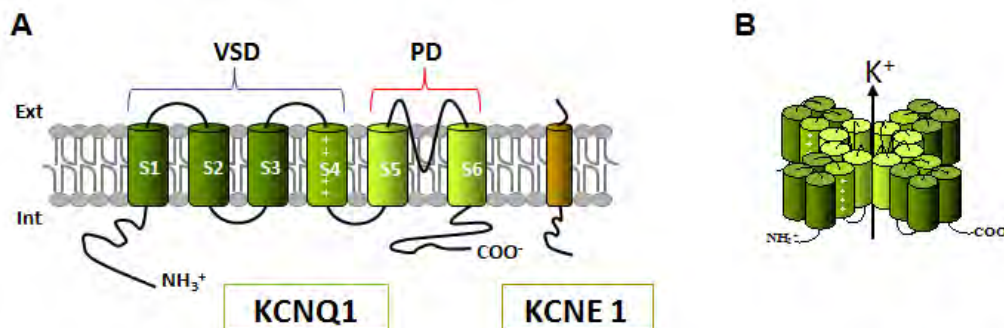


Figure 3 : Structure schématique du complexe KCNQ1-KCNE1.

(A) Sous-unité α à 6 segments transmembranaires avec la sous-unité β régulatrice KCNE1. VSD : domaine voltage-sensor ; PD : domaine pore. **(B)** Schéma de la structure tétramérique du canal fonctionnel.

• Régulation de KCNQ1

Le canal KCNQ1 s'associe avec des protéines partenaires responsables de la régulation de son activité. Les partenaires majeurs de KCNQ1 sont les cinq protéines membres de la famille KCNE (KCNE1-5). L'association de KCNQ1 avec chacune de ces sous-unités β auxiliaires entraîne un changement des caractéristiques biophysiques du courant potassique à travers ce canal (McCrossan and Abbott, 2004). Dans le cœur, la sous-unité auxiliaire

majoritaire est KCNE1 dont l'association avec KCNQ1 entraîne une augmentation de l'amplitude du courant, un décalage de la voltage-dépendance de l'activation vers des potentiels plus dépolarisants, un ralentissement des cinétiques d'activation et de désactivation, ainsi qu'une élimination du processus d'inactivation (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). En plus de ces effets sur les propriétés biophysiques de KCNQ1, il a été montré que l'association de KCNE1 avec ce canal affecte également le courant I_{Ks} en modulant l'interaction de ce canal avec d'autres régulateurs tel que le PIP_2 (Li et al., 2011).

Le PIP_2 est un phospholipide membranaire qui, en effet, joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité de KCNQ1. Ce phospholipide module le courant I_{Ks} en stabilisant l'état ouvert du pore de KCNQ1, ce qui se traduit par une augmentation de l'amplitude de ce courant. De plus, le PIP_2 ralentit les cinétiques de désactivation et entraîne un décalage, vers des potentiels plus négatifs, de la courbe d'activation de KCNQ1 (Figure 4, Loussouarn et al., 2003). Il a été montré que trois mutations de KCNQ1 retrouvées chez des patients atteints du syndrome du QT-long entraînent une diminution de l'affinité de ce canal au PIP_2 (Park et al., 2005). Cette étude suggère que cette diminution de l'affinité de KCNQ1 au PIP_2 est à l'origine de cette pathologie arythmique cardiaque. Les mécanismes moléculaires à la base de cette régulation du canal KCNQ1 et des canaux ioniques en général, par le PIP_2 seront détaillés par la suite dans un autre chapitre de cette introduction générale.

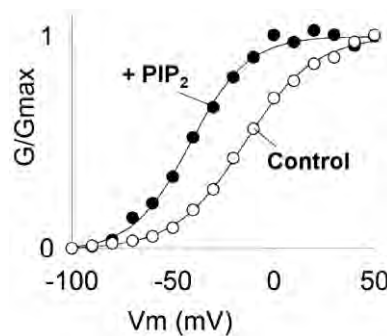


Figure 4 : Modulation de la voltage-dépendance du canal KCNQ1 par le PIP_2 .

La courbe d'activation représentant l'activation du canal en fonction du potentiel membranaire est présentée en condition contrôle (cercles blancs) et après ajout de PIP_2 exogène (cercles noirs). G : conductance ; Gmax : conductance maximale ; Vm : potentiel membranaire. Adapté selon (Loussouarn et al., 2003).

Le complexe canalaire KCNQ1-KCNE1 est également régulé par les variations d'osmolarité (Sasaki et al., 1994). Il a été montré quelques années plus tard dans notre laboratoire, que cette osmo-sensibilité du courant I_{Ks} est régie par le Mg^{2+} et les polyamines intracellulaires via leur modulation de l'interaction entre le complexe canalaire KCNQ1-KCNE1 et le PIP_2 (Piron et al., 2010).

Par ailleurs, le courant I_{Ks} est régulé par le système nerveux sympathique, ce qui permet la modulation de la durée du PA suite à l'activation de cette voie du système nerveux autonome (Terrenoire et al., 2005). Cette régulation de l'activité du complexe KCNQ1-KCNE1 est régie par l'activation d'un récepteur β -adrénergique conduisant à l'augmentation de la concentration en adénosine mono-phosphate cyclique (AMPc) et ainsi à une stimulation de la protéine kinase A (PKA) à la base de la phosphorylation du complexe canalaire (Potet et al., 2001). Sur des systèmes de réexpression, il a été montré que cette régulation du courant I_{Ks} par la voie de l'AMPc est très dépendante de la co-expression de la sous-unité KCNE1. Ce résultat est cohérent avec le fait que des mutations de KCNQ1 mais aussi de KCNE1, identifiées chez des patients atteints du syndrome du QT-long, rendent le complexe canalaire insensible à cette voie de régulation sympathique (Kurokawa et al., 2004; Marx et al., 2002).

Enfin, l'activité de KCNQ1 est aussi régulée par les variations de pH extra et intracellulaire. Ainsi, il a été montré qu'une acidification des milieux extracellulaire et intracellulaire entraîne respectivement une diminution et une augmentation de l'amplitude du courant potassique conduit par ce canal. De façon intéressante, ces effets sont annulés lorsque KCNQ1 est co-exprimé avec la sous-unité KCNE1 (Peretz et al., 2002; Unsöld et al., 2000).

En somme, la régulation de KCNQ1 fait intervenir différents acteurs. Il est intéressant de noter que l'implication du PIP_2 dans l'osmo-sensitivité du courant I_{Ks} d'une part, et celle de KCNE1 dans la régulation de ce courant par le système nerveux sympathique et par le pH d'autre part, reflète la complexité des mécanismes de régulation du canal KCNQ1.

- **Rôle de KCNQ1 dans la physiologie et physiopathologie cardiaque**

Le PA cardiaque constitue le phénomène électrique à la base des phénomènes de contraction-relaxation du cœur. La phase de repolarisation de ce PA, à l'origine de la relaxation cardiaque, fait intervenir trois types de canaux ioniques à savoir KCNQ1, hERG et Kir2, responsables des courants potassiques I_{Ks} , I_{Kr} et I_{K1} , respectivement (Figure 5).

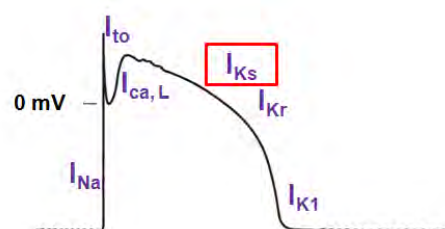


Figure 5 : Potentiel d'action cardiaque avec les différents courants ioniques impliqués.

KCNQ1 et sa sous-unité auxiliaire KCNE1 jouent un rôle majeur dans la fonction cardiaque, expliquant que de nombreuses mutations dans les gènes codant pour ces protéines sont à l'origine de pathologies cardiaques graves. Les mutations de KCNQ1 entraînant une modification de l'activité du canal via un défaut de trafic membranaire, d'assemblage ou de régulation, conduisent à des PA cardiaques prolongés et au syndrome du QT-long de type 1 (Keating and Sanguinetti, 2001). Le syndrome du QT-long est une pathologie cardiaque caractérisée par une prolongation de l'intervalle de temps entre l'initiation du complexe QRS et celle de l'onde T (correspondant à la contraction et à la relaxation ventriculaire, respectivement) observable sur un tracé d'électrocardiogramme (ECG, Figure 6). Ainsi, des mutations perte-de-fonction de KCNQ1 entraînent une repolarisation retardée qui est reflétée par une prolongation de l'intervalle QT sur l'ECG. Cette prolongation du PA peut être à l'origine d'arythmies cardiaques et dans certains cas, de la mort subite. D'autres mutations perte-de-fonction de KCNQ1 ont été également montrées comme étant à l'origine de la mort subite du nouveau-né (Schwartz et al., 1998, 2001).

Par ailleurs, des mutations perte-de-fonction de la sous-unité β KCNE1 peuvent induire d'autres formes du syndrome du QT-long ainsi qu'une autre pathologie cardiaque appelée syndrome de Jervell & Lange-Nielsen et caractérisée par une prolongation de l'intervalle QT et d'une surdité bilatérale congénitale (Splawski et al., 1997).

Enfin, une mutation gain-de-fonction de KCNQ1 (S140G) a été identifiée comme étant le caractère autosomique dominant à travers quatre générations d'une famille présentant une fibrillation auriculaire (Chen et al., 2003). Cette pathologie arythmique est caractérisée par un raccourcissement du PA cardiaque. Du fait de l'expression de KCNQ1 avec ses unités auxiliaires KCNE dans l'épithélium d'autres tissus de l'organisme, ses implications physiologiques et pathologiques ne se limitent pas au muscle cardiaque mais aussi à l'oreille interne, aux reins, au pancréas et au système gastro-intestinal (Jespersen et al., 2005).

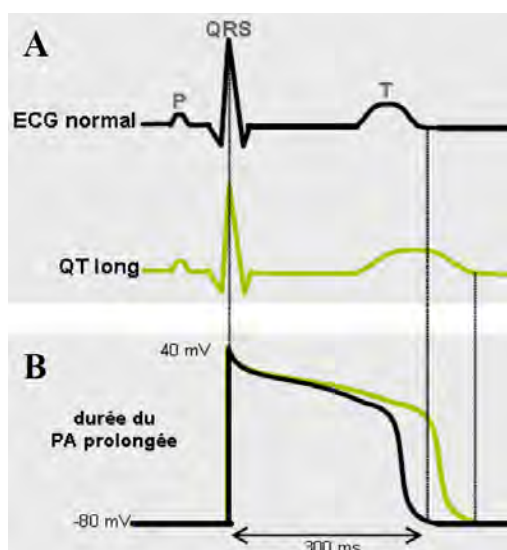


Figure 6 : Electrocardiogramme (ECG) et potentiel d'action (PA) ventriculaire dans le syndrome du QT long.

(A) Représentation schématique de tracés d'ECG chez un individu sain (noir) et un individu malade (vert). **(B)** La durée du PA ventriculaire est prolongée en condition pathologique (vert) comparé à la condition normale (noir).

b) Le canal Nav1.4

Nav1.4 est un canal sodique voltage-dépendant exprimé principalement dans les myocytes squelettiques et responsable de l'initiation du potentiel d'action (Figure 7) à l'origine des phénomènes de contraction et de relaxation musculaires.

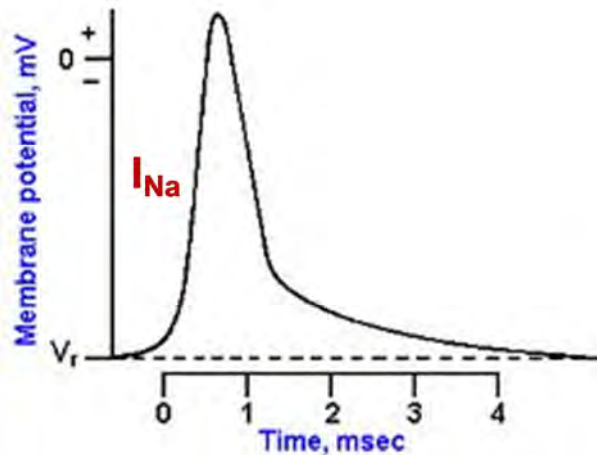


Figure 7 : potentiel d'action musculaire avec les types de courants ioniques impliqués.

(Vr) potentiel de repos, (I_{Na}) courant sodique,

Nav1.4 constitue la sous-unité α responsable des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques du canal (Pincin et al., 2005). Cette sous-unité canalaire est codée par le gène *SCN4A* situé sur le chromosome 17 humain (Vicart et al., 2005). Nav1.4 a une structure monomérique formée de 4 domaines homologues (DI, DII, DIII et DIV) et non-identiques (Figure 8, Noda et al., 1984). Chaque domaine est constitué de 6 segments transmembranaires (S1 à S6).

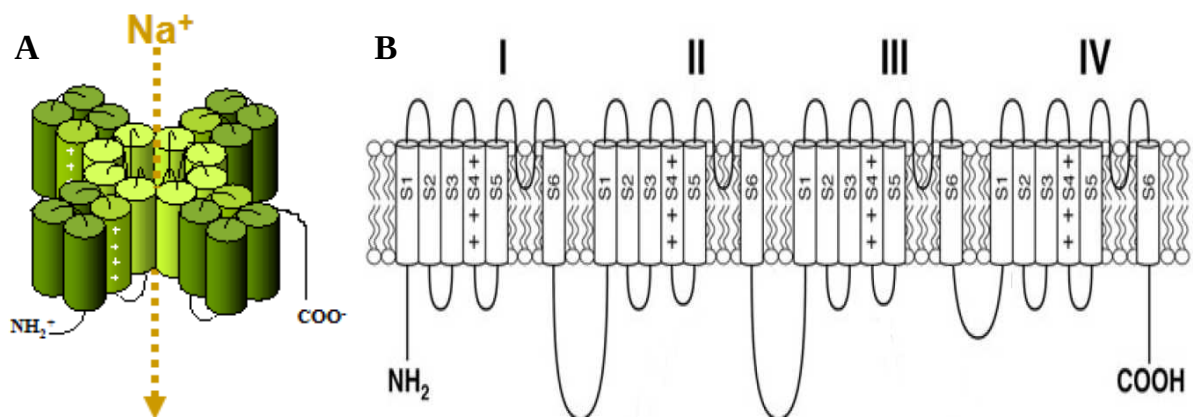


Figure 8 : Structure schématique du canal Nav1.4.

(A) Sous-unité canalaire. (B) Composition des domaines formant le canal (d'après Zakon et al, 2008).

De manière similaire à KCNQ1, les segments S1 à S4 des 4 domaines forment les domaines VSDs, notamment grâce au segment S4 très riche en résidus chargés positivement. En fonction des variations du potentiel membranaire, ces VSDs changent de conformations conduisant ainsi à l'ouverture-fermeture du pore, lequel est formé par l'association de tous les segments S5 et S6. Au sein de cette région du pore se trouvent les zones de sélectivité et de conduction des ions Na⁺ (Catterall et al., 2007). Cette topologie du canal est confirmée par les récentes structures cristallographiques des canaux sodiques bactériens NavAb (Payandeh et al., 2011a, 2012) et NavRh (Zhang et al., 2012), à la différence que ces derniers sont homotétramériques et non pas constitués d'une seule sous-unité. Les mécanismes d'activation de ce canal, et des canaux ioniques en général, en réponse aux variations du potentiel membranaire, restent encore mal-connus malgré de nombreuses études réalisées sur ce sujet. Ces mécanismes ont fait l'objet de mes recherches de thèse et seront donc décrits et discutés plus tard.

- **Régulation de Nav1.4**

Le fonctionnement de cette sous-unité α Nav1.4 fait intervenir une sous-unité β auxiliaire, Nav β 1, codée par le gène *SCN1B* situé sur le chromosome 19 humain (Vicart et al., 2005). Lorsqu'elle est co-exprimée avec Nav1.4 sur des oocytes de xénopes, cette sous-unité β modifie les propriétés biophysiques de ce canal : augmentation de l'amplitude du courant et de la fraction de la composante rapide de l'inactivation, accélération de l'inactivation et de la réactivation (Makita et al., 1994, 1996). Grâce à des approches de biologie moléculaire et d'électrophysiologie, cette dernière étude a montré que les boucles S5-S6 des domaines DI et DIV jouent un rôle crucial dans cette régulation de Nav1.4 par Nav β 1.

Une autre sous-unité régulatrice de Nav1.4 est la protéine calmoduline (CaM). La technique de FRET a permis de démontrer que cette protéine interagit avec l'extrémité C-terminale cytosolique du canal Nav1.4, et ce quelque soit l'état ouvert, fermé ou inactivé de ce canal. La co-expression de la CaM avec Nav1.4 modifie aussi bien le trafic du canal à la membrane que ses propriétés biophysiques: augmentation de l'expression membranaire du canal et décalage vers des potentiels plus négatifs de la courbe d'inactivation. Une approche de mutagenèse a par la suite, montré que la CaM interagit avec Nav1.4 au niveau d'une région de deux acides aminés (Ile et Gln) appelée « IQ motif » et située sur l'extrémité C-terminale du canal. En effet, la substitution de ces deux résidus par des alanine affecte la sensibilité du canal à la CaM (Biswas et al., 2008).

- **Implications physiopathologiques de Nav1.4**

Trente-huit mutations du gène *SCN4A*, codant pour le canal Nav1.4, ont été identifiées comme étant associées à différentes formes de pathologies musculaires squelettiques avec des symptômes et une sévérité variables dans le temps (Matthews et al., 2010). Ce canal est affecté dans plus de 41% des canalopathies du muscle squelettique (Jurkat-Rott et al., 2010). Deux types de mutations du gène *SCN4A* sont responsables de ces canalopathies :

- Les mutations gain-de-fonction à l'origine d'une entrée excessive de sodium dans les myocytes squelettiques. Ces mutations sont impliquées dans la paralysie périodique hyperkaliémique (Fontaine et al., 1990; Rojas et al., 1991), la paramyotonie congénitale (Ebers et al., 1991), la myotonie aggravée par le potassium (Bendahhou et al., 1999a) ou encore de façon anecdotique, une forme du syndrome myasténique congénital (Tsujino et al., 2003). Ces pathologies liées à un gain de fonction de Nav1.4 se caractérisent par une contracture et une raideur musculaire dues à une hyperexcitabilité du muscle. L'origine de cette hyperexcitabilité est un ensemble de dépolarisations spontanées induites par l'entrée excessive de sodium dans les cellules musculaires (Jurkat-Rott et al., 2010).
- Les mutations perte-de-fonction engendrant une entrée insuffisante de sodium dans les myocytes squelettiques à l'origine d'une excitabilité insuffisante des muscles concernés. Ces mutations sont responsables de certaines formes de paralysies appelées paralysies périodiques hypo-kaliémiques caractérisées par une faiblesse musculaire (Bulman et al., 1999). Contrairement aux mutations gain-de-fonction citées ci-dessus et qui affectent principalement l'ouverture-fermeture du pore, les mutations perte-de-fonction responsables de la paralysie périodique hypo-kaliémiques affectent, elles, les domaines VSD, et plus particulièrement les segments S4. Ces mutations consistent à la neutralisation d'un résidu positif au niveau des S4. L'expression des canaux Nav1.4 portant ces mutations, dans des oocytes de xénopes, a permis de découvrir l'existence d'un courant de fuite ayant les mêmes caractéristiques que le courant ω découvert dans le canal *Shaker* (Sokolov et al., 2007; Struyk and Cannon, 2007; Tombola et al., 2005). Ce courant protonique entrant et passant entre chaque S4 muté et le reste du VSD, est activé par l'hyperpolarisation (Figure 9), ce qui entraîne une déstabilisation du potentiel membranaire de repos vers des valeurs moins négatives auxquelles les canaux Nav1.4 restent inactivés, d'où la perte de fonction du canal et l'hypoexcitabilité musculaire (Jurkat-Rott and Lehmann-Horn, 2007).

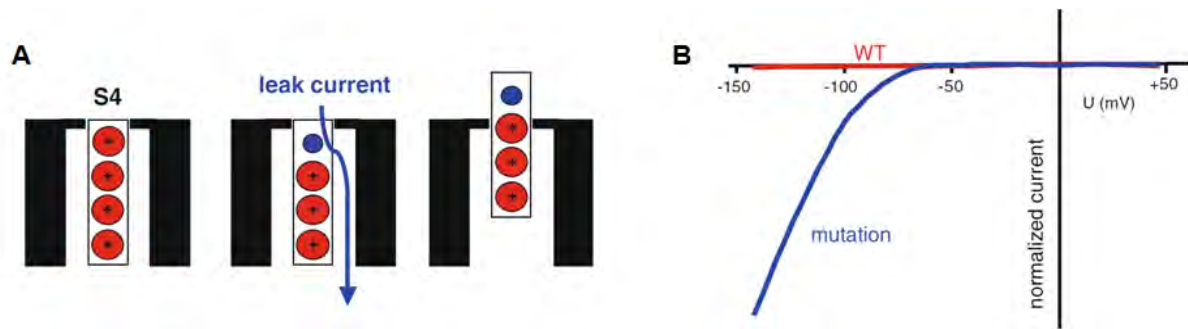


Figure 9 : Courant de fuite à l'origine de la paralysie périodique hypo-kaliémique.

(A) la substitution d'un résidu arginine (rouge) du côté extracellulaire du S4 par un acide aminé plus petit (bleu) comme une glycine, ouvre une voie de passage d'ions à des potentiels hyperpolarisants, ce qui entraîne un courant entrant protonique (flèche bleue). A des potentiels plus dépolarisants, le S4 se déplace vers le côté extracellulaire, ce qui entraîne la fermeture de cette voie par une autre résidu arginine, d'où une annulation de ce courant de fuite. (B) schéma d'un courant cationique à travers un canal sodique dont un résidu arginine a été neutralisé du côté extracellulaire de S4 (Jurkat-Rott et al., 2010).

En somme, toutes ces pathologies liées à des mutations gain ou perte-de-fonction de Nav1.4 entraînant une modification de l'excitabilité musculaire, se caractérisent par des attaques plus ou moins récurrentes de raideur ou de faiblesse musculaires, selon le type de mutation, et sont héréditaires avec un mode de transmission dominant. Enfin, notons que malgré la forte implication de Nav β 1 dans les propriétés biophysiques de Nav1.4, aucune pathologie musculaire connue n'a été associée à des mutations sur le gène codant pour cette sous-unité auxiliaire (Jurkat-Rott et al., 2010). Cela n'est pas très surprenant dans la mesure où cette sous-unité n'est pas spécifique du canal Nav1.4 et encore moins des autres Nav. En effet, une récente étude a montré que Nav β 1 interagit également avec le canal potassique neuronal Kv4.2 et régule à la fois l'expression membranaire et l'activité de ce canal (Marionneau et al., 2012).

c) Importance de l'environnement lipidique

La membrane plasmique constitue une barrière entre les milieux intra et extracellulaires, au sein de laquelle les canaux ioniques jouent leur rôle de pores sélectifs pour permettre les échanges d'eau et d'ions entre les cellules et leur environnement. Cette barrière est constituée principalement de lipides qui s'organisent en bicouche lipidique, rendant la membrane plasmique hydrophobe et donc imperméable à l'eau et aux ions. Mais au-delà de sa fonction de barrière, cet environnement lipidique pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'activité des canaux ioniques.

- **Etudes structurales**

Plusieurs études ont montré que des lipides membranaires interagissent avec des canaux ioniques, suggérant une modulation de ces canaux par ces lipides. Des études structurales sur KvAP et sur une chimère Kv1.2-Kv2.1 ont montré que des résidus du segment voltage-sensor S4 sont exposés à des lipides, lesquels jouent un rôle important dans l'orientation spatiale de ces canaux (Lee et al., 2005a; Long et al., 2007). D'autres études structurales sur des canaux Nav cristallisés en présence de lipides membranaires ont récemment confirmé ces interactions lipides-canaux (Payandeh et al., 2011a, 2012; Zhang et al., 2012).

- **Etudes fonctionnelles**

Sur le plan fonctionnel, il a été montré que l'hydrolyse d'un lipide de la face externe membranaire, la sphingomyéline, en céramide-1-phosphate, modifie le mouvement des segments S4 du canal Nav1.4 et de la phosphatase voltage-dépendante, Ci-VSP (Milescu et al., 2009). En utilisant un canal chimérique Kv2.1 dans lequel le motif « paddle » (côté extracellulaire de S3 + S4) a été remplacé par celui de Nav1.4 ou celui de la Ci-VSP, cette étude a montré que d'une chimère à l'autre, des lipides membranaires avaient des effets différents sur le mouvement du S4. Ces résultats suggèrent que ces lipides interagissent avec le motif « paddle » pour moduler les changements conformationnels des VSD et par conséquent l'activité du canal. En utilisant une toxine dont le site de fixation se trouve sur le motif « paddle », les auteurs de cette étude ont ensuite démontré le rôle de l'environnement lipidique dans les propriétés pharmacologiques de ces canaux (Milescu et al., 2009). Le groupement phosphate du céramide-1-phosphate joue un rôle crucial dans l'interaction entre ce lipide et le segment S4, puisque l'élimination de ce groupement par la sphingomyélinase C réduit considérablement les courants de porte des canaux potassiques *Shaker* et Kv1.3 (Xu et al., 2008). L'importance de ce groupement phosphate sur le mouvement du S4 a été également montrée sur le canal potassique KvAP. En effet, lorsque ce canal est exprimé dans une membrane sans phospholipides ou dans laquelle les groupements phosphate des lipides sont remplacés par des charges positives, il est non fonctionnel dans le premier cas et l'activation des S4 nécessite beaucoup plus d'énergie dans le second (Schmidt et al., 2006; Zheng et al., 2011).

Une autre étude s'est intéressée au rôle des acides gras poly-insaturés Omega-3 et Omega-6 sur l'activité des Kv en utilisant le canal potassique *Shaker* comme modèle (Börjesson et al., 2008). Cette étude a montré que ces lipides situés dans le feuillet externe de la membrane plasmique régulent la voltage-dépendance de ce canal *Shaker* via un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs. Les auteurs de cette étude ont

suggéré que ces acides gras poly-insaturés interagissent électrostatiquement avec des charges positives du segment S4 pour réguler l'activité des canaux ioniques voltage-dépendants présents à la membrane. Ces résultats sont cohérents avec les effets bénéfiques connus de ces acides gras Omega-3 et Omega-6 contre les crises d'épilepsie et les arythmies cardiaques, deux pathologies associées à un dysfonctionnement des canaux ioniques (Leaf et al., 2003; Lefevre and Aronson, 2000). Ces résultats sont également cohérents avec une autre étude montrant, au contraire, un effet pro-arythmique des acides gras Omega-3 chez le porc (Coronel et al., 2007). L'interaction directe entre ces acides gras polyinsaturés et les canaux ioniques avait déjà été montré auparavant grâce à des approches de fixation par des radio-ligands (Kang and Leaf, 1996).

Enfin, une récente étude a montré que les fonctions des canaux sodiques bactériens NavSp1 et NavMs sont considérablement modifiées en absence de phosphatidylinositol et de phosphatidylglycerol, deux lipides présents à la membrane (D'Avanzo et al., 2013). Ces résultats confirment encore une fois le rôle des lipides membranaires sur l'activité des canaux ioniques.

Cependant, toutes ces études montrant l'importance des lipides dans l'activité des canaux ioniques, ne précisent pas si les effets de ces lipides sur ces canaux se font via une interaction directe et spécifique, ou plutôt de façon indirecte via une modification de la structure de la membrane.

Le PIP_2 est l'un des phospholipides membranaires qui régulent l'activité de nombreux canaux ioniques (Logothetis et al., 2010). Les mécanismes moléculaires à la base de cette régulation ont fait l'objet de nombreux travaux y compris mes travaux de thèse, et les résultats de ces travaux seront présentés et discutés par la suite. Etant donné l'importance de l'environnement lipidique sur l'activité des canaux ioniques, il est facile de penser que des lipides membranaires comme le PIP_2 ont des fortes implications physiopathologiques.

- **Rôle physiopathologique de l'interaction PIP_2 -canaux ioniques**

Les résultats de quelques études sur la régulation des canaux par le PIP_2 suggèrent qu'une interaction PIP_2 -canaux défaillante peut conduire à une pathologie humaine.

Le complexe canalaire KCNQ1-KCNE1 est responsable du courant potassique cardiaque I_{Ks} . Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont permis de montrer que le PIP_2 régule l'activité de ce canal en stabilisant son état ouvert (Loussouarn et al., 2003). De plus, il a été également montré que des résidus situés du côté intracellulaire de ce canal KCNQ1 sont importants pour la régulation du canal par le PIP_2 . La substitution de ces résidus, qui a lieu chez certains patients atteints du syndrome du QT long de type 1, entraîne une diminution de

la sensibilité de ces canaux au PIP₂, suggérant un lien fort entre l'interaction canaux-PIP₂ et le syndrome du QT long (Park et al., 2005).

Comme mentionné précédemment, la sous-unité auxiliaire KCNE1 joue un rôle crucial dans l'activité de KCNQ1 dans le cœur, et des mutations sur le gène codant pour KCNE1 sont aussi associées au syndrome du QT long de type 5 (LQT5). Il a été montré que la neutralisation des charges positives situées dans la partie C-terminale de KCNE1 est associée au LQT5 (Hedley et al., 2009; Kapplinger et al., 2009; Lai et al., 2005). Une étude récente a montré l'importance de l'interaction du PIP₂ avec KCNE1 et a suggéré que le LQT5 (lié à KCNE1) est directement associé à une altération de l'interaction PIP₂-KCNE1. En effet, les propriétés du complexe canalaire sauvage ont été restaurées sur un complexe canalaire avec un mutant de KCNE1 en utilisant des doses de PIP₂ plus élevées que la normale, confirmant la dépendance du LQT5 au PIP₂ (Li et al., 2011).

La protéine hERG est un canal potassique voltage-dépendant par lequel passe le courant I_{Kr}, qui, avec le courant I_{Ks} à travers KCNQ1-KCNE1, sont à la base de la repolarisation cardiaque. Le PIP₂ provoque un ralentissement de la désactivation de hERG (Rodriguez et al., 2010a) et une augmentation de l'amplitude du courant (Bian et al., 2001a; Rodriguez et al., 2010a). Dans les sites potentiels de fixation du PIP₂, les têtes anioniques des phospholipides peuvent interagir avec les résidus positifs intracellulaires séparés par au moins un résidu aromatique (Hernandez et al., 2008; Rosenhouse-Dantsker and Logothetis, 2007). Dans ce canal hERG, un site d'interaction avec le PIP₂ se situe dans la partie C-terminale du segment S6 (résidus 883-864; Bian et al., 2004). De plus, trois mutations du gène codant pour hERG, associées au syndrome du QT long de type 2 (LQT2) et conduisant à la substitution ou à la délétion d'arginines (en positions 885, 887 et 892) sont localisées dans cette région (Arnestad et al., 2007; Napolitano et al., 2005; Tester et al., 2005). Par conséquent, il serait très intéressant d'étudier *in vitro* l'activité de ces canaux mutants pour déterminer une éventuelle implication du PIP₂ dans le LQT2.

A l'heure actuelle, seules les études sur le syndrome du QT-long ont montré un lien direct entre le PIP₂ et une canalopathie, malgré le nombre impressionnant de canaux voltage-dépendants ou non, régulés par ce phospholipide (Logothetis et al., 2010). Etant donné le fait que nombreux parmi ces canaux sont impliqués dans des canalopathies (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999) d'une part, et l'apparition de nouvelles données fonctionnelles et structurales précisant les sites de fixation du PIP₂ sur certains de ces canaux d'autre part, (Flynn and Zagotta, 2011a; Hernandez et al., 2008; Oliver et al., 2004; Thomas et al., 2011a; Zhang et al., 2003), il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure le PIP₂ et d'autres lipides membranaires sont impliqués dans ces canalopathies.

2- Structure modulaire des canaux ioniques voltage-dépendants

Chez les eucaryotes, les Nav et Cav sont des protéines membranaires composées de quatre domaines homologues (mais pas identiques) qui s'assemblent pour former un pore conduisant les ions, tandis que les Kv eucaryotes, mais aussi procaryotes, sont pour la plupart, des tétramères formés de sous-unités identiques (homotétramères). Quant aux Nav procaryotes connus à ce jour, ils ont tous une structure homotétramérique. Malgré cette variabilité structurale, il existe une forte similarité entre tous ces canaux Nav, Cav et Kv au niveau de leurs unités fonctionnelles. En effet, chaque sous-unité ou domaine dans un canal voltage dépendant est formé de six segments transmembranaires (S1-S6) reliés entre eux par des boucles intra ou extracellulaires. Ces segments ont été regroupés en deux catégories selon leurs rôles dans l'activité du canal. Les segments S1 à S4 constituent le domaine voltage sensor (VSD) tandis que les segments S5 et S6 ainsi que la boucle qui les relie, forment le domaine du pore (PD). Plusieurs études structurales, biochimiques et fonctionnelles sont cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle ces deux domaines seraient des modules à part entière capables de fonctionner de façon indépendante. Cette deuxième partie de l'introduction va se focaliser sur la présentation et la discussion des résultats de ces études.

a) Le module VSD

Les structures cristallographiques des canaux KvAP, Kv1.2 et NavAb ont permis de mieux comprendre les bases structurales du VSD (Jiang et al., 2003; Long et al., 2005a; Payandeh et al., 2011a). Ce VSD est composé des segments transmembranaires S1 à S4 reliés entre eux par des boucles intra ou extracellulaires (Figure 3). Le segment S4 du VSD est riche en acides aminés chargés positivement (Arg et Lys) qui sont espacés entre eux par deux résidus non-chargés. Ces résidus positifs se déplacent au sein de la membrane plasmique en fonction des différences de potentiel de part et d'autre de cette membrane. Le mouvement de ces charges positives à travers le champ électrique membranaire génère un courant appelé « courant de porte » du fait de son rôle dans l'ouverture-fermeture de la porte d'activation. Les mécanismes du mouvement du S4 dans lequel se trouvent ces charges positives seront décrits par la suite (page 28). Grâce à ce mouvement voltage-dépendant du S4, le module VSD est capable de détecter les variations du potentiel membranaire pour induire les changements conformationnels à la base de l'ouverture-fermeture de la porte d'activation.

En plus de son rôle dans les processus d'activation et d'inactivation du canal, le VSD joue un rôle crucial dans les processus d'inactivation. Rappelons que des résidus et changements conformationnels du filtre de sélectivité sont impliqués dans le processus d'inactivation lente (type C) des canaux Nav et Kv (Cuello et al., 2010; López-Barneo et al., 1993; Pavlov et al., 2005). Une étude récente sur le canal sodique Nav1.4 a montré que le mouvement du S4 du domaine IV est couplé aux changements conformationnels du filtre de sélectivité (Capes et al., 2012). En effet, la stabilisation du filtre de sélectivité dans une conformation donnée, soit par l'introduction de pont disulfure, soit par la fixation d'une toxine à hautes affinité et spécificité pour cette région, affecte le mouvement du segment S4 du domaine IV. Ce mouvement du S4 a été évalué en mesurant soit le mouvement des charges positives de ce segment à travers le champ électrique membranaire (aussi appelé courant de porte), soit le courant ionique de fuite entre le segment S4 et le reste du VSD, lorsque certains résidus positifs de ce S4 sont neutralisés (Sokolov et al., 2005). Ainsi, ce couplage énergétique entre le filtre de sélectivité et le mouvement du S4 du domaine IV suggère un rôle du VSD de ce domaine dans le processus d'inactivation (Capes et al., 2012). De plus, des études de mutagenèse associées à des études fonctionnelles en utilisant la technique de patch clamp, ont montré le rôle particulier du VSD de ce domaine IV dans le processus d'inactivation des canaux Nav (Bendahhou et al., 1999b; Kontis et al., 1997).

Une autre région reliée directement au VSD est également impliquée dans un processus d'inactivation, notamment l'inactivation rapide (type N), dans les canaux Kv et Nav. Des approches de mutagenèse dirigées associées à des études fonctionnelles ont été utilisées pour étudier les régions impliquées dans le processus d'inactivation. De cette façon, il a été montré sur le canal potassique *Shaker* qu'une région cytosolique de 40 acides aminés (6^{ème}-46^{ème} résidu) située dans l'extrémité N-terminale et formant ce qu'on appelle « la boule d'inactivation », est responsable de l'inactivation rapide (Hoshi et al., 1990, 1991). Les mêmes approches ont été utilisées sur le canal neuronal Nav1.2 dans lequel il a été montré que le processus d'inactivation rapide dépend d'un motif hydrophobe de trois résidus Isoleucine-Phénylalanine-Méthionine (IFM) situés dans la boucle reliant les domaines DIII et DIV (West et al., 1992). Dans les deux familles de canaux (Kv et Nav), la « boule d'inactivation » ou le « motif IFM » interagit avec le côté cytoplasmique du pore pour induire l'occlusion et donc l'inactivation du canal (Hoshi et al., 1991; West et al., 1992). Ces régions cytosoliques directement reliées au VSD confèrent à ce module un rôle non-négligeable dans le processus d'inactivation.

On retrouve ce module VSD non seulement dans des canaux, mais aussi dans des protéines enzymatiques, comme la phosphatase de l'ascidie *Ciona intestinalis* (Ci-VSP), ce qui rend l'activité enzymatique dépendante du potentiel (Murata et al., 2005). Cette Ci-VSP est

capable de catalyser des phospho-inositides comme le PIP_2 . Ainsi, l'étude de la voltage-dépendance a été réalisée en évaluant ses effets sur l'activité de canaux potassiques activés par le PIP_2 tels que les canaux KCNQ2/Q3 responsables du courant neuronal M et les canaux rectifiant entrant (Kir) impliqués dans l'excitabilité cellulaire et l'homéostasie potassique. La forte dépendance et sensibilité au PIP_2 de ces canaux a été montrée grâce à des approches fonctionnelles, biochimiques et radioactives (Huang et al., 1998a; Zhang et al., 1999, 2003).

Une étude récente illustre également la modularité du VSD et du PD. En effet, la fusion entre le VSD de Ci-VSP et le canal potassique viral voltage-indépendant Kcv permet de former un canal potassique chimérique voltage-dépendant regroupant les caractéristiques de ses composantes, à savoir les propriétés de sélectivité et d'ouverture-fermeture de Kcv d'une part, et la voltage dépendance de Ci-VSP de l'autre (Arrigoni et al., 2013). Ces résultats suggèrent que le couplage entre ce module VSD et l'ouverture-fermeture du pore ne requiert pas nécessairement une spécificité. Cependant, d'autres études ont au contraire, montré que la coopération entre le VSD et le PD nécessite des séquences bien spécifiques dans ces deux régions. En effet, il a été montré que l'association du VSD du canal potassique de drosophile, *Shaker*, avec le PD d'un canal potassique bactérien, KcsA, forme une protéine chimérique non-fonctionnelle malgré le fait qu'elle soit présente à la membrane plasmique (Caprini et al., 2001). Cette chimère devient fonctionnelle si et seulement si la partie C-terminale du PD de KcsA est remplacée par celle de *Shaker*, suggérant la nécessité d'une compatibilité entre le VSD et une région du PD (Lu et al., 2001).

Des approches de mutagenèse dirigée associées à des études fonctionnelles sur cette chimère *Shaker*-KcsA ainsi que sur le canal potassique hERG, ont mis en évidence l'importance de deux régions précises sur l'activité voltage-dépendante des canaux ioniques. Il s'agit de la boucle S4-S5 et de la partie C-terminale du segment S6. Les effets drastiques de mutations sur certains résidus de ces régions sur l'activité du canal démontrent l'importance d'une spécificité entre les modules VSD et PD (Lu et al., 2002; Tristani-Firouzi et al., 2002). Cette contradiction sur la nécessité ou non de compatibilité voire de spécificité entre VSD et PD, reflète la complexité des mécanismes impliqués dans le couplage entre ces deux modules. L'étude de ces mécanismes fait partie intégrante de mon travail de thèse.

b) Le module PD

Le domaine pore est composé par les segments S5 et S6 ainsi que la boucle qui les relie (Figure 3). Ce module constitue à la fois le domaine de sélectivité et de conduction des ions. Des études réalisées sur les canaux voltage-dépendants bactériens KvLm et NavSp1 ont montré que ce module peut fonctionner indépendamment du VSD. En effet, lorsque le module VSD de ces canaux est enlevé, le module PD reste fonctionnel avec les mêmes propriétés de sélectivité, de conduction et pharmacologiques que le canal entier (McCusker et al., 2011; Santos et al., 2008; Shaya et al., 2011). Ces résultats montrent que ces mutants « pore only » sont capables de s'assembler et être stables à la membrane pour assurer leur fonction canalaire. Un mutant « pore only » d'un autre canal bactérien est capable de s'assembler également et de former des cristaux à partir desquels sa structure cristallographique a été obtenue par diffraction aux rayons X (McCusker et al., 2012). Les données fournies par la structure de ce mutant « pore only », mais aussi par celles des canaux entiers KvAP (Jiang et al., 2003), Kv1.2 (Long et al., 2005a) NavAb (Payandeh et al., 2011a, 2012) et NavRh (Zhang et al., 2012), ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et les réarrangements structuraux à la base du fonctionnement du module PD.

Dans les Kv comme dans les Nav, ce module PD contient deux portes potentielles qui contrôlent le flux des ions à travers le pore.

1) Une porte d'activation située du côté cytosolique du pore, constituant la zone de conduction et dont les résidus jouent un rôle crucial dans les processus d'activation, inactivation rapide et désactivation. La localisation de la porte d'activation du côté cytoplasmique du pore a été suggérée sur les canaux potassiques à 2 domaines (voltage-indépendants), les Kv ainsi que sur les Nav. Par exemple, une étude sur le canal *Shaker* a consisté à introduire des cystéines à différentes positions de la partie cytoplasmique du S6 et à étudier l'accessibilité de ces cystéines à l'agent réducteur methanethiosulfonate-ethyltrimethylammonium (MTSET) exposé du côté intracellulaire (figure 10). Les résultats de cette étude montrent qu'un certain nombre de ces cystéines situées à l'intérieur du pore sont accessibles à l'agent réducteur uniquement lorsque le canal est à l'état ouvert. De plus, l'ion Cd^{2+} est capable de se fixer sur certains de ces cystéines sans affecter l'ouverture-fermeture du canal, tandis que la fixation de cet ion sur une cystéine beaucoup plus proche du cytosol stabilise le canal à l'état ouvert. Toutes ces observations suggèrent que le côté intracellulaire du pore joue un rôle crucial dans l'ouverture-fermeture du canal *Shaker* (Liu et al., 1997).

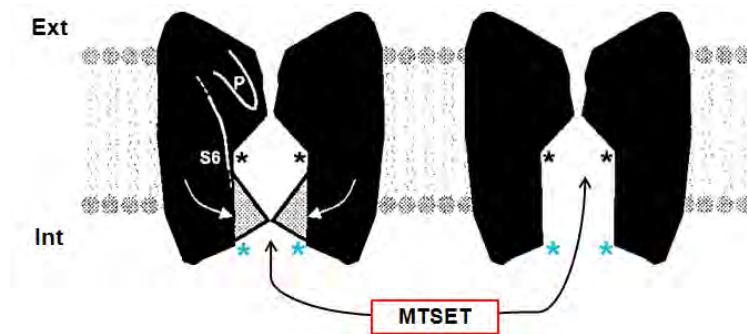


Figure 10 : Concept d'accessibilité de résidus du module PD à l'agent réducteur MTSET.

Deux résidus du PD ont été substitués par des cystéines (étoiles). Les flèches blanches représentent la localisation de la porte d'activation. Les cystéines situées du côté extracellulaire de la porte d'activation (étoiles noires) sont accessibles au MTSET intracellulaire uniquement lorsque la porte d'activation est ouverte (à droite). En revanche, les cystéines situées du côté intracellulaire de cette porte (étoiles bleues) y sont accessibles quel que soit l'état ouvert ou fermé de cette porte. Adapté selon (Liu et al., 1997).

D'autres approches structurales utilisant la spectroscopie à résonance électronique paramagnétique ont démontré sur le canal KcsA que, pendant l'ouverture-fermeture du pore, les résidus extracellulaires de ce module PD sont immobiles et qu'en revanche, des mouvements ont lieu sur l'extrémité C-terminale de l'hélice S6 (Perozo et al., 1999). Cette étude renforce l'idée d'une porte d'activation située du côté intracellulaire du pore. Toutefois, l'interprétation de ces résultats doit être faite avec beaucoup de précaution dans la mesure où la technique utilisée n'est pas suffisamment sensible pour détecter les mouvements de faible amplitude au niveau du filtre de sélectivité, qui pourraient également contrôler le passage des ions. En effet, de tels mouvements ont un rôle important dans le processus d'inactivation lente ainsi que dans la coordination des ions qui traversent le pore (Hoshi and Armstrong, 2013; Liu et al., 1996). Enfin, une autre étude a montré que l'inhibition d'un canal Nav par sa sous-unité auxiliaire se fait de façon état-dépendante. Cette étude suggère que la queue cytoplasmique de cette sous-unité auxiliaire interagit avec la porte d'activation du canal uniquement lorsque celui-ci est à l'état ouvert, pour induire l'occlusion réversible du pore (Grieco et al., 2005).

Toutes ces études soutiennent l'idée de la localisation de la porte d'activation du côté cytosolique. Toutefois, cette hypothèse ne semble pas généralisable à certains canaux ioniques tels que les canaux ioniques activés par les nucléotides cycliques (CNG). L'effet de l'ion Ag^{2+} sur des résidus cystéines situés à l'intérieur du pore est identique quelque soit l'état ouvert ou fermé du canal. Le diamètre de cet ion (2.52 Å) étant similaire ou supérieur à celui des ions potassium ou sodium déshydratés (2.66 Å et 1.94 Å, respectivement), ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de porte d'activation du côté cytosolique de ces canaux CNG (Flynn and Zagotta, 2001).

2) La deuxième porte du module PD est localisée du côté extracellulaire du pore, au niveau du filtre de sélectivité, entre les segments S5 et S6. Plusieurs études sur les canaux Nav ont montré que cette deuxième porte est responsable de l'inactivation lente ou très lente, processus similaires à l'inactivation de type C observée dans les canaux Kv (Balser et al., 1996; Bénitah et al., 1999; Ong et al., 2000; Todt et al., 1999; Vilin et al., 2001; Xiong et al., 2006). Le fonctionnement de cette 2^{ème} porte ferait intervenir, entre autres, des résidus du filtre de sélectivité, zone de sélection des ions (Cuello et al., 2010; Liu et al., 1996; López-Barneo et al., 1993). Une étude récente réalisée sur le canal sodique bactérien NaChBac a montré que la mutation d'un seul résidu de cette région est suffisante pour transformer ce canal sodique en canal calcique (Yue et al., 2002). Cette porte extracellulaire du pore est également le site de fixation d'ions perméants (Na^+ ou K^+) ou bloqueur (Ca^{2+}) (Cuello et al., 2010; Zhang et al., 2013).

Basée sur une forte similarité structurale entre les filtres de sélectivité (2^{ème} porte) de deux canaux sodiques cristallisés à deux états différents (pré-ouvert pour NavAb ; (Payandeh et al., 2011a) et fermé pour NavMs), une étude récente suggère que ces deux portes sont découplées (McCusker et al., 2012). Cependant, cette hypothèse est d'autant plus spéculative que la structure de NavMs supposée à l'état ouvert ne l'est probablement pas. En effet, il manque toute la région cytosolique du segment S6 dans la protéine à partir de laquelle cette structure a été obtenue. Le manque de cette région pourrait être à l'origine d'une conformation non-native de la protéine NavMs, et notamment du segment S6 qui serait beaucoup plus flexible et instable, expliquant ainsi le manque de densité d'électrons sur la région cytosolique de cette hélice S6 (McCusker et al., 2012). De plus, une étude précédente sur le canal potassique procaryote et voltage-indépendant KcsA a, au contraire, montré qu'il y a un couplage structural entre le filtre de sélectivité et la porte d'activation. En effet, les auteurs de cette étude ont démontré qu'il y a une forte corrélation entre le diamètre d'ouverture de la porte d'activation et les réarrangements structuraux du filtre de sélectivité (Cuello et al., 2010).

Dans certains canaux potassiques procaryotes (KcsA, KvAP, MthK, KirBac) et eucaryotes (Kir), constitués seulement de deux domaines transmembranaires M1 et M2, on retrouve une structure similaire à celle du PD (S5-S6) des canaux voltage-dépendants. L'activité de ces canaux voltage-indépendants est régulée par des éléments intracellulaires tels que le Mg^{2+} (Schrempf et al., 1995), le Ca^{2+} (Jiang et al., 2002a) et le PIP_2 (Shyng and Nichols, 1998), ainsi que par le pH (Cuello et al., 1998). L'existence de ces canaux à deux domaines transmembranaires, sur lesquels les premières structures cristallographiques des canaux ioniques ont été déterminées, renforce l'idée selon laquelle le pore forme un module capable

de fonctionner indépendamment du VSD. Selon cette hypothèse, le VSD sert à détecter les variations de potentiel de part et d'autre de la membrane, tandis que le PD constitue la zone de sélectivité et de conduction des ions. Cependant, l'existence des canaux à protons voltage-dépendants pousse à revoir cette généralité.

c) Le cas des canaux Hv

Les canaux à protons voltage-dépendants (Hv) représentent une famille de canaux ioniques laissant passer spécifiquement les ions H^+ . Aucune étude n'a montré que d'autres ions peuvent passer à travers ces canaux (Decoursey, 2003). L'activité de ces canaux dépend à la fois du potentiel membranaire, du gradient de pH de part et d'autre de la membrane (Cherny et al., 1995), et de la température (DeCoursey and Cherny, 1998; Kuno et al., 1997, 2009). La conductance de ces canaux Hv est 10^3 fois plus faible que celle des autres canaux voltage-dépendants (Cherny et al., 2003), et cette faible conductance serait probablement liée au fait que la concentration des ions H^+ est 10^6 fois plus faible que celle des principaux ions dans des solutions physiologiques (Decoursey, 2003). La grande particularité de ces canaux Hv est le fait qu'ils sont constitués de domaines composés seulement de quatre segments transmembranaires (S1 à S4), similaires aux VSDs des autres canaux voltage-dépendants et responsable à la fois de la détection du potentiel membranaire d'une part, et de la sélectivité et conduction des ions H^+ d'autre part (Figure 11A). Deux monomères s'associent au niveau de leurs extrémités C-terminale pour former un dimère, structure fonctionnelle du canal (Figure 11B).

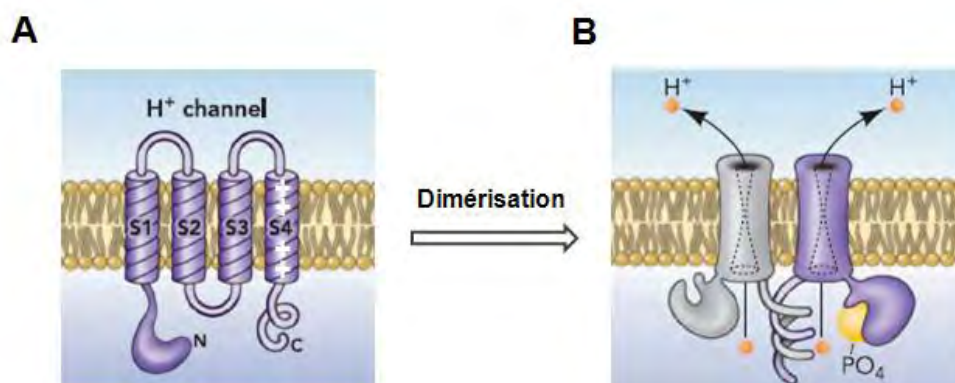


Figure 11 : Structure schématique d'un canal à proton.

(A) Sous-unité à 4 segments transmembranaires. **(B)** Schéma de la structure dimérique du canal fonctionnel.

Haut : côté extracellulaire. Bas : côté cytosolique. (Adapté selon DeCoursey, 2010).

Ces propriétés physiologiques de sélectivité et de conduction des ions H^+ par les canaux Hv malgré l'absence d'un PD, montrent que le module VSD peut présenter d'autres fonctions que la détection du potentiel membranaire.

La phosphatase voltage-dépendante (VSP) est une phosphatase membranaire dont l'activité est régulée par le potentiel membranaire. Cette protéine est composée, d'une part de quatre segments transmembranaires (S1-S4) avec un segment S4 riche en résidus positifs, tout comme le module VSD des canaux ioniques voltage-dépendants, et d'autre part d'un domaine cytosolique catalytique (Murata et al., 2005). La substitution d'un résidu Arg en His à l'extrémité intracellulaire du S4 (R171H) transforme une VSP, qui naturellement ne conduit pas des ions, en canal à H^+ voltage-dépendant (Sutton et al., 2012). L'alignement des séquences de cette VSP et des canaux Hv montre la présence d'un résidu His chez les canaux Hv dans cette position. Cette étude suggère que la sélectivité des canaux Hv aux H^+ est liée à un résidu His situé sur l'extrémité intracellulaire du segment S4.

De façon intéressante, des mutations par substitution d'Arg en His au niveau des segments S4 ont été retrouvées sur des canaux voltage-dépendants chez des patients atteints de certaines canalopathies. Les études *in vitro* de ces mutations ont montré l'existence d'une sélectivité et d'une conductance aux ions H^+ . C'est le cas de la mutation R666H sur le canal sodique musculaire Nav1.4 à l'origine d'une paralysie périodique hypo-kaliémique (Jurkat-Rott and Lehmann-Horn, 2007; Sokolov et al., 2010; Struyk and Cannon, 2007). On peut citer également la mutation R219H sur un segment S4 du canal sodique cardiaque Nav1.5 et qui est liée à une cardiomyopathie dilatée ainsi qu'à d'autres troubles de l'activité électrique cardiaque (Gosselin-Badaroudine et al., 2012). Enfin, l'introduction de mutations similaires (Arg en His) au niveau du segment S4 du canal *Shaker* ont comme conséquence l'apparition d'une conductance sélective pour les ions H^+ (Starace and Bezanilla, 2001, 2004; Starace et al., 1997). Ces observations laissent suggérer qu'un mécanisme d'évolution naturelle a probablement « exploité » ces propriétés de conduction ionique par le VSD pour générer les canaux Hv.

En somme, l'existence des canaux Hv et des protéases voltage-dépendantes d'une part, et les canaux potassiques à deux domaines transmembranaires ainsi que les mutants «pore-only» fonctionnels de l'autre, est parfaitement cohérente avec l'idée d'une structure modulaire des canaux ioniques voltage-dépendants. Reste maintenant à comprendre quels sont les mécanismes moléculaires régissant l'activité de chaque module ainsi que les éléments qui couplent leurs fonctions.

3- Mécanismes de fonctionnement des modules VSD et PD

a) Mouvement du segment S4 et courant de porte

Le segment S4, aussi appelé segment voltage-sensor, est l'élément clé de la détection des variations du potentiel membranaire par le VSD. En effet, ce segment riche en résidus chargés positivement se déplace au sein de la membrane plasmique lorsque le potentiel membranaire varie. Ce mouvement du S4 est à la base des changements conformationnels du canal, entraînant ainsi l'ouverture ou la fermeture du pore en fonction du potentiel membranaire. Le déplacement des charges positives du S4 dans le champ électrique membranaire génère un courant transitoire appelé « courant de porte » du fait de son rôle majeur dans les processus d'ouverture et fermeture de la porte d'activation. La mesure de ce « courant de porte », dont l'amplitude est approximativement 100 fois plus faible que le courant ionique traversant le pore du canal, nécessite deux conditions : d'une part, une très forte expression membranaire des canaux ioniques étudiés et d'autre part, une réduction voire une élimination du courant ionique et du courant capacitif correspondant à la charge et décharge de la membrane (Bezanilla and Stefani, 1998). Ces courants de porte sont mesurables, malgré la faible distance parcourue par le S4, grâce à la vitesse très élevée du mouvement du S4 d'une part, et à l'existence d'un champ électrique très focalisé au niveau membranaire par lequel passent les charges positives lors de ce mouvement du S4 d'autre part (Bezanilla, 2000; Starace and Bezanilla, 2004). Par ailleurs, le mouvement du S4 peut également être mesuré grâce à la technique de fluorimétrie à potentiel imposé qui consiste à attacher au niveau extracellulaire du S4, un fluorophore dont l'intensité de fluorescence varie en fonction de l'hydrophobicité de son environnement. La mesure des variations de fluorescence reflète ainsi le mouvement du S4. Cette technique présente l'avantage de permettre une mesure simultanée du mouvement du S4 et du courant ionique (Cha and Bezanilla, 1997; Mannuzzu et al., 1996).

Au-delà de la détection du mouvement du S4, plusieurs études se sont intéressées à la nature même de ce mouvement et ont abouti à trois modèles différents grâce à des techniques de biologie structurale, de biochimie et d'imagerie fluorescente.

➤ Le modèle du « voltage-sensor paddle »

Ce modèle est basé sur la structure cristallographique de KvAP, un canal potassique voltage-dépendant et exprimé par la bactérie *Aeropyrum pernix* (Jiang et al., 2003). Cette

structure a montré que le segment S3 est formé de deux hélices individuelles (S3a et S3b) séparées par une boucle. La deuxième hélice du S3 (S3b) est directement associée au S4 pour former le « voltage-sensor paddle », élément moteur du domaine voltage-sensor (Figure 12). Au potentiel de repos, S4 est localisé sur la face interne de la membrane alors que S3b est positionné au-dessus du S4. Suite à une dépolarisation membranaire, ce « voltage-sensor paddle » (S3b + S4) traverse la bicouche lipidique jusqu'à la face externe de la membrane (Jiang et al., 2003).

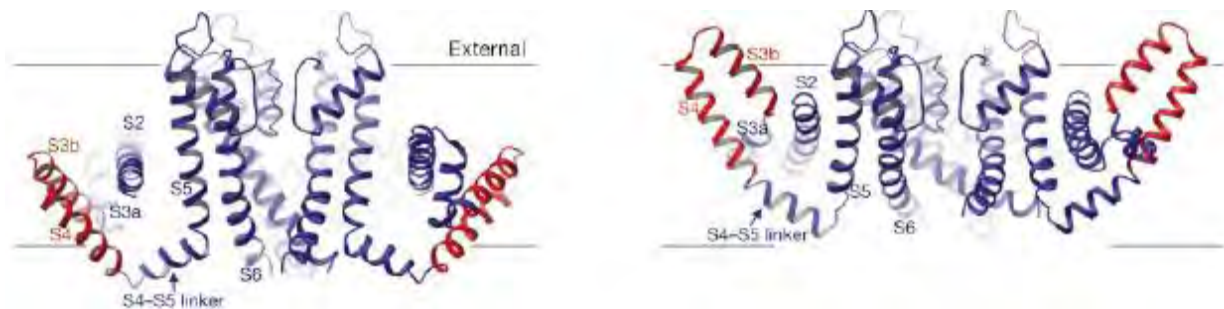


Figure 12 : Structure cristallographique de KvAP dans le modèle du « voltage-sensor paddle ».

Structure à l'état fermé (gauche) et ouvert (droite) de KvAP. En rouge sont représentées les hélices des segments S4 et S3b, et en bleu les autres segments (S1, S2, S3a, S5 et S6). D'après (Jiang et al., 2003).

Un mouvement de 15-20 Å a été suggéré en étudiant l'accessibilité de l'avidine à des molécules de biotines attachées à différentes positions du « voltage-sensor paddle » via des ponts disulfure avec des structures chimiques de différentes longueurs connues. L'approche a consisté à étudier l'accès de l'avidine présente du côté extracellulaire ou du côté cytosolique, en évaluant son effet sur la fonction du canal KvAP préalablement relié à la biotine (Ruta et al., 2005).

Toutefois, ce modèle présente des limites majeures du fait qu'il soit basé sur une structure cristallographique de KvAP qui serait différente de la structure native. En effet, il a été montré qu'en comparaison avec la structure d'un autre canal potassique, Kv1.2 (Long et al., 2005a), les segments S4 sur la structure de KvAP étaient à l'état de repos alors qu'au contraire, le pore du canal est à l'état ouvert. Etant donné le rôle crucial des interactions lipides-protéines sur la stabilité des canaux ioniques, cette structure non-native de KvAP serait due principalement à l'absence de lipides membranaires dans les conditions de cristallisation de KvAP (Lee et al., 2005b).

➤ Le modèle à vis hélicoïdale

Ce modèle a été initialement proposé pour les canaux sodiques (Guy and Seetharamulu, 1986) avant d'être adapté aux canaux potassiques (Durell and Guy, 1992). Grâce à une approche de modélisation, il a été suggéré que le segment S4 effectue un mouvement à la fois de rotation et de translation par rapport à son axe, en réponse aux variations du potentiel membranaire (Figure 13).

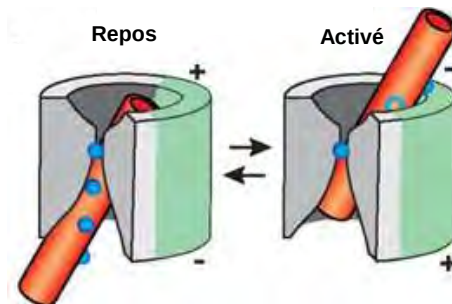


Figure 13 : Représentation schématique du modèle à vis hélicoïdale.

Le cylindre rouge représente le segment S4 avec les lipides qui l'entourent en vert. Les quatre premières charges positives sont représentées par des sphères bleues lorsqu'elles sont devant le domaine S4 et par des cercles lorsqu'elles sont derrière. Adaptée selon (Tombola et al., 2006).

Le canal potassique voltage-dépendant *Shaker*, exprimé par *Drosophila melanogaster*, a été utilisé comme modèle pour démontrer ces mouvements à la fois de rotation et de translation en utilisant les techniques de FRET (Glauner et al., 1999) et d'accessibilité des charges positives du S4 au réactif MTSET (Larsson et al., 1996), respectivement. Rappelons que ce MTSET (methanethiosulfonate-ethyltrimethylammonium) est un réactif hydrophile, imperméable à la membrane et contenant un groupement thiol capable de se fixer spécifiquement sur les groupements sulfhydriles des cystéines (Akabas et al., 1992). Ainsi, les expériences d'accessibilité consistent à étudier les effets du MTSET sur l'activité du canal dans lequel un ou des résidus positifs du S4 ont été préalablement mutés en Cys. Lorsqu'il y a accessibilité à la position mutée, le MTSET s'y fixe, ce qui se traduit par une modification de l'activité du canal. Cette approche s'applique également à d'autres régions du canal comme le pore (Kürz et al., 1995; Pascual et al., 1995, et page 23).

Des études basées sur ce modèle à vis hélicoïdal ont montré que le mouvement de rotation s'effectue avec un angle de $\sim 180^\circ$ et ce, de façon simultanée à un mouvement de translation du S4 de l'ordre de $\sim 13.5 \text{ \AA}$ à travers la membrane plasmique (Glauner et al., 1999; Gandhi and Isacoff, 2002).

➤ Le modèle du transporteur

Contrairement aux deux précédents modèles, le modèle du transporteur suggère un mouvement de translation du S4 très faible, de ~ 2 Å (Cha et al., 1999; Chanda et al., 2005). Selon ce modèle, ce faible mouvement est suffisant pour faire passer les charges du S4 d'une crevasse intracellulaire (état de repos) à une crevasse extracellulaire en réponse à une dépolarisation membranaire (Figure 14), permettant ainsi les changements conformationnels nécessaires à l'ouverture-fermeture du pore (Chanda et al., 2005).

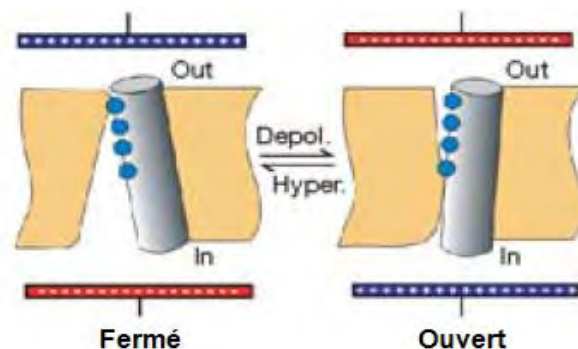


Figure 14 : Représentation schématique du modèle du transporteur.

Le cylindre gris représente le segment S4 au sein de la membrane plasmique (beige). Les quatre premières charges positives sont représentées par des sphères bleues. Ce schéma montre comment la dépolarisation empêche l'accessibilité des résidus positifs du S4 par des composés ajoutés à la face intracellulaire comme le MTSET. D'après (Chanda et al., 2005).

Ce modèle est parfaitement cohérent avec les résultats montrant une accessibilité au MTSET intra ou extracellulaire dépendante de l'état activé ou de repos du canal, et qui ont initialement permis de suggérer le modèle à vis hélicoïdale selon lequel le S4 traverse toute la membrane pendant son mouvement (Larsson et al., 1996). En effet, des crevasses présentes du côté intra et extracellulaire permettraient d'exposer les résidus de S4 d'un côté ou de l'autre de la membrane grâce à la rotation du S4.

➤ Vers un modèle consensuel du mouvement du S4

Les trois modèles décrits ci-dessus sur le mouvement du S4 diffèrent entre eux, aussi bien sur la nature du mouvement que sur son amplitude. Ces différences, notamment sur l'amplitude du mouvement du S4 allant de ~ 2 Å sur Kv1.2 (Cha et al., 1999) et *Shaker* (Chanda et al., 2005) à ~ 15 Å sur *Shaker* (Larsson et al., 1996) peuvent s'expliquer par

l'utilisation de techniques variées avec des limites de détections différentes. Certaines techniques telles que le FRET peuvent sous-estimer la distance du mouvement en ne prenant en compte que des conformations rares lorsque les fluorophores donneur et accepteur sont très proches l'un de l'autre. D'autres techniques utilisées dans ces études du mouvement du S4, telles que le « cross-linking » et le ciblage par la biotine, peuvent surestimer la distance du mouvement en stabilisant de façon covalente des conformations rares et extrêmes dans lesquelles une cystéine est exceptionnellement accessible du côté intra ou extracellulaire (Tombola et al., 2006). Par ailleurs, le mouvement extrême de ~ 20 Å décrit sur le canal procaryote KvAP (Ruta et al., 2005) est également incomparable aux mouvements suggérés sur les canaux eucaryotes de la famille *Shaker*, du fait d'une conformation non-native de la structure de KvAP (Lee et al., 2005b).

Très récemment, un modèle structural des états de repos, intermédiaire et activé du domaine voltage sensor a été établi à partir de la première structure cristallographique d'un canal sodique voltage-dépendant (Payandeh et al., 2011a). Selon ce dernier modèle structural, la translation du S4 est de l'ordre de 6 à 8 Å et sa rotation de 30° (Yarov-Yarovoy et al., 2012). Plusieurs études supportent l'idée d'un mouvement du S4 commun à tous les canaux ioniques. Cependant, un mouvement du S4 avec des caractéristiques propres pour chaque type ou famille de canaux ne peut pas être exclu étant donné leurs différences à la fois structurales et fonctionnelles. En effet, le nombre et la disposition des charges positives du S4 ne sont pas identiques entre les différents canaux ioniques. Ces différences pourraient éventuellement expliquer leurs différences fonctionnelles, notamment sur la voltage-dépendance de leur activation. Cette différence sur leur voltage-dépendance se traduit par des valeurs de potentiel de demi-activation ($V_{1/2}$) différentes : par exemple, -10 mV pour Kv1.2 contre -51 mV pour KvAP (Ruta et al., 2003; Watanabe et al., 2007).

Afin d'apporter des réponses plus complètes sur ce mouvement du segment S4 à l'origine de la dépendance au potentiel des canaux ioniques, des structures cristallographiques de ces protéines en entier et à différents états (repos et activé) sont nécessaires. A l'heure actuelle, seuls les modèles par homologie et les simulations par dynamique moléculaire permettent de suggérer les caractéristiques du mouvement du S4 dans tous ses différents états. Mais les données issues de ces approches sont à considérer avec prudence du fait de leur caractère purement prédictif.

b) Ouverture de la porte d'activation

Dans tous les canaux ioniques, à l'exception des canaux CNG (Flynn and Zagotta, 2001), la porte d'activation située du côté cytosolique du pore constitue la zone principale où ont lieu les processus d'ouverture et de fermeture du canal. Toutes les structures cristallographiques des canaux ioniques déterminées à ce jour (Cuello et al., 2010; Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2002a; Long et al., 2005a; McCusker et al., 2012; Payandeh et al., 2011a, 2012; Zhang et al., 2012) illustrent que cette porte d'activation est formée par le croisement entre les extrémités intracellulaires des segments S6 de chaque domaine ou sous-unité. Cependant, le mécanisme moléculaire régissant son fonctionnement est loin d'être le même pour tous les canaux ioniques. Grâce à des approches de biologie structurale et de mutagenèse dirigée, associées à des études fonctionnelles, plusieurs mécanismes ont été proposés sur l'ouverture-fermeture de cette porte d'activation.

➤ Le modèle de l'articulation au niveau d'une glycine

La première structure cristallographique d'un canal ionique a été déterminée sur le canal potassique bactérien KcsA, constitué de deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2) similaires aux segments S5 et S6 des canaux voltages-dépendants (Doyle et al., 1998). La comparaison de cette structure de KcsA à l'état fermé, avec celle d'un autre canal potassique bactérien, MthK, à l'état ouvert (Jiang et al., 2002a), a permis d'établir un modèle sur le mécanisme d'ouverture et fermeture de la porte d'activation (Figure 15). Selon ce modèle, l'ouverture de la porte d'activation des canaux potassiques nécessite un ploiement des segments S6 au niveau d'un résidu Glycine (Gly, en position 83 dans MthK). Ce fléchissement entraînerait l'éloignement des extrémités intracellulaires des S6 entre elles, permettant ainsi l'ouverture de la porte d'activation (Jiang et al., 2002a, 2002b).

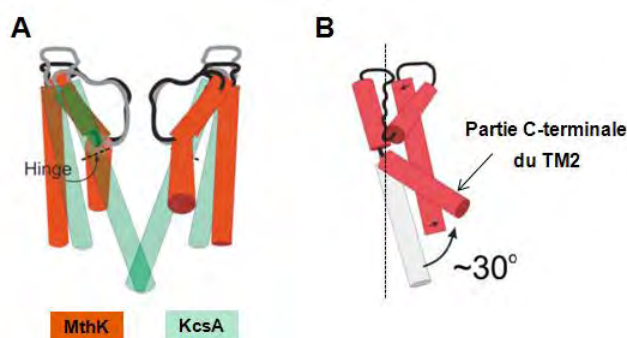


Figure 15 : Comparaison entre les structures des canaux KcsA et MthK.

(A) Superposition de KcsA (vert) et MthK (orange). Le filtre de sélectivité a servi de point de référence. Pour plus de clarté, seules deux sous-unités sur quatre sont représentées. **(B)** Comparaison d'une sous-unité de chacun des deux structures vues par rapport à l'axe central de symétrie du tétramère (ligne pointillée noire). D'après (Perozo, 2002).

L'importance du résidu Glycine 219 (correspondant au Glycine 83 sur MthK) sur l'ouverture de la porte d'activation a été démontrée sur le canal sodique bactérien NaChBac en utilisant une approche de mutagenèse dirigée associée à des études fonctionnelles (Zhao et al., 2004a, 2004b). En effet, la substitution de ce résidu Glycine 219 de l'hélice S6 par un résidu Proline pour favoriser la courbure rigide à cette position (Barlow and Thornton, 1988), entraîne une stabilisation de l'état ouvert du canal et ralentit considérablement sa cinétique de désactivation (Zhao et al., 2004a). Ces effets semblent être très spécifiques à la fois de la position et de la nature de la mutation puisqu'aucun effet majeur n'a été observé suite à la substitution des résidus voisins Isoleucine 218 et Tyrosine 220 en Proline ou celle de la Glycine 219 par une Alanine (Zhao et al., 2004a, 2004b).

Etant donné le caractère très conservé de cette Glycine sur les canaux potassiques à 2 domaines transmembranaires ainsi que sur certains canaux potassiques, calciques et sodiques à 6 domaines transmembranaires, il a été suggéré que ce mécanisme d'ouverture de la porte d'activation basé sur l'articulation de l'hélice S6 au niveau d'une Glycine, est généralisable à tous les canaux ioniques (Zhao et al., 2004a). Cependant, ce modèle présente une limite majeure : il est basé sur la comparaison entre des structures statiques de deux canaux potassiques différents (KcsA et MthK) dont les mécanismes d'ouverture de la porte d'activation ne sont peut être pas identiques, auquel cas ce premier mécanisme est contestable. D'autre part, le résidu Gly constituant l'articulation du segment S6 n'est pas conservé sur certains canaux ioniques, ce qui suggère l'existence d'un ou plusieurs autres modèles d'ouverture et fermeture de la porte d'activation.

➤ **Le modèle de coude au niveau du motif Pro-X-Pro**

Ce modèle a été proposé suite à des études réalisées sur le canal potassique *Shaker* dans lequel le résidu Gly constituant la charnière sur KcsA et MthK n'est pas conservé. Il a été montré qu'un ion Cd^{2+} est capable d'interagir simultanément avec une cystéine introduite en position 476 d'une sous-unité, et l'histidine native en position 486 d'une autre sous-unité, pour former un pont métallique capable de stabiliser l'état ouvert du canal *Shaker*. La formation de ce pont reflète une proximité entre ces deux résidus situés du côté cytosolique du S6 (Holmgren et al., 1998). Or, ces résidus sont éloignés de 13 Å sur la structure de *Shaker* par homologie avec celle de KcsA (Figure 16A), d'où l'existence d'un autre modèle d'ouverture-fermeture du pore pour *Shaker*.

Une autre étude a montré que des bloqueurs du pore sont capables de protéger des cystéines introduites sur la partie cytosolique de S6 contre des composés chimiques pouvant interagir avec ces cystéines. De façon intéressante, cette protection ne dépend pas de l'état ouvert ou fermé du canal (del Camino et al., 2000). Cette deuxième étude est elle aussi

incompatible avec le modèle de la charnière au niveau d'une glycine car l'accessibilité des bloqueurs à des cystéines situées entre les positions 470 et 478, et ce de façon indépendante de l'état ouvert ou fermé du canal, n'est pas cohérente avec la zone de croisement des S6 proposée sur KcsA à l'état fermé. En revanche, ces résultats pourraient s'expliquer par la formation d'un coude rigide au-dessus de la position 470. Ainsi, l'équipe de Gary Yellen, à l'origine de ces deux études sur *Shaker*, a proposé que l'ouverture-fermeture du pore de ce canal implique une structure en coude formée par le motif Pro-X-Pro (où X est n'importe quel acide aminé) situé sur le côté cytoplasmique de S6 et en amont de la position 470 (Figure 16B).

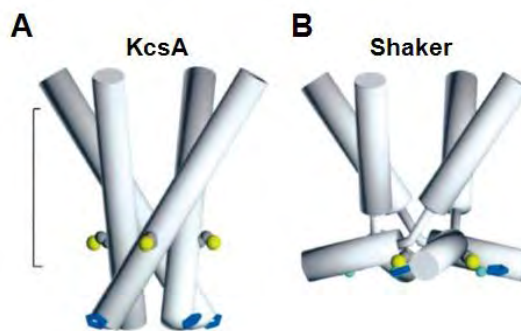


Figure 16 : Comparaison entre KcsA et le module PD de *Shaker*.

(A) Modèle de Shaker issu de la structure de KcsA. Dans ce modèle, le résidu H486 (bleu foncé) est trop éloigné du résidu V476 (sphère jaune) pour coordonner le l'ion cadmium (sphère bleue ciel). **(B)** Modèle de coude lié au motif PXP dans le canal Shaker. Dans ce modèle, H486 est suffisamment proche de V476 pour coordonner le cadmium. Le crochet représente la position de la membrane plasmique. D'après (del Camino et al., 2000).

Etant donné la conservation de ce motif Pro-X-Pro dans tous les Kv, ce modèle de fonctionnement du pore serait identique pour tous ces canaux (del Camino et al., 2000). Ce modèle a été ensuite confirmé par la structure cristallographique de Kv1.2 dans laquelle ce motif Pro-X-Pro constitue la zone de courbure rigide des S6 (Long et al., 2005a).

➤ **Le modèle de rotation autour d'une thréonine**

En comparant les structures cristallographiques des canaux sodiques bactériens NavAb et NavMs supposés être à l'état inactivé et ouvert, respectivement, une étude récente a proposé un nouveau mécanisme d'ouverture de la porte d'activation (McCusker et al., 2012). D'après cette étude, l'ouverture de la porte d'activation est basée sur un mouvement de rotation de la région intracellulaire du S6 au niveau d'un résidu Thr en position 209, qui permettrait l'éloignement des extrémités intracellulaires du S6 par rapport à l'axe du pore. Cette étude comparative montre une ouverture d'un diamètre suffisant (>8 Å) pour laisser

passer des ions Na⁺ hydratés (~7.8 Å de diamètre). Cependant, comme expliqué ci-dessus, la structure de NavMs supposée à l'état ouvert peut ne pas refléter un état natif du canal du fait de l'absence de la région cytosolique des segments S6. Par conséquent, ce modèle est à considérer avec précaution, d'autant plus qu'il n'y a eu aucune donnée fonctionnelle en faveur de ce modèle. Il serait intéressant d'une part, d'étudier les effets de mutations de ce résidu Thr sur la probabilité d'ouverture du canal, et d'autre part de déterminer la structure du pore en entier avec ou sans des mutations sur ce résidu Thr en position 209.

4- Couplage entre les modules VSD et PD

Le couplage entre les modules VSD et PD consiste à transférer le mouvement du segment S4 en ouverture-fermeture du pore. Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires impliqués dans ce couplage entre les modules VSD et PD.

a) Médiation par la boucle S4-S5

L'interaction physique entre la boucle S4-S5 (appelée ici B4-5) et la partie C-terminale de S6 (appelée ici TS6), ainsi que le rôle de cette interaction dans le couplage entre le mouvement du S4 et l'ouverture de la porte d'activation, ont été étudiés dans plusieurs canaux ioniques voltage-dépendants en utilisant différentes techniques : mutagenèse dirigée associée à des études fonctionnelles sur une protéine chimère de *Shaker* et KcsA (Lu et al., 2001, 2002), alanine-scanning de B4-5 et TS6 sur Kv4.2 (Barghaan and Bähring, 2009) et cross-linking de B4-5 et TS6 sur hERG (Ferrer et al., 2006), mais aussi sur spHCN1 (Prole and Yellen, 2006). Toutes ces approches ont permis de démontrer le rôle majeur de B4-5 et TS6 sur le couplage entre le voltage-sensor et S6. Cette interaction a été également confirmée par la structure cristallographique du canal potassique voltage-dépendants Kv1.2 (Long et al., 2005a).

L'ensemble de ces études indiquent clairement que le mouvement du segment voltage-sensor et l'ouverture de la porte d'activation sont couplés à travers l'interaction entre B4-5 et TS6. Reste à savoir comment cette interaction entre B4-5 et TS6 fait le lien entre l'activation du VSD et l'ouverture du pore. Ainsi, plusieurs modèles d'interaction ont été proposés.

- **Modèle de « levier mécanique »**

Dans une étude utilisant une protéine chimérique dans laquelle le module PD de *Shaker* a été remplacé par celui de KcsA, il a été montré que B4-5 et TS6 jouent un rôle crucial dans la dépendance au potentiel des canaux ioniques (Lu et al., 2001, 2002). La fermeture incomplète du pore dans la protéine chimérique *Shaker-KcsA* dont B4-5 et TS6 sont issus de canaux différents, suggère que ces 2 régions interagissent à l'état fermé du canal. En supposant que les segments voltage sensor S4 sont couplés au pore dans les canaux *Shaker* de façon non-allostérique, les auteurs de cette étude ont proposé le modèle de « levier mécanique » dans lequel les B4-5 poussent sur les TS6 à des potentiels repolarisant, lorsque le canal est fermé. A l'inverse, lorsque la membrane est dépolarisée, les segments S4 se déplacent vers la face externe de la membrane, empêchant la constriction du pore par les B4-5, ce qui entraîne l'ouverture de la porte d'activation (Figure 17). La structure cristallographique correspondant à l'état ouvert de Kv1.2 (Long et al., 2005a), un homologue de *Shaker* chez les mammifères, est parfaitement cohérente avec ce mécanisme selon lequel tous les segments S4 doivent être activés pour permettre l'ouverture du pore.

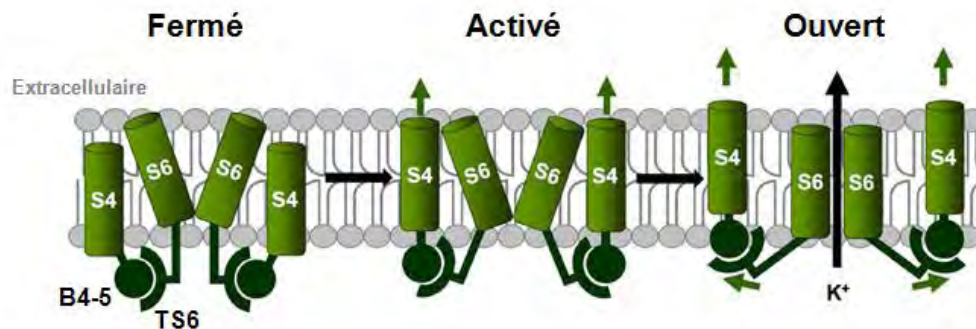


Figure 17 : Modèle de levier mécanique.

Ce modèle propose une interaction forte et permanente entre la boucle S4-S5 (B4-5) et la partie C-terminale de S6 (TS6) comme étant à la base du couplage entre le mouvement du segment voltage-sensor S4 et l'ouverture du pore.

Dans d'autres études fonctionnelles sur *Shaker*, il a été montré que des mutations dans B4-5 ou TS6 ont des effets considérables sur la phase lente du courant de porte « Off » (Batulan et al., 2010). Ce courant de porte « Off » correspond au mouvement des charges positives de S4 de l'état activé à l'état de repos (Figure 18). De plus, il a été montré que la fermeture de la porte d'activation a un impact sur ce courant de porte « Off ». L'interprétation de ces résultats a été que l'interaction entre B4-5 et TS6 maintient les S4 en position « activée » et stabilisent ainsi l'état ouvert du canal *Shaker* (Batulan et al., 2010). La même équipe a identifié d'autres mutations dans B4-5 et TS6 qui découplent complètement le

mouvement du S4 de l'ouverture du pore. Cela suggère que le module PD exerce une influence mécanique sur le mouvement du module VSD. En effet, en présence de ces mutations entraînant une perte de fonction sur l'ouverture du pore, les segments S4 sont activés à des potentiels plus négatifs, comparé au canal sauvage (les S4 sont plus libres pour bouger), ce qui se traduit par un décalage de la voltage-dépendance des courants de porte vers des potentiels plus négatifs et donc un gain de fonction sur le module VSD (Haddad and Blunck, 2011). Cet impact du découplage entre les modules VSD et PD sur le mouvement des S4 suggère une interaction forte et permanente entre B4-5 et TS6 sur le canal sauvage.

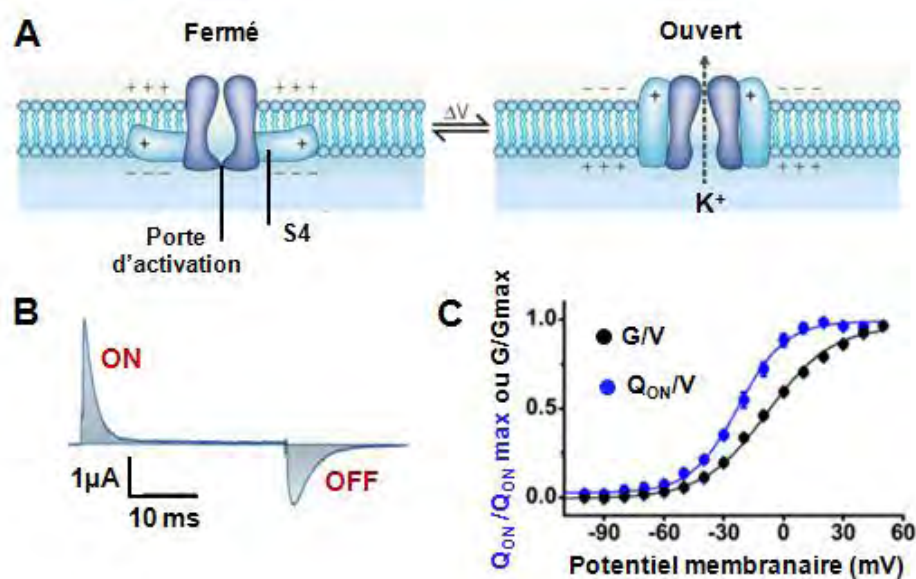


Figure 18 : Mouvement du segment S4 et courant de porte.

(A) Représentation schématique du mouvement du segment S4 d'un côté à l'autre de la membrane entre les états fermé et ouvert du canal *Shaker*. (B) Exemple d'enregistrement de courant de porte. ON : courant de porte lors de la dépolarisation membranaire. OFF : courant de porte lors du retour des S4 en position de repos après la repolarisation membranaire. (C) Exemple de courbes montrant la voltage-dépendance du courant de porte ON (Q_{ON}/V) et celle de la conductance ionique (G/V) du canal KCNQ1.

Sur le plan structural, l'interaction entre B4-5 et TS6 a été observée sur la structure cristallographique de Kv1.2 à l'état ouvert, ce qui est cohérent avec le couplage électromécanique entre le mouvement du S4 et le pore. Dans cette première et seule structure cristallographique d'un Kv eucaryote, les S4 ont été suggérés comme étant responsables d'un travail mécanique exercé sur le pore à travers les B4-5, lesquels sont positionnées de façon à serrer ou à dilater la partie interne des hélices S6 (Long et al., 2005a).

Les auteurs de cette étude ont ensuite déterminé, grâce à une approche de modélisation par homologie, la structure de ce même canal mais cette fois-ci à l'état fermé, et y ont observé que l'interaction entre B4-5 et TS6 est toujours existante. Ces résultats sont cohérents avec le modèle de « levier mécanique » selon lequel le segment B4-5 interagit de façon permanente avec TS6 pour faire le lien entre le mouvement du S4 et l'ouverture-fermeture de la porte d'activation (Long et al., 2005b). Cependant, il est important de signaler la possibilité que la structure cristallographique de Kv1.2 en faveur de ce modèle, ne corresponde pas à une conformation native. En effet, cette structure montre une position du S4 par rapport au pore qui est incompatible avec la proximité entre le premier résidu Arg du S4 (R249) et le résidu A351 du pore (Lewis et al., 2008). Cette proximité entre R249 et A351 a été démontrée en générant des ponts métalliques de Zn^{2+} ou de Cd^{2+} entre ces deux positions après avoir muté leurs résidus en Histidine. Ces résultats confirment que ces deux résidus sont très proches lorsque le canal est à l'état ouvert (Lewis et al., 2008). Toutefois, ces données fonctionnelles sont à considérer avec prudence car l'introduction de site de fixation d'ion métallique pourrait également entraîner le canal à une conformation non-native.

Dans ce modèle d'interaction forte et permanente entre B4-5 et TS6, il est facile de comprendre pourquoi la séquence de TS6 dans les canaux Kv est bien conservée. Cette région contient un motif (Pro-X-Pro) ou un résidu (Gly) à l'origine d'une courbure de l'hélice S6 nécessaire à une interaction optimale et permanente entre B4-5 et TS6 (del Camino et al., 2000; Jiang et al., 2002a, 2002b; Long et al., 2005a). Cependant, comme nous allons le voir sur le chapitre suivant, il semble que dans d'autres canaux voltage-dépendants, l'interaction entre B4-5 et TS6 n'est pas permanente et permet de stabiliser uniquement l'état ouvert ou l'état fermé du canal.

- **Modèle d'interaction labile**

Une approche de mutagenèse dirigée sur le canal potassique cardiaque hERG a permis de suggérer la proximité entre B4-5 et TS6 lorsque ce canal est fermé (Tristani-Firouzi et al., 2002). En effet, l'introduction de cystéines dans ces régions B4-5 et TS6 conduit à une diminution de l'amplitude du courant uniquement dans un environnement oxydant, et cet effet est d'autant plus prononcé que le potentiel de repos est très négatif, donc lorsque le canal est fermé. Cette voltage-dépendance de la stabilisation de l'état fermé du canal hERG par un pont disulfure entre B4-5 et TS6 est cohérente avec une interaction labile stabilisant uniquement l'état fermé du canal hERG sauvage (Ferrer et al., 2006). La spécificité entre les acides aminés impliqués dans cette interaction entre B4-5 et TS6 est un élément crucial

puisque une mutation ponctuelle (D540K) au niveau de B4-5 est suffisante pour déstabiliser considérablement la fermeture du canal, notamment à des potentiels hyperpolarisants (Sanguinetti and Xu, 1999). Et de façon intéressante, cet effet peut être corrigé par des mutations ponctuelles (R665A, R665Q ou R665D) situées au niveau de TS6 (Tristani-Firouzi et al., 2002).

Par ailleurs, d'autres études réalisées sur les canaux HCN et KAT1 sont cohérentes avec ce modèle d'interaction labile entre B4-5 et TS6. Ces canaux HCN et KAT1 ont la particularité d'être activés par des potentiels hyperpolarisants. Dans ce cas, la dépolarisation membranaire entraîne la désactivation de ces canaux tandis que l'hyperpolarisation conduit à leur activation (Moroni et al., 2000).

Une approche de scanning par des Alanines sur HCN2 a permis d'identifier 3 résidus de B4-5 (E324, Y331 et R339) jouant un rôle crucial dans la stabilisation de l'état fermé car la mutation de ces résidus rend le canal constitutivement ouvert (Chen et al., 2001). Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse d'une interaction labile entre B4-5 et TS6, impliquant des résidus bien spécifiques. Toutefois, ils n'expliquent pas l'inversion de la voltage-dépendance de ces canaux du fait que l'interaction entre B4-5 et TS6 stabilise l'état fermé, tout comme pour le canal hERG qui lui est, au contraire, activé par la dépolarisation. Une explication possible de cette inversion de la voltage-dépendance serait qu'une autre interaction entre B4-5 et TS6 stabilise l'état ouvert du canal à des potentiels hyperpolarisants et que cette interaction soit abolie lors de la dépolarisation, conduisant ainsi à la fermeture du canal. Cette hypothèse a été validée grâce à une approche de cross-linking sur le canal spHCN1 dans lequel il a été montré que le fait de forcer l'interaction entre B4-5 (F359) et la région cytosolique proche de TS6 (K482) élimine la désactivation du canal, suggérant que cette interaction stabilise son état ouvert (Prole and Yellen, 2006). Cependant, il est important de rappeler que ce type d'approche peut conduire à une conformation non-native du canal, ce qui fait que l'interprétation de ces résultats doit être faite avec beaucoup de précaution. La stabilisation de l'état ouvert (Prole and Yellen, 2006) ou fermé (Chen et al., 2001) de ces canaux HCN par des interactions spécifiques entre B4-5 et TS6 suggère un modèle plus complexe dans ce couplage entre le VSD et le PD. Ce modèle, qui sera développé par la suite, impliquerait des résidus différents en fonction de l'état ouvert ou fermé du canal et pourrait constituer un modèle consensuel.

Cette idée d'interaction différente entre B4-5 et TS6 à l'état fermé et à l'état ouvert a été suggérée dans une autre étude. Cette étude utilisant une approche de modélisation par homologie sur le canal KAT1 a montré que la fermeture du canal se fait via une répulsion entre B4-5 (R190, R197) et TS6 (R307, R310) tandis que son ouverture se fait lorsque B4-5 tourne autour d'elle-même de façon à permettre une interaction électrostatique entre D188 dans B4-5 et R307, R310 dans TS6 (Grabe et al., 2007). Mais une fois de plus, ces résultats

restent tout de même spéculatifs du fait que l'approche à partir de laquelle ils ont été obtenus est basée sur une modélisation par homologie avec un autre canal et non sur des données expérimentales sur le canal KAT1.

Tous ces résultats obtenus sur les canaux activés par l'hyperpolarisation (HCN et KAT1) sont cohérents avec l'idée d'une interaction labile et spécifique entre B4-5 et TS6. Cette spécificité est incohérente avec le fait que la fusion de deux protéines qui n'ont aucun rapport, à savoir le VSD de Ci-VSP et le canal potassique viral Kcv à deux domaines (correspondant au PD) permette de former un canal potassique chimérique voltage-dépendant qui s'ouvre et se ferme correctement (Arrigoni et al., 2013).

Enfin, des études fonctionnelles associées à des approches de mutagenèse dirigée sur le canal potassique cardiaque KCNQ1 ont montré que des mutations de résidus spécifiques au niveau de B4-5 ou de TS6, entraînent l'apparition d'un courant voltage-indépendant, suggérant que ces mutations diminuent l'interaction entre B4-5 et TS6 lorsque le canal est à l'état fermé (Boulet et al., 2007; Labro et al., 2011). Ces résultats suggèrent également une interaction labile et spécifique entre B4-5 et TS6 qui, comme pour le canal hERG, stabiliserait l'état fermé du canal KCNQ1.

Etant donné le caractère labile et spécifique de cette interaction entre B4-5 et TS6, il est très facile d'imaginer un modèle selon lequel B4-5 pourrait jouer le rôle d'un ligand capable de se fixer de façon spécifique à TS6 (son récepteur) pour stabiliser l'état fermé des canaux potassiques activés par la dépolarisation (Figure 19), ou l'état ouvert de ceux activés par l'hyperpolarisation. **Ainsi, mon deuxième projet de thèse a consisté à étudier l'application de ce nouveau modèle « ligand-récepteur » sur le canal KCNQ1.**

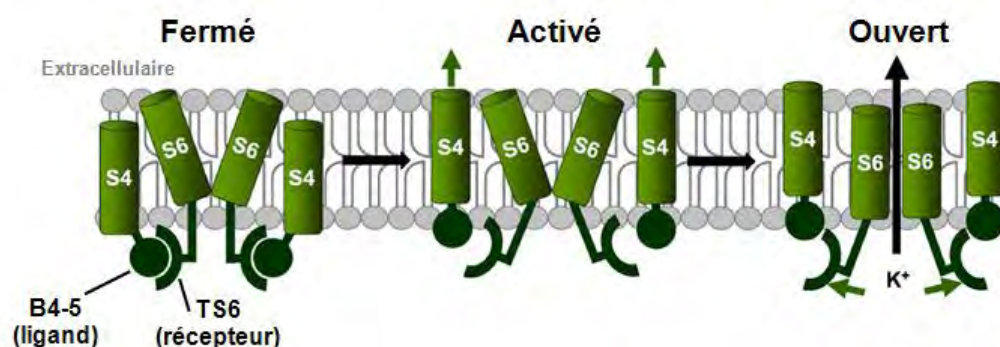


Figure 19 : Modèle de ligand-récepteur

Ce modèle propose une interaction labile et spécifique entre la boucle S4-S5 (B4-5) et la partie C-terminale de S6 (TS6), stabilisant la fermeture de la porte d'activation.

- **Le cas des canaux Nav et Cav**

Chez les eucaryotes, les canaux Nav et Cav résultent de la fusion entre quatre sous-unités différentes pour former un seul monomère à quatre domaines. Dans cette structure hétérotétramérique, chaque domaine partage la même architecture que les sous-unités des canaux Kv, à savoir six domaines transmembranaires (S1 à S6) avec S1-S4 formant le VSD, S4 étant riche en résidus positifs, et un PD formé par l'association des segments S5 et S6. Puisque la voltage-dépendance de ces canaux est générée par les mouvements des segments S4 en réponse aux variations du potentiel membranaire (Kurejová et al., 2007; Yang and Horn, 1995), tout comme les Kv, nous avons émis l'hypothèse que les mécanismes de dépendance au potentiel de ces canaux Nav et Cav d'une part, et Kv d'autre part, seraient identiques. Par conséquent, **le but de mon troisième projet de thèse est d'étudier l'application du modèle « ligand récepteur » sur les canaux sodiques eucaryote Nav1.4 et procaryote NavSp1.**

- **Vers un modèle consensuel**

La différence majeure entre le modèle de « levier mécanique » et celui d'interaction labile est que dans le premier, l'interaction entre B4-5 et TS6 est permanente et le mécanisme d'ouverture-fermeture du pore suite au mouvement du S4 est purement mécanique. En revanche, dans le second modèle, l'interaction entre B4-5 et TS6 est labile et implique des résidus bien spécifiques, ce qui permet une stabilisation d'un état bien précis (ouvert ou fermé) du canal. Toutefois, deux études récentes sur les canaux hERG et HCN montrent que l'interaction entre B4-5 et TS6 pourrait impliquer un modèle encore plus complexe que les modèles décrits ci-dessus (Kwan et al., 2012; Ng et al., 2012). Dans la première étude et dans un premier temps, la structure d'un peptide correspondant à B4-5 a été déterminée en solution et les auteurs ont observé que ce peptide contient une hélice amphipathique (de Asp 540 à Leu 550). A partir de ces données structurales, les auteurs ont utilisé une approche de mutagenèse par Alanine-scanning pour étudier le rôle des résidus constituant cette hélice amphipathique sur la fonction du canal hERG. C'est ainsi qu'ils ont montré que certains résidus de B4-5 sont impliqués dans la stabilisation des états ouvert ou fermé du canal, tandis que d'autres sont plutôt responsables des interactions stabilisant des états intermédiaires ou des états de transition très complexes (Ng et al., 2012). Il a donc été suggéré que B4-5 interagisse avec TS6 pour stabiliser différents états du canal hERG (comme pour le modèle de levier mécanique) et que ces interactions soient labiles et impliquent différents résidus bien précis de B4-5 en fonction de l'état du canal (comme pour le modèle d'interaction labile).

Une seconde étude réalisée sur le canal HCN d'oursin a consisté à introduire des cystéines au niveau de B4-5 et de la région cytosolique proche de TS6 (post-TS6) afin d'étudier les effets de ponts métalliques (Cd^{2+}) entre ces deux régions sur l'activité du canal. Les auteurs de cette étude ont observé que le fait de forcer l'interaction entre ces deux régions stabilise le canal à l'état ouvert ou à l'état fermé, en fonction de la position des paires de cystéines. En utilisant un concatémère dimérique de ce canal, il a été démontré qu'il y a une proximité entre B4-5 d'une sous-unité avec la région post-TS6 d'une sous-unité voisine, et ce aussi bien à l'état ouvert qu'à l'état fermé du canal (Kwan et al., 2012). Cette étude est cohérente avec des résultats précédemment observés sur d'autres canaux HCN montrant que des interactions entre B4-5 et TS6 ou la région post-TS6 sont impliquées dans les états ouvert et fermé du canal (Chen et al., 2001; Prole and Yellen, 2006). Toutes ces études laissent suggérer un modèle consensuel selon lequel les B4-5 interagiraient avec des TS6 ou des régions post-TS6 des sous-unités voisines pour stabiliser les différents états du canal, et que ces interactions impliqueraient des résidus distincts en fonction de l'état du canal.

En somme, toutes les études citées sur ce chapitre montrent le rôle de B4-5 dans la médiation entre les modules VSD et PD, à l'origine de l'ouverture-fermeture des canaux ioniques voltage-dépendants. La prochaine étape de recherche sur ce sujet consistera à éclaircir les mécanismes moléculaires de cette interaction grâce à la détermination de nouvelles structures cristallographiques à haute résolution, associées à des approches fonctionnelles et bioinformatiques. Par ailleurs, une nouvelle hypothèse a été émise sur la participation d'un autre acteur, un phospholipide membranaire, dans la médiation entre les modules VSD et PD.

b) Médiation par le PIP_2

Le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) est un phospholipide chargé négativement et situé dans la face interne de la membrane plasmique. Il joue un rôle majeur dans des processus cellulaires divers et variés. En effet, le PIP_2 a été montré comme étant impliqué dans la production des messagers secondaires inositol trisphosphate et diacylglysérol, dans l'organisation du cytosquelette, dans le trafic des protéines à la membranaire, ainsi que dans la régulation de l'activité des canaux ioniques et transporteurs (Hilgemann et al., 2001; McLaughlin et al., 2002). Parmi les canaux régulés par le PIP_2 , on retrouve à la fois des canaux voltage-dépendants et non-voltage-dépendants : Kv (Bian et al., 2001b; Loussouarn et al., 2003; Park et al., 2005; Rodriguez et al., 2010b; Zhang et al., 2003), Cav (Wu et al., 2002), HCN (Flynn and Zagotta, 2011b), Kir (Hilgemann and Ball, 1996; Huang et al., 1998b)

et TRP (Rohács et al., 2005).

Malgré cette variété de canaux sensibles au PIP_2 , les mécanismes moléculaires à la base de cette régulation ne sont pas encore bien établis et ont fait l'objet de quelques études biophysiques. Plusieurs hypothèses ont été émises sur les mécanismes de régulation des canaux voltage-dépendants par ce phospholipide. Une hypothèse propose que le PIP_2 agisse sur un des modules, notamment le PD. Une autre hypothèse suggère que le PIP_2 réalise le couplage entre les modules VSD et PD (Zaydman et al., 2013).

- **Stabilisation de l'ouverture de la porte d'activation**

Dans tous les canaux sensibles au PIP_2 cités ci-dessus, il a été montré que ce phospholipide a un effet gain-de-fonction sur l'amplitude du courant. Plusieurs études fonctionnelles ont montré que cet effet activateur est régi par une stabilisation, par le PIP_2 , de l'ouverture de la porte d'activation.

La première étude sur les mécanismes de régulation des canaux par le PIP_2 a été réalisée sur Kir6.2, un canal potassique non-voltage-dépendant et à deux domaines transmembranaires M1 et M2 (équivalents à S5 et S6 dans les Kv). Dans cette étude, il a été montré que l'effet activateur du PIP_2 passe par une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal en présence de ce phospholipide dont le site de fixation serait au niveau de résidus positifs situés à l'extrémité C-terminale proche du segment M2 (Shyng and Nichols, 1998). Ces résultats ont été confirmés par la détermination des structures cristallographiques de canaux Kir en présence et en absence de PIP_2 (Hansen et al., 2011; Whorton and MacKinnon, 2011, 2013). Ces données structurales ont permis de montrer que le PIP_2 exerce son rôle agoniste du canal en interagissant avec des résidus positifs situés au niveau de l'interface entre les domaines transmembranaire et cytoplasmique, et que cette interaction favoriserait l'état ouvert du canal.

Ce modèle de régulation des canaux ioniques par le PIP_2 est cohérent avec des études fonctionnelles réalisées dans notre laboratoire sur les Kv cardiaques KCNQ1 et hERG, dans lesquelles il a été montré que l'effet activateur du PIP_2 est lié à une augmentation de l'amplitude du courant et à un ralentissement des cinétiques de désactivation (Loussouarn et al., 2003; Rodriguez et al., 2010b). Une approche de mutagenèse associée à des études fonctionnelles a permis d'identifier sur l'extrémité C-terminale de KCNQ1, des résidus positifs interagissant avec les charges négatives du PIP_2 . De façon intéressante, la mutation de ces résidus diminue l'affinité du canal à ce phospholipide (Park et al., 2005). Une autre étude a par la suite montré, grâce à des techniques de biochimie et d'électrophysiologie, que la mutation d'autres résidus positifs situés sur la région proximale de l'extrémité C-terminale de

KCNQ1 diminue l'interaction entre le canal et le PIP₂ (Thomas et al., 2011b). Etant donné la localisation de ces résidus positifs, ces deux études sont cohérentes avec l'effet activateur du PIP₂ par stabilisation de l'ouverture du canal KCNQ1 (Loussouarn et al., 2003).

Cependant, il a été montré que la régulation de ce canal KCNQ1 par le PIP₂ implique également un résidu positif situé sur B4-5, suggérant un rôle de ce phospholipide dans le couplage entre le VSD et le PD (Park et al., 2005). De plus, des études fonctionnelles sur la régulation des canaux Cav et HCN par le PIP₂ ont montré que ce phospholipide module à la fois l'amplitude du courant et la voltage-dépendance de l'activation (Flynn and Zagotta, 2011b; Wu et al., 2002). Deux hypothèses permettent d'expliquer ces effets du PIP₂ sur deux paramètres distincts de l'activité du canal, à savoir l'activation du VSD et l'ouverture-fermeture du PD : Soit le PIP₂ module séparément le mouvement du S4 et l'ouverture-fermeture du pore, via deux modes d'action distincts, soit le PIP₂ module le couplage entre ces deux processus, comme proposé ci-dessous.

- **Médiation directe du couplage par le PIP₂**

Une étude très récemment publiée s'est intéressée au rôle du PIP₂ dans le couplage électromécanique entre les modules VSD et PD du canal KCNQ1 (Zaydman et al., 2013). Dans cette étude, la technique de fluorimétrie à potentiel imposé permet de mesurer le mouvement de S4 sur lequel est attaché un fluorophore. L'intensité de la fluorescence étant corrélée au niveau d'hydrophobicité de l'environnement dans lequel se trouve le fluorophore, on peut construire une courbe F-V qui reflète la voltage-dépendance des mouvements du S4. Les auteurs ont utilisé dans cette étude, la Ci-VSP pour diminuer le PIP₂ en variant le potentiel membranaire. Ces variations de la concentration du PIP₂ affectent considérablement l'amplitude du courant potassique sans aucun effet sur la courbe F-V correspondant à la voltage-dépendance du mouvement du S4. Ce résultat montre donc que le PIP₂ n'est pas nécessaire à l'activation des VSD. Un mutant L353K de KCNQ1 provoque un découplage entre le VSD et le PD rendant le pore constitutivement ouvert (Boulet et al., 2007). Dans ce mutant, l'application de PIP₂ a un effet gain de fonction sur la courbe F-V, comme si le PIP₂ permettait de transférer le gain de fonction du pore vers le VSD. Cette observation a conduit les auteurs de cette étude à suggérer que le PIP₂ joue un rôle dans le couplage entre ces deux modules.

Cependant, cette interprétation est contradictoire aux résultats de leur première expérience montrant qu'un effet du PIP₂ sur l'amplitude du courant n'a aucun impact sur le mouvement de S4. En effet, une étude réalisée sur le canal *Shaker* a montré que l'introduction d'une mutation au niveau du pore, permettant de découpler le VSD du PD, affecte le mouvement

des S4 qui deviennent plus facilement activables (Haddad and Blunck, 2011). De ce fait, on peut supposer que dans le cas de KCNQ1, si le PIP_2 modulait le couplage entre le VSD et le PD, la diminution du PIP_2 entrainerait un découplage entre VSD et PD et par conséquent, une altération du mouvement des S4. Pour éviter de comparer des canaux aux propriétés biophysiques différentes, il serait intéressant de vérifier si la même chose existe sur *Shaker*. C'est ce que j'ai fait lors de mon projet n°1.

Les auteurs de cette nouvelle étude ont ensuite utilisé un modèle mathématique suggérant que les effets du PIP_2 sur KCNQ1 impliquent une régulation directe du couplage entre les VSD et les PD par ce phospholipide et sans effet direct sur les modules eux-mêmes. Cette hypothèse est contradictoire à une autre étude réalisée sur ce même canal et montrant que le PIP_2 agit directement sur le pore pour stabiliser le canal à l'état ouvert (Loussouarn et al., 2003). Cette contradiction pourrait en partie s'expliquer par la différence d'approches expérimentales entre ces deux études. La première étude utilise la configuration inside-out de la technique de patch clamp, avec des cellules de mammifères et l'addition de PIP_2 exogène directement sur la face interne de la membrane. En revanche, cette nouvelle étude utilise la configuration cellule entière de la technique de double électrode avec des oocytes de xénope et une phosphatase voltage-dépendante (Ci-VSP) pour faire varier le niveau de PIP_2 membranaire.

Enfin, une approche de mutagenèse dirigée associée à des études fonctionnelles a permis aux auteurs de cette nouvelle étude, de déterminer le site de fixation du PIP_2 au niveau de B4-5. Par conséquent, ils ont proposé un nouveau modèle de régulation du canal KCNQ1 par le PIP_2 . Selon ce modèle, le PIP_2 se fixe à l'interface entre le VSD et le PD, ce qui lui permet, grâce à ses charges négatives, d'empêcher les répulsions entre les résidus chargés positivement situés au niveau de ces modules VSD et PD (Figure 20). Ceci permettrait donc au PIP_2 de retenir ces deux modules ensemble et de faire transférer entre eux les énergies issues de leurs changements conformationnels (Zaydman et al., 2013).

En conclusion, cette étude suggère que le PIP_2 joue le rôle de médiateur dans le couplage entre les modules VSD et PD.

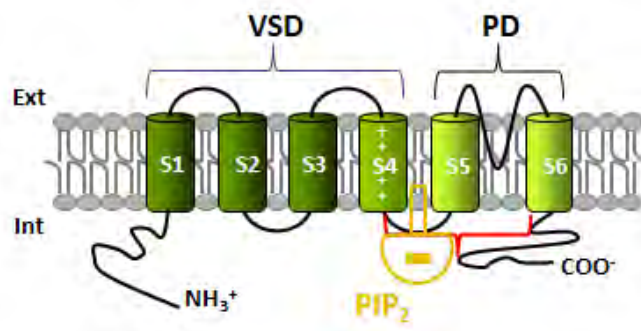


Figure 20 : Modèle de médiation directe du couplage entre les modules VSD et PD par le le PIP_2 .

La proposition de cette nouvelle hypothèse de médiation du couplage entre VSD et PD par le PIP_2 reflète le manque d'informations sur les mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux ioniques par le PIP_2 . Par conséquent, **mon premier projet de thèse s'est focalisé sur l'étude de ces mécanismes de régulation des canaux ioniques par le PIP_2 en utilisant le canal *Shaker* comme modèle d'étude.** Ce projet a consisté à évaluer si dans ce canal, le PIP_2 module séparément le mouvement du S4 et l'ouverture-fermeture du pore via deux mécanismes distincts.

- **Le canal potassique *Shaker* : un bon modèle d'étude**

Le gène *Shaker* issu de *Drosophila melanogaster* est le premier gène codant pour un canal potassique voltage-dépendant à être cloné (Tempel et al., 1987). Ce clonage a largement contribué, d'une part à l'identification de la superfamille des Kv, canaux ioniques homologues de *Shaker* chez les vertébrés, et d'autre part à une compréhension du rôle des Kv dans les pathologies humaines. Le canal *Shaker* est l'un des canaux potassiques voltage-dépendants dont les mécanismes de fonction sont largement étudiés. Par conséquent, il sert souvent de modèle dans les études de la voltage-dépendance des canaux ioniques en général.

Comme tout Kv, il a une structure homotétramérique et chaque sous-unité est constituée de deux modules (VSD et PD) reliés entre eux par B4-5. Des modèles cinétiques basés sur l'étude des paramètres biophysiques de *Shaker* et résumant le comportement macroscopique de ses courants, ont permis de prédire que le fonctionnement de ce canal nécessite plusieurs mouvements des VSDs relativement indépendants, entre leurs états de repos et activé, suivis d'une transition concertée permettant à la porte d'activation au niveau du PD de passer de l'état fermé à l'état ouvert (Bezanilla et al., 1994; Hoshi et al., 1994; Stefani et al., 1994; Zagotta et al., 1994a, 1994b).

Par ailleurs, ce canal *Shaker*, comme tout canal voltage-dépendant, contient un segment voltage-sensor (S4) riche en résidus chargés positivement et dont les mouvements en réponse aux variations du potentiel membranaire sont à l'origine de l'activité voltage-dépendante du canal. Ces mouvements des charges positives du S4 à travers le champ électrique membranaire, aussi appelés courant de porte, sont à la base de la dépendance au potentiel du canal. De façon intéressante, ces courants de porte sont beaucoup plus facilement mesurables dans le canal *Shaker*, comparés aux autres canaux ioniques. De plus, il a été montré que la mutation W434F au niveau du PD de *Shaker* rend le canal non-perméable aux ions et ce, sans affecter les mouvements des charges du S4, ce qui permet de mieux détecter les courants de porte (Perozo et al., 1993). Ainsi, ce canal *Shaker*, et

notamment son mutant W434F, représente un très bon modèle pour l'étudier le mouvement des charges positives de S4, par la technique de patch clamp. Enfin, un autre mutant Shaker-IR-A359C-C445V permet de fixer un fluorophore sur la face extracellulaire de S4 et mesurer les variations de la fluorescence en fonction des mouvements de ce segment voltage-sensor. Ce mutant permet ainsi de mesurer simultanément le mouvement du S4 et le courant ionique, par la technique de fluorimétrie à potentiel imposé (Cha and Bezanilla, 1997; Mannuzzu et al., 1996).

De plus, comme Haddad and Blunck ont montré que dans *Shaker*, un découplage VSD/PD « libère » les S4 et provoque un gain de fonction sur la voltage-dépendance du mouvement de S4 (cf ci-dessus), nous pouvons déterminer si le PIP₂ réalise ou non un couplage entre les deux modules.

En somme, le canal potassique *Shaker* représente un bon modèle d'étude fonctionnelle des changements conformationnels du VSD à l'origine de l'ouverture-fermeture du pore. Nous avons par conséquent, utilisé ce modèle pour étudier les effets potentiels du PIP₂ sur le mouvement du S4 afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux ioniques par ce phospholipide membranaire.

OBJECTIFS

Projet 1

Mon premier projet de thèse s'est focalisé sur l'étude des mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux potassiques par le PIP_2 , en utilisant comme modèle le canal potassique *Shaker* (article 1).

Projet 2

Mon deuxième projet de thèse consistait à étudier les mécanismes de dépendance au potentiel du canal potassique cardiaque KCNQ1 (article 2).

Projet 3

Mon troisième projet de thèse avait pour but de vérifier si le mécanisme de dépendance au potentiel établi pour KCNQ1 est applicable aux canaux sodiques eucaryote (Nav1.4) et procaryote (NavSp1).

RESULTATS

Projet 1 :

Etude des mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux potassiques voltage-dépendants par le PIP₂
--

Introduction

Comme décrit dans l'introduction générale, le PIP₂ est un phospholipide membranaire impliqué dans la régulation de différentes fonctions cellulaires. Ce phospholipide joue également un rôle majeur dans la régulation de l'activité des canaux ioniques (Hilgemann et al., 2001; Logothetis et al., 2010b; McLaughlin et al., 2002). Quelques études ont suggéré un rôle physiopathologique de l'interaction PIP₂-canal (Li et al., 2011; Park et al., 2005). L'interaction de ce phospholipide avec des canaux ioniques a été illustrée par des études structurales réalisés sur des canaux Kir (Hansen et al., 2011; Whorton and MacKinnon, 2011, 2013). Une étude biophysique sur le canal potassique Kir6.2 a montré que le PIP₂ active ce canal via une stabilisation de son état ouvert, ce qui se traduit par une augmentation de sa probabilité d'ouverture et donc de l'amplitude du courant (Shyng and Nichols, 1998). De part sa constitution par deux segments transmembranaires (M1 et M2, équivalents à S5 et S6 chez les Kv), ce canal KATP Kir6.2 a une structure comparable à celle du module PD des Kv. De façon intéressante, le module PD du canal potassique KCNQ1, tout comme Kir6.2, est activé par le PIP₂, ce qui se traduit par une augmentation de l'amplitude du courant (Loussouarn et al., 2003). Des approches de mutagenèse dirigée associées à des études fonctionnelles sur ce canal KCNQ1 ont permis d'identifier des résidus positifs au niveau de TS6, mais aussi un résidu de B4-5, tous impliqués dans la régulation du canal par le PIP₂ (Park et al., 2005). La région B4-5 des Kv étant comparable à la région N-terminale des KATP, les résultats de cette dernière étude sont cohérents avec les structures cristallographiques de Kir6.2 montrant l'implication de résidus du pore et de l'extrémité N-terminale du canal, dans la coordination des molécules de PIP₂ interagissant avec ce canal (Hansen et al., 2011; Whorton and MacKinnon, 2011, 2013).

En plus de l'augmentation de l'amplitude du courant, un décalage vers la gauche de la courbe d'activation du canal KCNQ1 a été observé lorsque la quantité de PIP₂ est augmentée. Un modèle cinétique a suggéré que ces deux effets gain-de-fonction du PIP₂ sur KCNQ1 sont associés à une stabilisation par ce phospholipide, de l'ouverture de la porte d'activation.

D'autres études fonctionnelles sur la régulation des canaux Cav et HCN par le PIP₂ ont montré que le PIP₂ module à la fois l'amplitude du courant et la voltage-dépendance de l'activation. Mais cette fois, l'ensemble des deux effets ne sont pas liés à une stabilisation de l'ouverture de la porte d'activation dans la mesure où l'effet sur l'amplitude est un gain de fonction, comme pour KCNQ1 et Kir6.2, tandis que l'effet sur la voltage-dépendance de l'activation est une perte de fonction (Flynn and Zagotta, 2011b; Wu et al., 2002). Ces résultats suggèrent un effet supplémentaire du PIP₂ ciblant spécifiquement le module VSD, responsable de la voltage-dépendance du canal, ou un effet du PIP₂ sur le couplage entre les deux modules VSD et PD comme suggéré par l'étude de Jiamin Cui (Zaydman et al., 2013 et page 45).

Une étude réalisée sur le canal potassique hERG a suggéré une prédominance de l'effet du PIP₂ sur la stabilisation de l'ouverture de la porte d'activation, mais sans démonstration expérimentale (Rodriguez et al., 2010b). Mon projet 1 de thèse consiste à étudier sur un autre canal potassique voltage-dépendant, si l'effet du PIP₂ sur la porte d'activation est prédominant d'une part, et si le PIP₂ a un effet direct sur le module VSD ou plutôt sur le couplage entre les deux modules VSD et PD d'autre part.

Pour répondre à ces interrogations, nous avons utilisé le canal potassique *Shaker* comme modèle, ainsi que des approches fonctionnelles (patch clamp et fluorimétrie à voltage imposé) et de modélisation (simulation par dynamique moléculaire). Nous avons ainsi, déterminé les mécanismes moléculaires à la base de la régulation de ce canal *Shaker*, et probablement des Kv en général, par le PIP₂.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le « Journal of Biological Chemistry » (**Abderemane-ali et al, 2012**).

Dual Effect of Phosphatidyl (4,5)-Bisphosphate PIP₂ on Shaker K⁺ Channels*[§]

Received for publication, May 16, 2012, and in revised form, August 21, 2012. Published, JBC Papers in Press, August 29, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.382085

Fayal Abderemane-Ali^{‡§¶1}, Zeineb Es-Salah-Lamoureux^{‡§¶2}, Lucie Delemotte^{***‡}, Marina A. Kasimova^{**§§}, Alain J. Labro^{¶¶}, Dirk J. Snyders^{¶¶}, David Fedida^{||}, Mounir Tarek^{**}, Isabelle Baro^{1,2,3}, and Gildas Loussouarn^{‡§¶3}

From the [‡]INSERM, UMR 1087, Nantes, F-44007, France, the [§]CNRS, UMR 6291 Nantes F-44007, France, the [¶]l'Institut du Thorax, Université de Nantes, Nantes, F-44007, France, the ^{||}Department of Anesthesiology, Pharmacology and Therapeutics, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z3, the ^{**}CNRS, UMR 7565 Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Nancy Université, France, the ^{***}Institute of Computational and Molecular Science, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania 19122, the ^{§§}Department of Biophysics, Faculty of Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia, and the ^{¶¶}Department of Biomedical Sciences, Laboratory for Molecular Biophysics, Physiology, and Pharmacology, University of Antwerp, 2610 Antwerp, Belgium

Background: Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂) regulates several voltage-gated K⁺ channels, but the molecular mechanism remains elusive.

Results: PIP₂ exerts on Shaker opposite effects on maximal current amplitude and activation voltage dependence.

Conclusion: PIP₂ stabilizes the gate in the open state and the voltage sensor in the resting state.

Significance: This is the first description of an effect of PIP₂ on voltage sensor movement.

Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂) is a phospholipid of the plasma membrane that has been shown to be a key regulator of several ion channels. Functional studies and more recently structural studies of Kir channels have revealed the major impact of PIP₂ on the open state stabilization. A similar effect of PIP₂ on the delayed rectifiers Kv7.1 and Kv11.1, two voltage-gated K⁺ channels, has been suggested, but the molecular mechanism remains elusive and nothing is known on PIP₂ effect on other Kv such as those of the Shaker family. By combining giant-patch ionic and gating current recordings in COS-7 cells, and voltage-clamp fluorimetry in *Xenopus* oocytes, both heterologously expressing the voltage-dependent Shaker channel, we show that PIP₂ exerts 1) a gain-of-function effect on the maximal current amplitude, consistent with a stabilization of the open state and 2) a loss-of-function effect by positive-shifting the activation voltage dependence, most likely through a direct effect on the voltage sensor movement, as illustrated by molecular dynamics simulations.

Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂)⁴ is a negatively charged phospholipid of the inner leaflet of the plasma membrane that is a key player in a variety of cellular processes.

It has been demonstrated to be involved in the production of the second messengers inositol trisphosphate and diacylglycerol, in cytoskeletal organization, membrane trafficking, and regulation of ion channels and transporters activities (1, 2). Examples of PIP₂-dependent ion channels and receptors include inwardly rectifying K⁺ channels (Kir) (3, 4), voltage-gated K⁺ channels (Kv) (5–8), voltage-gated Ca²⁺ channels (9), TRP channels (10), and NMDA receptors (11, 12).

Functional studies (13, 14) and more recently, structural studies on Kir channels (15, 16) demonstrated that PIP₂ acts by stabilizing the channels in an open state. Indirect evidence suggests that such open state stabilization by PIP₂ might also be true for Kv channels, as indicated for Kv7.1 (17) and Kv11.1 (8). The molecular mechanism underlying this PIP₂ regulation of Kv channels is still unclear, although it was shown that mutations of positive residues in the cytosolic C terminus significantly reduce PIP₂ affinity for those channels (6, 18, 19). Interestingly, in Kv channels but also in voltage-gated Na⁺ channels (Nav), positive residues of the voltage sensor S4 are close to the inner leaflet of the cell plasma membrane, especially in the closed state (20–23). This raises the question whether or not PIP₂ can also modify the activity of these channels by direct modulation of the voltage-sensing mechanism.

To address this issue, we compared the effect of PIP₂ on ionic and gating currents of Shaker channel (24), which was used as a model in this study, as it allows recording of large gating currents. We observed non-concomitant and opposite effects on current amplitude and channel voltage dependence, suggesting a dual effect of PIP₂ on channel activity. Gating current measurement and voltage-clamp fluorimetry suggest that a direct effect of PIP₂ on the voltage-sensor movement underlies the PIP₂-induced modification of the channel voltage dependence, but not of the current amplitude, suggesting two binding sites.

* This work was supported by the Hubert Curien Program (Tournesol Program, Project Number 22628VD).

[§] This article contains supplemental Figs. S1 and S2.

¹ Recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche.

² Supported by fellowships from the Lefoulon Delalande Foundation and the Fondation de la Recherche Médicale.

³ To whom correspondence should be addressed: l'Institut du Thorax, Unité Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, IRT-UN, 8 Quai Moncouso, BP 70721, 44007 Nantes cedex 1, France. Tel.: +33-0-2-28-08-01-50; Fax: 33-0-2-28-08-01-30; E-mail: gildas.loussouarn@inserm.fr.

⁴ The abbreviations used are: PIP₂, phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate; TMRM, tetramethylrhodamine-5-maleimide; PMT, photomultiplier tube; PME, particle mesh Ewald; MD, molecular dynamics.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Transfection

The COS-7 cell line, derived from the African green monkey kidney, was obtained from the American Type Culture Collection (CRL-1651, Rockville, MD) and cultured in DMEM supplemented with 10% serum and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin), all from GIBCO, (Paisley, Scotland). Cells were transiently transfected with the plasmids using Fugene-6 (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN) according to the standard protocol recommended by the manufacturer.

The WT Shaker (clone E, kind gift from Toshinori Hoshi), the N terminus-deleted Shaker $\Delta 6-46$ (Shaker-IR) in which fast inactivation is removed (25), and the non-conducting Shaker-W434F and Shaker-IR-W434F mutants were expressed in COS-7 cells using a pGW1 expression vector. The W434F mutation was used to permanently inactivate channels (26, 27) to record gating currents. The plasmid coding for the green fluorescent protein (pEGFP) used to identify transfected cells was purchased from Clontech (Palo Alto, CA).

For giant-patch experiments on Shaker and Shaker-IR, a total of 1 μ g of DNA was used. For giant-patch experiments on Shaker-W434F and Shaker-IR-W434F, a total of 8 μ g of DNA was used. In both cases, 20% pEGFP combined with 80% of DNA of interest were used for transfection in a well of a 12-well plate.

Electrophysiology

From 24 to 72 h after transfection, COS-7 cells were mounted on the stage of an inverted microscope and constantly superfused at a rate of ~ 2 ml/min. Experiments were performed at room temperature (23 ± 2 °C). Acquisition and analysis were performed using pCLAMP 10.2 software (Molecular Devices). Electrodes were connected to an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments). For giant-patch experiments, the procedure described by Hilgemann (Hilgemann, 1989) was adapted to excise giant patches from COS-7 cells. Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (glass type 8250, King Precision Glass, Claremont, CA) on a vertical puller (P30, Sutter Instruments, Novato, CA) and fire-polished using a microforge (MF-83, Narishige, Tokyo, Japan) to obtain tip diameters of ~ 10 μ m for patch pipettes and ~ 20 μ m for excision pipettes. The excision pipette, filled with the standard bath solution (see below), was connected to a 20-ml syringe to apply suction for excision. A microperfusion system allowed local application and rapid change of the different experimental solutions (28). In this giant-patch configuration, series resistances (around 0.5 M Ω) were not compensated, leading to a maximal error of 2 mV in the recordings with the current of the highest amplitude during the depolarizing pulse.

Protocols for Shaker and Shaker-IR Ion Currents

Activation Protocol—Plasma membranes were held at -80 mV, depolarized to various potentials during 40 ms, from -10 to -75 mV, with 2.5 mV decrements, then repolarized to -80 mV, every 5 s. This protocol allowed several measurements:

Maximal current, measured as the maximal activation current amplitudes at -10 mV obtained by fitting both activation and inactivation phases with Equation 1,

$$I(t) = I_{\max} \times (1 - \exp(-t/\tau_{\text{act}}))^4 \times (r - (r - 1) \times \exp(-t/\tau_{\text{inact}})) \quad (\text{Eq. 1})$$

where $I_{\max}$ is the maximal current amplitude, τ_{act} the time constant of activation, τ_{inact} the time constant of inactivation, and r the residual percentage of current upon full inactivation. This equation allowed determining both activation and inactivation time constants at different potentials.

Half-activation potential and slope factor of activation curve were obtained by fitting the maximal current at each step divided by the electromotive force, with a Boltzmann function (Equation 2),

$$I_{\text{rel}} = 1/(1 + \exp(-(V_m - V_{1/2})/k)) \quad (\text{Eq. 2})$$

where V_m is the membrane potential, $V_{1/2}$ is the half-activation potential, and k is the slope factor.

Tail Protocol—Plasma membranes were held at -80 mV, depolarized to -10 mV during 50 ms, then repolarized to various potentials during 10 ms, from -20 to -110 mV, with 5-mV decrements, and finally repolarized to -80 mV, every 5 s. This protocol allowed determining the deactivation time constants at different potentials by fitting relaxation of ion current upon the first repolarization with a single exponential.

Inactivation Protocol—Membrane holding potential was -80 mV. Plasma membranes were depolarized (pre-pulse) during 4 s to various potentials, from -95 to -15 mV, with 5 mV increments, then depolarized (pulse) to $+50$ mV during 250 ms, before being repolarized to -80 mV, every 5 s. Inactivation curves, obtained by normalizing maximum amplitude upon second pulse, were fitted with the following Boltzmann Equation 3,

$$I_{\text{rel}} = (1/1 - \exp(-(V_m - V_{1/2})/k)) \quad (\text{Eq. 3})$$

where V_m is the membrane potential, $V_{1/2}$ is the half-activation potential, and k is the slope factor.

This inactivation curve allowed characterizing of half-inactivation potential and slope factor of inactivation curve.

Recovery from Inactivation Protocol—Plasma membranes were held at -80 mV or -100 mV. An initial 200 ms pulse (prepulse) to $+20$ mV was followed by a second similar pulse (pulse) after an interval from 0 to 2 s, with 0.1 s increments. Pulse/prepulse relative amplitude was plotted against time interval. Recovery from inactivation time constants were obtained from the single exponential fit of recovery from inactivation curves.

Protocol for Shaker-W434F and Shaker-IR-W434F "ON" Gating Currents (I_{gON})—Activating ON gating currents (I_{gON}) were elicited during 30 ms depolarizing potentials between -100 and $+60$ mV (with $+10$ mV increments) starting from a -80 mV holding potential. Subsequently, deactivating OFF gating currents (I_{gOFF}) were recorded during a 30 ms repolarizing step to -100 mV. Capacitive and leak currents were subtracted

Dual Effect of PIP₂ on Shaker K⁺ Channels

using a -P/4 protocol starting from -100 mV or holding potential. Interpulse interval was 5 s long.

This protocol allowed to determine: (i) the total amount of gating charges moved, measured by integrating the ON gating current at +60 mV and (ii) the voltage dependence of charge movement (half-activation potential and slope factor) by plotting the amount of gating charge as a function of depolarizing potential (Q-V curve) and fitting the relation with a Boltzmann function (Equation 2).

Protocol for Shaker-IR-A359C-C445V Ion Currents and Voltage-clamp Fluorimetry—Oocytes were prepared as previously reported (29). Oocytes were placed in a bath chamber that was perfused with control ND96 bath solution containing (in mmol/liter), 96 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, and 5 HEPES, titrated to pH 7.4 with NaOH. Microelectrodes were filled with 3 mol/liter KCl and had resistances of 1 to 5 MΩ. Voltage control and data acquisition was achieved with a Warner Instruments OC-725C amplifier (Hamden, CT), and Axon Digidata 1322 A/D converter (Axon Instruments, Foster City, CA), connected to a personal computer running pClamp9 software (Molecular Devices Corp.).

Fluorimetry was performed on the Shaker-IR-A359C-C445V (30, 31) simultaneously with two-electrode voltage clamp. Labeling of the oocytes with tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMRM; Invitrogen, Carlsbad, CA) dye was performed at 10 °C in a depolarizing solution containing (in mmol/liter), 100 KCl, 1.5 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, and 10 HEPES, titrated to pH 7.4 using KOH, with 5 μmol/liter TMRM. After 30 min of labeling, oocytes were stored in ND96 solution in the dark until voltage-clamped. Fluorimetry was performed using a Nikon TE300 inverted microscope with Epi-Fluorescence attachment and a 9124b Electron Tubes photomultiplier tube (PMT) module (Cairn Research, Kent, UK) as was described previously (Es-Salah-Lamoureux *et al.*, 29). To minimize fluorophore bleaching, a Uniblitz computer-controlled shutter (Vincent Associates, Ottawa, ON, Canada) was used, and opened shortly prior to application of voltage clamp pulses. Fluorescence signal sampling frequency was 6.67 kHz; signal traces were filtered offline at 300–1000 Hz. To correct for photobleaching of fluorophore that occurred during shutter opening during activation protocol and single sweep experiments, control fluorescence data were recorded in the absence of any change in voltage, and subtracted from the voltage-dependent signal.

Membrane holding potential was -80 mV. Membranes were depolarized during 100 ms to various potentials, from -120 to 60 mV, with 10 mV increments, then repolarized to -80 mV, every 2 s.

Solutions and Drugs

For giant-patch experiments, cells were superfused with a standard solution containing (in mM) 145 KCl, 10 HEPES, and 1 EGTA, pH 7.3 with KOH. A solution of (in mM) 145 K-glucuronate, 10 HEPES, and 1 EGTA, pH 7.3 with KOH, was used to superfuse the cell during measurements and to fill the tip of the patch pipettes. Polylysine (Sigma-Aldrich) was diluted to 25 μg/ml before use. PIP₂ (Calbiochem, Villeneuve d'Ascq, France) was diluted to 5 μM and sonicated on ice for 30 min before application to inside-out patches.

Molecular Dynamics Simulations

We used all-atom models of the equilibrated open and closed conformations of the Kv1.2 embedded in fully hydrated POPC lipid bilayer (22). The first ring of the bottom leaflet of POPC molecules around the Kv1.2 was replaced by PIP₂ molecules (54 molecules for the closed conformation and 65 molecules for the open conformation) (supplemental Fig. S2). The system was then solvated in 150 mM KCl solution (A total of ~350,000 atoms) and gradually relaxed using a standard procedure: the entire protein was fixed for 6 ns, enabling reorganization of the lipid and solution, then the backbone only for 2 ns, enabling relaxation of the side chains before finally letting the system relax freely for over 50 ns until reaching equilibrium.

The MD simulations were carried out using the program NAMD2 (32). Langevin dynamics was applied to keep the temperature (300 K) fixed. The equations of motion were integrated using a multiple time-step algorithm. Short- and long-range forces were calculated every 1 and 2 time steps, respectively, with a time step of 2.0 fs. Chemical bonds between hydrogen and heavy atoms were constrained to their equilibrium value. Full three-dimensional periodic boundary conditions were used and long-range electrostatic forces were taken into account using the particle mesh Ewald (PME) approach. The water molecules were described using the TIP3P model (33). The simulation used the CHARMM22-CMAP force field with torsional cross-terms for the protein (34), CHARMM36 for the POPC phospholipids (35), and the CHARMM-compatible parameters for PIP₂ developed in the group of Pr. Osman (36). The simulations were performed on the SGI ALTIX ICE Machine JADE at the CINES supercomputer center (Montpellier, France).

Statistical significance of the observed effects was assessed by Student's *t* test or two-way ANOVA test, using SigmaStat 3.1 software. *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

The Function of Shaker Channels is PIP₂-dependent—The effect of PIP₂ on Shaker potassium channels was studied using the inside-out configuration of the patch-clamp technique. Patch excision of the membrane of a COS-7 cell expressing Shaker-IR mutant, in which the amino terminus responsible for the fast (N-type) inactivation was removed (25), led to a current rundown, potentially attributable to a decrease in membrane PIP₂ levels. Consistent with that, addition on the inner side of the membrane of 25 μg/ml of a PIP₂-scavenger, polylysine (Fig. 1, lower panel), accelerated the observed rundown, and eventually led to a complete loss of the channel activity (data not shown). Thus, polylysine was only transiently added (~25 s) to reduce the current to approximately one-half of its initial value in order to maintain enough current to measure the biophysical parameters (Fig. 1, left lower panel). Polylysine removal did not lead to recovery of the current, suggesting that polylysine was not blocking the pore. Most importantly, intracellular addition of 5 μM PIP₂ restored the current amplitude (Fig. 1, middle lower panel) confirming that the observed rundown is PIP₂-dependent as previously reported for Kv11.1 and Kv7.1 channels (5, 8, 17).

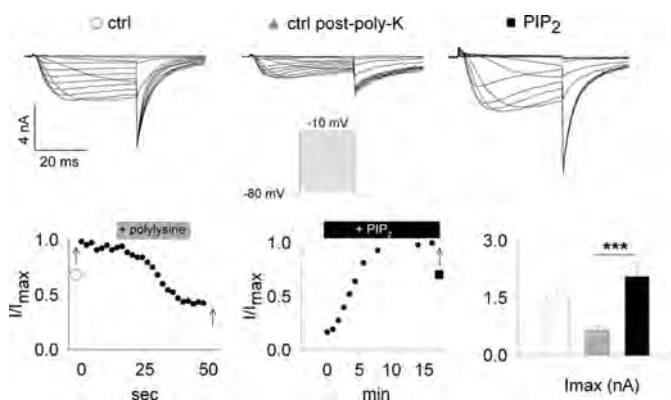


FIGURE 1. Rundown of Shaker-IR currents and reversal by PIP₂ application. Upper panel, representative Shaker-IR currents obtained from a giant patch of a transfected COS-7 cell in response to an activation protocol (inset) after excision (left panel, ctrl, empty circle), after a 25-s application of 25 μ g/ml polylysine (middle panel, ctrl post-poly-K, gray triangle), and at steady state, after $\sim$ 15 min of PIP₂ (5 μ M) application (right panel, PIP₂, dark square). Lower panel, left, kinetics of relative peak tail-current amplitude from a representative cell, showing a slight rundown that is increased by addition of poly-K. Middle, time course of ion current from a representative cell, showing an increase in the current upon addition of PIP₂. Right, maximal full activation current amplitudes at -10 mV obtained by fitting both activation and inactivation phases with Equation 1 (see "Experimental Procedures"). Mean of maximal current at -10 mV obtained from 15 patches (***, $p < 0.001$).

PIP₂ Induces an Increase in Maximal Current Amplitude: a Gain of Function—To fully characterize the effect of PIP₂ on channel function, biophysical parameters were recorded at three distinct periods: just after patch excision ("ctrl"), after a 25 s application of polylysine ("ctrl post-poly-K"), and at steady state after $\sim$ 15 min (14.3 $\pm$ 3.3 min) of 5 μ M PIP₂ application ("PIP₂"). Of note, since excision is associated with the dilution of many cytosolic components, the variation of the biophysical parameters observed between "ctrl" and "ctrl post-poly-K" may be due to other factors in addition to PIP₂ decrease (8). For this reason, we rather focused on the comparison between "ctrl post-poly-K" and "PIP₂" conditions.

Ionic current recordings from a representative patch are shown in Fig. 1, upper panel. Membrane depolarization led to fast activation of the channels, followed by the expected remaining slow C-type inactivation (25). From the activation protocol (Fig. 1, inset) fitting both activation and inactivation with Equation 1 allowed determining accurately the maximal current at -10 mV in the three conditions (Fig. 1, right lower panel). The average maximal current, which is decreased after 25-s addition of polylysine, recovers to its original value upon addition of 5 μ M PIP₂, demonstrating a gain-of-function effect of the phospholipid on the current amplitude.

PIP₂ Induces a Loss of Function on the Voltage-dependence of Activation—To investigate the PIP₂ effects on Shaker activation gating in greater detail, we studied the voltage-dependence of activation and the activation and deactivation kinetics (Fig. 2). Data from the activation protocol (Fig. 1, upper panel) were used to construct the activation curves and to determine the activation kinetics using Equation 1 (see "Experimental Procedures"). After $\sim$ 15 min of PIP₂ application, the activation curves were shifted by about +15 mV (Fig. 2A and C), and the slope factor was slightly decreased (Fig. 2D). The decrease in the slope factor may be due to an incomplete decrease in PIP₂ leading to a combination of channels with two profiles (PIP₂-

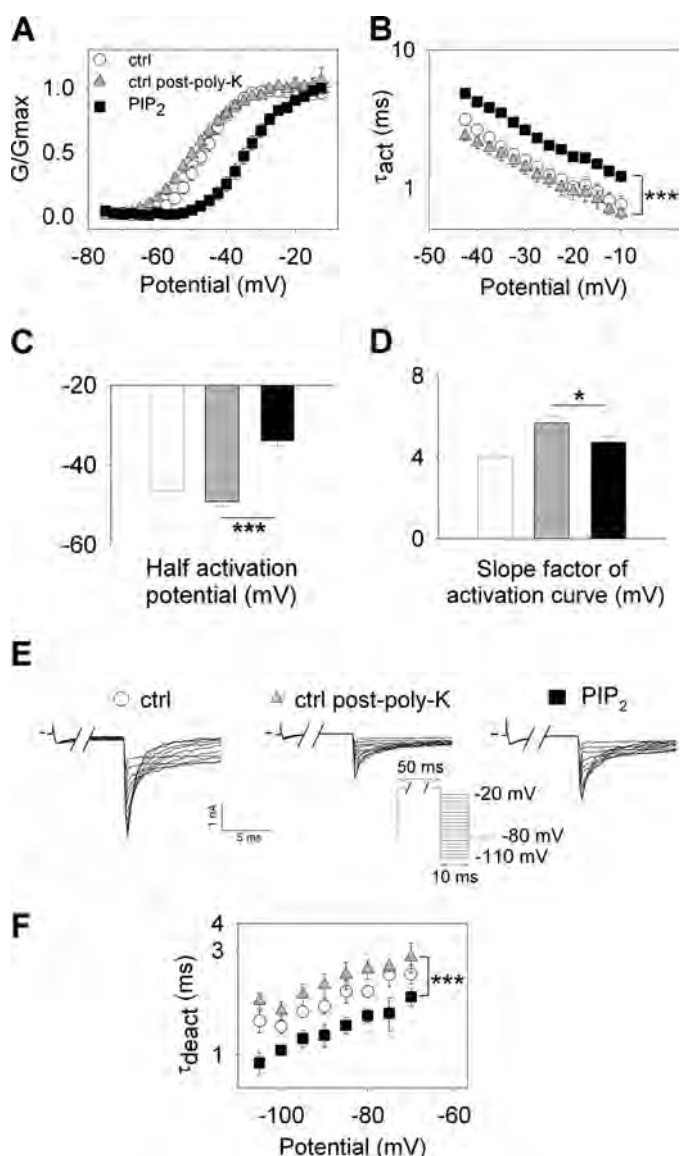


FIGURE 2. Modification of Shaker-IR activation properties in presence of PIP₂. A, mean relative conductance-voltage (G/G_{max} -V) relationships fitted with a Boltzmann function and obtained using the same protocol as in Fig. 1, upper panel ($n = 15$). B, mean activation time constants at different potentials, obtained from 15 patches (***, $p < 0.001$ PIP₂ versus ctrl post-poly-K). C, mean half-activation potentials and D, slope factors of G/G_{max} -V curves ($n = 15$, *, $p < 0.05$). E, currents obtained from a giant patch of a representative transfected COS-7 cell with a tail protocol (shown as inset). F, deactivation time constants obtained by fitting relaxation of ion current upon repolarization with a single exponential ($n = 8$).

bound and PIP₂-free), resulting in a shallower activation curve at a macroscopic level. In addition, PIP₂ application significantly slowed the activation kinetics measured at potentials from -42.5 to -10 mV (Fig. 2B), and accelerated the deactivation kinetics at different potentials (Fig. 2, E and F). All the parameters (activation curve, activation, and deactivation kinetics) showed a similar 15-mV shift in voltage dependence (Fig. 2, A, B, and F), suggesting that the PIP₂-induced loss-of-function might be acting on the closed to open equilibrium with no structural change in the activation mechanism.

One could argue that open pore stabilization may interfere with voltage sensor movement. In other words, PIP₂ may not

Dual Effect of PIP₂ on Shaker K⁺ Channels

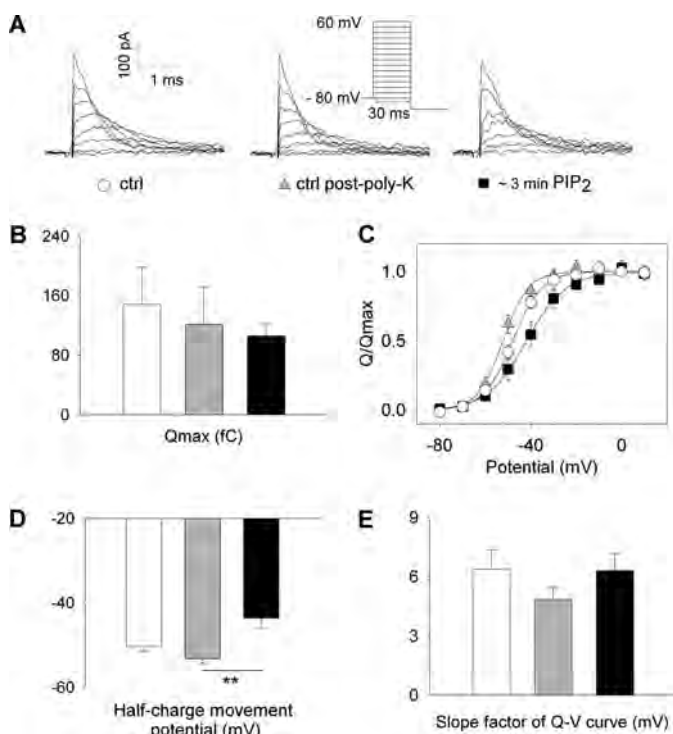


FIGURE 3. Effect of PIP₂ on non conducting Shaker-IR gating current. A, representative Shaker-IR-W434F "On" gating currents obtained from a giant patch of a transfected COS-7 cell in response to an activation protocol (inset) after excision (left panel, ctrl, empty circle), after a 25-s application of 25 μ g/ml polylysine (middle panel, ctrl post-poly-K, gray triangle) and at steady-state, after ~3 min of PIP₂ (5 μ M) application (right panel, PIP₂, dark square). B, mean total amount of gating charges moved at 60 mV ($n = 8$), (C) relative "On" charge movement-voltage (Q-V) relationships fitted with a Boltzmann function ($n = 8$) and obtained using the same protocol as in A, (D) half-charge movement potential (**, $p < 0.01$) and (E) slope factor of activation curve.

directly interact with the voltage sensor, but allosterically acts on its movement by stabilizing the open state. Measuring PIP₂ effect as early as ~3 min (2.8 min $\pm$ 0.8) after PIP₂ application allowed us to notice that the PIP₂ impact on the voltage-dependence of activation was preceding the impact on current amplitude (supplemental Fig. S1). This rather suggests a direct effect of PIP₂ on the voltage sensor.

To test if the modification of the voltage-dependence of activation originates from an effect of PIP₂ on the voltage sensor, we recorded gating currents from the non-conducting Shaker-IR mutant W434F, using the giant-patch technique. To our knowledge, this is the first report of recording the PIP₂ effect on ion channel gating currents. Data from a representative patch are shown on Fig. 3A. The protocol shown in the inset was used to determine the total amount of gating charges moved and the relative charge-voltage (Q-V) curve (Fig. 3, B and C) from integrating the activating "On" gating current IgON (the "Off" gating current was too slow and too small to be accurately measured). The results show that the total amount of gating charges moved and the slope factor k of Q-V curve are similar for the three conditions (Fig. 3, B and E). Most interestingly, following ~3 min (3.1 min $\pm$ 0.6) PIP₂ addition, the voltage dependence of the "On" charge movement was shifted by about 10 mV toward positive potentials (Fig. 3, C and D), reminiscent of what was observed at the ion current level (Fig. 2A). The effect of

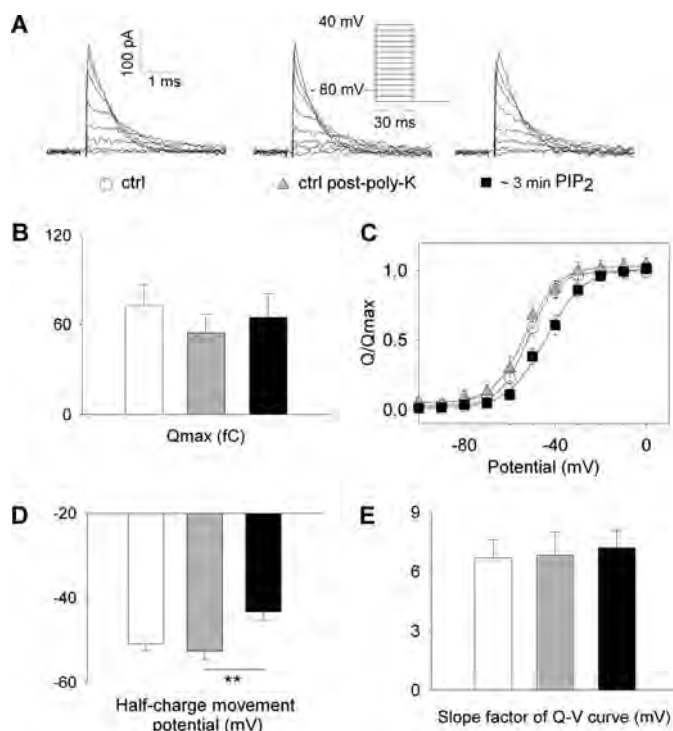


FIGURE 4. Effect of PIP₂ on nonconducting Shaker gating current. A, representative Shaker-W434F "On" gating currents obtained from a giant patch of a transfected COS-7 cell in response to an activation protocol (inset) after excision (left panel, ctrl, empty circle), after a 25-s application of 25 μ g/ml polylysine (middle panel, ctrl post-poly-K, gray triangle) and at steady state, after ~3 min of PIP₂ (5 μ M) application (right panel, PIP₂, dark square). B, mean total amount of gating charges moved at 40 mV ($n = 9$), C, relative "On" charge movement-voltage (Q-V) relationships fitted with a Boltzmann function ($n = 9$) and obtained using the same protocol as in A, (D) half-charge movement potential (**, $p < 0.01$) and (E) slope factor of activation curve.

PIP₂ on the activation curve is therefore correlated with an effect of the phospholipid on the voltage sensor movement.

To test if the interaction of PIP₂ with the voltage sensor is affected when the N-type inactivation module is intact, we also observed the effect of PIP₂ on the gating current in the full-length channel, Shaker W434F (Fig. 4). After ~3 min of PIP₂ application, we observed, as for Shaker-IR W434F, a positive shift of about 10 mV in the voltage dependence of Shaker W434F "On" charge movement (Fig. 4, C and D). Similar to Shaker-IR, PIP₂ does not modify the total amount of gating charges moved and the slope factor k of Q-V curve from the Shaker full-length (Fig. 4, B and E).

To confirm PIP₂ influence on gating and ion currents, we used the voltage-clamp fluorimetry technique, that allows monitoring in real time voltage-dependent and time-dependent conformational changes related to the S4 segments (37), while recording ion currents simultaneously. We studied the effects of a phosphatidylinositol kinase inhibitor, wortmannin, using the Shaker-IR-A359C-C445V mutant (30, 31). Wortmannin inhibits, at micromolar concentrations, PI(4) kinase (PI4K) (38), a critical enzyme in the synthetic cascade of PIP₂. Hence, wortmannin application leads to a decrease in membrane PIP₂ (5, 38, 39). In this study, cytosolic PIP₂ level of oocytes was reduced by a 40-min incubation with 15 μ M wortmannin. Reduction of PIP₂ stocks in treated oocytes resulted in comparable 14 and 11-mV negative shifts of both ionic current

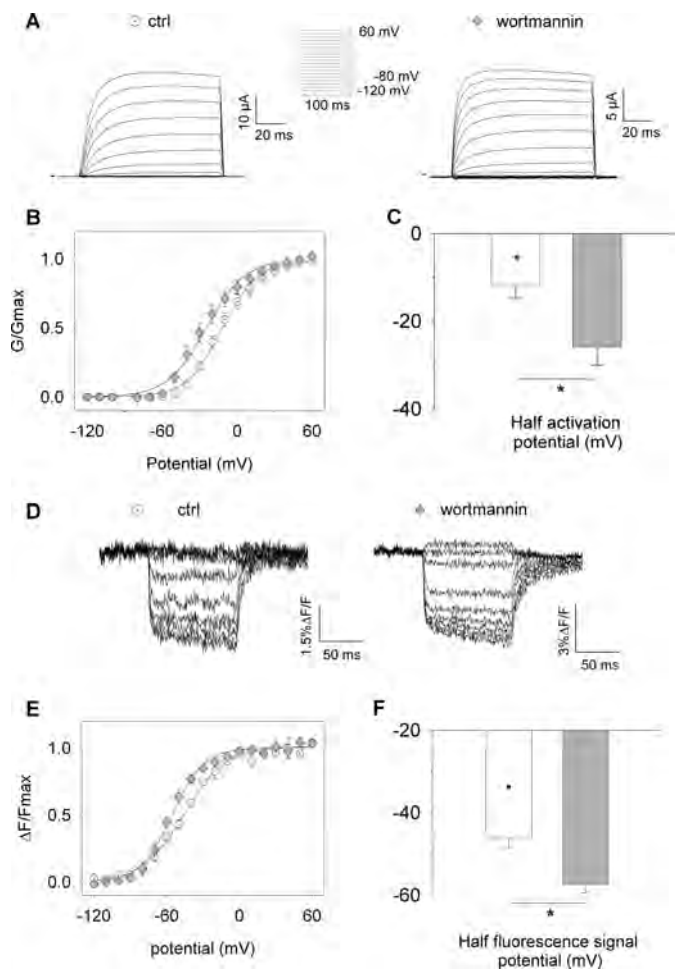


FIGURE 5. Effect of PIP_2 decrease on both ion and gating currents, probed by voltage-clamp fluorimetry. A and D, representative whole-cell recording of Shaker-IR-A359C-C445V ion currents (A) and fluorescence signal (D) obtained from an injected *Xenopus* oocyte in response to an activation protocol (inset, every 2 s). B, conductance-voltage (G-V) relationships fitted with a Boltzmann function (control $n = 5$ and wortmannin $n = 4$). C, half activation potentials (*, $p < 0.05$). E, fluorescence signal-voltage relationship was fitted with a Boltzmann function and obtained from the recordings as shown in D (control $n = 3$ and wortmannin $n = 5$). F, half-fluorescence signal potentials.

(Fig. 5, A–C) and fluorescence voltage-dependences (Fig. 5, D–F). These data mirror the 15 and 10-mV positive shifts of ionic and gating currents when PIP_2 was increased in COS-7 cells. Of note, there was no effect of PIP_2 reduction on Shaker half-activation potential in COS-7 cells (Fig. 2, A and C). As said earlier in this study, but also for hERG channels (8), it is more difficult to compare the conditions before and after poly-lysine application, the variation of the biophysical parameters observed may be due to the dilution of cytosolic factors in addition to PIP_2 decrease. In summary, the data obtained in oocytes are in accordance with what was observed on COS-7 cells, and further suggest that the loss-of-function effects of PIP_2 on the activation voltage-dependence are a consequence of the effect on the voltage sensor itself.

PIP_2 Induces a Gain of Function on the Inactivation Gate—Shaker channels show two distinct inactivation processes, N-type and C-type (25). Using the Shaker-IR mutant in which there is no N-type inactivation, we evaluated whether PIP_2 affects C-type inactivation voltage dependence and the kinetics

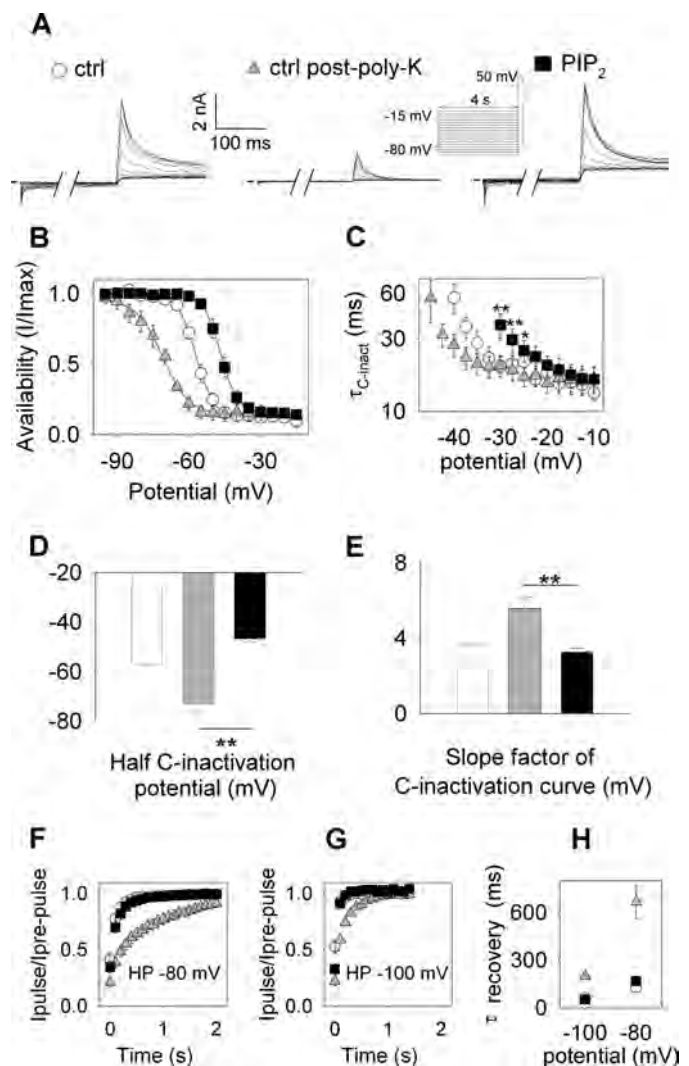


FIGURE 6. Effect of PIP_2 on C-type inactivation of Shaker-IR channels. A, representative ion currents from a giant patch of a Shaker-IR transfected COS-7 cell, obtained with an inactivation protocol (inset, holding potential was -80 mV, pre-pulse during 4 s at various potentials, with 5-mV increments and pulse at 50 mV during 250 ms, every 5 s). B, inactivation curves, obtained by normalizing the test pulse maximum amplitudes, were fitted with a Boltzmann equation ($n = 5$). C, C-type inactivation time constants, obtained using Equation 1 to fit recordings as in Fig. 1, were plotted against voltage ($n = 15$, **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$). D, half inactivation potentials and E, slope factors of inactivation curves (**, $p < 0.01$). F and G, recovery from inactivation. Pulse/prepulse relative amplitude plotted against time interval. HP: holding potential. H, recovery from inactivation kinetics ($n = 6$).

of C-type inactivation and of its recovery. All these biophysical parameters were recorded in the ctrl, ctrl post-poly-K, and PIP_2 conditions (Fig. 6). An inactivation protocol (Fig. 6A, inset) was applied in the three experimental conditions (Fig. 6A) and used to determine inactivation curves (Fig. 6B). The protocol shown in Fig. 1 was used to determine inactivation kinetics (Fig. 6C). We observed that, in presence of PIP_2 , the voltage dependence of inactivation was shifted by about 26 mV toward positive potentials (Fig. 6, B and D), the slope factor of inactivation curve was reduced (Fig. 6, B and E), and the inactivation kinetics were slowed (Fig. 6C). In addition, recovery from inactivation was accelerated in presence of PIP_2 (Fig. 6, F–H). The recovery from inactivation at -80 mV in “ PIP_2 ” condition was similar to the one at -100 mV in ctrl post-poly-K condition, suggesting a

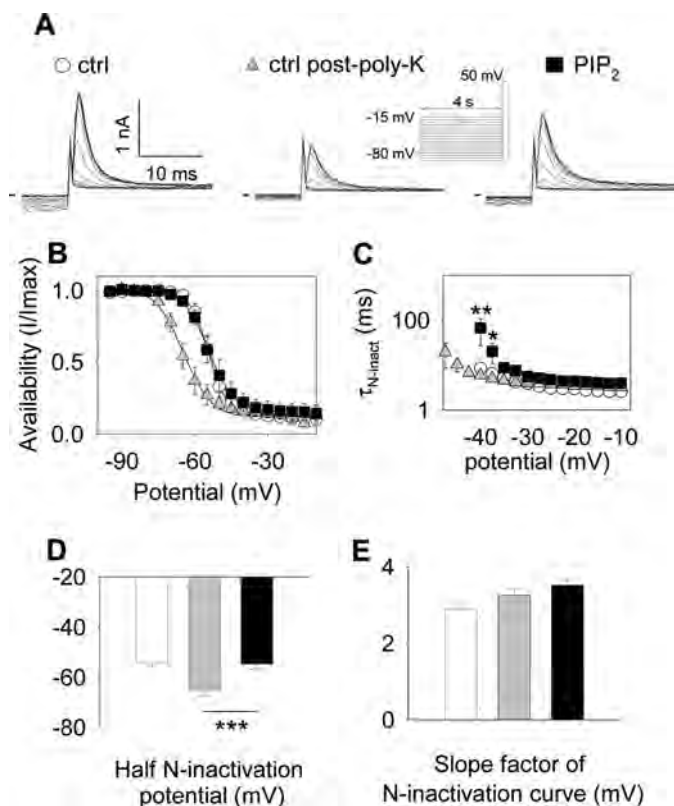


FIGURE 7. Effect of PIP₂ on N-type inactivation of Shaker channels. A, representative ion currents from a giant patch of a Shaker-transfected COS-7 cell, obtained with an inactivation protocol (inset, holding potential was -80 mV, pre-pulse during 4 s at various potentials, with 5-mV increments and pulse at 50 mV during 250 ms, every 5 s). B, inactivation curves, obtained by normalizing the test pulse maximum amplitudes, were fitted with a Boltzmann equation ($n = 7$). C, N-type inactivation time constants, calculated by using equation 1 to fit Shaker recordings, obtained with an activation protocol (Fig. 1, inset), were plotted against voltage ($n = 7$, **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$). D, half-inactivation potentials and E, slope factors of inactivation curves (***, $p < 0.001$).

+20 mV-shift in the recovery from inactivation kinetics. All the parameters (inactivation curve, inactivation, and recovery from inactivation kinetics) showed a similar shift in voltage dependence (Fig. 6, B, C, and H), reminiscent of the PIP₂ effect on activation. Since C-type inactivation is coupled to activation (40), PIP₂ effect on channel inactivation may occur through the activation process.

On the full-length Shaker, we evaluated the PIP₂ effect on N-type inactivation, which develops around 10 times faster than C-type inactivation, as shown on the representative trace (Fig. 7A). Interestingly, we observed that PIP₂ induces a slowing of inactivation kinetics (Fig. 7C) and a positive shift of about 10 mV in the voltage dependence of inactivation (Fig. 7, B and D). A slowing of N-type inactivation in presence of PIP₂ was already demonstrated in Kv1.1 (Shaker-like) and Kv3.4 channels (41).

DISCUSSION

We used Shaker and a combination of electrophysiology and voltage-clamp fluorimetry to better understand the molecular mechanism underlying the effect of PIP₂ on the Kv channel activity. We show that PIP₂ 1) exerts a gain-of-function effect on the channel by increasing the maximal current amplitude

and 2) exerts also a loss-of-function effect by right-shifting the voltage dependence of channel activation, most likely through a direct effect on the voltage sensor movement. This study demonstrates for the first time the influence of PIP₂ on both ion and gating currents of a voltage-dependent channel.

Two Opposite PIP₂ Effects on Shaker Channels—Until now, only a gain-of-function effect of PIP₂ was described for several potassium channels. For instance, analysis of single channel recordings of the voltage-independent potassium K_{ATP} channel showed that PIP₂ stabilizes the open state by acting on the final concerted opening transition (13). Simulation of the macroscopic current of Kv7.1 (17) and Kv11.1 (8) Kv channels by kinetic models were consistent with PIP₂ stabilizing the open state, by acting on the final concerted opening, as in the case of the K_{ATP} channel. In Shaker channel, PIP₂ up-regulates the channel activity with (i) no concomitant change in the voltage-dependence (any change in voltage dependence occurs before the current increase, and is associated with a loss of function) and (ii) no concomitant change in total charge movement. These observations suggest that PIP₂ activates the channel through a direct stabilization of the activation gate, similar as Kir6.2, Kv7.1, and Kv11.1 (8, 13, 17).

Here we show that PIP₂ application leads, in addition to the gain of function, to changes in several biophysical parameters of Shaker activation that are all associated with a loss of function: accelerated deactivation, slowed activation, and positive shift in the activation curve. Such a dual effect is a new concept in potassium channels, although it has been reported for two voltage-gated calcium channels (9) and more recently for a sea urchin HCN channel (42). Interestingly enough, in both cases, an effect on maximal current amplitude was observed in addition to an action on the voltage-dependence of the channels, as in our study.

While an effect of PIP₂ on the activation gate has been described for several channels, this study suggests an additional effect of PIP₂ on the voltage sensor. Of note, the effects of PIP₂ on the activation and C-type inactivation properties of the ionic current were comparable (10–20 mV shift toward positive potentials). In Shaker, the C-type inactivation gate seems voltage-independent *per se* (25) and coupled to activation (40). The fact that the PIP₂ effects on activation and inactivation are similar suggests that PIP₂ modulates the early process of voltage sensor movement rather than the coupling between inactivation and activation gates. This idea is consistent with the following model.

A Molecular Model of Kv1.2 Suggests that PIP₂ Interacts Both with S4 Lower Residues and with S6 C Terminus—To gain a molecular insight into the mechanism of PIP₂ effect on Shaker function, molecular dynamics simulations of an open- and closed-state Shaker-like (Kv1.2) channel embedded in a membrane containing a ring of PIP₂ molecules in the inner leaflet were conducted (supplemental Fig. S2). The analyses of the equilibrated conformations of the channel suggest that the PIP₂ molecules interact electrostatically with positively charged residues of the channel in a state-dependent manner.

In particular, PIP₂ lipids may interact with two different regions that bear an excess of positive charges (Fig. 8). The first encloses the S4-S5 linker outermost residues (Lys-312, Arg-

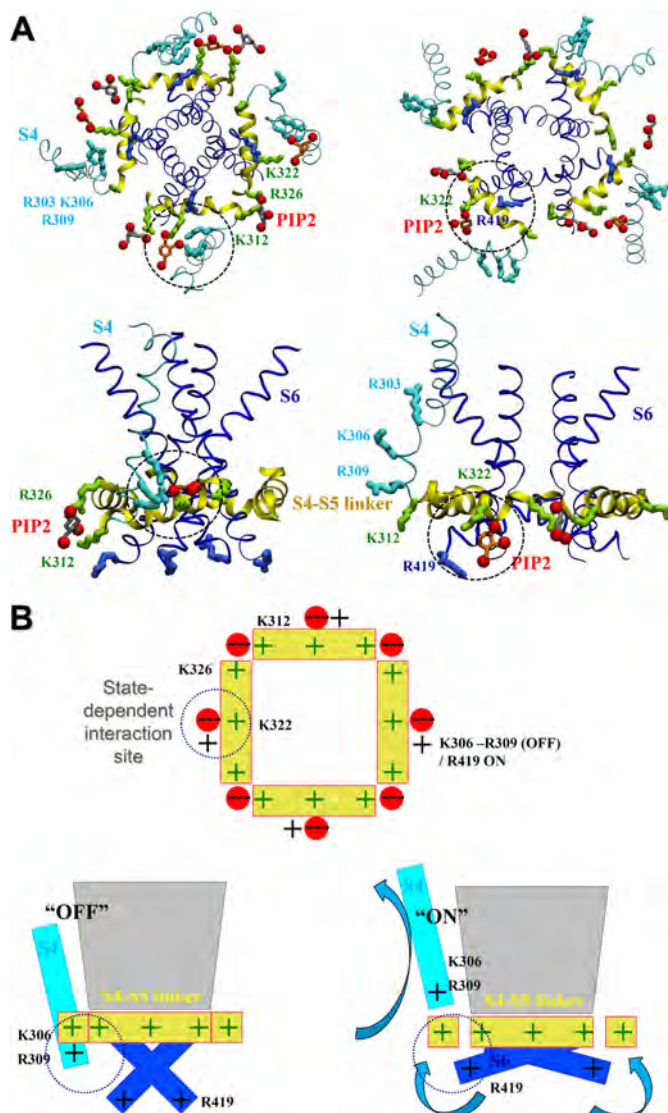


FIGURE 8. State-dependent interaction site for Kv1.2/PIP₂ revealed by atomistic MD simulations. Molecular model (A) and scheme (B) of the closed (left) and open (right) conformations of the channel. A, view from the intracellular side of the channel (Up) and from the side (Down). In both states, the head groups of two PIP₂ molecules (depicted as red spheres) interact with the basic residues Lys-312 and Arg-326 (green sticks) of the outermost regions of S4-S5 linker (yellow ribbon) and with Lys-322 located at the middle of the S4-S5 linker. At this site, PIP₂ molecules interact with Lys-306 and Arg-309 of the bottom of S4 (cyan sticks and ribbon) in the closed state and with R419 (blue sticks) of the C terminus of S6 in the open state (state-dependent interaction site; dashed circle). The Kv1.2 S1 to S3 and S5 helices, and the lipids and solvent are not represented for clarity.

326) and is occupied by the same residue in both open and closed forms of the channel. The second region is located in the middle of the S4-S5 linker (close to Lys-322) and is of particular interest as the channel positively charged residues occupy it in a state-dependent manner: In the closed state, aside from the linker residue Lys-322, this site encloses the S4 lower basic residues Arg-303, Lys-306, and Arg-309, consistent with PIP₂ stabilization of the resting position of the voltage sensor and the slowed activation. In the open state, as was found for Kv1.2 embedded in a zwitterionic POPC bilayer (22), these S4 residues are in interaction with negative residues of the VSD, and are not in direct interaction with the PIP₂ molecules. Nonethe-

less they remain close enough to their headgroups to feel the electric field generated by their high negative charge. Such an observation could account for the accelerated deactivation kinetics reported above. Besides, in this open state, the Arg-419 of the S6 C-terminal part come close to this interaction site to interact with PIP₂, consistent with the fact that this negatively charged lipid PIP₂ stabilizes the open gate conformation, possibly through a mechanism similar to the one described for Kir channels (15).

In summary, the molecular model seems to rationalize the electrophysiology and fluorimetry data presented above and provides an insight into the molecular mechanisms involved in the seemingly contradictory gain- and loss-of-function effects of intracellular PIP₂. Of course further experiments will be necessary to further validate this model.

Physiological Relevance of the PIP₂ Effect—In many channels, the presence of PIP₂ and/or related phosphoinositides is required for channel function. The experiments presented here suggest that this also applies to the Shaker channel. Even if exogenous PIP₂ impact the activity of many channels, modulation of channel activity in response to physiological variation of PIP₂ does not need to apply to every PIP₂-dependent channel (44). The Kv channels, Kv7 (5, 45), and Kv11.1 (7, 18) do indeed respond to physiological changes of PIP₂ levels.

Shaker-like Kv1.2 channels play fundamental roles in generating electrical pulses and regulating membrane potential in brain (46), and this physiological importance of the Kv1.2 channel has been confirmed by the fact that Kv1.2 knock-out mice exhibit enhanced seizure susceptibility and die in the third postnatal week (47). In that context, it would be interesting to evaluate if a decrease in PIP₂ induced by a PLC-coupled receptor (5) will either increase the Kv1.2 current, via a shift in the voltage-dependence, or decrease the Kv1.2 current, via a decrease in maximal current amplitude. Recently, Kruse *et al.* studied the effect of PIP₂ depletion on some Shaker-like channels (Kv1.1, Kv1.3, Kv1.4, and Kv1.5) using physiological enzymes such as G protein-coupled receptor, voltage-sensitive lipid 5-phosphatase or an engineered fusion protein carrying both lipid 4-phosphatase and 5-phosphatase activity (pseudo-janin). Their results suggested that a physiological PIP₂ depletion does not affect the activity of these Shaker-like channels (48). Similar experiments should be done on native tissues to clearly establish (or not) a role of PIP₂ in receptor activated transduction pathways. But it is indeed important to keep in mind that polylysine, wortmannin, and PIP₂ application (used here) may lead to variation in PIP₂ beyond physiological range (44). Nevertheless, the complete rundown of Shaker current and complete recovery in presence of PIP₂ suggest a role of PIP₂ as a permissive cofactor, necessary for channel activation in the membrane, as discussed previously (49). Of note, comparison of Kv2.1 gating and ion currents indicates that only 2% of the surface channels conduct (50). It is possible that the inactive channel are not interacting with PIP₂, resulting in detectable gating currents with no ion currents.

To summarize, the experiments presented here suggest that PIP₂ is necessary for Shaker channels activity. Our results also suggest that there are at least two modes of action of PIP₂, one potentially acting on the final concerted opening and stabilizing

the open state (like for kir6.2, Kv7.1, Kv11.1) and another, as evidenced here, on the voltage dependence of the channel, through a direct effect on voltage sensor movement. Consistently, while this paper was under revision, Rodriguez-Menchaca *et al.* showed a similar dual effect of PIP₂ on Kv1.2 channels and highlighted the interaction of PIP₂ with two residues in S4-S5, partially consistent with the molecular model presented here (43).

Acknowledgment—Simulations were performed using HPC resources from GENCI-CINES Grant 2011-76742 and 2011-75137.

REFERENCES

- Hilgemann, D. W., Feng, S., and Nasuhoglu, C. (2001) The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. *Sci. STKE* **2001**, re19
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., and Murray, D. (2002) PIP₂ and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 151–175
- Huang, C. L., Feng, S., and Hilgemann, D. W. (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by G[β][γ]. *Nature* **391**, 803–806
- Hilgemann, D. W., and Ball, R. (1996) Regulation of cardiac Na⁺, Ca²⁺ exchange, and KATP potassium channels by PIP₂. *Science* **273**, 956–959
- Zhang, H., Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, C. M., Jin, T., and Logothetis, D. E. (2003) PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* **37**, 963–975
- Park, K. H., Piron, J., Dahimene, S., Mérot, J., Baró, 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
- Bian, J., Cui, J., and McDonald, T. V. (2001) HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Circ. Res.* **89**, 1168–1176
- Rodriguez, N., Amarouch, M. Y., Montnach, J., Piron, J., Labro, A. J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2010) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) stabilizes the open pore conformation of the Kv11.1 (hERG) channel. *Biophys. J.* **99**, 1110–1118
- Wu, L., Bauer, C. S., Zhen, X. G., Xie, C., and Yang, J. (2002) Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P₂. *Nature* **419**, 947–952
- Rohács, T., Lopes, C. M., Michailidis, I., and Logothetis, D. E. (2005) PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* **8**, 626–634
- Michailidis, I. E., Helton, T. D., Petrou, V. I., Mirshahi, T., Ehlers, M. D., and Logothetis, D. E. (2007) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulates NMDA receptor activity through α-actinin. *J. Neurosci.* **27**, 5523–5532
- Mandal, M., and Yan, Z. (2009) Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* **76**, 1349–1359
- Shyng, S. L., and Nichols, C. G. (1998) Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* **282**, 1138–1141
- Sui, J. L., Petit-Jacques, J., and Logothetis, D. E. (1998) Activation of the atrial KACH channel by the βγ subunits of G proteins or intracellular Na⁺ ions depends on the presence of phosphatidylinositol phosphates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1307–1312
- Whorton, M. R., and MacKinnon, R. (2011) Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺ channel and gating regulation by G proteins, PIP₂, and sodium. *Cell* **147**, 199–208
- Hansen, S. B., Tao, X., and MacKinnon, R. (2011) Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature* **477**, 495–498
- Loussouarn, G., Park, K. H., Bellocq, C., Baró, I., Charpentier, F., and Escande, D. (2003) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J.* **22**, 5412–5421
- Bian, J. S., Kagan, A., and McDonald, T. V. (2004) Molecular analysis of PIP₂ regulation of HERG and IKr. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H2154–2163
- Thomas, A. M., Harmer, S. C., Khambra, T., and Tinker, A. (2011) Characterization of a binding site for anionic phospholipids on KCNQ1. *J. Biol. Chem.* **286**, 2088–2100
- Jogini, V., and Roux, B. (2007) Dynamics of the Kv1.2 voltage-gated K⁺ channel in a membrane environment. *Biophys. J.* **93**, 3070–3082
- 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
- Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C., and Treptow, W. (2011) Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 6109–6114
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W. A. (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353–358
- Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1987) Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* **237**, 770–775
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1991) Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7**, 547–556
- Perozo, E., MacKinnon, R., Bezanilla, F., and Stefani, E. (1993) Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels. *Neuron* **11**, 353–358
- Yang, Y., Yan, Y., and Sigworth, F. J. (1997) How does the W434F mutation block current in Shaker potassium channels? *J. Gen. Physiol.* **109**, 779–789
- Loussouarn, G., Baró, I., and Escande, D. (2006) KCNQ1 K⁺ channel-mediated cardiac channelopathies. *Methods Mol. Biol.* **337**, 167–183
- Es-Salah-Lamoureaux, Z., Fougere, R., Xiong, P. Y., Robertson, G. A., and Fedida, D. (2010) Fluorescence-tracking of activation gating in human ERG channels reveals rapid S4 movement and slow pore opening. *PLoS ONE* **5**, e10876
- Mannuzzu, L. M., Moronne, M. M., and Isacoff, E. Y. (1996) Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* **271**, 213–216
- Cha, A., and Bezanilla, F. (1997) Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence. *Neuron* **19**, 1127–1140
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **926**–935
- Mackerell, A. D., Jr., Feig, M., and Brooks, C. L., 3rd (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **25**, 1400–1415
- Klauda, J. B., Venable, R. M., Freites, J. A., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A. D., Jr., and Pastor, R. W. (2010) Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B* **114**, 7830–7843
- Lupyan, D., Mezei, M., Logothetis, D. E., and Osman, R. (2010) A molecular dynamics investigation of lipid bilayer perturbation by PIP₂. *Biophys. J.* **98**, 240–247
- Horne, A. J., and Fedida, D. (2009) Use of voltage clamp fluorimetry in understanding potassium channel gating: a review of Shaker fluorescence data. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **87**, 411–418
- Nakanishi, S., Catt, K. J., and Balla, T. (1995) A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5317–5321

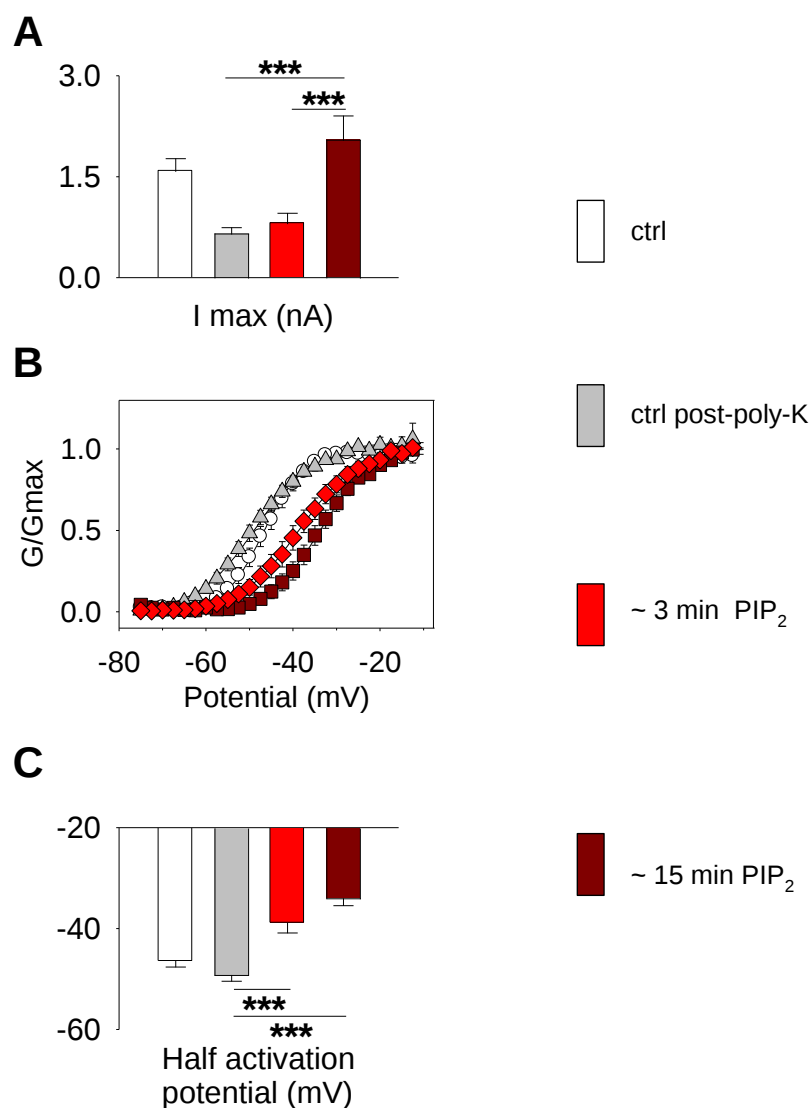
39. Loussouarn, G., Pike, L. J., Ashcroft, F. M., Makhina, E. N., and Nichols, C. G. (2001) Dynamic sensitivity of ATP-sensitive $K(+)$ channels to ATP. *J. Biol. Chem.* **276**, 29098–29103
40. Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., Pan, A. C., Gagnon, D. G., Dalmás, O., Cordero-Morales, J. F., Chakrapani, S., Roux, B., and Perozo, E. (2010) Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in $K(+)$ channels. *Nature* **466**, 272–275
41. Oliver, D., Lien, C. C., Soom, M., Baukrowitz, T., Jonas, P., and Fakler, B. (2004) Functional conversion between A-type and delayed rectifier K^+ channels by membrane lipids. *Science* **304**, 265–270
42. Flynn, G. E., and Zagotta, W. N. (2011) Molecular mechanism underlying phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced inhibition of $SpIH$ channels. *J. Biol. Chem.* **286**, 15535–15542
43. Rodriguez-Menchaca, A. A., Adney, S. K., Tang, Q.-Y., Meng, X.-Y., Rosenhouse-Dantsker, A., Cui, M., and Logothetis, D. E. (2012) PIP_2 controls voltage-sensor movement and pore opening of K_v channels through the S4-S5 linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [online] www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891352 (Accessed August 20, 2012).
44. Lindner, M., Leitner, M. G., Halaszovich, C. R., Hammond, G. R., and Oliver, D. (2011) Probing the regulation of TASK potassium channels by $PI4,5P_2$ with switchable phosphoinositide phosphatases. *J. Physiol.* **589**, 3149–3162
45. Suh, B. C., and Hille, B. (2002) Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* **35**, 507–520
46. Wang, H., Kunkel, D. D., Martin, T. M., Schwartzkroin, P. A., and Tempel, B. L. (1993) Heteromultimeric K^+ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* **365**, 75–79
47. Brew, H. M., Gittelman, J. X., Silverstein, R. S., Hanks, T. D., Demas, V. P., Robinson, L. C., Robbins, C. A., McKee-Johnson, J., Chiu, S. Y., Messing, A., and Tempel, B. L. (2007) Seizures and reduced life span in mice lacking the potassium channel subunit $Kv1.2$, but hypoexcitability and enlarged $Kv1$ currents in auditory neurons. *J. Neurophysiol.* **98**, 1501–1525
48. Kruse, M., Hammond, G. R., and Hille, B. (2012) Regulation of voltage-gated potassium channels by $PI(4,5)P_2$. *J. Gen. Physiol.* **140**, 189–205
49. Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B. C., and Hille, B. (2010) Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J. Physiol.* **588**, 3179–3185
50. O'Connell, K. M., Loftus, R., and Tamkun, M. M. (2010) Localization-dependent activity of the $Kv2.1$ delayed-rectifier K^+ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12351–12356

Supplemental information

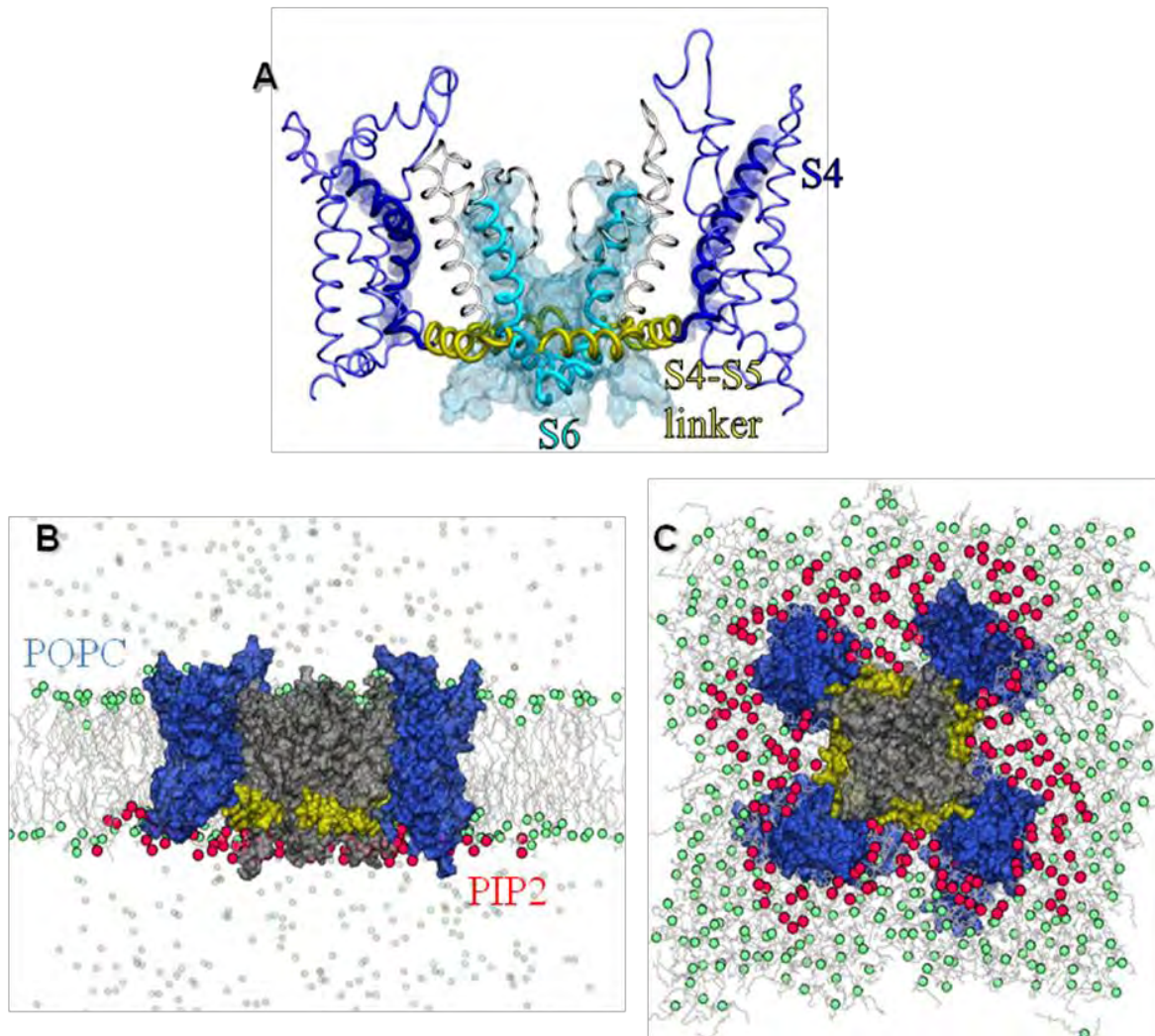
Dual regulation of *Shaker* K⁺ channels by PIP₂

Fayal Abderemane-Ali, Zeineb Es-Salah-Lamoureux, Lucie Delemotte, Marina A. Kasimova, Alain J. Labro, Dirk J. Snyders, David Fedida, Mounir Tarek, Isabelle Baró, Gildas Loussouarn

SUPPLEMENTAL DATA



Supplemental Figure 1: PIP_2 opposite effects on Shaker occurs with different kinetics. (A) Mean of maximal current at -10 mV obtained from 15 patches ($***p < 0.001$). (B) Conductance-voltage (G - V) relationships fitted with a Boltzmann function and obtained using the same protocol as in Figure 1, upper panel. (C) Mean half activation potentials.



Supplemental Figure 2: View of the molecular system used in the MD simulations. (A) Side view of the Kv1.2 channel highlighting the location of S4 (dark blue), the S4-S5 linker (yellow) and the central pore helix S6 (cyan). (B) Side and (C) bottom view of the simulation system. The channel was embedded in a POPC bilayer (headgroups as green spheres) in which the ring of bottom leaflet lipid molecules was replaced by PIP₂ molecules (red spheres). The simulation time does not allow for dilution of the PIP₂ molecules within the POPC bilayer.

Discussion

Résumé des résultats

Le but de cette étude était de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux potassiques voltage-dépendant par le PIP_2 . En utilisant le canal *Shaker* comme modèle, et une combinaison d'approches d'électrophysiologie et de fluorimétrie à potentiel imposé, nous avons montré que le PIP_2 exerce 1) un effet gain-de-fonction majeur sur le canal en augmentant l'amplitude du courant, et 2) un effet perte-de-fonction en décalant vers des potentiels plus dépolarisants, la voltage-dépendance de l'activation du canal. Cet effet perte-de-fonction est associé à un décalage vers des potentiels plus dépolarisants, de la voltage-dépendance du mouvement des segments S4 à l'origine de l'activation du canal. Grâce à une approche de simulation par dynamique moléculaire, nous avons modélisé cette dualité des effets du PIP_2 et suggéré les déterminants moléculaires à la base de ces effets.

Ainsi, cette étude montre que le PIP_2 régule le canal potassique *Shaker* de deux manières :

- le PIP_2 se fixe sur des résidus positifs situé du côté intracellulaire du pore et stabilise le canal à l'état ouvert, d'où une augmentation de l'amplitude du courant.
- le PIP_2 se fixe également sur des résidus positifs situés du côté intracellulaire des segments S4 et stabilise ces S4 en position de repos, d'où un décalage vers des potentiels plus dépolarisants, des voltage-dépendances du mouvement des S4 et de l'ouverture de la porte d'activation.

Deux sites de fixation, deux mécanismes d'action

Notre étude montre une dualité des effets du PIP_2 sur le canal potassique *Shaker*. Une étude récente a également montré une telle dualité des effets du PIP_2 sur le canal potassique neuronal Kv1.2, homologue de *Shaker* chez les mammifères (Rodriguez-Menchaca et al., 2012). Ces deux études montrent que les effets opposés du PIP_2 ont lieu avec des cinétiques différentes. De façon intéressante, l'ordre des effets est toujours le même quel que soit le sens dans lequel varie le PIP_2 (diminution ou augmentation) : l'effet sur la voltage-dépendance précède toujours celui sur l'amplitude. Ces résultats montrent l'existence de deux mécanismes d'action impliquant au moins deux sites différents de fixation du phospholipide sur le canal. La localisation précise de ces sites sera décrite dans la discussion générale. Ces résultats permettent également d'exclure, au moins pour *Shaker*, l'hypothèse selon laquelle la modulation du canal KCNQ1 par le PIP_2 est liée uniquement à un effet de ce phospholipide sur le couplage entre les modules VSD et PD (Zaydman et al.,

2013). En effet, il a été montré qu'un découplage entre le VSD et le PD de *Shaker* « libère » le voltage sensor et provoque un décalage vers la droite de la courbe d'activation (Haddad and Blunck, 2011), ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Toutefois, il est possible que les mécanismes que nous venons de décrire sur *Shaker* ne soient pas applicables aux canaux KCNQ1. Pour cette raison, il serait intéressant de vérifier si la régulation de ce canal KCNQ1 par le PIP₂ est liée uniquement à un effet sur le couplage entre les modules VSD et PD, ou bien à des effets directs sur ces modules. Pour ce faire, il serait intéressant d'étudier les effets du PIP₂ sur le canal KCNQ1 dont les arginines du segment S4 seraient neutralisées. Si l'effet prédominant du PIP₂ est de stabiliser la porte d'activation, ce mutant devrait être sensible au PIP₂.

Limites de l'étude

La principale limite de notre étude est l'utilisation de la polylysine pour diminuer la concentration de PIP₂ disponible. Cette molécule n'étant pas spécifique du PIP₂, ses effets sont à interpréter avec prudence. La polylysine est une molécule très chargée positivement et formée de la répétition de résidus Lysine. Par ses charges positives, cette polylysine masque les groupements phosphate du PIP₂ en interagissant avec leurs charges négatives. Toutefois, ces mêmes charges positives de la polylysine peuvent interagir également avec tout autre composé chargé négativement, y compris des composés lipidiques membranaires capable de réguler l'activité des canaux ioniques (D'Avanzo et al., 2013). Ainsi, la diminution de l'amplitude du courant en présence de la polylysine n'est pas forcément liée à une diminution du PIP₂, même si l'activité normale du canal est restaurée après ajout de PIP₂ exogène. Il est possible que ce PIP₂ exogène remplace le PIP₂ endogène masqué par la polylysine, mais il peut aussi libérer de la polylysine, d'autres composés négatifs de la membrane. Et dans ce cas, la restauration de l'amplitude du courant pourrait simplement être liée à la libération des groupements négatifs de ces composés membranaires. Mais de façon intéressante, la réduction du PIP₂ par la wortmanine dans le cas de *Shaker* (notre étude), et par d'autres approches telles que la Ci-VSP ou un anticorps anti-PIP₂ dans le cas du canal Kv de la famille *Shaker*, produit des résultats similaires (Rodriguez-Menchaca et al., 2012). Cela suggère que les effets observés sont bien liés au PIP₂ et non à d'autres composés membranaires.

Outre les effets sur l'amplitude du courant, la variation du PIP₂ disponible en utilisant cette approche conduit à un décalage similaire de la voltage-dépendance de nombreux paramètres biophysiques tels que l'activation, l'inactivation, la déactivation ou encore les cinétiques d'activation et d'inactivation. Ces résultats laissent penser qu'un effet de charge de cette polylysine serait à l'origine d'une modification du potentiel membranaire, auquel cas

le PIP_2 n'interagirait pas spécifiquement avec les acides aminés du B4-5. Cependant, l'obtention de résultats similaires entre la polylysine et une autre molécule sans effet de charge, la wortmanine, permet d'exclure un effet de charge de la polylysine sur le potentiel membranaire. En effet, la wortmanine est une molécule inhibitrice spécifique de la PI3-kinase, responsable de la synthèse des $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ et $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$, et dans une moindre mesure, de la PI4-kinase, responsable de la synthèse du $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (Nakanishi et al., 1995). Et c'est au PIP_2 qu'on associe grossièrement les effets de la wortmanine sur le canal *Shaker* car il est le phospholipide le plus abondant dans la membrane. Mais pour que l'étude soit complète, il faudrait étudier les effets des $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ et $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ car si par exemple le $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ est dix fois moins abondant mais dix fois plus efficace sur la modulation du canal, il jouerait un rôle régulateur non négligeable.

L'ensemble des résultats de notre étude suggèrent un rôle physiologique du PIP_2 dans l'activité du canal potassique *Shaker* dans la mesure où ce phospholipide semble être nécessaire à l'activité du canal. Toutefois, l'utilisation de ces deux approches (polylysine et wortmanine) peut induire des variations du niveau de PIP_2 plus élevées que celles qui sont induites par des processus physiologiques. On ne peut donc pas conclure sur l'implication du PIP_2 dans la régulation du canal *Shaker*, par exemple par un récepteur couplé à une phospholipase C. Ainsi, il serait intéressant d'étudier le rôle du PIP_2 dans la régulation des canaux mammifères de la famille *Shaker* en utilisant des approches alternatives qui provoquent des variations de PIP_2 dans un intervalle physiologique.

Exemples d'approches alternatives

- Phosphatase voltage-dépendante

La phosphatase voltage-dépendante (VSP, *pour voltage-sensor phosphatase*) est une phosphatase dont l'activité enzymatique est régulée par les variations du potentiel membranaire. La protéine est composée de deux modules : le VSD composé de quatre segments transmembranaires (S1-S4) avec le segment S4 riche en résidus positifs, et la partie cytosolique responsable de l'activité enzymatique (Figure 21). La première VSP a été identifiée chez l'Ascidie marine *Ciona intestinalis*, ce qui lui a valu le nom de Ci-VSP (Murata et al., 2005). D'autres VSP ont été par la suite, identifiées chez d'autres espèces tels que le zebrafish *Danio rerio* et les amphibiens *Xenopus laevis* et *xenopus tropicalis* (Hossain et al., 2008; Murata and Okamura, 2007; Ratzan et al., 2011).

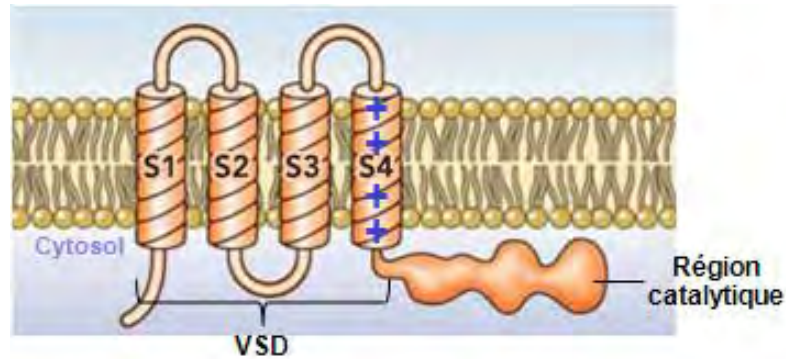


Figure 21 : Structure schématique d'une phosphatase voltage-dépendante.

La protéine est formée de deux parties : un domaine voltage-sensor (VSD) et une région catalytique responsable de l'activité phosphatasique. D'après (DeCoursey, 2010)

Ces VSP présentent un avantage majeur pour les études expérimentales portant sur la régulation des canaux ioniques voltage-dépendants par le PIP_2 . En effet, du fait de la dépendance de l'activité phosphatase au potentiel membranaire, elles permettent un meilleur contrôle de la variation du niveau de PIP_2 membranaire. De plus, étant donné que la VSP est exprimée à la membrane comme les canaux ioniques, cette approche ne nécessite pas que la cellule soit intacte pendant l'expérience. Par conséquent, cette VSP permet d'utiliser des configurations comme l'inside-out permettant d'avoir accès à la face intracellulaire de la membrane.

En revanche, une étude a montré que la Ci-VSP déphosphoryle le $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ mais aussi le $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$, ce qui remet en cause la spécificité de cette enzyme (Halaszovich et al., 2009). Il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure les autres VSP sont spécifiques du $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, phospholipide majoritaire du feuillet interne membranaire.

- Modulation induite par la rapamycine

Une approche alternative a été développée pour faire varier le niveau de PIP_2 membranaire de façon inductible (Suh et al., 2006; Varnai et al., 2006). Cette approche est basée sur l'hétéro-dimérisation des protéines FRB et FKBP induite par la rapamycine (Figure 22A). FRB est une protéine ancrée sur la face interne de la membrane plasmique tandis que FKBP reste dans le cytosol. En présence de rapamycine, FKBP est transloquée au niveau membranaire par la formation d'un dimère avec FRB. Par conséquent, l'expression de FRB d'une part, et d'une protéine de fusion entre FKBP et une phosphatase spécifique du PIP_2 d'autre part, permet de déclencher la déphosphorylation du PIP_2 membranaire par ajout de rapamycine. De plus, l'expression d'une protéine fluorescente telle que la GFP ou la RFP, en fusion avec FRBP, permet de suivre en temps réel la translocation du complexe FRBP-

phosphatase vers la membrane (Figure 22B). Cette approche présente un avantage majeur dans la mesure où elle permet de moduler de façon inductible et spécifique, la concentration de PIP_2 membranaire par ajout de rapamycine dans le milieu extracellulaire. Une telle approche a déjà été utilisée dans des études sur la régulation des canaux ioniques par le PIP_2 (Lindner et al., 2011; Suh et al., 2006; Varnai et al., 2006).

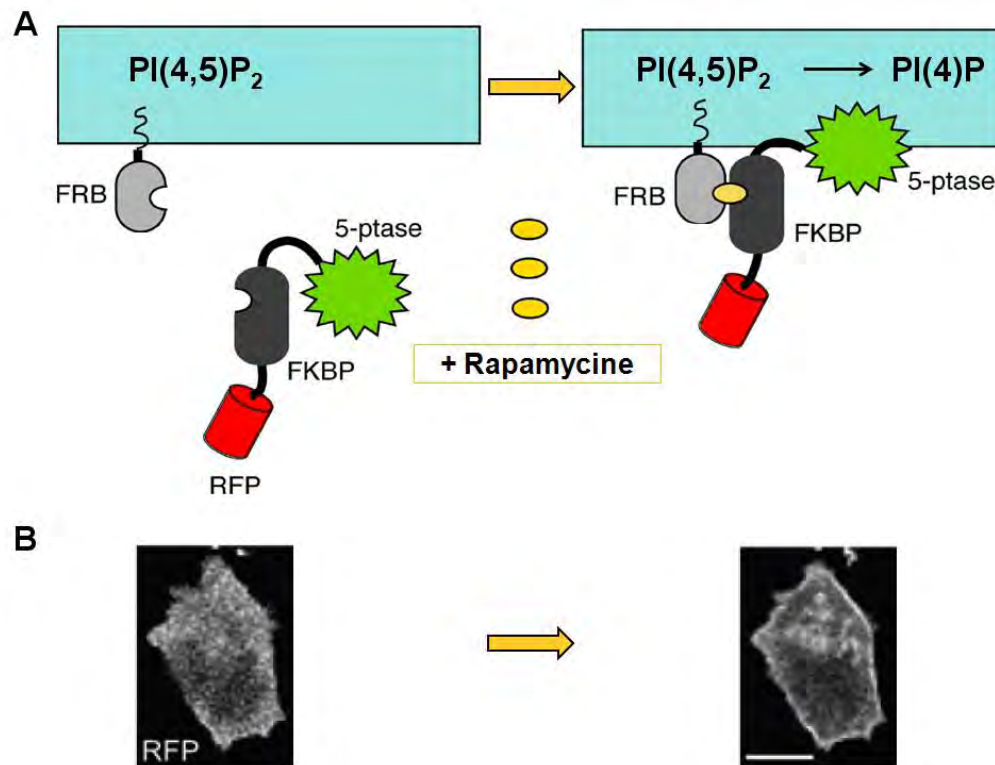


Figure 22 : Modulation inductible de la concentration de PIP_2 membranaire.

(A) L'hétérodimérisation de FRB (FRBP rapamycin binding) membranaire avec la phosphatase (5-ptase) cytosolique couplée à FRBP (FK506 binding protein) et RFP (red fluorescence protein), après ajout de rapamycine entraîne un recrutement de la phosphatase à la membrane et une déphosphorylation du PIP_2 . (B) Exemple de suivi de la translocation membranaire du complexe cytosolique phosphatase-FKBP-RFP suite à l'ajout de rapamycine, grâce à l'observation de la fluorescence émise par RFP. Adapté selon (Lindner et al., 2011; Varnai et al., 2006).

Toutefois, l'utilisation de cette approche nécessite de garder la cellule intacte pendant l'expérience. Cela limite d'utiliser certaines configurations comme l'inside-out, nécessaires pour ajouter des composés comme le PIP_2 , directement à la face intracellulaire de la membrane. De plus, l'utilisation d'une 5'-phosphatase peut également faire intervenir d'autres phospholipides comme le PI(3,5)P_2 ou le PI(3,4,5)P_3 .

En somme, ces exemples d'approches alternatives permettent de reproduire des variations relativement physiologiques, mais pas forcément spécifiques, du niveau de PIP₂ membranaire. Il faut tout de même garder en tête que les protéines utilisées dans ces approches alternatives peuvent être sous ou surexprimées à des niveaux non-physiologiques, ce qui fait que ces techniques, même si elles sont présentées comme provoquant des variations de PIP₂ physiologiquement pertinentes (Kruse et al., 2012), ne dispensent pas d'étudier la pertinence de la régulation par le PIP₂ dans des modèles *in vivo*.

Conclusion

Cette étude détermine les mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux Kv par le PIP₂. Ce phospholipide régule ces canaux via deux effets perte et gain-de-fonction sur les modules VSD et PD, respectivement, et avec une prédominance de l'effet gain de fonction. Du fait de cet effet majeur du PIP₂ sur le module PD de *Shaker* via une stabilisation de l'ouverture de la porte d'activation, tout comme pour KCNQ1, hERG et Kir6.2, cette étude confirme l'homologie fonctionnelle proposée auparavant entre les canaux potassiques à six domaines transmembranaires et ceux à deux domaines transmembranaires (Loussouarn et al., 2003). Une telle homologie fonctionnelle serait cohérente avec les similarités structurales entre ces canaux potassiques à deux domaines transmembranaires et le module PD des canaux potassiques à six domaines transmembranaires.

Projet 2 :

Etude des mécanismes de régulation du canal potassique cardiaque KCNQ1 par le potentiel membranaire

Introduction

Comme décrit dans l'introduction générale, les canaux ioniques voltage-dépendants sont constitués de deux modules : le VSD responsable de la détection des variations du potentiel membranaire, et le PD constituant la zone de sélectivité et de conduction des ions. La régulation de ces canaux ioniques par le potentiel membranaire se fait via un couplage entre ces deux modules. Nombreuses études sur différents canaux ioniques et utilisant différentes techniques, ont permis d'identifier deux principaux acteurs dans ce couplage : B4-5 et TS6 (Barghaan and Bähring, 2009; Ferrer et al., 2006; Lu et al., 2001, 2002; Prole and Yellen, 2006). L'ensemble de ces études démontrent que le mouvement du segment voltage sensor S4 à l'origine des changements conformationnels du VSD d'une part, et l'ouverture-fermeture de la porte d'activation permettant le passage ou non des ions à travers le PD d'autre part, sont couplés à travers l'interaction entre B4-5 et TS6. Cette interaction a été également confirmée par la structure cristallographique du canal potassique voltage-dépendant Kv1.2 (Long et al., 2005a).

Malgré ce consensus sur les acteurs du couplage entre ces modules VSD et PD, plusieurs modèles ont été proposés sur ses mécanismes moléculaires, lesquels régissent la régulation de l'activité des canaux ioniques par le potentiel membranaire. 1) le modèle de « levier mécanique » selon lequel l'interaction entre B4-5 et TS6 est permanente et le couplage entre VSD et PD se fait de façon purement mécanique. 2) le modèle d'interaction labile selon lequel l'interaction entre B4-5 et TS6 est spécifique, non-permanente et stabilisatrice d'un état bien précis du canal (ouvert ou fermé). 3) le modèle consensuel selon lequel B4-5 et TS6 interagissent en permanence mais que cette interaction fait intervenir des résidus bien précis et différents en fonction de l'état ouvert ou fermé du canal. Cette variété de modèles reflète la complexité des mécanismes de couplage entre les modules VSD et PD. Ainsi, mon deuxième projet de thèse s'est focalisé sur l'étude de ces mécanismes sur le canal potassique cardiaque KCNQ1.

Des études sur ce canal ont montré que des mutations de résidus spécifiques au niveau de B4-5 ou de TS6 entraînent l'apparition d'un courant voltage-indépendant, suggérant que ces mutations diminuent l'interaction entre B4-5 et TS6 lorsque le canal est à l'état fermé (Boulet et al., 2007; Labro et al., 2011). Ces résultats suggèrent également une interaction labile et

spécifique entre B4-5 et TS6, stabilisant l'état fermé du canal KCNQ1. Ces deux études, ainsi que d'autres arguments, nous ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle B4-5 jouerait le rôle d'un ligand voltage-dépendant, capable de se fixer de façon spécifique à TS6 (son récepteur) pour stabiliser l'état fermé du canal KCNQ1 (Figure 23A).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué, grâce à la technique de patch-clamp, les effets de minigènes codant pour des peptides mimétiques de B4-5 ou TS6, sur l'activité de KCNQ1. Si l'hypothèse est vraie, la surexpression du peptide mimétique de B4-5 devrait stabiliser la fermeture du canal et de ce fait, induire une perte de fonction (Figure 23B). En revanche, la surexpression du peptide mimétique de TS6 devrait déstabiliser la fermeture du canal KCNQ1 en leurrant B4-5 endogène au canal. Ce peptide devrait donc entraîner un gain de fonction (Figure 23C).

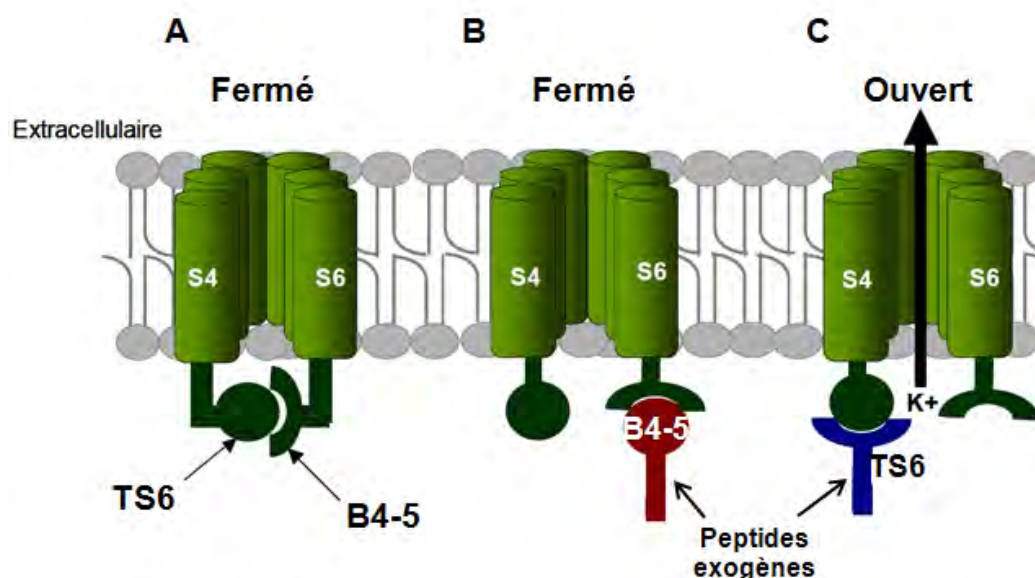


Figure 23 : Modulation de l'activité de KCNQ1 par des peptides exogènes B4-5 et TS6 selon le modèle ligand-récepteur. B4-5 : boucle S4-S5. TS6 : partie C-terminale du S6.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le « Journal of Biological Chemistry » (Choveau, Rodriguez, **Abderemane-Ali** et al, 2011).

KCNQ1 Channels Voltage Dependence through a Voltage-dependent Binding of the S4-S5 Linker to the Pore Domain^{*S}

Received for publication, May 19, 2010, and in revised form, October 1, 2010. Published, JBC Papers in Press, October 12, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.146324

Frank S. Choveau^{‡S¶1}, Nicolas Rodriguez^{‡S¶1}, Fayal Abderemane Ali^{‡S¶1}, Alain J. Labro[¶], Thierry Rose^{**}, Shehrazade Dahimène^{‡S¶12}, Hélène Boudin^{¶12}, Carole Le Hénaff^{‡S¶14}, Denis Escande^{‡S¶1}, Dirk J. Snyders[¶], Flavien Charpentier^{‡S¶13}, Jean Mérot^{‡S¶15}, Isabelle Baro^{‡S¶15}, and Gildas Loussouarn^{‡S¶15,6}

From [‡]INSERM, U915, Nantes F-44000, France, ^SCNRS, ERL3147, Nantes F-44035, France, [¶]Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'Institut du Thorax, Nantes F-44000, France, the [¶]Department of Biomedical Sciences, Laboratory for Molecular Biophysics, Physiology, and Pharmacology, University of Antwerp, 2610 Antwerp, Belgium, ^{**}Institut Pasteur, Plate-forme de Biophysique des Macromolécules et de leurs Interactions, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, ^{¶¶}INSERM, U643, Nantes F-44000 France, and ^SCHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes F-44000, France

Voltage-dependent potassium (Kv) 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 voltage sensors (S4) regulate pore gating? Previous mutagenesis data obtained on the Kv channel KCNQ1 highlighted the critical role of specific residues in both the S4-S5 linker (S4S5_L) and S6 C terminus (S6_T). From these data, we hypothesized that S4S5_L behaves like a ligand specifically interacting with S6_T and stabilizing the closed state. To test this hypothesis, we designed plasmid-encoded peptides corresponding to portions of S4S5_L and S6_T of the voltage-gated potassium channel KCNQ1 and evaluated their effects on the channel activity in the presence and absence of the ancillary subunit KCNE1. We showed that S4S5_L peptides inhibit KCNQ1, in a reversible and state-dependent manner. S4S5_L peptides also inhibited a voltage-independent KCNQ1 mutant. This inhibition was competitively prevented by a peptide mimicking S6_T, consistent with S4S5_L binding to S6_T. Val²⁵⁴ in S4S5_L is known to contact Leu³⁵³ in S6_T when the channel is closed, and mutations of these residues alter the coupling between the two regions. The same mutations introduced in peptides altered their effects, further confirming S4S5_L binding to S6_T. Our results suggest a mechanistic model

in which S4S5_L acts as a voltage-dependent ligand bound to its receptor on S6 at rest. This interaction locks the channel in a closed state. Upon plasma membrane depolarization, S4 pulls S4S5_L away from S6_T, allowing channel opening.

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) channel provided a lot of information on the structure of Kv channels (1–3). Even though these data initiated controversies on the dynamics of the voltage sensor, S4 (4), they provided a new template for investigations on Kv channel molecular characteristics. For example, the structure of the Kv pore domain (S5–S6) turned out to be similar to the pore domain of two-transmembrane domain potassium channels like KcsA (5) and KirBac1.1 (6). Besides structure, the crystallographic analyses of KvAP and Kv1.2 gave insights on the dynamics of channel voltage dependence. Notably, the crystal structure of Kv1.2 is believed to represent the channel in an open state (3), and in this conformation, the S4-S5 linker (S4S5_L)⁷ is interacting with the S6 C terminus (S6_T). The authors (3) used homology modeling to infer a closed state structure from the open state structure. In the closed state, the model shows that S4S5_L and S6_T are also in contact. Those results pointed to a mechanism by which S4S5_L are permanently linked to S6, and this link is critical in translating the voltage sensor movement into gate opening or closure (3).

In a few other channels, the S4S5_L/S6_T interaction seems rather state-dependent. A second-site suppressor yeast screen in the hyperpolarization-activated channel KAT1 suggested that S4S5_L and S6_T are interacting only in the channel open state (7). In another hyperpolarization-activated channel,

^{*} This work was supported in part 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), the Hubert Curien Program (Tournesol program), and the Association Française contre les Myopathies (Grant 14120 to G. L.), and from Vaincre La Mucoviscidose (to J. M.).

[†] This work was the last we discussed with D. Escande, our irreplaceable mentor (deceased November 13, 2006). Denis, thanks for your leading enthusiasm in every project.

^S The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. 1.

¹ Supported by the Fondation Génavie, the Fondation pour la Recherche Médicale, and the Fédération Française de Cardiologie.

² Recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche.

³ Recipient of a tenure position supported by INSERM.

⁴ Present address: Institut des Vaisseaux et du Sang, Hôpital Lariboisière, 8 rue Guy Patin, 75475 Paris Cedex 10, France.

⁵ Recipient of a tenure position supported by CNRS.

⁶ To whom correspondence should be addressed: INSERM U915, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex, France. Fax: 33-2-28-08-01-30; E-mail: gildas.loussouarn@inserm.fr.

⁷ The abbreviations used are: S4S5_L, S4-S5 linker; S6_T, S6 C terminus; hERG, human ether-a-go-go-related gene; HCN, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel.

cross-linking of S4S5_L and S6_T prevented the channel from deactivating (8), suggesting that S4S5_L and S6_T are interacting only when the channel is open. In hERG too, a cross-linking study suggested a state-dependent S4S5_L and S6_T interaction but, this time, in the closed state (9). In the cited studies, the state-dependent interaction between S4S5_L and S6_T suggests that this interaction may stabilize the open state of hyperpolarization-activated channels (KAT1, HCN) and the closed state of depolarization-activated channels (hERG).

Scanning mutagenesis studies were performed in a cardiac voltage-gated potassium channel, KCNQ1 (10, 11) to study the role of S4S5_L (see companion article (31)) and S6_T (12) in the voltage modulation of this channel. These studies identified residues implicated in the S4S5_L/S6_T interaction. In particular, the V254A mutation in S4S5_L and L353A mutation in S6_T led to a similar phenotype, *i.e.* the appearance of a voltage-independent current component, suggesting that mutation of one of these residues decreases the interaction between S4S5_L and S6_T in the closed state. Thus, as in hERG, specific interaction between S4S5_L and S6_T residues may also stabilize KCNQ1 channel closed state. This would suggest that S4S5_L acts as a ligand, stabilizing the channel closed state, such as ATP stabilizes the K_{ATP} channel closed state (13). To test whether S4S5_L by itself is a ligand and S6_T is its receptor, we have designed plasmids coding for the potential ligand (S4S5_L, 16 amino acids) and receptor (S6_T, 13 amino acids) and tested their effects on KCNQ1 function. Our results suggest that S4S5_L stabilizes the channel in a closed conformation by interacting with S6_T. Upon depolarization of the plasma membrane, S4 pulls S4S5_L away from S6_T, allowing channel opening.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmid Constructs—Complementary DNAs encoding KCNQ1 peptides were amplified by polymerase chain reaction using specific primers corresponding to KCNQ1 S4S5_L or S6_T. 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 (14). To construct the pCB6-L353A hKCNQ1, a NotI-BamHI fragment containing the mutation was cut out of the pIRES2-EGFP-L353A hKCNQ1 (12) and ligated into pCB6-hKCNQ1 to replace the WT sequence. Sequencing of the plasmid confirmed the presence of the mutation and the absence of unwanted mutations.

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 Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 international units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) at 5% CO₂ and 95% air at 37 °C in a humidified incubator. Cells were transfected in 35-mm plates when the culture reached 60–80% confluence, with DNA (2–5 µg total DNA as described below) complexed with FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemical) according to the standard protocol recommended by the manufacturer. In most of our experiments, the peptide effects were studied on a fusion protein of 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). In the present study, this pCDNA3.1-KCNE1-KCNQ1 construct is named the KCNE1-KCNQ1 concatemer (E1-Q1). GFP allowed the detection of cells expressing the peptide. For experiments with WT E1-Q1 or S140G E1-Q1 (WT KCNE1 fused to S140G KCNQ1), pIRES-GFP plasmids encoding S4S5_L, S6_T, 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. For experiments with WT or L353A KCNQ1, the pIRES-GFP plasmids (4 µg per plate) were cotransfected with the human pCB6-KCNQ1 (1 µg per plate). In experiments in which two peptides were simultaneously expressed (see Fig. 7), DNA composition was 0.2 µg of pCDNA3.1-S140G E1-Q1, 0.9 µg pIRES-GFP plasmids encoding S4S5_L, and 0.9 µg of pIRES-GFP plasmids encoding S6_T (or pCB6-CD4 (15) for control cells). In hERG experiments, COS-7 cells were co-transfected with 0.4 µg of pSI hERG (16) and 1.6 µg of pEGFP (control) or pIRES-GFP plasmids encoding a peptide (S4S5_L or S6_T).

Electrophysiology—24 to 72 h 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. KCNQ1 and hERG activation curves were obtained from the tail currents and fitted by Boltzmann equations. KCNE1-KCNQ1 activation and deactivation kinetics were obtained by a monoexponential fit. If channels are spending more time in deeper closed states, they need to go through more states before reaching the open state. This is reflected by a prolonged delay in channel activation (17). This delay in channel activation was calculated from the shift in the monoexponential fit of the current measured at +80 mV.

Solutions—In ruptured patch experiments, pipettes (Kimble; Vineland, NJ) were filled with the following solution: 150 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA and 0.5 mM MgCl₂, pH 7.2, with KOH. In permeabilized patch experiments, the pipette solution contained the following: 120 mM K-glucuronate, 25 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0.8 µg/ml amphotericin B, pH 7.2, with KOH. The standard Tyrode perfusion solution contained the following: 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES and 5 mM glucose, pH 7.4, with NaOH.

Kinetic Model—The KCNE1-KCNQ1 kinetic model was derived from the model described by Silva and Rudy (18). This model has been optimized using Model Maker (version 4.0, AP Benson) to fit our experimental data, with an additional constraint: *P_o* is <0.65 at potentials where the channel is fully activated. This constraint comes from the observation

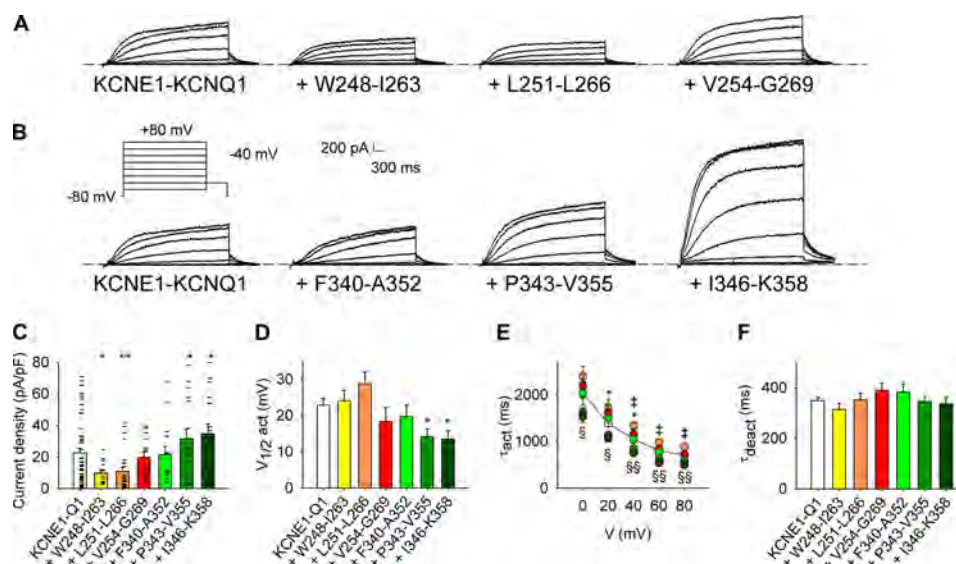


FIGURE 2. Effects of the "S4S5 linker" or the "S6 C terminus" peptides on KCNE1-KCNQ1 currents. *A* and *B*, representative whole-cell recordings of the WT KCNE1-KCNQ1 current in the absence (KCNE1-KCNQ1) and in the presence of S4S5_L (*A*) or S6_T peptides (*B*). *Inset*, voltage protocol used in *A* and *B*, one epoch every 7 s. *C–F*, average KCNE1-KCNQ1 tail current density at -40 mV after a prepulse at $+80$ mV (*C*), half-activation potential ($V_{1/2act}$) (*D*), activation time constant at potential from 0 to $+80$ mV (τ_{act}) (*E*), and deactivation time constant at -40 mV (τ_{deact}) (*F*) in the absence and in the presence of various S4S5_L or S6_T peptides ($n = 15$ – 58). In *C*, current amplitude scatter data is also presented (—). *, Trp^{248} – Ile^{263} ; †, Leu^{251} – Leu^{266} ; ‡, Pro^{343} – Val^{355} ; ¶, Ile^{346} – Lys^{358} . One symbol, $p < 0.05$; two symbols, $p < 0.01$. Error bars show the S.E.

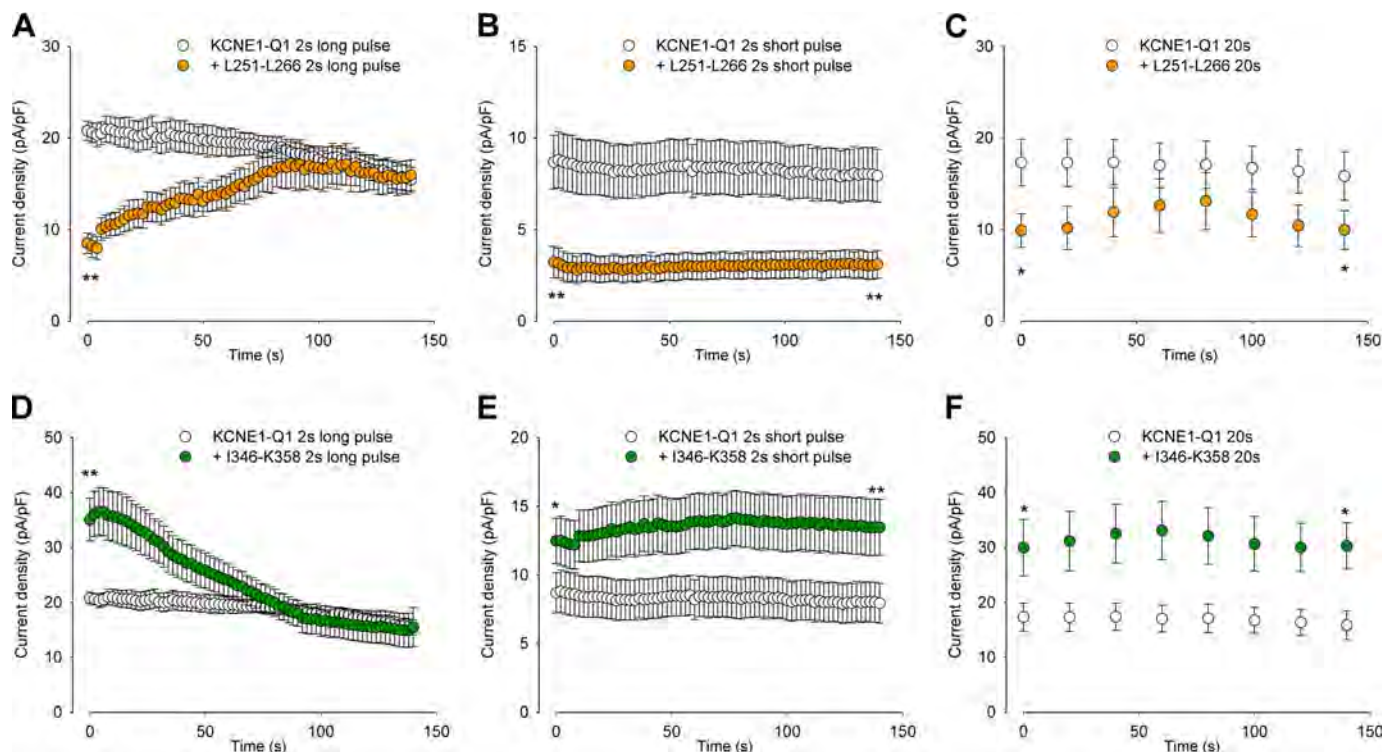


FIGURE 3. Reversibility of the peptide effects. *A–C*, average KCNE1-KCNQ1 tail-current density measured at -40 mV after a 250-ms to 1-s prepulse at $+80$ mV, as a function of time after patch rupture, in cells expressing no peptide (KCNE1-KCNQ1) or the Leu^{251} – Leu^{266} peptide. Both voltage pulse duration (*A*, 1 s; *B*, 250 ms) and depolarization frequencies were varied (*A*, a depolarization every 2 s; *C*, a depolarization every 20 s). Resting potential was -80 mV ($n = 8$ – 38). *D–F*, same experiments as in *A–C*, with the Ile^{346} – Lys^{358} peptide ($n = 8$ – 28). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ versus KCNE1-KCNQ1 alone.

mutation to an alanine has a high impact on the channel voltage dependence (*cf.* Fig. 1 and see companion article (31)).

S6 C Terminus Peptides Activate KCNE1-KCNQ1 Channels— If the S6 C terminus is the receptor for S4S5_L, then the S6_T peptides should decoy the endogenous S4S5_L linker, prevent its binding to S6_T, and increase channel activity. Indeed, two

of them (Pro^{343} – Val^{355} and Ile^{346} – Lys^{358}) up-regulated the WT channel and shifted the half-activation potential toward negative values (Fig. 2, *B–D*). Activation was accelerated (Fig. 2*E*), but deactivation was unaffected (Fig. 2*F*). The absence of effect of peptide Phe^{340} – Ala^{352} is consistent with the fact that this peptide is missing Leu^{353} and Val^{355} . These residues seem

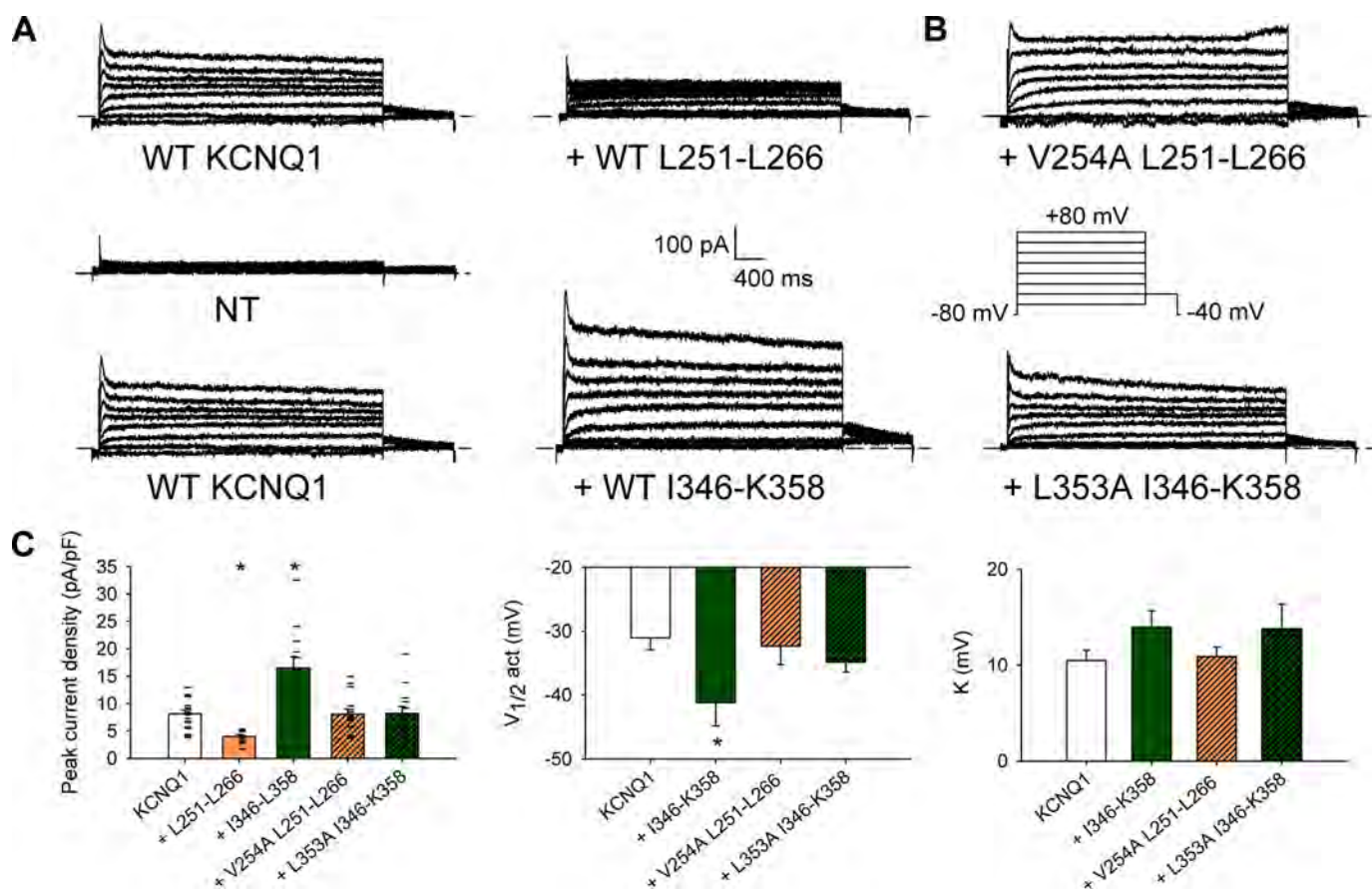


FIGURE 4. Effects of WT and mutant S4S5_L or S6_T peptides on KCNQ1 currents. *A*, representative whole-cell recordings of nontransfected cells (NT) and WT KCNQ1 current in the absence (KCNQ1) and in the presence of the S4S5_L peptide (+ Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶) or the S6_T peptide (+ Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸). *Inset*, voltage protocol, one epoch every 7 s. *B*, representative whole-cell recordings of the WT KCNQ1 current in the presence of a mutant S4S5_L peptide (+ V254A Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶) or a mutant S6 C terminus peptide (+ L353A Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸). *C*, average 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 nontransfected cells, 10–18 otherwise). In *C*, current amplitude scatter data are also presented (–). *, $p < 0.05$ versus KCNQ1 alone.

to play a major role in the channel voltage modulation because their substitutions to an alanine have a high impact on channel voltage dependence (*cf.* Fig. 1 and Ref. 12).

Use- and State-dependent Reversibility of Peptide Effects—In the following experiments, we studied the most potent inhibiting peptide Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ and the most potent activating peptide Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ 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 (Fig. 3, *A* and *D*). In cells expressing KCNE1-KCNQ1 alone, the current was quite stable with a slight rundown (23). In cells coexpressing the channel and the Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ peptide, the current density increased to reach control values measured in absence of peptide (Fig. 3*A*). Conversely, in cells coexpressing the channel and the Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ peptide, the current density decreased to reach control values (Fig. 3*D*). This suggests that both peptides do not act on channel trafficking but strictly on gating.

Because any bound peptide (S4S5_L or S6_T) is most probably intercalated between the endogenous S4S5_L and S6_T (*cf.* scheme in Fig. 8*A*), membrane depolarization, which pulls on the endogenous S4S5_L, may free the peptide that is otherwise trapped in the core of the protein. In other words, long and frequent depolarization should favor reversion; shorter or less

frequent depolarization should have less effect. To test this, a shorter depolarizing pulse was applied with maintained frequency. In this condition, no reversion was observed for both the inhibiting peptide Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ (Fig. 3*C*) and the activating peptide Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ (Fig. 3*E*). We also tested a depolarizing pulse with maintained duration but lower frequency. Again, no reversion was observed (Fig. 3, *D* and *F*). Altogether, these results suggest that peptide unbinding is favored by membrane depolarization, consistent with the state-dependent channel/peptide interaction.

Effect of Peptides on KCNQ1 without KCNE1—Several studies suggest that KCNE1 interacts with S4S5_L (24) and S6_T (24, 25). To evaluate the role of KCNE1 in the ligand/receptor mechanism, we coexpressed the most potent peptides (Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ for S4S5_L and Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ for S6_T) with KCNQ1 alone. Like in the presence of KCNE1, we observed a current inhibition with Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ and an activating effect with Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ (Fig. 4, *A* and *C*). These results suggest that the S4S5_L/S6_T state-dependent interaction is independent of the presence/absence of KCNE1.

Mutations That Decrease S4S5_L and S6_T Interaction also Alter Peptide Effect—Altogether, the data presented above support the hypothesis that S4S5_L peptides target the channel S6_T and vice versa. To further address the specificity of the

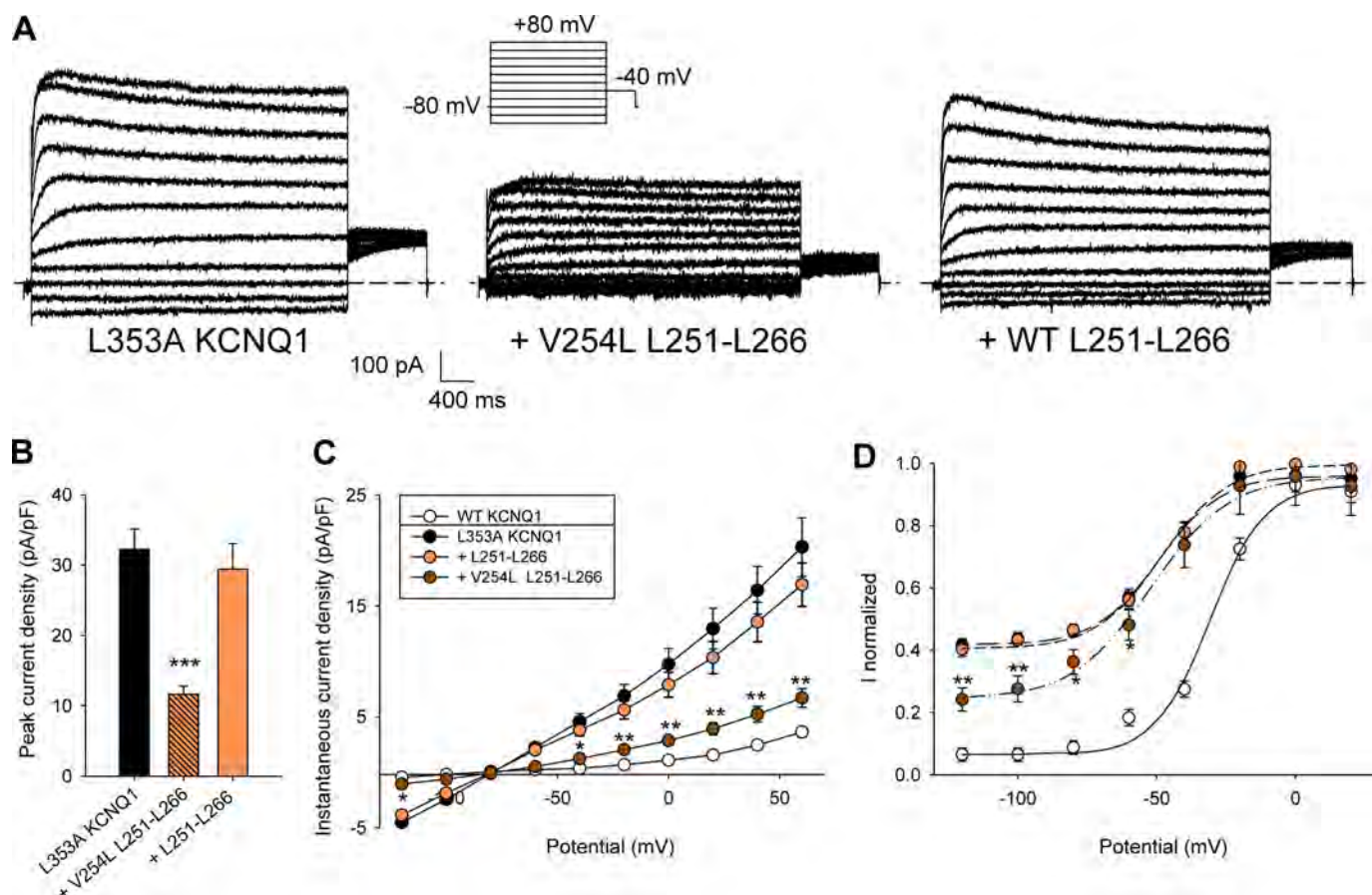


FIGURE 5. **Effects of WT and mutant S4S5_L peptides on L353A KCNQ1 currents.** *A*, representative whole-cell recordings of L353A KCNQ1 current in the absence (KCNQ1 L353A) and in the presence of the mutant (+ Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ V254L) or the WT S4S5_L peptide (+ Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶). *Inset*, voltage protocol, one epoch every 7 s. *B*, mean peak current density, in the three conditions described in *A* ($n = 10$ – 12). *C*, instantaneous current density, measured at the beginning of the prepulse, as a function of prepulse potential ($n = 10$ – 12). *D*, activation curve built from the tail currents at -40 mV ($n = 10$ – 12). In *C* and *D*, besides the three conditions described in *A*, KCNQ1 data are shown for comparison. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus L353A KCNQ1 alone.

interaction between the peptides and the channel, we evaluated the effect of peptides bearing mutations known to decrease S4S5_L and S6_T interaction. In an accompanying paper, Snyder and co-workers (31) show that the V254A mutation in S4S5_L and the L353A mutation in S6_T generate an instantaneous current component, suggesting that S4S5_L/S6_T interaction is weakened by the mutations (see companion article (31)). Indeed, introduction of the V254A mutation into the S4S5_L peptide Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ abolished the peptide inhibition of the channel. Similarly, introduction of the L353A mutation into the S6_T peptide Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ abolished its activating effect. The suppression of both peptide effects (Fig. 4, *B* and *C*) supports that the S4S5_L peptide is specifically targeting S6_T, and vice versa. Looking now at the channel, introduction of the L353A mutation should also render the channel less sensitive to the WT S4S5_L peptide. Indeed, the peak current measured in the mutant channel L353A was not decreased when the WT S4S5_L peptide was coexpressed (Fig. 5, *A* and *B*), also suggesting that the S4S5_L peptide is specifically targeting S6_T.

Rescue of L353A Channel Closure by V254L Peptide Further Supports Peptide Specificity—In the companion article (31), the partial open phenotype of the L353A mutant channel could be rescued by the V254L mutation in the channel

S4S5_L. In parallel, in the experiments with peptides, introduction of the V254L mutation in the S4S5_L peptide restored its effect on the L353A mutant channel (Fig. 5, *A* and *B*). Moreover, the instantaneous current observed in L353A (*cf.* companion article (31)) was also reduced by the V254L S4S5_L peptide but not by the WT S4S5_L peptide (Fig. 5*C*). This reduction of the instantaneous current could also be observed in the activation curve (Fig. 5*D*). These experiments strictly mimicked the rescue of the S4S5_L/S6_T interaction observed within the channel by Labro *et al.* (see companion article (31)) and is a strong support for a specific interaction between the channel and the peptide.

S4S5_L Peptide Effect on a Voltage-independent Mutant—The S140G E1–Q1 mutant (WT KCNE1 fused to S140G KCNQ1) does not show any voltage dependence in the -80 to $+80$ mV range (26). If S4S5_L peptides bind to S6_T to stabilize the closed state, they should inhibit the mutant channel as well. Fig. 6 shows that coexpression of the S140G E1–Q1 mutant channel with the S4S5_L peptides (Trp²⁴⁸–Ile²⁶³ or Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶) led to an almost complete inhibition of the current (Fig. 6, *A* and *B*), whereas the activating peptides had no effect on the already fully activated S140G channel. In cells expressing the inhibitory S4S5_L

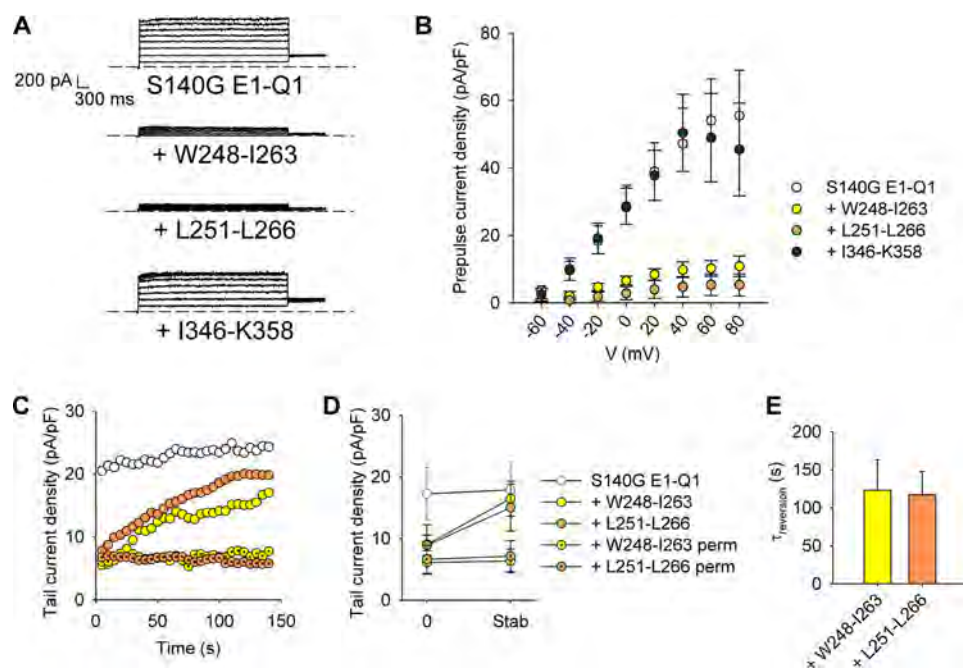


FIGURE 6. Effects of the S4S5_L or the S6_T peptides on S140G E1-Q1 currents. *A*, representative ruptured patch recordings of the S140G E1-Q1 current in the absence (S140G E1-Q1) and in the presence of S4S5_L peptides (+ Trp²⁴⁸-Ile²⁶³ or + Leu²⁵¹-Leu²⁶⁶) or a S6_T peptide (+ Ile³⁴⁶-Lys³⁵⁸). The voltage protocol was the same as described in the legend to Fig. 2. *B*, S140G E1-Q1 current density measured on the late current ($n = 9-21$). *C*, S140G E1-Q1 tail current density measured at -40 mV after a prepulse at $+40$ mV during dilution of S4S5_L peptides and in permeabilized configuration (*perm*) ($n = 8$) in representative cells. Voltage protocol was from a holding potential of -80 mV, one voltage step to $+40$ mV (1000 ms) and then back to -40 mV (500 ms), every 5 s. *D*, mean tail-current density measured as in *C*, immediately after patch rupture/permeabilization (0) and after current stabilization (*stab*). *E*, reversion time constant ($\tau_{\text{reversion}}$) determined from a monoexponential fit of the run-up in the conditions presented in *C* ($n = 6-8$).

peptides, patch rupture led to a gradual increase in current density (Fig. 6, *C-E*), consistent with the peptide dilution into the patch pipette, as observed for the WT channel above. Current recovery did not occur when peptide dilution was prevented using the permeabilized patch configuration (Fig. 6, *C* and *D*). It is worth noting that the current increased toward values similar to those observed in the absence of peptide indicating that the peptides affect channel gating but not trafficking. Importantly, the reversion of the peptide effects indicates a loose peptide/channel association consistent with a loose S4S5_L/S6_T interaction in the channel.

S4S5_L and S6_T Peptides Interact with Each Other—Our observations suggest an interaction between S4S5_L and S6_T in the channel protein. Accordingly, when the two peptides are coexpressed, they should bind to each other and annihilate their respective effect. To confirm this, we used the S140G E1-Q1 mutant, which is sensitive to the S4S5_L but not the S6_T peptides. When both a S4S5_L (Trp²⁴⁸-Ile²⁶³ or Leu²⁵¹-Leu²⁶⁶) and a S6_T peptide (Ile³⁴⁶-Lys³⁵⁸) were coexpressed with the channel, the inhibition of S140G E1-Q1 by a S4S5_L peptide was not observed (Fig. 7). This loss of inhibition is consistent with the idea that the S6_T peptide Ile³⁴⁶-Lys³⁵⁸ associates with the S4S5_L peptide and competitively prevents S4S5_L peptide association with the channel S6_T. Hence, S4S5_L and S6_T peptides that bind the WT channel can also bind to each other. Interestingly, the effects of S4S5_L peptides are not prevented by the S6_T peptide Phe³⁴⁰-Ala³⁵² that does not up-regulate the WT KCNE1-KCNQ1 channel either. This suggests that the S6_T peptide that does not bind the WT

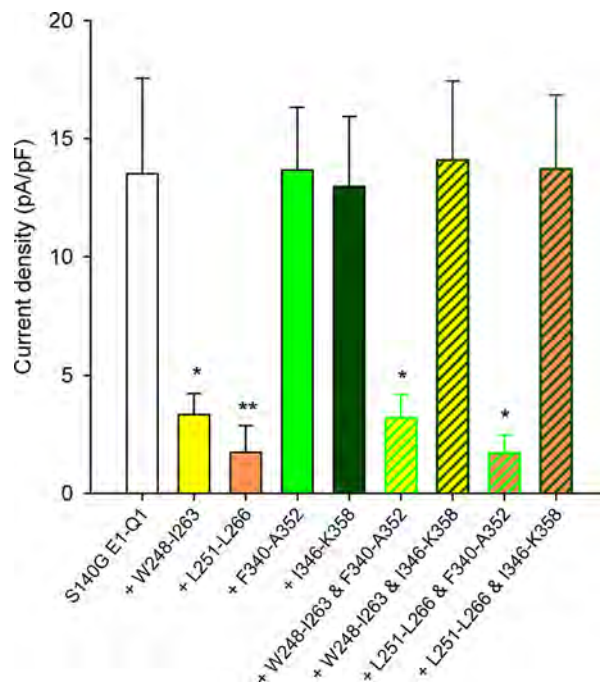


FIGURE 7. Interaction between S4S5_L and S6_T peptides probed by S140G. S140G E1-Q1 tail current densities in the absence (S140G E1-Q1) and in the presence of various S4S5_L or/and S6_T peptides suggesting interactions between Leu²⁵¹-Leu²⁶⁶ and Ile³⁴⁶-Lys³⁵⁸, Trp²⁴⁸-Ile²⁶³ and Ile³⁴⁶-Lys³⁵⁸ and the lack of interaction between Leu²⁵¹-Leu²⁶⁶ and Phe³⁴⁰-Ala³⁵², and between Trp²⁴⁸-Ile²⁶³ and Phe³⁴⁰-Ala³⁵² ($n = 9-13$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ versus S140G E1-Q1.

KCNE1-KCNQ1 channel cannot bind the S4S5_L peptide either, further confirming the specificity of the S4S5_L/S6_T interaction.

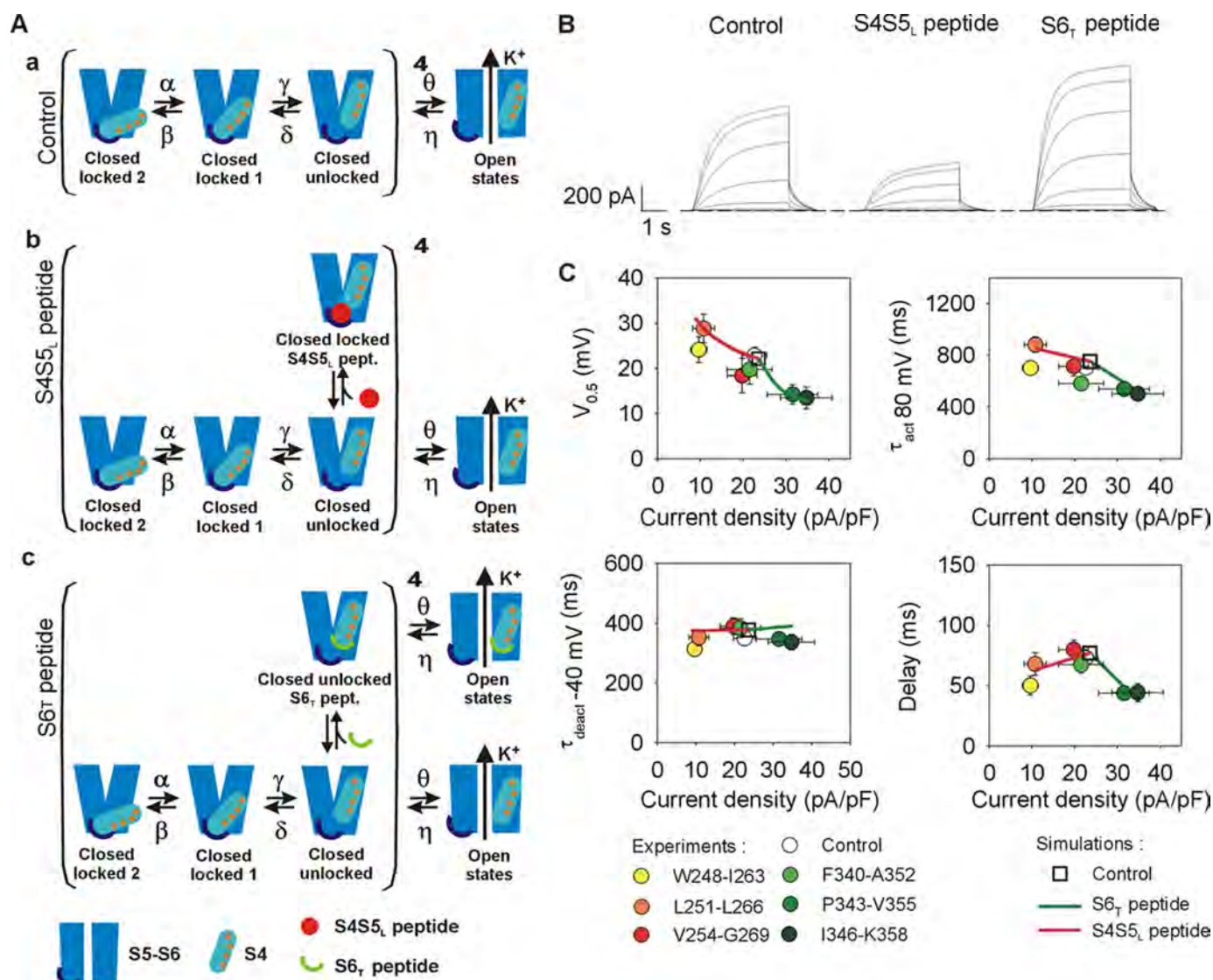


FIGURE 8. Kinetic model of KCNE1-KCNQ1 and its interactions with S4S5_L or S6_T peptide. *A*, kinetic model scheme. This model is based on Rudy's model for the KCNE1-KCNQ1 tetramer (18). We hypothesize that the unbinding of the S4S5_L and S6_T domains unlocks the channel and corresponds to the last transition 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 (*panel a*), presence of S4S5_L peptides (*panel b*) and presence of S6_T peptides (*panel c*). Optimized transition rates are presented in Table 1. *B*, simulated currents during step protocols in the absence (*Control*) or the presence of S4S5_L or S6_T peptide. *C*, comparison between simulated and experimental half-activation potentials, activation kinetics, deactivation kinetics, and delay of activation 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.

S4S5_L/S6_T Interaction Is Channel-specific—To establish the channel specificity of the S4S5_L peptide Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ and the S6_T peptide Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ for KCNE1-KCNQ1, we tested their potential effects on hERG, another voltage-gated potassium channel. As shown in the [supplemental Fig. 1](#), KCNQ1 S4S5_L and S6_T peptides had no effect on hERG current amplitude and half-activation potential, confirming that peptides are channel-specific.

A Kinetic Model Describes Observed Data for All 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 peptide-induced alterations in KCNE1-KCNQ1 channel properties (18). We deliberately made the peptides bind only the closed state immediately preceding the concerted opening (Fig. 8, *A*, panels *b*

and *c*) because, in the other closed states, the proximity of the endogenous S4S5_L and S6_T is supposed to prevent peptides access. In the model, the S4S5_L peptide mimics the endogenous S4S5_L linker and locks the channel in a closed state. Conversely, the S6_T peptide decoys the endogenous S4S5_L 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 (Fig. 8, *B* and *C*). The kinetic model also illustrates that peptides binding prevents the channel from going to deep closed state (especially closed locked 2 in Fig. 8*A*). This should provoke a reduction in the delay of channel activation (17). Indeed, the delay measured in the current recordings was similar to the delay calculated in the

model, further validating the model and the specificity of the peptides effects (Fig. 8C).

DISCUSSION

Altogether, our results show that S4S5_L acts as an inhibiting ligand that binds with low affinity to S6_T only at negative potentials, locking the S5-S6 pore domain in a closed state. The state-dependent interaction between S4S5_L and S6_T has already been proposed by Ferrer *et al.* (9) for hERG, another delayed rectifier potassium channel. This idea was suggested by the fact that a covalent link between S4S5_L and S6_T stabilizes the hERG closed state (9). If S4S5_L and S6_T interact in both the closed and open states, a covalent interaction should not lead to channel closure. If, conversely, S4S5_L interacts with S6 only in the closed state, one expects that forcing S4S5_L interaction with S6 closes the channel.

In the present study, we propose a similar state-dependent interaction between S4S5_L and S6_T in KCNQ1 channels and provide a mechanistic scheme in which a ligand attached to S4 (S4S5_L) interacts with the pore and locks it closed in a voltage-dependent fashion. This mechanism supports the functional model in which the six-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 two-transmembrane domain channel.

In this model, the vicinity between S4S5_L and S6_T in the closed state suggests that the interaction between S4S5_L and S6_T is loose enough to allow S4S5_L/S6_T unbinding upon depolarization. We tried to confirm this by biochemical methods using synthetic MG Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ and MG Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ peptides, but we could not solubilize the peptides at concentrations >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. Importantly, proteins expressed under the control of a CMV promoter can reach expression levels in the millimolar range (27, 28). Yeast two hybrid technique was also used to probe the S4S5_L and S6_T peptides interaction in a “cytosolic” environment but no interaction between Leu²⁵¹–Leu²⁶⁶ and Ile³⁴⁶–Lys³⁵⁸ 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 S4S5_L/S6_T interaction, our experiments analyzing the effects of Val²⁵⁴ and Leu³⁵³ point mutations (Figs. 4 and 5), the S4S5_L/S6_T peptide interaction (Fig. 7), and channel specificity (supplemental Fig. 1) strongly support this interaction. Importantly, all of these results are consistent with a loose interaction between S4S5_L and S6_T.

Interestingly, the ligand/receptor mechanism we propose in this study may explain the surprising observation that hyperpolarization-activated channels have a similar voltage sensor domain as depolarization-activated channels but an opposite response to depolarization. In the hyperpolarization-activated channel KAT1 (7) and HCN (29), S4S5_L has also been suggested to couple voltage sensing and pore opening by a labile

binding (29). Similar to our model where S4S5_L binds S6_T in the closed state, the S4S5_L/S6 interaction seems present only in the open state of KAT1 and HCN (7, 8). This would explain why the latter channels are closed by membrane depolarization. The state-dependent interaction between S4S5_L and S6_T 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 suggested here describes the pore domain as being locked closed at rest by the binding of a ligand (S4S5_L) to the gate (S6_T). Upon plasma membrane depolarization, S4 pulls S4S5_L away from S6_T, allowing channel opening. Other molecular mechanisms will have to be taken into account to fully understand the complex voltage dependence, like the molecular events accompanying the concerted channel opening triggered by S4 movement (30).

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

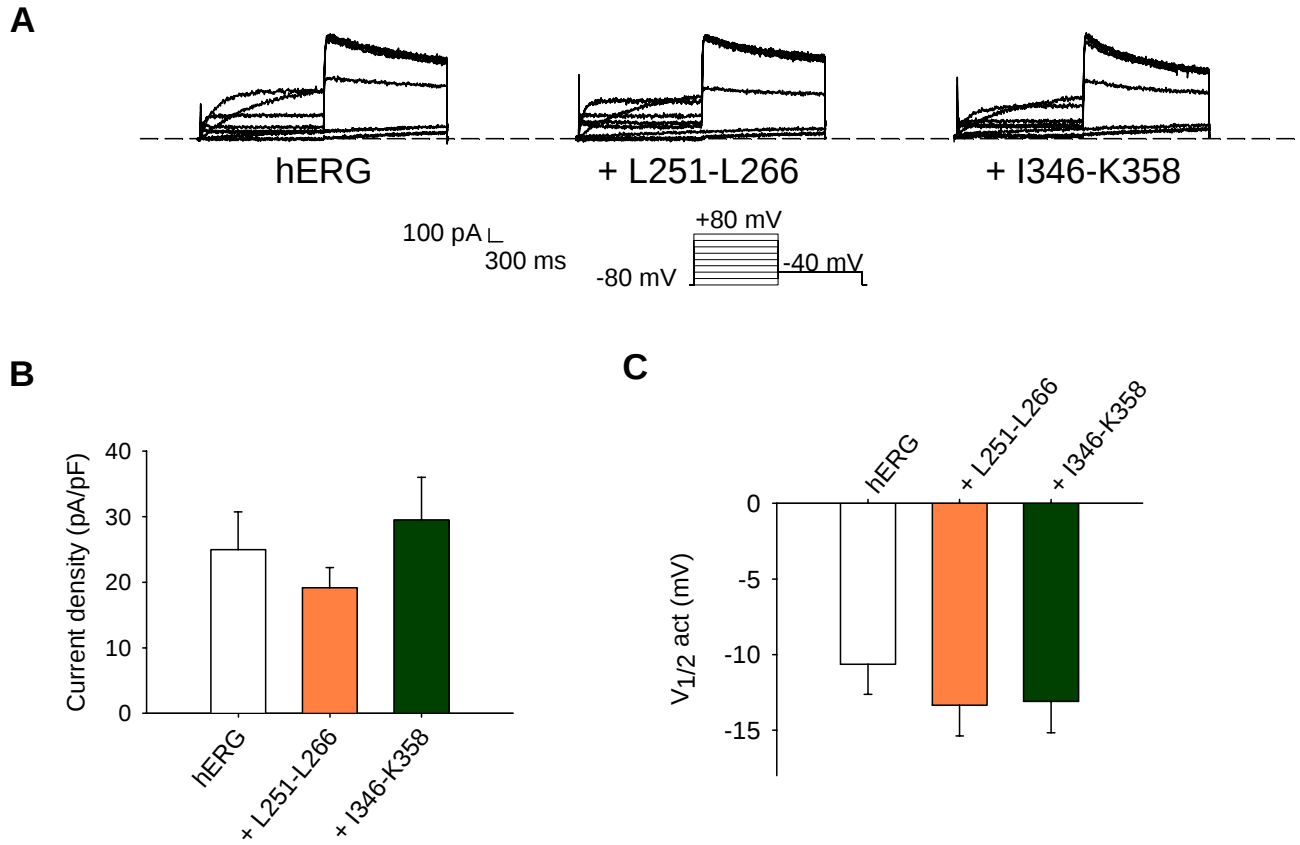
Acknowledgments—We thank Béatrice Leray, Marie-Joseph Louérat, and Agnès Carcouët for expert technical assistance.

REFERENCES

- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R. (2003) *Nature* **423**, 42–48
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003) *Nature* **423**, 33–41
- Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) *Science* **309**, 903–908
- Ahern, C. A., and Horn, R. (2004) *Trends Neurosci.* **27**, 303–307
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69–77
- 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
- Grabe, M., Lai, H. C., Jain, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2007) *Nature* **445**, 550–553
- Prole, D. L., and Yellen, G. (2006) *J. Gen. Physiol.* **128**, 273–282
- Ferrer, T., Rupp, J., Piper, D. R., and Tristani-Firouzi, M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 12858–12864
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996) *Nature* **384**, 78–80
- 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
- Boulet, I. R., Labro, A. J., Raes, A. L., and Snyders, D. J. (2007) *J. Physiol.* **585**, 325–337
- John, S. A., Weiss, J. N., Xie, L. H., and Ribalet, B. (2003) *J. Physiol.* **552**, 23–34
- Gilchrist, A., Li, A., and Hamm, H. E. (2002) *Sci. STKE*. **2002**, PL1
- Le Maout, S., Welling, P. A., Brejon, M., Olsen, O., and Merot, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10475–10480
- Belloq, C., Wilders, R., Schott, J. J., Louérat-Oriou, B., Boisseau, P., Le Marec, H., Escande, D., and Baró, I. (2004) *Mol. Pharmacol.* **66**, 1093–1102
- Cole, K. S., and Moore, J. W. (1960) *Biophys. J.* **1**, 1–14
- Silva, J., and Rudy, Y. (2005) *Circulation* **112**, 1384–1391

Molecular Mechanism of KCNQ1 Channel Voltage Dependence

19. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001) *Nature* **413**, 809–813
20. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002) *J. Gen. Physiol.* **120**, 663–676
21. Wang, W., Xia, J., and Kass, R. S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34069–34074
22. Park, K. H., Piron, J., Dahimene, S., Mérot, J., Baró, I., Escande, D., and Loussouarn, G. (2005) *Circ. Res.* **96**, 730–739
23. Loussouarn, G., Baró, I., and Escande, D. (2006) *Methods Mol. Biol.* **337**, 167–183
24. Kang, C., Tian, C., Sönnichsen, F. D., Smith, J. A., Meiler, J., George, A. L., Jr., Vanoye, C. G., Kim, H. J., and Sanders, C. R. (2008) *Biochemistry* **47**, 7999–8006
25. Zheng, R., Thompson, K., Obeng-Gyimah, E., Alessi, D. M., Chen, J., Cheng, H., and McDonald, T. V. (2010) *Biochem. J.* **428**, 75–84
26. 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
27. Lin, P., Luby-Phelps, K., and Stull, J. T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5987–5994
28. 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
29. 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
30. Soler-Llavina, G. J., Chang, T. H., and Swartz, K. J. (2006) *Neuron* **52**, 623–634
31. Labro, A. J., Boulet, I. R., Choveau, F., Mayeur, E., Bruyns, T., Loussouarn, G., Raes, A. L., and Snyders, D. J. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 717–726



Supplementary figure. Specificity of peptides effects on KCNQ1. A, representative whole-cell recordings of WT hERG current in the absence (hERG) and in the presence of S4S5_L (+ L251-L266) or S6T peptide (+ I346-K358). Inset: voltage protocol, one epoch every 6 s. 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).

Discussion

Résumé des résultats

Le but de cette étude était de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à la base du couplage entre les modules VSD et PD, et plus précisément, la nature de l'interaction entre B4-5 et TS6, principaux acteurs de ce couplage.

Grâce à une approche fonctionnelle consistant à évaluer les effets de peptides mimétiques de B4-5 ou TS6, sur l'activité du canal KCNQ1, nous avons établi un nouveau modèle appelé modèle de « ligand-récepteur » à la base du couplage entre les modules VSD et PD. Selon ce modèle, B4-5 jouerait le rôle d'un ligand capable de se fixer sur TS6 (son récepteur), de façon spécifique, réversible et état-dépendante, pour stabiliser le canal KCNQ1 à l'état fermé. Plusieurs résultats ont permis d'aboutir à ce modèle « ligand-récepteur ».

- 1) L'expression d'un peptide mimétique de B4-5 (Trp248-Ile263 ou Leu251-Leu266) entraîne une diminution de l'amplitude du courant et un ralentissement des cinétiques d'activation du canal KCNQ1. Ces effets inhibiteurs s'expliquent par une interaction entre le peptide exogène B4-5 et TS6 endogène, conduisant à une stabilisation de la fermeture de la porte d'activation.
- 2) Au contraire, l'expression de peptides mimétiques de TS6 (Pro343-Val355 and Ile346-Lys358) entraîne une augmentation de l'amplitude du courant et une accélération des cinétiques d'activation du canal. Les effets activateurs de ces peptides s'expliquent par le fait que le peptide TS6 exogène interagit avec B4-5 endogène, empêchant ainsi l'occupation de TS6 endogène, d'où une déstabilisation de la fermeture du canal.
- 3) Les effets de ces peptides modulateurs sont à la fois réversibles et dépendants de l'état ouvert ou fermé du canal. Cette modulation est en effet, atténuée voire éliminée par la dilution des peptides et par la dépolarisation membranaire.
- 4) Des mutations ponctuelles sur B4-5 et TS6, diminuant l'interaction entre ces deux régions modifient également les effets des peptides. De façon intéressante, l'introduction de mutations ponctuelles complémentaires sur ces peptides restaure à nouveau leurs effets sur les canaux mutants, suggérant une forte spécificité de l'interaction entre B4-5 et TS6.
- 5) Ces peptides mimétiques de B4-5 et TS6 sont capables d'interagir entre eux et diminuer mutuellement leurs effets sur l'activité de KCNQ1. Cela renforce la notion de spécificité des effets de ces peptides.
- 6) Ces peptides n'ont aucun effet sur un autre canal potassique voltage-dépendant cardiaque, hERG, suggérant une spécificité de ces peptides vis-à-vis du canal ciblé.

7) Enfin, les effets des peptides modulateurs B4-5 et TS6 observés sur le plan expérimental, ont été reproduits sur un modèle cinétique simulant le modèle « ligand-récepteur », ce qui renforce la cohérence entre notre hypothèse et les résultats expérimentaux.

Ensemble, tous ces résultats expérimentaux et de modélisation valident le modèle « ligand-récepteur » sur le canal KCNQ1.

Limites de l'étude

Malgré la cohérence des résultats expérimentaux avec notre hypothèse de travail, cette étude présente certaines limites non-négligeables :

- Les résultats expérimentaux de cette étude sont principalement basés sur une comparaison de l'amplitude du courant entre deux types de populations cellulaires à savoir des cellules avec ou sans expression de peptide exogène. Même si nous avons effectué un grand nombre de mesures (58 pour le contrôle), il serait plus convaincant d'utiliser une approche avec laquelle chaque cellule serait elle-même son propre contrôle. Un exemple d'approche est le système d'induction par la rapamycine décrit ci-dessus (page 68). Dans ce cas, l'approche consisterait à faire exprimer la protéine FRB d'une part, et une protéine de fusion FKBP-peptide mimétique d'autre part (Figure 24). L'ajout de la rapamycine permettrait l'export du peptide à la membrane.

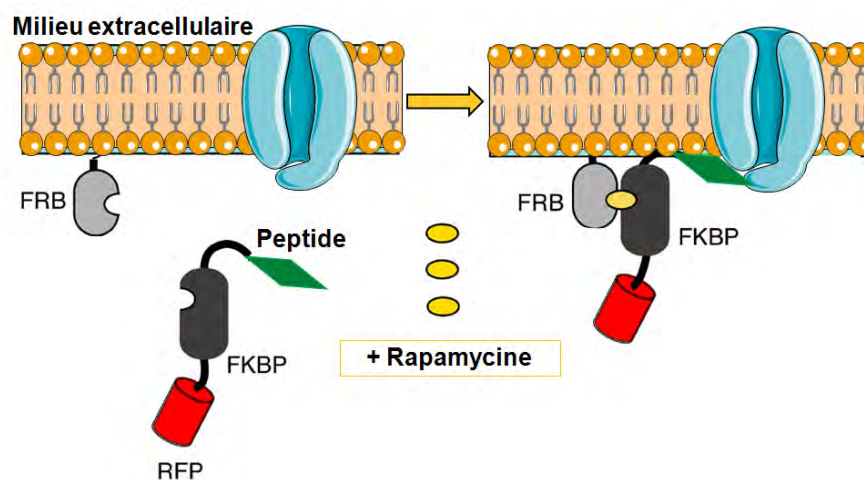


Figure 24 : Export membranaire d'un peptide de façon inducible.

L'hétérodimérisation de FRB (FRBP rapamycin binding) membranaire avec FRBP (FK506 binding protein) couplée à un peptide B4-5 ou TS5, après ajout de rapamycine, entraîne un recrutement du peptide à la face intracellulaire de la membrane.

Ainsi, on pourrait mesurer les paramètres biophysiques avant et après ajout de la rapamycine. Une telle approche a déjà été utilisée pour inhiber, de façon inductible, un canal calcique voltage-dépendant par une GTPase (Yang et al., 2007).

- Dans cette étude, nous avons montré que les effets des peptides ne dépendent pas de la présence ou non de la sous-unité auxiliaire KCNE1, suggérant que ces effets sont liés à une interaction directe entre le peptide et le canal KCNQ1. Toutefois, cela n'exclut pas la possibilité d'un effet indirect via une autre protéine ou macromolécule partenaire de KCNQ1. Afin de confirmer l'interaction physique entre B4-5 et TS6, nous avons en vain essayé de caractériser l'interaction directe entre les peptides synthétiques B4-5 et TS6 les plus efficaces, en utilisant deux techniques biochimiques différentes: l'ultracentrifugation analytique et le gel natif. L'échec enregistré dans ces approches est probablement dû à une faible solubilité de ces peptides synthétiques à cause de leur forte hydrophobicité. Contrairement au cytosol, les solutions utilisées dans ces approches ne permettraient pas de solubiliser les peptides de façon à atteindre des concentrations suffisamment élevées pour qu'il y ait interaction peptide-canal. L'utilisation de la technique de double hybride chez la levure n'a pas permis non plus de caractériser de façon biochimique, cette interaction. L'hypothèse la plus probable est que cette interaction est très faible et que la sensibilité de cette technique n'est pas suffisamment élevée pour détecter une telle interaction. Etant donné la proximité des régions B4-5 et TS6 à l'état fermé, il n'est pas nécessaire que cette interaction soit forte, et il est plus logique qu'elle soit faible pour permettre le canal de passer d'un état à un autre en dépensant moins d'énergie. Des approches de biologie structurales seront nécessaires pour mieux caractériser cette interaction et mieux comprendre ses bases moléculaires. L'importance de telles approches sera décrite dans la discussion générale.
- Face à l'échec de caractériser l'interaction peptide-canal par des approches biochimiques d'une part, et au manque de données structurales sur une telle interaction d'autre part, on ne peut pas exclure la possibilité que le peptide interagisse sur une autre région du canal (différente de B4-5 et TS6). Néanmoins, les résultats obtenus avec le canal KCNQ1 sauvage ou muté, et les peptides mutés (Figure 4C et 5B-D de l'article 2) suggèrent que cette hypothèse est moins probable.

Conclusion

Ce projet a permis 1) d'identifier un nouveau mécanisme de couplage entre les modules VSD et PD du canal potassique cardiaque KCNQ1, et 2) d'élaborer des peptides modulateurs spécifiques de ce canal. Reste à mieux comprendre les mécanismes moléculaires de ce nouveau mécanisme d'une part, et à étudier dans quelle mesure ce nouveau mécanisme est applicable à d'autres familles de canaux (Nav et Cav) d'autre part. Enfin, il sera nécessaire d'étudier les bases structurales de l'interaction peptide-canal afin d'améliorer l'efficacité de ces peptides modulateurs. Ces perspectives ont fait l'objet de mon projet 3 dont nous allons parler à présent.

Projet 3 :

Généralisation du modèle ligand-récepteur aux canaux sodiques eucaryote (Nav1.4) et procaryote (NavSp1)

Introduction

Comme décrit dans l'introduction générale, les canaux sodiques voltage-dépendants eucaryotes sont constitués de quatre domaines (DI, DII, DIII et DIV) homologues fusionnés pour former la sous-unité α canalaire (Figure 25B). Chaque domaine présente la même organisation structurale qu'une sous-unité des Kv qui eux, sont tétramériques (Figure 25A). En effet, chaque domaine est formé de six segments transmembranaires (S1 à S6) repartis en deux modules : le VSD formé de S1 à S4 avec S4 riche en résidus positifs, et un PD formé par l'association des S5 et S6. Quant aux Nav et Kv procaryotes, ils ont une structure homotétramérique et avec cette même organisation en six segments transmembranaires repartis en deux modules.

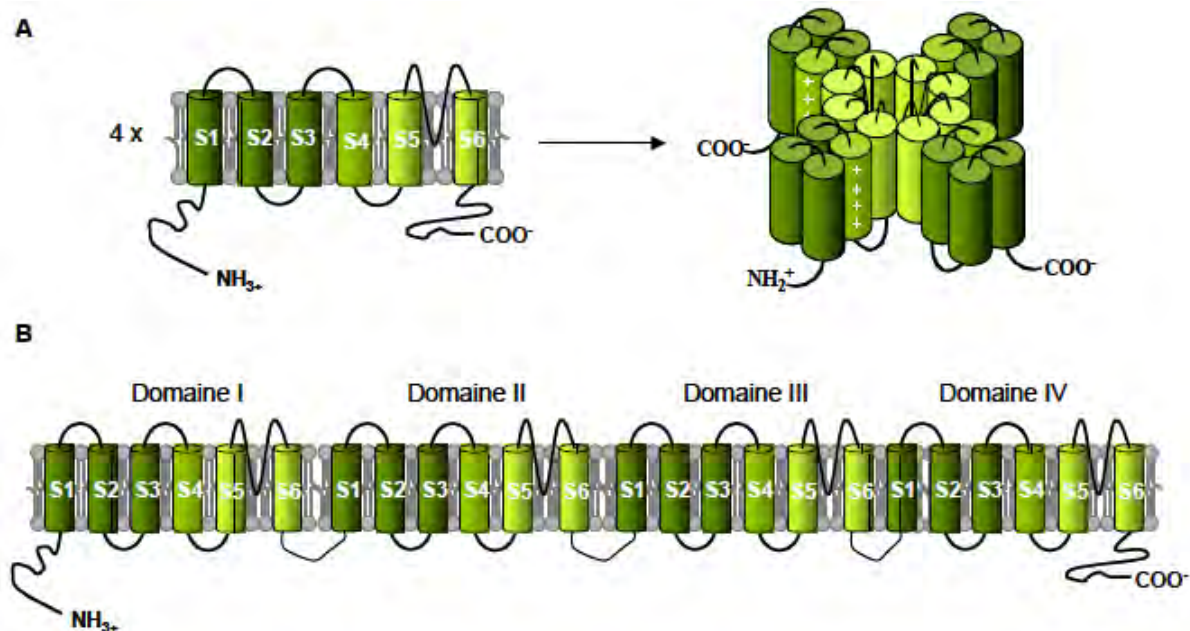


Figure 25 : Structure schématique de la structure des canaux ioniques voltage-dépendants.

(A) Canaux potassiques eucaryotes et tous canaux procaryotes. (B) Canaux sodiques et calciques eucaryotes.

Etant donné cette homologie structurale entre Nav et Kv d'une part, et le fait que la voltage-dépendance des Nav, tout comme les Kv, est régie par les mouvements du S4 en réponse aux variations du potentiel membranaire d'autre part, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le modèle de « ligand-récepteur » établi pour KCNQ1 est applicable aux canaux Nav. De plus, la structure cristallographique du canal sodique bactérien NavAb, montre une porte d'activation fermée pendant que les voltage sensor S4 sont en position « activé » avec les régions B4-5 et TS6 distantes, suggérant que l'interaction entre B4-5 et TS6 n'est pas permanente (Payandeh et al., 2011a). Ces données structurales sont cohérentes avec notre hypothèse. Afin d'étudier l'éventuelle application du modèle ligand-récepteur aux canaux Nav, nous avons utilisé comme modèles deux canaux sodiques différents: le canal sodique musculaire Nav1.4 et le canal sodique bactérien NavSp1.

Si notre hypothèse est vraie, on devrait reproduire sur ces canaux Nav, des résultats similaires à ceux obtenus sur KCNQ1 à savoir, une inhibition du canal par des peptides mimétiques de B4-5 et une activation par des peptides mimétiques de TS6. Ainsi, tout comme pour KCNQ1, nous avons étudié les effets des peptides mimétiques de B4-5 ou de TS6 de Nav1.4 et de NavSp1 sur l'activité de ces canaux, en utilisant la technique de patch clamp.

Matériel et Méthodes

a) Détermination des séquences peptidiques

Un alignement de séquences a été réalisé entre les domaines (DI, DII, DIII et DIV) de Nav1.4 et les sous-unités des canaux homotétramériques NavSp1, Kv1.2, Kv2.1, KCNQ1, hERG et *Shaker* afin de déterminer les séquences des peptides mimétiques de B4-5 ou de TS6 (Figure 26). Pour chaque région B4-5 et TS6, trois plasmides de même longueur et à des positions légèrement différentes, ont été déterminés pour compenser l'imprécision de l'alignement due à la faible similarité entre les séquences des Kv et des Nav. En raison d'un dépôt de brevet en cours, la nature des séquences des peptides modulateurs de Nav1.4 ne sera pas précisée sur ce manuscrit.

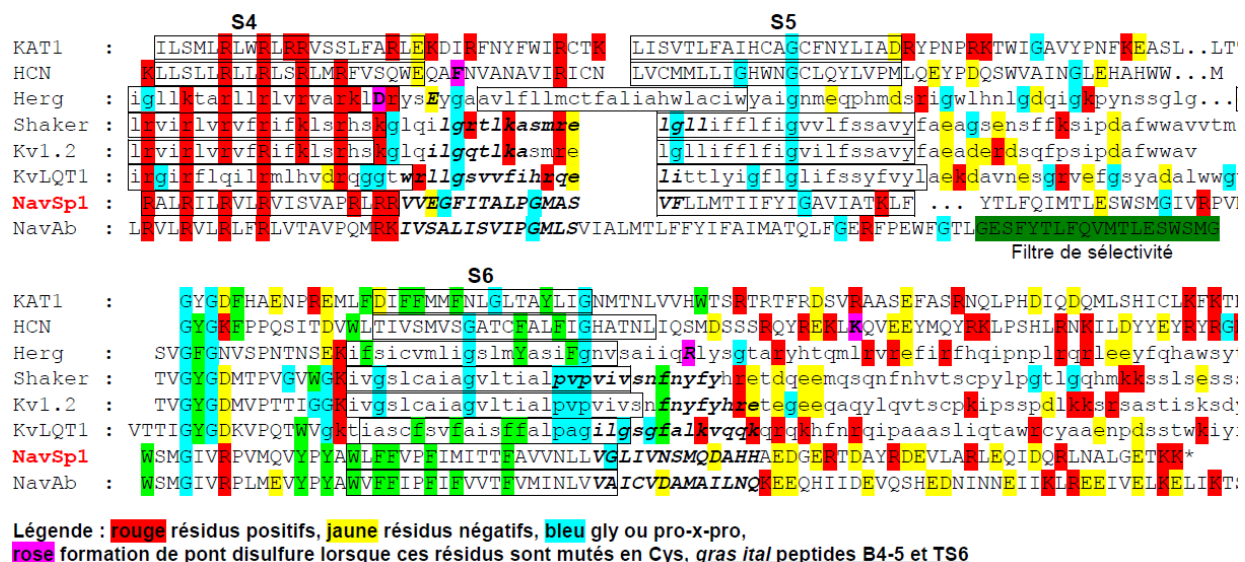


Figure 26 : Alignement de séquences en vue d'identifier les séquences des peptides modulateurs.

L'alignement est réalisé principalement avec la prise en compte des arginines/lysines de S4, et des glycines/motifs PVP, ainsi que des profils d'hydropathie mettant en évidence les segments transmembranaires (encadrés).

Les effets de ces peptides sur l'activité des canaux Nav1.4 et NavSp1, sont évalués sur des systèmes de réexpression (cellules COS-7 ou HEK-293) transfectées avec le plasmide codant pour le canal d'intérêt et celui codant pour le peptide à évaluer.

b) Construction des plasmides codant pour les peptides mimétiques de B4-5 ou TS6

Les minigènes codant pour les peptides correspondant à B4-5 ou à TS6 ont été clonés dans des plasmides pIRES2-EGFP (Clontech) selon différentes étapes (Figure 27) :

- Les ADNc (c pour complémentaire) sont amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant le plasmide pCDNA3.1-Nav1.4 (fourni par Pr H. Abriel, Bern, Suisse) comme matrice, et des amorces spécifiques (invitrogen) correspondant à B4-5 ou à TS6. Ces amorces ont été établies de façon à avoir des produits de PCR contenant, à l'extrémité 5', un site de restriction Xho I, une séquence consensus KOZAK, suivie d'un codon initiateur ATG et d'un codon GGA codant pour l'acide aminé glycine. Ce dernier permet de réduire la dégradation des peptides par le protéasome (Gilchrist et al., 2002). L'extrémité 3' du produit de PCR contient un codon stop (TAG) suivi d'un site de restriction BamH I. Chaque produit de PCR fait environ 70 paires de bases.

- Après sous-clonage de ces produits de PCR dans le vecteur TOPO SD (Invitrogen), les vecteurs TOPO contenant les minigènes sont coupés par les enzymes Xho I et BamH I. Cette étape de sous-clonage permet une meilleure efficacité de coupure des minigènes par

Xho I et BamH I en augmentant la zone de fixation de ces enzymes sur l'ADN.

- Parallèlement, le vecteur pIRES2-EGFP (Clontech) est lui aussi coupé par ces mêmes enzymes de restriction.

- Après digestion, le vecteur et les inserts sont séparés sur gel et purifiés avant d'être ligués à 16°C par la T4 DNA ligase. Des bactéries XL1-blue compétentes sont transformées avec les produits de ligation, et les bactéries contenant le plasmide pIRES2 EGFP avec minigène sont sélectionnées sur milieu LB solide riche en kanamycine (100µg/mL).

- Enfin, une extraction d'ADN par miniprep (NucleoSpin® Plasmid, Macherey-Nagel) est réalisée sur quelques clones, lesquels sont vérifiés par restriction enzymatique. Les clones positifs sont ensuite vérifiés par séquençage.

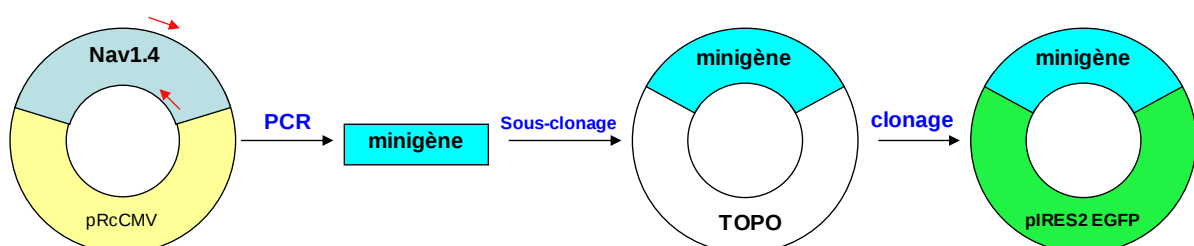


Figure 27 : Etapes de clonage des minigènes sous le plasmide pIRES2 EGFP.

Quant aux plasmides codant pour les peptides mimétiques de B4-5 et TS6 de NavSp1, ils ont été directement commandés chez Top Gene tec (Canada). Et là encore, l'ADNc, cette fois-ci synthétisé chimiquement sans PCR, est inséré dans un vecteur pIRES2 EGFP.

c) Système de réexpression : cellules COS-7 ou HEK-293

La lignée cellulaire COS-7 correspond à des fibroblastes de rein de singe vert d'Afrique, infectés avec un mutant du virus simien SV40 (Gluzman, 1981). La lignée HEK-293 (human epithelium kidney) quant à elle, correspond à des fibroblastes de l'épithélium rénal (Graham et al., 1977). Ces deux lignées sont utilisées comme système d'expression hétérologue de nombreuses protéines. Elles présentent un avantage majeur dans l'étude des canaux ioniques voltage-dépendants car ces protéines membranaires y sont très faiblement exprimées de manière endogène.

- *Transfection des cellules COS-7 et HEK-293*

Pour l'étude sur Nav1.4, des cellules COS-7 ont été transfectées, en utilisant le fugene 6 (Roche Molecular Biochemical) comme agent de transfection, avec les plasmides suivants :

- pCDNA3.1-Nav1.4 (5%) codant pour le canal sodique Nav1.4

- pRC-CMV-h β 1 (5%) codant pour la sous-unité auxiliaire Nav β 1
- pIRES2-EGFP-minigène (90%) codant pour le peptide évalué ou pEGFP-N3 (90%) codant pour la protéine GFP (green fluorescence protein) pour la condition contrôle.

Au total, 1 μ g d'ADN est transfecté dans des cellules COS-7 à ~60% de confluence dans un puit d'une plaque 12 puits.

Pour l'étude sur NavSp1, des cellules HEK-293 ont été transfectées, en utilisant la lipofectamine 2000 (invitrogen) comme agent de transfection, avec les plasmides suivants :

- pIRES2-EGFP-NavSp1 (40%) codant pour le canal NavSp1
- pIRES2-EGFP-mini-gène (60%) codant pour le peptide évalué ou pEGFP-N3 (60%) codant pour la GFP.

Au total, 5 μ g d'ADN sont transfectés dans des cellules HEK-293 à ~60% de confluence dans un puit d'une plaque 6 puits à l'aide de 12.5 μ L de lipofectamine 2000.

Le gène codant pour la GFP, protéine naturellement fluorescente dans un spectre lumineux allant du bleu à l'ultraviolet (Prendergast and Mann, 1978), est utilisé comme gène rapporteur et les cellules transfectées sont observées au microscope à épifluorescence.

Les conditions de transfection sont choisies de façon à maximiser la quantité de peptides exogènes tout en ayant un courant sodique mesurable.

- *Repiquage des cellules transfectées*

Les cellules transfectées sont repiquées 24 heures après la transfection : il s'agit d'une dilution déterminée selon la confluence des cellules et un réensemencement de nouvelles boîtes. Etant donné que les mesures électrophysiologiques sont effectuées sur des cellules isolées, ce repiquage a pour but d'obtenir des cellules COS-7 ou HEK-293 isolées les unes des autres. Ce repiquage est réalisé selon différentes étapes :

- Le milieu de culture est remplacé par 1 mL de PBS afin de rincer les cellules. Le PBS est ensuite retiré.
- Les cellules sont détachées du fond de la boîte par ajout de 150 μ L de solution à 0.25% de trypsine solubilisée dans le tampon PBS/EDTA, avec incubation à 37°C.
- Au bout de deux minutes, les cellules sont sorties de l'incubateur et 2 mL de milieu de culture sont ajoutés afin d'arrêter l'action de la trypsine. Ces 2 mL de milieu, contenant les cellules en suspension, sont alors récupérés et transférés dans un tube de 15 mL.
- Ensuite, une dissociation mécanique est réalisée par une pipette 2 mL, ce qui conduit à l'obtention d'une suspension de cellules isolées grâce aux forces de cisaillement créées par l'aspiration et éjection à l'aide de la pipette.

- Cette suspension cellulaire est, par la suite, diluée avec du milieu de culture. Le facteur de dilution dépend, d'une part de la confluence cellulaire initiale estimée au microscope optique, et d'autre part du délai d'utilisation des cellules par la technique de patch-clamp. Par exemple, pour une densité d'environ 70% de confluence, des dilutions au 1/40^{ème} et au 1/80^{ème} sont effectuées pour des utilisations respectives des cellules 24h et 48h après.

- Enfin, 2 mL de suspension diluée sont déposés dans une boîte de Petri de 35mm et celle-ci est ensuite placée dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'aux expériences.

d) Technique de patch clamp

- *Principe*

La technique de patch clamp en configuration « cellule entière » (Figure 28) a été utilisée pour mesurer le courant sodique des cellules transfectées, en imposant un créneau de potentiels variables à leur membrane cellulaire (mode voltage-clamp).

- *Configuration « cellule entière »*

La technique de patch clamp consiste à poser la pointe d'une pipette en verre, dont l'extrémité a un diamètre d'environ 1 µm, sur une membrane cellulaire de telle sorte que le contact pipette/membrane soit électriquement résistant. Ce contact est renforcé par une légère aspiration exercée à l'intérieur de la pipette. Lorsque la résistance de ce contact atteint le giga-Ohm, le contact est alors appelé "giga-seal". Dans ces conditions, l'isolation électrique de l'ensemble pipette-cellule est suffisante.

Pour obtenir la configuration «cellule entière» (Hamill et al., 1981), une aspiration supplémentaire est appliquée à l'aide d'une seringue. Ceci permet de percer la membrane cellulaire par aspiration du fragment de membrane isolé sous la pointe de la pipette. Par conséquent, la résistance entre le milieu intra-pipette et le milieu intracellulaire va diminuer, ce qui permet l'accès électrique au milieu intracellulaire (Figure 28).

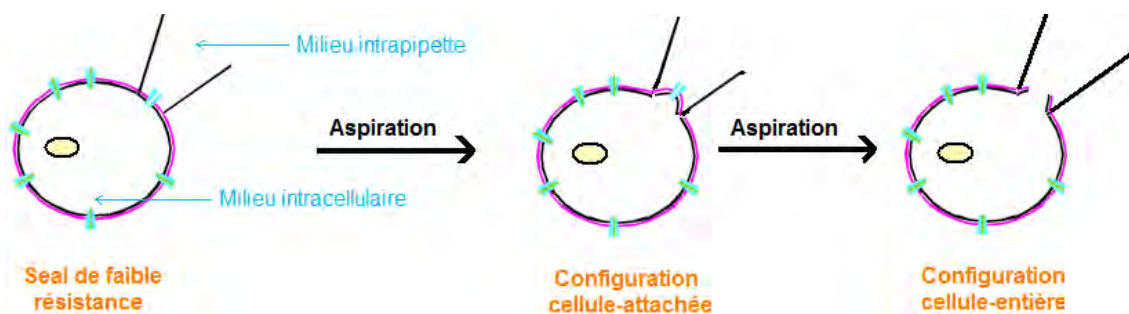


Figure 28 : Représentation schématique du passage à la configuration cellule-entière.

- *Dispositif expérimental*

Fabrication des pipettes : Pour l'étude sur des cellules COS-7 exprimant Nav1.4, les pipettes de patch clamp ont été fabriquées à partir de capillaires de verre borosilicate (Kimble Kontes, New-jersey, USA). Ces capillaires sont placés dans une étireuse verticale (Sutter Instrument CO, Model-P30, Novato, CA, USA) réglée de façon à fournir des micropipettes d'une résistance comprise entre 1.9 et 2.9 M Ω .

Pour l'étude sur des cellules HEK-293 exprimant NavSp1, les pipettes ont été fabriquées à partir de capillaires de verre borosilicate (TW150F-3, WPI, Sarasota, USA). Ces capillaires sont étirés dans une étireuse horizontale (Sutter Instrument) et ensuite polis grâce à une microforge (MF-900 microforge, Narishige, Tokyo, Japon) de façon à obtenir des pipettes de résistance comprise entre 2 et 3 M Ω .

60 à 80% des erreurs de voltage dues à la résistance série, ont été compensées.

Installation de patch clamp : Une boîte de cellules isolées est placée sur la platine d'un microscope inversé qui repose sur une table anti-vibrations (Figure 29). Les cellules sont perfusées en continu par une solution extracellulaire dont la composition diffère selon la configuration.

La pipette de patch clamp est remplie d'une solution intrapipette et ensuite fixée sur un porte-électrode relié à un micromanipulateur électrique permettant de placer avec précision cette micropipette sur la cellule. L'électrode de mesure et de stimulation contenue dans la pipette est connectée à un amplificateur de patch-clamp (Axon 200A, Molecular devices, USA) qui permet d'imposer le potentiel à la membrane cellulaire et d'enregistrer les courants ioniques (voltage-clamp). Ces deux signaux électriques (stimulation et acquisition) sont, à la base, des différences de potentiel entre cette électrode de mesure et une électrode de référence baignant dans le milieu extracellulaire. Le contrôle des paramètres de stimulation, l'acquisition des tracés, ainsi que l'analyse des données, sont réalisés par ordinateur grâce au logiciel pClamp version 10.0 (Molecular Devices, USA).

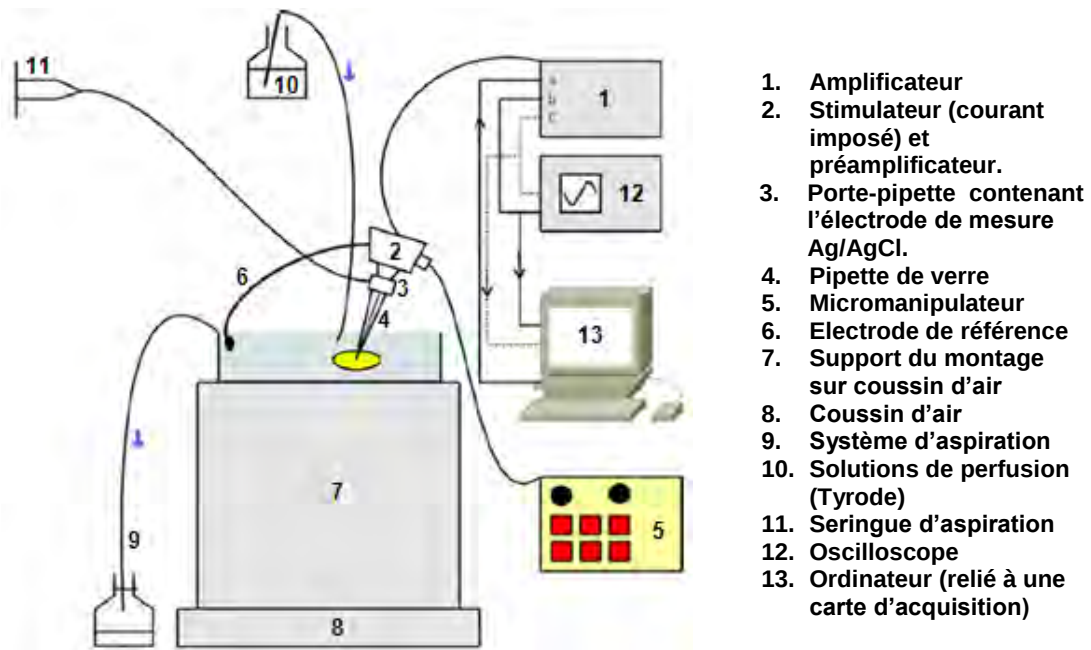


Figure 29 : Schéma d'une installation de patch clamp.

- *Composition des solutions*

Etude sur Nav1.4 : Les cellules COS-7 isolées baignent dans une solution de Tyrode modifiée, renouvelée constamment par un système de perfusion générale et d'aspiration. La composition de cette solution (en mM : NaCl 145, KCl 4, HEPES 5, Glucose 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, pH 7.4 avec du NaOH) est établie de façon à se rapprocher des conditions extracellulaires physiologiques des cellules COS-7. Dans cette solution baigne également l'électrode de référence.

Une solution de perfusion locale (en mM : 145 NaCl, 4 CsCl, 5 HEPES, 5 Glucose, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, pH 7.4 avec du NaOH) est appliquée, via un système d'éjecteur, au niveau extracellulaire de la cellule sur laquelle les paramètres biophysiques du courant sodique sont mesurés. Contrairement au Tyrode modifié, cette solution de perfusion locale contient du césium, un inhibiteur des canaux potassiques.

L'électrode de mesure et de stimulation baigne dans la solution intrapipette (en mM : 10 NaCl, 64.5 CsCl, 70.5 acide aspartique, 5 HEPES, pH 7.2 avec CsOH).

Les compositions de ces différentes solutions se rapprochent de celles des milieux physiologiques des cellules COS-7, excepté pour la concentration en potassium. Ce dernier a été remplacé dans les solutions intrapipette et de perfusion locale, par du césium afin de limiter l'apparition de courants potassiques endogènes.

Etude sur NavSp1 : Les cellules HEK-293 isolées baignent dans une solution extracellulaire (en mM : 155 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 KCl, 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.4 avec NaOH).

L'électrode de mesure et de stimulation baigne dans la solution intrapipette (en mM : 120 Cs-methane sulfonate, 8 NaCl, 10 EGTA, 2 Mg-ATP, 20 HEPES, pH 7.4 avec CsOH).

Toutes les expériences électrophysiologiques ont été réalisées à température ambiante (25°C).

e) Présentation des résultats

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne $\pm$ erreur standard à la moyenne. Les différences sont statistiquement testées en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney (comparaison de 2 moyennes de 2 conditions différentes avec un nombre d'échantillons inférieur à 30). Une différence avec une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

Résultats

A- Etude sur le canal Nav1.4

Des peptides B4-5 exogènes modulent l'activité du canal Nav1.4

Rappelons que notre hypothèse est que la boucle S4-S5 (B4-5) de chaque domaine (DI, DII, DIII et DIV) serait un ligand dépendant du potentiel qui se fixerait sur l'extrémité C-terminale du segment S6 (TS6) du même domaine ou d'un domaine voisin, pour stabiliser la fermeture du canal sodique Nav1.4 (Figure 23).

Si cette hypothèse est vraie, alors les peptides mimétiques des B4-5 devraient être capables d'interagir avec des TS6 endogènes et moduler l'activité du canal. Nous avons évalué les effets de quatre peptides mimétiques des B4-5 de chaque domaine du canal Nav1.4, en utilisant la configuration « cellule entière » de la technique de patch clamp. Afin d'éviter tout biais dû à la dilution des peptides par la solution contenue dans la pipette de patch, les effets des peptides ont été observés juste après la rupture du patch. Pour étudier les effets des peptides sur l'activité du canal, un plasmide codant pour le peptide étudié a été co-transfecté avec deux autres plasmides, l'un codant pour le canal Nav1.4 et l'autre pour sa sous-unité auxiliaire Nav β 1. En condition contrôle (sans peptide exogène), le plasmide codant pour le peptide a été remplacé par un autre codant pour la GFP.

Dans toutes les conditions, un protocole de stimulation à saut unique du potentiel membranaire a permis d'enregistrer un courant sodique entrant avec la même allure, à savoir une phase d'activation et suivie d'une phase d'inactivation (Figure 30A). A partir de ces enregistrements, les effets des minigènes codant pour ces peptides ont été étudiés en comparant la densité du courant (amplitude du courant en pA / capacité membranaire en pF) entre les cellules contrôles et les cellules exprimant un peptide exogène B4-5 d'un domaine bien précis (DI, DII, DIII ou DIV). Notons que la capacité membranaire est proportionnelle à la surface membranaire. Par conséquent, la densité du courant représente l'amplitude du courant normalisée par rapport à la taille de la cellule.

Nos résultats montrent que les peptides mimétiques des B4-5 des domaines DI et DII ont un effet inhibiteur sur la densité du courant (ou courant relatif, Irel, Figure 30B). En effet, par rapport aux cellules contrôles (Irel = -118 ± 28 pA, n=10), cette densité du courant est diminuée de façon significative en présence de peptides exogènes B4-5 du domaine DI (Irel = -21.9 ± 9.1 pA, n = 8, p=0.004) ou du domaine DII (Irel = -35.8 ± 11 pA, n=7, p=0.026). En revanche, les peptides exogènes B4-5 des domaines DIII (Irel = -53.3 ± 20 pA, n =7, p=0.38) et DIV (Irel = -71.5 ± 22 pA, n=6, p=0.71) n'ont aucun effet significatif sur cette densité du courant.

Selon notre hypothèse, les effets inhibiteurs de ces peptides B4-5 des domaines DI et DII sur la densité du courant seraient liés à une stabilisation de la fermeture de la porte d'activation. L'évaluation des effets de ces peptides sur la probabilité d'ouverture du canal ainsi que sur les cinétiques d'activation et de désactivation, permettraient de confirmer ou infirmer une telle stabilisation de la porte d'activation à l'état fermée. En plus de cet effet, ces peptides pourraient affecter également la voltage-dépendance de l'activation, du fait du caractère voltage-dépendant de l'interaction entre B4-5 et TS6. Toutefois, ces effets inhibiteurs pourraient également être liés à d'autres paramètres tels que (i) une variation de l'expression de Nav1.4 ou (ii) une variation du trafic du canal à la membrane.

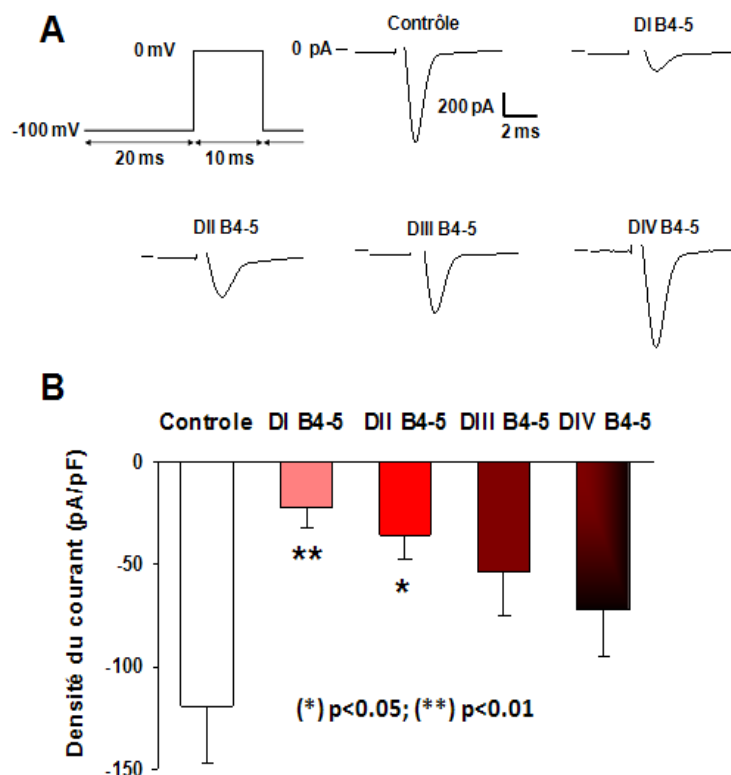


Figure 30 : Effets des peptides B4-5 sur la densité du courant.

(A) Un protocole de saut unique de potentiel (*en haut à gauche*) a été utilisé pour enregistrer le courant sodique aux différentes conditions contrôle et en présence de peptides exogènes B4-5. Un tracé représentatif de chaque condition est présenté. (B) Moyennes des densités du courant.

Les peptides B4-5 exogènes n'affectent pas la voltage-dépendance de l'activation

Afin d'étudier les effets des peptides mimétiques des B4-5 des quatre domaines sur la voltage-dépendance de l'activation du canal, les courants sodiques ont été enregistrés suite à un protocole d'activation dans les différentes conditions (Figure 31A).

A partir de ces enregistrements, des courbes d'activation ont été établies (Figure 31B) et les

effets des minigènes sur la voltage-dépendance de l'activation du canal ont été étudiés en comparant, entre les cellules contrôles et les cellules exprimant un peptide B4-5 exogène, deux paramètres issus de cette courbe d'activation :

- le potentiel de demi-activation ($V_{1/2}$ d'activation) c'est-à-dire le potentiel auquel 50% des canaux sont activés. Ce paramètre reflète la sensibilité de la porte d'activation au potentiel membranaire.
- la pente de la courbe d'activation reflétant la sensibilité de la porte d'activation aux variations du potentiel membranaire.

Nos résultats montrent que ces peptides B4-5 exogènes n'ont aucun effet significatif sur la voltage-dépendance de l'activation (Figure 31B). En effet, le $V_{1/2}$ d'activation n'est pas statiquement différent (Figure 31C) entre les cellules contrôles ($V_{1/2} = -18.6 \pm 3.7$ mV) et celles exprimant les peptides exogènes B4-5 des domaines DI ($V_{1/2} = -19.5$ mV ± 3.7 mV), DII ($V_{1/2} = -15.5 \pm 2.5$ mV), DIII ($V_{1/2} = -20.8 \pm 4.9$ mV) et DIV ($V_{1/2} = -16.2 \pm 1.4$ mV). La pente de la courbe d'activation est également inchangée (Figure 31D) entre la condition contrôle ($K = 5.9 \pm 0.3$) et les conditions avec les peptides exogènes B4-5 des domaines DI ($K = 6.7 \pm 0.6$), DII ($K = 5.8 \pm 0.4$), DIII ($K = 5.9 \pm 0.4$) et DIV ($K = 5.7 \pm 0.1$).

En résumé, les peptides mimétiques des B4-5 des domaines DI et DII ont un effet inhibiteur sur la densité du courant tandis qu'aucun des peptides B4-5 n'affecte la voltage-dépendance de l'activation du canal. Les effets inhibiteurs des peptides mimétiques des B4-5 des domaines DI et DII sur la densité du courant sont cohérents avec le rôle de ces domaines dans le processus d'activation du canal Nav1.4 et des canaux sodiques en général. En revanche, l'absence d'effet de ces peptides inhibiteurs sur la voltage-dépendance de l'activation peut s'expliquer soit par le faible nombre d'échantillons, ou une interaction non-optimale entre ces peptides exogènes et TS6 endogène car nous n'avons testé que quelques peptides candidats. L'augmentation du nombre d'échantillons ainsi que l'évaluation des effets des autres peptides B4-5 exogènes sont en cours. Les séquences de ces nouveaux peptides à tester sont décalées de trois acides aminés à gauche et à droite par rapport aux peptides testés, afin de corriger les éventuelles erreurs d'alignement.

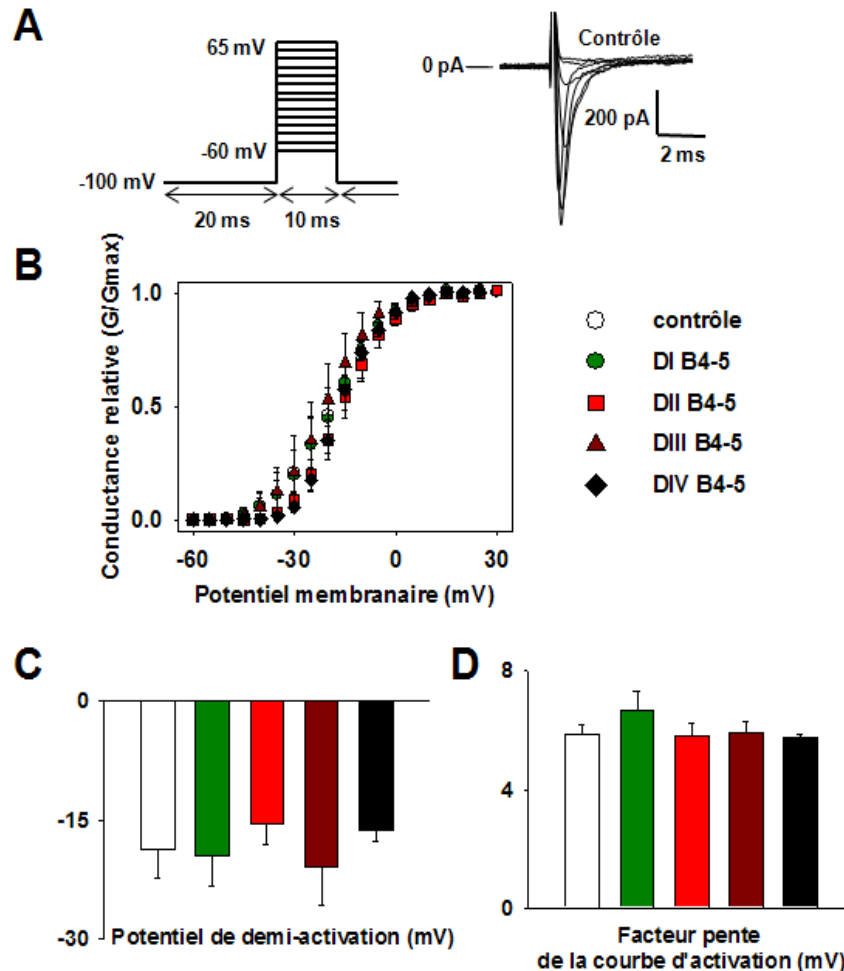


Figure 31 : Etude des effets des peptides B4-5 sur la voltage-dépendance du canal Nav1.4.

(A) Un protocole d'activation (à gauche) a été utilisé pour enregistrer le courant sodique à différents potentiels comme illustré pour la condition contrôle (à droite). Le même protocole a été utilisé pour les conditions B4-5 de chaque domaine de Nav1.4. Ce protocole consiste à dépolariser la cellule de -60 à +65mV avec un incrément de 5 mV pendant 10ms, suivi d'une phase de repolarisation à -100mV après chaque dépolarisation. B4-5 : boucle S4-S5. (B) A partir de ces enregistrements, les courbes d'activation ont été construites selon une équation de type Boltzmann. Ces courbes d'activation ont ensuite permis de déterminer (C) les potentiels de demi-activation et (D) les facteurs pente.

Le peptide mimétique de TS6 du domaine DI est sans effet sur la densité du courant

Toujours selon notre hypothèse, les TS6 sont les récepteurs auxquels se lient les ligands B4-5 pour stabiliser la fermeture du canal au potentiel membranaire de repos. Si cette hypothèse est vraie, l'expression de peptides mimétiques de ces TS6 devrait leurrer les B4-5 endogènes et ainsi entraîner un gain-de-fonction via une déstabilisation de la fermeture du canal.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué les effets de ces peptides exogènes TS6 sur l'activité du canal. Parmi ces peptides, seul le peptide mimétique de TS6 du domaine DI a pu être étudié avec un nombre d'échantillons suffisamment élevé pour faire les tests statistiques. Nos résultats montrent que, par rapport au contrôle ($I_{rel} = -118 \pm 28$ pA, $n=10$), ce peptide exogène TS6 du DI ($I_{rel} = -93.7 \pm 21$ pA, $n=6$, $p=0.71$) n'a aucun effet sur la densité du courant (Figure 32). Ce manque d'effet peut s'expliquer par un manque d'interaction entre le peptide et le canal, du fait de la séquence du peptide. Nous sommes en train d'étudier les effets de tous les autres peptides TS6 des quatre domaines, y compris les peptides dont les séquences sont décalées de trois acides aminés à gauche ou à droite par rapport aux séquences issues de l'alignement.

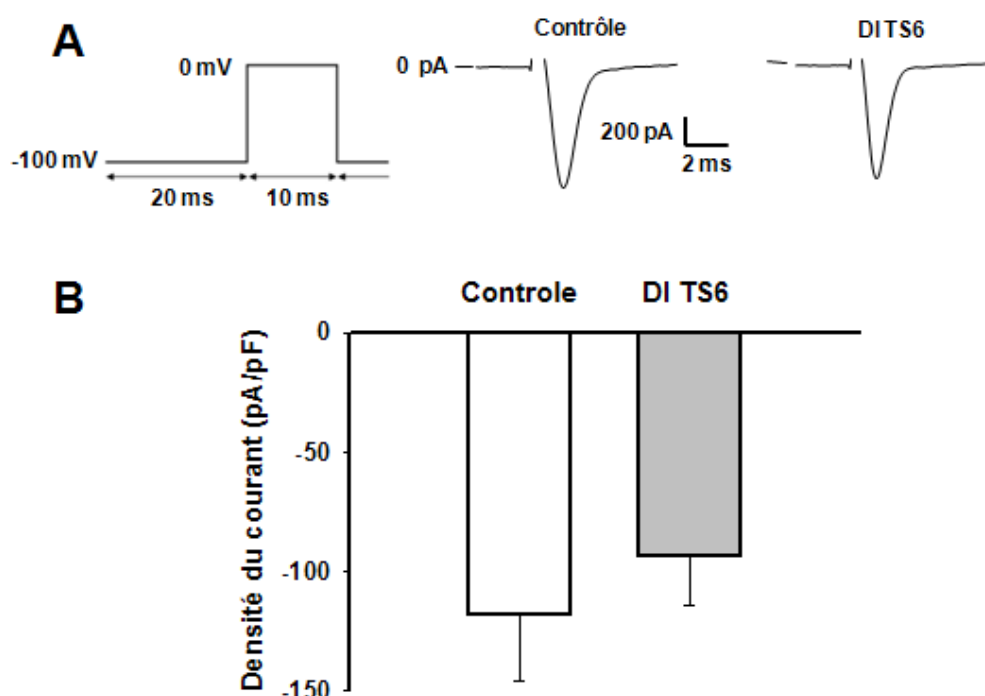


Figure 32 : Effets du peptide TS6 du domaine DI sur la densité du courant.

(A) Un protocole de saut unique de potentiel (à gauche) a été utilisé pour enregistrer le courant sodique aux différentes conditions (contrôle ou en présence du peptide exogènes TS6 du domaine DI). Un tracé représentatif de chaque condition est présenté (à droite). **(B)** Moyennes des densités du courant.

B- Etude sur le canal NavSp1

Rappelons que NavSp1 est un homotétramère, ce qui fait qu'il y a seulement un seul B4-5 et un seul TS6. L'alignement de séquences entre ce canal et les canaux KAT1, HCN, hERG, Shaker, Kv1.2, KCNQ1, NavAb (Figure 26) a permis de déterminer les séquences des peptides B4-5 et TS6 susceptibles d'avoir des effets modulateurs sur l'activité du canal NavSp1. Comme pour les canaux KCNQ1 et Nav1.4, d'autres peptides B4-5 et TS6 ont été déterminés en décalant la séquence issue de l'alignement (séquence 0) de trois acides aminés à gauche (séquence -3) ou à droite (séquence +3). En somme, les séquences de trois peptides exogènes B4-5 et trois peptides exogènes TS6 ont été déterminées. Des plasmides codant pour ces peptides ont été co-transfectés avec le plasmide pIRES2 EGFP codant pour NavSp1. Pour la condition contrôle, le plasmide codant pour le peptide a été remplacé par celui codant pour la GFP. La configuration « cellule entière » de la technique de patch clamp a été utilisée pour étudier les effets des six peptides exogènes B4-5 et TS6.

Le peptide mimétique de B4-5 module l'activité du canal NavSp1

Selon notre hypothèse, l'expression du peptide exogène B4-5 devrait inhiber l'activité du canal par stabilisation de sa fermeture via une interaction avec TS6 endogène. Nous avons évalué les effets des peptides exogènes B4-5 (0, -3 et +3) sur la densité du courant normalisée par rapport au contrôle (Figure 33, tableau 1). Nos résultats montrent que l'expression du peptide exogène B4-5 (-3) entraîne une diminution de la densité du courant. En revanche, les peptides exogènes B4-5 (0) et (+3) n'ont aucun effet significatif sur cette densité du courant. Une forte tendance à un effet activateur du peptide B4-5 (+3) est tout de même observée (Figure 33, tableau 1).

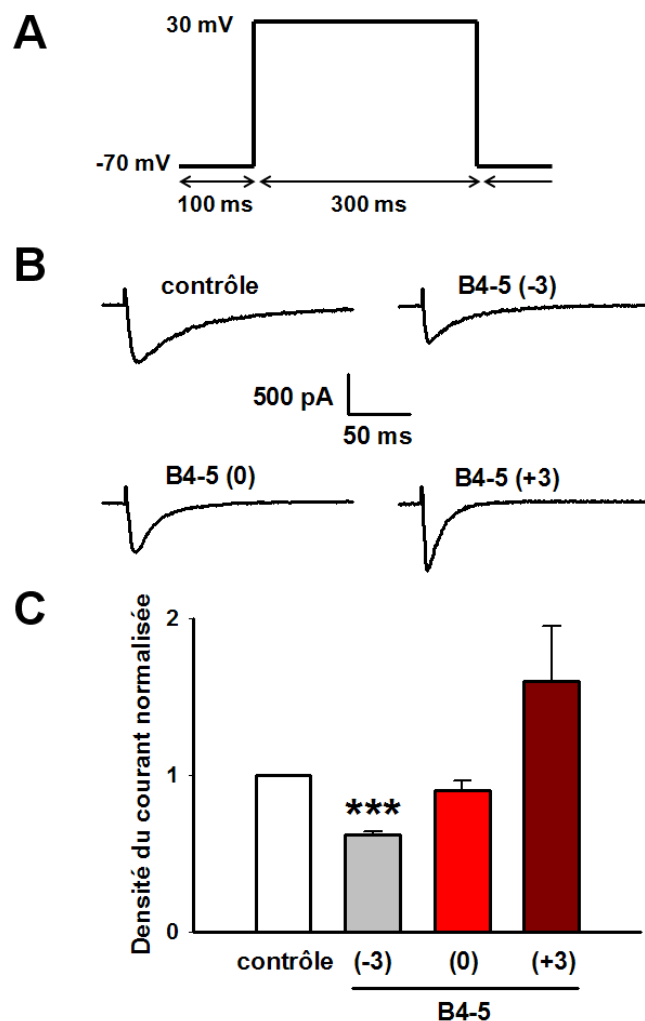


Figure 33 : Effets des peptides B4-5 de NavSp1 sur la densité du courant.

(A) Un protocole de saut unique de potentiel a été utilisé pour enregistrer (B) le courant sodique aux différentes conditions contrôle, B4-5 (-3), B4-5 (0) et B4-5 (+3). (C) Moyennes des densités du courant. *** $p < 0.001$.

	Contrôle	B4-5 (-3)	B4-5 (0)	B4-5 (+3)	TS6 (-3)	TS6 (0)	TS6 (+3)
Densité du courant normalisée	1.00	0.62	0.90	1.60	1.24	0.82	2.39
erreur standard à la moyenne	0.00	0.02	0.06	0.35	0.02	0.17	0.30
Nombre d'expérience		3	2	4	2	2	3
Nombre de cellules total	108	25	22	35	31	20	41
p (test de mann & whitney)		<0.001	0.33	0.34	0.33	0.33	0.01

Tableau 1 : Résultats d'évaluation des effets des peptides B4-5 et TS6 de NavSp1.

Le peptide mimétique de TS6 module l'activité du canal NavSp1

Selon notre hypothèse, le peptide exogène TS6 devrait, quant à lui, leurrer B4-5 endogène et de ce fait, déstabiliser la fermeture du canal, ce qui se traduirait par un effet gain-de-fonction sur l'activité du canal. Nous avons donc évalué les effets des peptides exogènes TS6 (-3, 0 et +3) sur la densité du courant normalisée par rapport au contrôle (Figure 34). Nous avons observé que le peptide exogène TS6 (+3) entraîne une augmentation considérable de cette densité du courant. En revanche, les peptides exogènes TS6 (-3) et (0) sont sans effet sur ce paramètre (Figure 34, tableau 1).

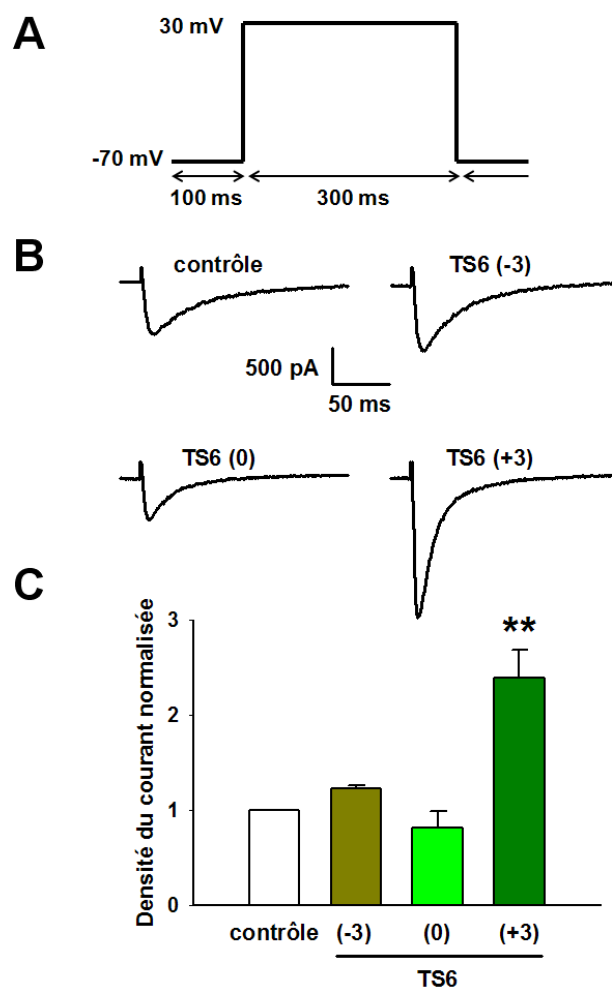


Figure 34 : Effets des peptides TS6 de NavSp1 sur la densité du courant.

(A) Un protocole de saut unique de potentiel a été utilisé pour enregistrer (B) le courant sodique aux différentes conditions contrôle, TS6 (-3), TS6 (0) et TS6 (+3). (C) Moyennes des densités du courant. ** $p < 0.01$.

Discussion

Résumé des résultats

Le but de ce projet 3 était d'étudier l'application du modèle « ligand-récepteur » sur les canaux sodiques voltage-dépendants Nav1.4 et NavSp1. Selon ce modèle, les B4-5 jouent le rôle de ligands inhibiteurs voltage-dépendants capables de se fixer sur les TS6 (leurs récepteurs) pour stabiliser l'état fermé du canal. Ainsi, nous avons utilisé la même approche que pour KCNQ1, à savoir l'évaluation des effets des peptides mimétiques des régions B4-5 et TS6 des canaux sodiques Nav1.4 et NavSp1 sur l'activité de ces derniers.

L'étude sur Nav1.4 a permis d'identifier deux peptides mimétiques des B4-5 des domaines DI et DII ayant un effet inhibiteur sur l'amplitude du courant. Les effets de nombreux autres peptides mimétiques de B4-5 ou TS6 sont en cours d'évaluation.

Quant aux expériences réalisées sur le canal NavSp1, elles ont permis d'identifier un peptide mimétique de B4-5 ayant un effet inhibiteur d'une part, et un peptide mimétique de TS6 ayant un effet activateur d'autre part. Ces deux effets ont lieu sur l'amplitude du courant.

Cohérence des résultats avec le modèle « ligand-récepteur »

Tous ces résultats obtenus sur Nav1.4 et NavSp1 sont parfaitement cohérents avec le modèle « ligand-récepteur ». Comme pour KCNQ1, des peptides mimétiques de B4-5 de ces canaux Nav sont capables d'interagir avec les TS6 endogènes à ces canaux et stabiliser la fermeture de la porte d'activation, d'où leurs effets inhibiteurs. A l'inverse, des peptides mimétiques de TS6 sont capables de leurrer les B4-5 endogènes, les empêchant ainsi d'interagir avec les TS6 endogènes, ce qui aboutit à une déstabilisation de la fermeture du canal, d'où leurs effets activateurs. Ces résultats suggèrent une application du modèle « ligand-récepteur » aux canaux Nav.

Toutefois, il est important de mentionner qu'un autre peptide mimétique de B4-5 de NavSp1 a un effet à forte tendance activatrice, ce qui est cohérent avec le modèle consensuel du couplage entre VSD et PD. Selon ce modèle, l'interaction entre B4-5 et TS6 stabilise les états ouvert ou fermé du canal, différents résidus étant impliqués dans la stabilisation de chaque état, comme décrit par Ng et al. (2012).

Les trois peptides mimétiques d'une région (B4-5 ou TS6) ont été déterminés en décalant leur séquence de trois acides aminés. Ce court décalage semble suffisant pour avoir des peptides avec des effets différents, ce qui suggère une certaine spécificité dans l'interaction peptide-canal. Il sera intéressant d'étudier, grâce à une approche de mutagenèse dirigée associée à des études fonctionnelles, les déterminants moléculaires de cette interaction.

Perspectives

Etudes fonctionnelles

Nombreuses expériences fonctionnelles sont en cours pour compléter les résultats ci-dessus afin de préciser les mécanismes de dépendance au potentiel de ces canaux Nav. Ces expériences consistent à :

- Compléter l'évaluation des autres peptides mimétiques de B4-5 ou TS6 de Nav1.4 sur l'amplitude du courant.
- évaluer les effets des peptides modulateurs des canaux Nav1.4 et NavSp1 sur leurs paramètres biophysiques à savoir la voltage-dépendance de l'activation et de l'inactivation ainsi que les cinétiques d'activation, d'inactivation et de désactivation.
- évaluer la spécificité et la réversibilité des effets des peptides les plus efficaces sur ces deux canaux Nav.
- étudier si l'expression simultanée de différents peptides mimétiques de différents domaines et ayant le même effet (activateur ou inhibiteur) sur Nav1.4, permet d'amplifier leurs effets.

Ensuite, des approches de biologie structurale permettront de caractériser les bases structurales de l'interaction entre B4-5 et TS6. Ces approches structurales seront décrites par la suite dans la discussion générale (page 138).

Le canal sodique bactérien NavSp1 : bon modèle d'étude structurale

Depuis la première découverte et caractérisation fonctionnelle d'un canal sodique procaryote exprimé chez *Bacillus halodurans* (Ren et al., 2001), les canaux sodiques bactériens (NavBacs) ont été utilisés comme modèles pour mieux comprendre les bases structurales de leurs homologues eucaryotes. Ces NavBacs présentent un avantage majeur pour les études structurales : ils peuvent être exprimés par *Escherichia Coli* en quantité suffisante pour obtenir des cristaux à partir desquels leur structure sera déterminée grâce à une diffraction aux rayons X. A ce jour, quatre structures cristallographiques de NavBacs ont été obtenues (McCusker et al., 2012; Payandeh et al., 2011b, 2012; Zhang et al., 2012). Certains de ces NavBacs sont fonctionnels lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules de mammifères, ce qui permet l'étude de leurs caractéristiques biophysiques en utilisant la technique de patch clamp. Par conséquent, ces NavBacs constituent de très bons outils pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires et les bases structurales de l'activité et de la régulation des canaux Nav eucaryotes.

Le canal NavSp1 est un canal sodique voltage-dépendant naturellement exprimé par la bactérie *Silicibacter Pomeroyi*. La structure cristallographique du mutant « pore only » de ce canal vient d'être déterminée dans le laboratoire du Pr Daniel L. Minor (UCSF). Lors de mon séjour de recherche dans ce laboratoire spécialisé en biologie structurale, j'ai réalisé la caractérisation fonctionnelle de ce canal ainsi que les déterminants moléculaires impliqués dans ses propriétés d'activation, inactivation et de sélectivité (annexe 1).

A présent, nous tentons de déterminer à nouveau la structure de ce mutant « pore only » du canal NavSp1 mais cette fois-ci avec la région B4-5. Les données structurales issues d'une telle caractérisation structurale permettront de mieux comprendre les bases structurales et moléculaires de l'interaction entre B4-5 et TS6. En d'autres termes, la détermination d'une structure cristallographique d'un canal à l'état fermé et montrant une interaction entre B4-5 et TS6 permettra de déterminer les types d'interaction ainsi que les résidus impliqués dans le couplage entre les modules VSD et PD. A partir de là, des approches de modélisation et de mutagenèse associées à des études fonctionnelles, permettront de déterminer les mutations à introduire sur les peptides exogènes pour augmenter leurs effets sans affecter leur spécificité vis-à-vis du canal ciblé. Cette étape représente un objectif majeur dans ce projet, à savoir l'amélioration de l'efficacité des peptides modulateurs (activateurs et inhibiteurs).

Il serait également intéressant de déterminer la structure du mutant « pore only » de NavSp1 sans la région B4-5, mais cette fois-ci, en présence d'un peptide exogène B4-5. La mise en évidence de l'interaction entre un tel peptide et le mutant « pore only » confirmerait que les effets des peptides mimétiques de B4-5 sont liés à une interaction de ces peptides avec TS6, et non avec une autre région du canal. Cela permettrait également d'écarter la possibilité d'une insertion de ces peptides B4-5 exogènes dans l'interstice entre le VSD et le PD pour jouer un rôle de "cale" plus ou moins spécifique du canal ciblé.

Le canal sodique musculaire Nav1.4 : bon modèle d'étude in-vivo

Une fois que l'amélioration de l'efficacité des peptides modulateurs sera réalisée sur le canal NavSp1 puis sur Nav1.4 et KCNQ1, la prochaine étape consistera à étudier *in-vivo*, les effets des peptides améliorés.

Comme décrit dans l'introduction générale, le canal Nav1.4 présente un rôle physiopathologique majeur sur les muscles squelettiques. Des mutations perte et gain-de-fonction sur le gène *SCN4A* codant pour ce canal ont été associées à de nombreuses pathologies telles que des paralysies périodiques hypo et hyperkaliémique, la myotonie congénitale ou encore le syndrome myasténique congénital (Jurkat-Rott et al., 2010). De façon intéressante, il existe des modèles animaux de ces pathologies comme la souris dont

le canal Nav1.4 possède la mutation R669H (Wu et al., 2011), ou celle avec la mutation M1592V sur ce canal (Hayward et al., 2008). Ces souris présentent les symptômes de la paralysie périodique hypokaliémique et hyperkaliémique, respectivement.

De plus, il est plus facile d'accéder aux muscles squelettiques qu'à d'autres tissus excitables comme le cœur et le cerveau, pour injecter les peptides modulateurs dans le cadre d'une étude *in-vivo* de leurs effets. Une telle étude nécessitera des approches fonctionnelles permettant d'évaluer la motricité *in-vivo*. De telles approches pourront donc être utilisées pour évaluer *in-vivo*, les effets des peptides améliorés, sur des modèles animaux de paralysies périodiques.

Ainsi, le canal Nav1.4 constitue un bon modèle d'étude *in-vivo* des effets des peptides.

Revue d'articles

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de rédiger un article de revue présentant les connaissances actuelles sur la régulation des canaux potassiques voltage-dépendants et d'autres canaux, par le PIP_2 et par le potentiel membranaire. Plus précisément, cet article de revue illustre les effets opposés du PIP_2 et de la boucle S4-S5 sur les canaux potassiques voltage-dépendants.

Cet article a été publié dans le journal « Frontiers in pharmacology of ion channels and channelopathies » (Choveau, **Abderemane-Ali** et al, 2012).



Opposite effects of the S4–S5 linker and PIP₂ on voltage-gated channel function: KCNQ1/KCNE1 and other channels

Frank S. Choveau^{1,2,3†}, Fayal Abderemane-Ali^{1,2,3}, Fabien C. Cohan^{1,2,3}, Zeineb Es-Salah-Lamoureux^{1,2,3}, Isabelle Baró^{1,2,3} and Gildas Loussouarn^{1,2,3*}

¹ UMR 1087, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nantes, France

² UMR 6291, Centre National de la Recherche Scientifique, Nantes, France

³ L'Institut du Thorax, L'UNAM Université, Université de Nantes, Nantes, France

Edited by:

Mounir Tarek, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Reviewed by:

Nikita Gamper, University of Leeds, UK

David A. Brown, University College London, UK

*Correspondence:

Gildas Loussouarn, L'Institut du Thorax, UMR 1087/CNRS UMR 6291, IRT-UN, 8 Quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France.
e-mail: gildas.loussouarn@univ-nantes.fr

†Present address:

Frank S. Choveau, UTHSCSA, San Antonio, TX, USA.

Voltage-gated potassium (Kv) channels are tetramers, each subunit presenting six transmembrane segments (S1–S6), with each S1–S4 segments forming a voltage-sensing domain (VSD) and the four S5–S6 forming both the conduction pathway and its gate. S4 segments control the opening of the intracellular activation gate in response to changes in membrane potential. Crystal structures of several voltage-gated ion channels in combination with biophysical and mutagenesis studies highlighted the critical role of the S4–S5 linker (S4S5_L) and of the S6 C-terminal part (S6_T) in the coupling between the VSD and the activation gate. Several mechanisms have been proposed to describe the coupling at a molecular scale. This review summarizes the mechanisms suggested for various voltage-gated ion channels, including a mechanism that we described for KCNQ1, in which S4S5_L is acting like a ligand binding to S6_T to stabilize the channel in a closed state. As discussed in this review, this mechanism may explain the reverse response to depolarization in HCN-like channels. As opposed to S4S5_L, the phosphoinositide, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), stabilizes KCNQ1 channel in an open state. Many other ion channels (not only voltage-gated) require PIP₂ to function properly, confirming its crucial importance as an ion channel cofactor. This is highlighted in cases in which an altered regulation of ion channels by PIP₂ leads to channelopathies, as observed for KCNQ1. This review summarizes the state of the art on the two regulatory mechanisms that are critical for KCNQ1 and other voltage-gated channels function (PIP₂ and S4S5_L), and assesses their potential physiological and pathophysiological roles.

Keywords: voltage-gated potassium channels, S4–S5 linker, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, patch-clamp, channelopathies

PART 1: ROLE OF THE S4–S5 LINKER IN CHANNEL VOLTAGE DEPENDENCY

Voltage-gated ion channels are all designed according to a common pattern including six transmembrane segments (S1–S6), with S1–S4 forming the voltage-sensing domain (VSD), in which the positively charged S4 is the voltage sensor *per se*, and S5–S6 forming the pore. The N- and C-termini are cytosolic. Whereas voltage-gated K⁺ channels are tetrameric assemblies of identical or homologous subunits, eukaryotic Ca²⁺ and Na⁺ voltage-gated channels are the result of the fusion of four subunits.

If a general consensus started to emerge on the nature and the (nano-)metrics of the movement of the voltage sensor in voltage-gated channels, it is still not the case for the nature of the coupling between the voltage sensor movement and the gate opening. In this first part, we review most of the results obtained through various experimental approaches on various channels, that can give insights on the nature of the coupling, and we try to classify this coupling into two categories: a strong or a labile coupling between the main actors, namely, the S4–S5 linker (referred here as S4S5_L) and the C-terminal part of the S6 transmembrane segment (S6_T).

HOW DOES THE VOLTAGE SENSOR REGULATE PORE GATING?

Movement of the voltage sensor

The ability of K_v channels to sense the membrane potential is conferred via the VSD. The S4 segment moves across the plasma membrane in response to changes in membrane potential, allowing the transition of the channel between a closed conformation and an open conformation. Many studies have investigated the nature of the S4 movement, and came up with three different models, with major differences in this movement.

* According to the crystal structure of KvAP, S4 coupled to S3 form a helical hairpin, or “paddle,” moving 15–20 Å across the lipid bilayer, as confirmed by avidin accessibility to different-length tethered biotin reagents (Jiang et al., 2003; Ruta et al., 2005). However, a number of lines of evidence suggest that the KvAP structure does not correspond to a native conformation, such as the fact that the VSD is in a resting state and in contrast, the pore is in the open state. This non-native state is potentially due to the use of monoclonal antibody fragments in order

to stabilize the structure, but more likely due to the absence of membrane lipids (Lee et al., 2005).

* The “transporter” model, described in Shaker, involves a very small movement of S4 (2–3 Å) from a crevice in contact with the intracellular solution to another one in contact with the extracellular solution (Cha et al., 1999; Chanda et al., 2005).

* Finally, the helical screw model (Guy and Seetharamulu, 1986) and the similar sliding helix model (Catterall, 1986), originally proposed for sodium channels, have been then adapted to K_v channels (Durell and Guy, 1992). These models suggest that S4 rotates ~180°, and at the same time, translates ~13.5 Å along its axis (reviewed in Börjesson and Elinder, 2008). Strikingly, “embryonic” paddle and helical screw models were predicted as early as 1981 (Figures 2 and 9 of Armstrong, 1981).

The variety of these models, and the fact that they predict a magnitude of the S4 movement across the membrane ranging from 2 Å (Cha et al., 1999) to ~15 Å in Shaker (Larsson et al., 1996), most probably come from the variety of the techniques employed. Some of the techniques (such as FRET) underestimate the distances by capturing rare conformations when the donor and acceptor are nearby. On the contrary, cross-linking or tethered biotin may overestimate distances by capturing and covalently stabilizing rare and extreme conformations in which a cysteine is accessible intracellularly or extracellularly (Tombola et al., 2006).

A structural model of Shaker, based on the crystal structure of Kv1.2, predicts an axial rotation and a translation of S4 (Yarov-Yarovoy et al., 2006) as described in the “helical screw” model. In addition, a subsequent tilting motion of the S4 is also suggested. Very recently, disulfide-locking experiments and structural models of resting and activated state of the VSD in a sodium channel, NaChBac, propose an outward movement (~6–8 Å) of S4 relative to S1, S2, and S3 and a rotation (~30°) of the S4 coupled to a tilting motion relative to the S4S5_L (Yarov-Yarovoy et al., 2012). Studies of these different channels support the idea that a common S4 movement may be applied to various channels, including KCNQ channels. The next step will be to solve the crystal structure of KCNQ channels, in an attempt to gain insights on the structural conformation corresponding to gating of these channels. Presently, homology models (Smith et al., 2007) and molecular dynamics are valuable templates to better understand the physiological and pathophysiological mechanisms of voltage dependency (Delemotte et al., 2011).

Coupling between the voltage sensor and the gate: S4S5_L and S6_T play a major role

The S4S5_L interacts with S6_T in many voltage-gated channels.

Which part of the channel links the voltage sensor movement to the gate opening? The physical interaction between S4S5_L and S6_T and the role of this interaction in translating the voltage sensor movement to the gate opening have been investigated in many voltage-gated channels by diverse techniques. The results obtained will be detailed below and in other reviews of the present Frontiers Research Topic, but it is important to note that many works stress the major role of this S4S5_L–S6_T interaction. Mutagenesis associated to functional studies using chimeras of Shaker and KcsA (Lu et al., 2001, 2002), alanine-scanning of S4S5_L and S6_T

in Kv4.2 (Barghaan and Bähring, 2009), cross-linking studies of S4S5_L and S6_T in human ether-a-go-go related gene (hERG; Ferrer et al., 2006), but also in the hyperpolarization-activated channel, spHCN1 (Prole and Yellen, 2006), all converge to the notion that S4S5_L and S6_T play a major role in the coupling between the voltage sensor and the S6_T. This is further confirmed by the crystal structures of K_v and Na_v channels, which show that the distance between S4S5_L and S6_T fits with the hypothesis that these regions contact each other (Long et al., 2005; Payandeh et al., 2011).

These studies strongly indicate that the VSD-activation and gate coupling are associated through the S4S5_L–S6_T interaction. However, many questions remain to be elucidated. Are other regions of channels involved in this coupling? How exactly does this S4S5_L–S6_T interaction make the link between VSD-activation and gate coupling?

The N-terminus and the S1 segment are also involved in the VSD-pore coupling.

In addition to S4S5_L and S6_T interaction, other regions influence voltage-dependent channel activity. One of those regions is the N-terminus (Nter). In many signaling proteins, a PAS domain is present where it functions as a signal sensor and its name comes from the transcription factors in which it was first identified: period circadian protein (Per), aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (Arnt), and single-minded protein (Sim). The PAS domain is also present in the N-terminus of three K_v channel families, Kv10, Kv11, and Kv12. An interaction between the PAS domain and S4S5_L has been postulated as underlying the slow deactivation process of hERG channels (Wang et al., 1998a; Chen et al., 1999). Long QT syndrome (LQT) is a cardiac disease characterized by prolonged ventricular repolarization, arrhythmias, and sudden death. In some LQT patients, a disruption of the presumed interaction between the PAS domain and S4S5_L would result in an acceleration of the deactivation rate, leading to a decrease in this critical repolarizing current (Chen et al., 1999). Alonso-Ron et al. (2008) showed that channels lacking Nter domain or bearing mutations in S4S5_L exhibited similar slowed deactivation and positive shift in the voltage dependence of activation, supporting the hypothesis of an interaction between these two regions. However, no experiment has unequivocally demonstrated a direct Nter–S4S5_L interaction although a recent study has demonstrated a close proximity between Nter and S4S5_L in hERG (de la Peña et al., 2011). To highlight such interaction, the authors introduced cysteines in the PAS domain and in the S4S5_L and then tested the effects of applying an oxidizing agent, *tert*-butyl hydroperoxide (TbHO₂), on channels expressing those cysteines. Formation of disulfide bonds, induced by TbHO₂, between cysteines introduced in Nter and S4S5_L, dramatically decreases the tail current. This effect is completely reversed by dithiothreitol, a reducing agent. Taken together, these data indicate that Nter can bind to S4S5_L, stabilizing the channel in the closed state. A more exhaustive review on the role of cytoplasmic domains (CTD) in voltage-gated potassium channels gating is available in another article of this Frontiers Research topic (Barros et al., 2012).

The coupling between the VSD and the pore may also occur through interactions between transmembrane domains (TMD). Cross-linking studies in Shaker channel showed the proximity between the S4 and S5 segments, and suggested that interactions

may be involved in the coupling between the VSD and the pore (Broomand et al., 2003; Gandhi et al., 2003). Also, statistical analysis of K_v channels sequences and mutagenesis studies suggest that an interface between the S1 domain and the pore helix, both highly conserved in K_v channels, is required for this coupling as well (Lee et al., 2009). Indeed, a tryptophan scanning of residues forming the interaction surface between S1 and the pore helix in Shaker has shown that mutations of those residues affect channels function. Finally, formation of a disulfide bond, forcing the S1-pore helix interaction, leads to an alteration of gating.

In summary, a network of interactions, including Nter, S1, S4S5_L, and S6_T, seems to be involved in the coupling between VSD and the pore.

INTERACTION BETWEEN S4S5_L AND S6_T: TWO MODELS

Model 1: Mechanical lever model (Figure 1A)

Shaker. The Shaker gene from *Drosophila melanogaster* was the first potassium channel to be cloned (Tempel et al., 1987), contributing to the identification of a family of homologous channels in vertebrates (the K_v superfamily) and to the understanding of the role of K_v channels in human diseases. This channel is one of the most extensively studied voltage-activated ion channels and often serves as a model in the study of voltage dependency. In this tetrameric voltage-gated K⁺ channel, the four VSDs are covalently connected to the S5 segments of the pore region by the S4–S5 linkers, as mentioned above. Kinetic models predicted that the gating mechanism of this channel involves several relatively independent movements of the four VSDs between resting and activated states, followed by a concerted opening transition where the S6 gate moves from a closed to an open state (Bezannila et al., 1994; Hoshi et al., 1994; Stefani et al., 1994; Zagotta et al., 1994a,b). This model was further confirmed by using a triplet of mutations in the S4 that make the final concerted step rate limiting in the activation pathway, thus rendering it more detectable (Ledwell and Aldrich, 1999).

In an elegant work using chimeras in which Shaker pore module is replaced by the one of KcsA channel (Lu et al., 2001, 2002), Lu and co-workers showed that S4S5_L and S6_T play a key role in voltage dependency. Incomplete channel closures in Shaker-KcsA chimeras with modified S4S5_L and S6_T suggest that these regions interact in the closed state (Lu et al., 2002). Assuming that the voltage sensors S4 are coupled to the gate in Shaker channels via an obligatory (one S4 in the down state is enough to keep the channel closed) rather than an allosteric mechanism, they proposed a mechanical lever model in which S4S5_L are pushing the S6 gate in a closed conformation at negative voltages. The crystal structure corresponding to the open state of the related vertebrate Kv1.2 (below) is consistent with this mechanism in which all the S4 segments have to be in an “up” state to allow pore opening.

In other functional studies, Shaker mutations in S4S5_L and S6_T were shown to have a dramatic effect on the slow component of the off-gating current. Together with the fact that closing the gate impacts on gating charge return, this has been interpreted as the S4S5_L and S6_T interaction allosterically keeping S4 in the “up” position and stabilizing the open state (Batulan et al., 2010). The same group identified other Shaker mutations in S4S5_L and S6_T that completely uncouple S4 movement from pore opening. They

used the mutations to show that the pore domain exerts a mechanical load onto the voltage sensors. Indeed, these mutations lead the voltage sensors to be activated at more negative potentials (they are more free to move), and relieve the mode shift of the voltage sensor, that they interpret as a stabilization of the open state directly impacting the S4 movement (Haddad and Blunck, 2011).

Altogether, these data support both the specificity and the strength of interaction between S4S5_L and S6_T, consistent with the mechanical lever mechanism, but in a more complex manner, with potentially state-dependent S4S5_L and S6_T interactions stabilizing the closed (Lu et al., 2002) and the open (Batulan et al., 2010) states. Of note, the critical role of S4S5_L and S6_T interaction in channel open state stabilization has been recently illustrated using high speed molecular dynamics simulation (Jensen et al., 2012). Altogether these data, suggest a mechanism more complex than a pure electromechanical coupling.

Kv1.2. The Kv1.2 channel is a Shaker-like voltage-gated potassium channel expressed in mammalian neurons and involved in the regulation of pre- and post-synaptic membrane excitability. The interaction between the S4–S5 linker and the S6 segment was observed in the crystal structure of Kv1.2 in the open state (Long et al., 2005), confirming the electromechanical coupling between the voltage sensor movement and the pore, as suggested previously by Lu and co-workers in Shaker channels. The S4 were suggested to perform mechanical work on the pore of Kv1.2 through the S4–S5 linkers, which are positioned to constrict or dilate the S6 inner helices of the pore (Long et al., 2005). A prediction of the channel closed state was built based on the hypothesis of a permanent coupling. In this configuration where the S6 helix is presented as a “receptor” of S4–S5 linker, it is easy to understand why its sequence on K_v channels is quite conserved: Pro-X-Pro, where X is any amino-acid (Shaker-like K_v channels), or Gly (other K_v channels) in the corresponding region. This structure allows bending of the S6 helix in order to form the correct interaction with the S4–S5 linker helix. However, the absence of a structure of K_v channels in the closed state prevents from determining the exact molecular nature of the voltage-dependent gate closure. Moreover, the structure of Kv1.2 may not completely correspond to the functional open-activated state, especially for the position of S4 relative to the pore, since this structure is incompatible with the proximity of first S4 arginine R294 and a pore domain residue, A351 (Lewis et al., 2008). Such proximity between R294 and A351 was probed by the generation of a high affinity binding site of Zn²⁺ or Cd²⁺ when the residues were mutated to histidine. As discussed above for cross-linking experiments trying to estimate the S4 position and movement, introduction of the Zn²⁺ or Cd²⁺ high affinity binding site may also capture the channel in a non-native state.

Only the combination of experimental and *in silico* approaches, and the multiplication of channel structures will help understanding the molecular details of the channel voltage dependency. For instance, a recent crystal structure obtained from a prokaryotic voltage-gated sodium channel (structurally similar to eukaryotic voltage-gated K⁺ channels) supports the idea of a transient and quite labile coupling between S4S5_L and the S6_T (Figure 1B). Indeed, we can observe in this structure that the voltage sensors S4 are in their activated position even though the pore is closed

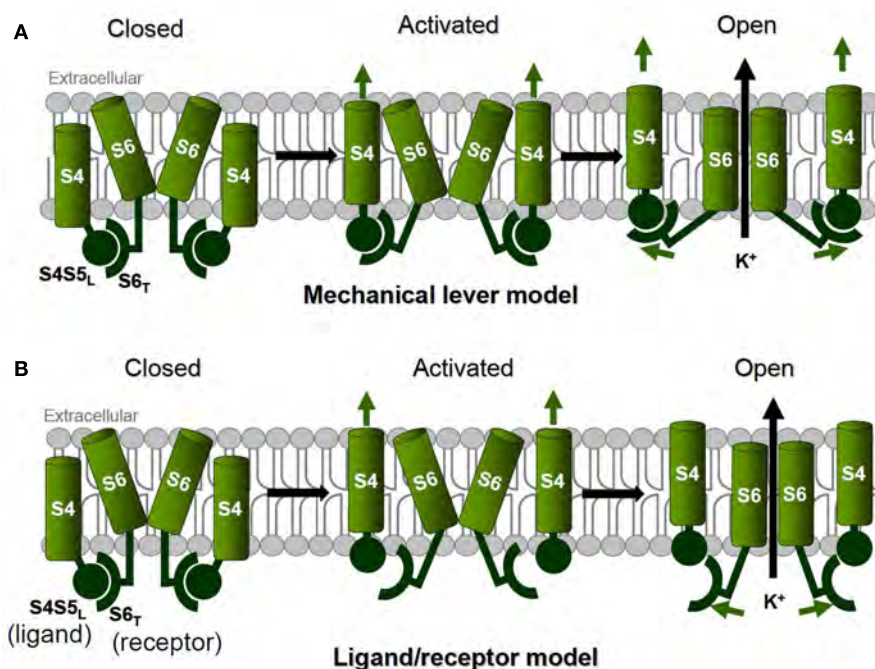


FIGURE 1 | Two models of coupling between voltage sensor movement and pore opening. (A) The mechanical lever model with a strong coupling between voltage sensor movement and pore opening, as suggested for Kv1.2

and Shaker. **(B)** The ligand/receptor model with a loose and state-dependent coupling between voltage sensor movement and pore opening, as suggested for KCNQ1 channels.

(Payandeh et al., 2011), and this corresponds to a decreased interaction of S4S5_L with S6_T.

Model 2: Ligand/receptor model (Figure 1B)

KCNQ1. It is now admitted that the VSD-pore coupling is mediated by the interaction between S4S5_L and S6_T. Several works on Shaker and Kv1.2 channels (above) suggest that the nature of this interaction is a strong coupling of the pore opening with voltage sensor movement. But in other channels, the interaction between S4S5_L and S6_T may be state-dependent, and leads to stabilization of the channel in the open or closed state. Forcing the interaction between S4S5_L and S6_T seems to stabilize hERG channels in a closed conformation (Ferrer et al., 2006). One interpretation can be that S4S5_L is the equivalent of a ligand, able to bind to S6_T and to stabilize the channel in a closed state. Upon depolarization, S4 drags the S4S5_L ligand away from its receptor, allowing the channel to open (Figure 1B). To test this hypothesis on KCNQ1, we designed peptides identical to S4S5_L (the “ligand”) and S6_T (the “receptor”) based on sequence alignment with Shaker, in which interacting areas in the S4S5_L and the S6_T were suggested (Lu et al., 2001, 2002). KCNQ1 coassembles with the β -subunit KCNE1 to form the channel responsible for the cardiac slowly activating delayed rectifier current, I_{Ks} . In COS-7 cells transfected with the cardiac KCNE1-KCNQ1 channel complex and the S4S5_L or S6_T mimicking peptides, we found that co-expression of S4S5_L peptides (“ligand” or inhibitory peptides) and the channel resulted in a reduction of the voltage-dependent potassium currents. In contrast, S6_T peptides (“receptor” or decoy peptides) up-regulated channels activity, by competing with the endogenous S6_T and

decreasing the inhibitory effect of the endogenous S4S5_L binding to the endogenous S6_T (Choveau et al., 2011). This confirms that S4S5_L can be compared to a ligand that locks channels in the closed state by interacting with its receptor, S6_T. The specificity of the S4S5_L/S6_T interaction was confirmed by mutating the partners. Previous mutagenesis studies in KCNQ1 channels identified mutations in S4S5_L (V254A) and in S6_T (L353A) that prevent the channels from closing completely at hyperpolarizing potentials (Boulet et al., 2007; Labro et al., 2011), consistent with a decrease in the S4S5_L–S6_T interaction. Based on these results, introduction of V254A in S4S5_L peptide or L353A mutations in S6_T peptide should disrupt the channel-peptide interaction and thus abolish their respective effect on the K⁺ current. Mutant peptides have indeed no effect on KCNQ1 function (Choveau et al., 2011). To further demonstrate the specificity of the peptides-KCNQ1 interaction, a couple of mutations were tested both on the peptides and on the channel. In the KCNQ1 channel, introduction of L353A mutation located in S6_T leads to an instantaneous current component, that is abolished by the introduction of V254L mutation located in S4S5_L (Labro et al., 2011). The increased side chain volume induced by V254L substitution is probably compensating for the decreased side chain volume induced by the L353A one. We hypothesized (i) that the incomplete L353A channel closure was due to a low binding affinity of the endogenous WT ligand (S4S5_L) to its L353A mutated S6_T receptor and (ii) a restored binding affinity of the endogenous V254L mutated ligand (S4S5_L) to the mutated S6_T receptor. To confirm this, we showed that the WT S4S5_L peptide has indeed no effect on the L353A KCNQ1 channel, whereas the mutant S4S5_L peptide (V254L) has an effect

on this L353A KCNQ1 channel (Choveau et al., 2011). Altogether, our results are consistent with a ligand/receptor mechanism in which S4S5_L acts as a ligand that binds to its receptor, S6_T, stabilizing the pore in a closed conformation. May this ligand/receptor mechanism be applied to other voltage-gated channels?

Human ether-a-go-go related gene. The hERG encodes the voltage-gated potassium channel underlying the cardiac delayed rectifier current, I_{Kr} , participating in the repolarization phase of cardiac action potential (Curran et al., 1995; Sanguinetti et al., 1995; Trudeau et al., 1995). hERG channel structure is similar to that of Shaker-like voltage-gated channels (Warmke and Ganetzky, 1994), possessing six (S1–S6) TMDs that comprise voltage sensor (S1–S4) and ion conduction pore (S5–S6) region. Despite this similarity, hERG channels behave very differently from Shaker-like channels: hERG activation and deactivation gating kinetics are much slower, whereas inactivation and the recovery from inactivation are rapid and intrinsically voltage-dependent (Smith et al., 1996; Sanguinetti and Tristani-Firouzi, 2006). Similarly to KCNQ1, the proximity between the S4S5_L and S6_T in the closed state was suggested by mutagenesis of these regions (Tristani-Firouzi et al., 2002). Most importantly, introducing cysteines in both S4S5_L and S6_T led to a current decrease in an oxidizing environment, and predominantly at a negative holding potential. This potential-dependent channel locking in the closed state is consistent with the formation of a disulfide bond between the cysteines introduced in S4S5_L and S6_T (Ferrer et al., 2006), and suggest that S4S5_L binding to S6_T locks the channel closed. This is in accordance with the ligand-receptor model underlying the voltage dependency of hERG channel activity. In the WT channel, interaction between S4S5_L and S6_T occurs via specific amino-acids since a point mutation (D540K) located in S4S5_L (Sanguinetti and Xu, 1999) fundamentally alters the gating properties of hERG channels and these changes are prevented by additional point mutations (R665A, R665Q, or R665D) located in S6_T (Tristani-Firouzi et al., 2002). The demonstrated specificity of amino-acids interaction further supports the S4S5_L ligand and S6_T receptor model. A companion review (Cheng and Claydon, 2012) in the present Research Topic suggests that the sequence of the S4S5_L may be partly responsible for the slow activation kinetics of hERG channels.

HCN and KAT1. The hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide-gated (HCN) channels represent a family of four members (HCN1–4) that carry I_f (“f” for “funny”) or I_h (“h” for “hyperpolarization”) currents (DiFrancesco, 1981). Sequence analysis revealed that the primary structure of HCN channels is similar to that of voltage-gated potassium channels, i.e., six TMDs (S1–S6), including the positively charged voltage sensor S4 and the ion-conducting pore between S5 and S6. Ionic currents through HCN channels modulate the intrinsic electrical activity in the heart (DiFrancesco et al., 1979; DiFrancesco, 1993) and in a variety of neurons (Pape, 1996). Intriguingly, these non-specific cation channels are activated upon cell membrane hyperpolarization, contrarily to the classical depolarization-activated ion channels.

How can this difference in the gating behavior be explained? Two competing models have been proposed. The first model proposes that HCN channels are in an inactivated state when the membrane is depolarized and that its hyperpolarization induces channels to recover from inactivation and enter into an open state (Miller and Aldrich, 1996; Gauss et al., 1998). The second suggests that HCN channels gating is opposite to the one of K_v channels. In other words, membrane depolarization induces HCN channels deactivation whereas membrane hyperpolarization results in channel activation. Uncovering hyperpolarization-induced inactivation in KAT1, a six-segment potassium channel cloned from the higher plant *Arabidopsis* and having similar gating characteristics as HCN, has provided an argument that favors the second model for hyperpolarization-dependent activation of HCN channels (Moroni et al., 2000).

Alanine-scanning mutagenesis in HCN2 channel identified three S4S5_L residues playing a major role in the S6 gate stabilization in the closed state (Chen et al., 2001), consistent with the “ligand/receptor” model of voltage dependency described in KCNQ1 and hERG. However, this does not explain in a straightforward way the reversed voltage dependency of the channel compared to other voltage-gated channels. A possible explanation would be that a specific S4S5_L–S6_T interaction also favors an open state (in mirror to such interaction favoring a closed state in KCNQ1 or hERG channels). Using a cysteine cross-linking approach, a study showed that forced interaction between the S4S5_L (F359C) and the C-terminus, downstream to S6 (K482C), leads to a constrained and unnatural opening of spHCN1 channel (Prole and Yellen, 2006). Using a homology modeling approach, another study on KAT1 suggested that channel closure occurs via an electrostatic repulsion between S4S5_L (R190 and R197) and S6_T (R307 and R310) while the channel opening occurs when S4S5_L is rotating, allowing an electrostatic interaction between D188 in S4S5_L and R307, R310 in S6_T (Grabe et al., 2007). Again, all these studies are in good agreement with a ligand/receptor model of voltage dependency.

Kv4.2. Kv4.2 channel belongs to the family of voltage-gated potassium channels related to the *Shal* gene of *Drosophila* (Kv4 channels). These channels mediate a subthreshold-activating current (I_{SA}) that controls dendritic excitation and the backpropagation of neuronal action potentials (Hoffman et al., 1997). These Kv4 channels share structural motifs that are conserved in Shaker-like K_v channels, including the positively charged S4 voltage sensor, the TTXGYGD signature sequence in the selectivity filter, and the Pro-X-Pro motif in the S6 segment. One specificity of these channels, as compared to Shaker-like channels, is their significant closed-state inactivation induced by small depolarization (Jerng et al., 2004) and a fast voltage-dependent recovery from inactivation (tens to hundreds of milliseconds). Using functional and modeling approaches, it was demonstrated that this closed-state inactivation is strongly linked to the S4-charge immobilization in Kv4.2 channels, suggesting that the functional availability of Kv4.2 channels is directly regulated by the voltage sensors (Dougherty et al., 2008). Another study based on structural modeling and alanine-scanning, demonstrated that this voltage-dependent regulation involves a dynamic coupling between the S4S5_L and S6_T. This

dynamic coupling mediates both transient activation and closed-state inactivation in Kv4.2 channels (Barghaan and Bähring, 2009). While interaction between S4S5_L and S6_T is necessary for channel activation, the Kv4 inactivation process would result from a destabilization of this interaction. This is detailed in another review (Bähring, 2012) of the present Research Topic. A model of labile coupling might thus be applied to Kv4.2 channels the same way as for KCNQ1, hERG, HCN, or KAT1 channels.

Na_v and Ca_v channels. Voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels (Na_v and Ca_v, respectively), are fused tetrameric subunits with the same structural organization as proper tetrameric K_v channels. Indeed, Na_v and Ca_v subunits contain four homologous but not identical domains, each including six transmembrane segments (S1–S6), a voltage sensor domain with a positively charged S4 segment and a pore region formed by the association of S5 and S6 segments.

Since the voltage-dependent activity of Na⁺ and Ca²⁺ channels is mediated by the S4 movements in response to membrane potential variation (Yang and Horn, 1995; Hu et al., 2003) like voltage-gated potassium channels, we hypothesize that the ligand-receptor mechanism we demonstrated for KCNQ1 (Choveau et al., 2011; Labro et al., 2011) may be applied to Na⁺ and Ca²⁺ channels. The recent crystal structure of the prokaryotic one-domain voltage-gated sodium channel is consistent with our hypothesis since it can be observed that the channel gate (S6) is closed while the S4 segments are in the “up” position (Payandeh et al., 2011). Moreover, in this pre-open configuration (or pre-locked configuration if we consider the open to close pathway), the interaction surface between S4S5_L and S6_T is reduced as compared to the Kv1.2 channels structure (Payandeh et al., 2011). These observations support the model of a spontaneously opening and closing pore (McCusker et al., 2011; Shaya et al., 2011) with S4S5_L locking the channel in a closed state when the membrane is polarized (Figure 1B). It will be interesting to confirm if this model also applies to Na⁺ and Ca²⁺ channels, using the approach of exogenous peptides mimicking S4S5_L or S6_T, as used in Choveau et al. (2011).

IMPAIRED S4–S5 AND S6 INTERACTION UNDERLIES HUMAN DISEASES

As developed earlier, it is broadly accepted that the interaction between S4S5_L and S6_T is extremely important for voltage-gated ion channels function (activation, deactivation, and inactivation). For that reason, disruption of such interaction may have dramatic physiological effects, and lead to certain forms of disease.

Both cardiac and neurological disorders have been linked to impaired S4–S5_L and S6_T interactions in K_v channels. For instance, many mutations of the KCNQ1 channels lead to the LQT, a cardiac disease characterized by prolonged ventricular repolarization, arrhythmias, and sudden death. Interestingly, looking specifically at the S4S5_L, it was shown that LQT1 mutations (type 1 LQT, associated with mutations in KCNQ1) are clustered on the one side of the S4S5_L α-helix structure, that is putatively responsible for interactions with the S6_T region (Boulet et al., 2007; Labro et al., 2011), while several LQT1 mutations are also localized in the interacting S6_T region (<http://www.fsm.it/cardmoc/>), comforting in the opinion that the interaction of S4S5_L with S6_T is physiologically

crucial for a proper heart function. Unfortunately, specific studies that would directly relate the importance of this interaction with disease are still lacking. However, in order to confirm that the ligand/receptor model (Figure 1B) fits well with the KCNQ1-E1 complex behavior, we used an atrial fibrillation mutant, S140G, that was shown to deactivate extremely slowly, and thus that presents almost no voltage dependence in the –80 to +80 mV range (Chen et al., 2003; Restier et al., 2008). Interestingly, while “S6_T/activator peptides” clearly affect WT KCNQ1-KCNE1 channels, no effect was observed on the S140G-E1 complex. Conversely, “S4S5_L/inhibitory peptides” did have a dramatic blocking effect, suggesting that the endogenous S4S5_L of the S140G mutant channel does not reach S6_T. Although speculative, these data suggest that in this mutant, the gain-of-function effect might be somehow related to an impaired interaction between S4S5_L and S6_T (Choveau et al., 2011) due to a stabilization of S4 in the “up” state (Restier et al., 2008).

On the other hand, the pathological effect of a Kv1.1 channel mutation is consistent with the mechanical lever model of Kv1 channels (Figure 1A): the observation that a mutation located in the S4S5_L prevents Kv1.1 open state stabilization led to the conclusion that disrupted S4S5_L and S6 interactions underlie one type of episodic ataxia disease, in direct support of the mechanical lever model (Batulan et al., 2010).

Recently, it was proven that S4S5_L and S6 regions of the voltage-gated calcium channel Cav2.3 are coupled during the activation process (Wall-Lacelle et al., 2011). Since Ca_v channels are involved in several pathologies, including episodic ataxia, familial hemiplegic migraine, idiopathic generalized epilepsy (Adams and Snutch, 2007), one can easily imagine that an impaired S4S5_L–S6_T interaction in these channels might also underlie diseases, knowing that mutations in patients have been found in those critical regions (Adams and Snutch, 2007; Pietrobon, 2007).

PART 2: MODULATION OF VOLTAGE-GATED CHANNELS BY PIP₂

PIP₂ REGULATES SEVERAL VOLTAGE-GATED CHANNELS

KCNQ1 channels

Effect of PIP₂ on I_{Ks} currents. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) is a minor acidic membrane lipid found primarily in the inner leaflet of the plasma membrane. PIP₂ was first described as the precursor of the second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG) when cleaved by receptor-activated phospholipase C (PLC; Berridge, 1981). It was realized much later that plasma membrane PIP₂ is not simply a precursor, but also a signaling molecule in its own right (reviewed in Logothetis et al., 2010). As also demonstrated for a wide variety of ion channels and transporters (Gamper and Shapiro, 2007; Suh and Hille, 2008; Logothetis et al., 2010), we showed that PIP₂ is a necessary cofactor for KCNQ1 channel activity (Loussouarn et al., 2003). It regulates KCNQ1 channel function by stabilizing its open conformation, leading to increased current amplitude, slower deactivation kinetics, and a negative shift in the steady-state activation curve. Such PIP₂ effect was described by a kinetic model in which only the final concerted step toward opening was affected by PIP₂ levels (Figure 2). In this model, when the membrane is depolarized, the movement of the four voltage sensors

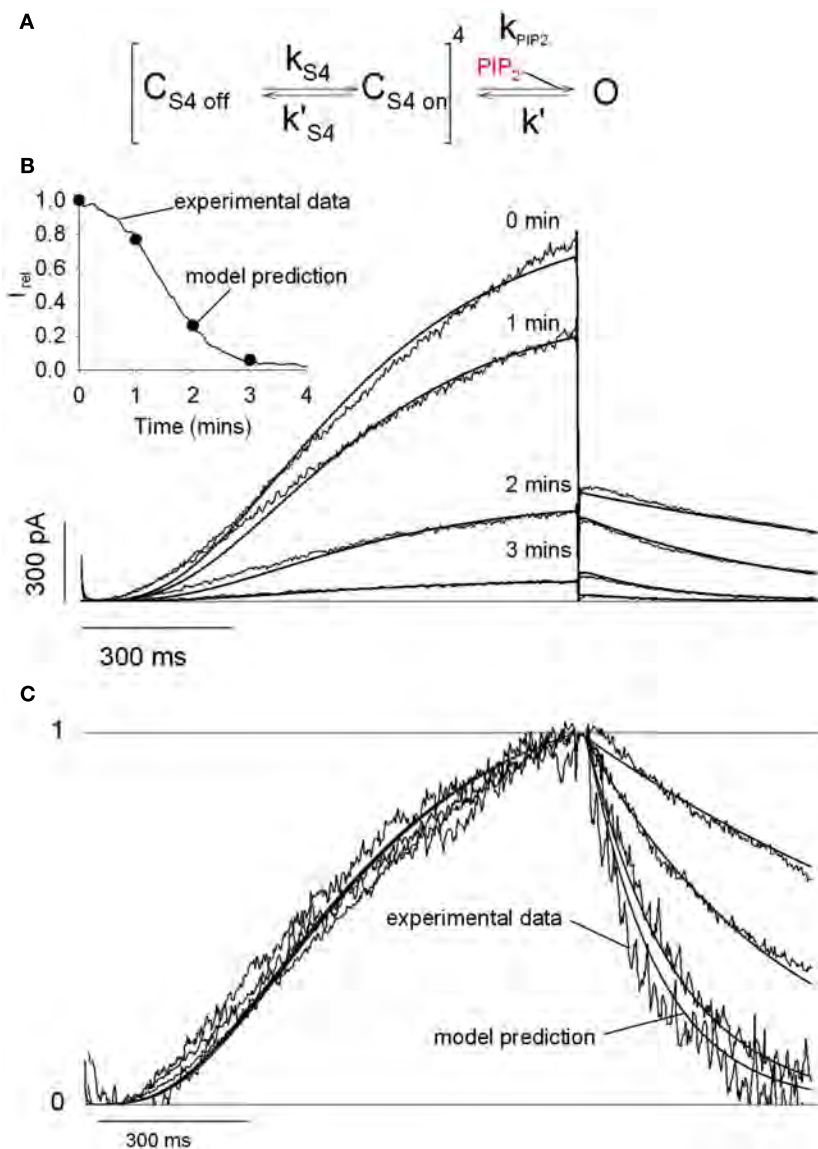


FIGURE 2 | A model based on the stabilization of the open state by PIP₂ recapitulates the characteristics of the KCNQ1/KCNE1 currents. (A)

During activation, k'_{S4} is negligible whereas $k_{S4} = 3.56/\text{s}$, and during deactivation $k'_{S4} = 7.47/\text{s}$ whereas k_{S4} is negligible. In this model, PIP₂ only affects the transition from a closed state to an open state when the four voltage sensors are in the permissive state ($C_{S4 \text{ on}}$). Thus, during simulated rundown, only k_{PIP_2} varies ($k' = 87.3/\text{s}$). (B) Experimental traces were

superimposed with the simulated current (solid lines). k_{PIP_2} was fixed to 592.74, 176.43, 25.84, and 4.53/s (simulating PIP₂ level decrease) to best fit the decrease in current amplitude during rundown, as shown in the inset. Inset: simulated (circles) and observed current (solid line) amplitudes as a function of time after patch excision. (C) Traces in (B) were normalized to compare the observed and simulated kinetics of activation and deactivation. From Loussouarn et al. (2003).

in the upward direction is rate limiting, making activation kinetics PIP₂-independent. But, when the membrane is repolarized, the transition of the concerted pore closing becomes rate limiting, making deactivation kinetics PIP₂-dependent. Other KCNQ channels are also PIP₂ sensitive, like the KCNQ2/KCNQ3 complex responsible for the neuronal M-current (cf. below). It is interesting to note that for this channel complex, the biophysical parameters do not seem to vary as PIP₂ levels vary (Shapiro et al., 2000), and more specifically the deactivation kinetics (Zhang et al., 2010). It is possible for those channels, that the concerted pore closing is

not rate limiting, making deactivation kinetics PIP₂-independent. In KCNQ4, similar kinetics of “OFF” gating current and ion current deactivation are consistent with this hypothesis (Miceli et al., 2012).

The KCNQ1/KCNE1 kinetic model shares similarities with the one of Kir6.2/SUR1 channel (Enkvetchakul et al., 2000) suggesting similar effects of PIP₂ on six-domain and on two-domain channels. Furthermore, similarly to several inwardly rectifying K⁺ (K_{ir}) channels, ROMK, GIRK, and IRK (Huang et al., 1998), direct interaction of PIP₂ with a cluster of basic residues located in the

C-terminus close to S6 was recently shown in KCNQ1 channel (Thomas et al., 2011). This functional homology may give some insights on the nature of PIP₂ regulation of KCNQ1/KCNE1 channels. From the crystal structure of a GIRK channel, Whorton and Mackinnon showed that PIP₂ molecules lie at the interface between the TMD and the CTD (TMD-CTD) and are coordinated by several positively charged residues Lys64, Lys194, Lys199, and Lys200 (Whorton and Mackinnon, 2011). PIP₂ is suggested to couple the G-loop gate (open by GTP binding) and the inner helix gate. But even in the absence of GTP, it allows the outer and interfacial helices to slightly shift downward and outward, and the inner helices to slightly rotate. Even if the motion of the inner helices is not sufficient to open the pore by itself, it shows that PIP₂ binding can lead to the inner helices rearrangements. For KCNQ1, PIP₂ binding to the cluster of basic residues located just after S6 (Thomas et al., 2011) may lead to the stabilization of the inner helices in an open state. In another recent crystallographic study, Hansen et al. (2011) showed that PIP₂ mediates docking of the whole CTD to the TMD and subsequent opening of the inner helix gate of Kir2.2. Thereby, we can speculate that KCNQ1 CTD could interact with the membrane, via interactions with PIP₂. This idea is supported by our previous work showing that substitutions of arginines located at the C-terminus of KCNQ1 channels (R539 and R555, cf. below) decrease the channel-PIP₂ sensitivity. However, crystallographic studies must be done to confirm this hypothesis.

Impact of KCNE1 subunits on PIP₂ sensitivity of I_{Ks}. Although KCNQ1 is a voltage-gated channel on its own, KCNE1 leads to changes in the current properties: it increases the amplitude, shifts the voltage dependence of activation toward more positive potentials, slows activation and deactivation kinetics, and suppresses inactivation (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). More recently, it was shown that KCNE1 alters the function of I_{Ks} by modulating the interaction between PIP₂ and the KCNQ1/KCNE1 complex (Li et al., 2011). It is established that the interaction between proteins and PIP₂ is often based on interaction between basic residues with the negative charges of PIP₂ (Suh and Hille, 2008). In light of this, Li et al. (2011) individually mutated 11 basic residues located in the cytosolic C-terminus of KCNE1 to identify key structural determinants contributing to I_{Ks} regulation by PIP₂. To do this, they studied for each mutant the gradual decrease of KCNQ1/KCNE1 channel activity (“rundown”) observed right after excision in the inside-out configuration of the patch-clamp technique, patch excision provoking a decrease in membrane PIP₂ levels. In their study, Li et al. (2011) demonstrated that KCNE1 increases the PIP₂ sensitivity of I_{Ks}. More specifically, they identified 4 basic residues (R67, K69, K70, and H73) in KCNE1 that seem to play a critical role in this PIP₂ sensitivity. They showed that neutralization of these basic residues abolished the delay before rundown that is specifically observed when KCNE1 is co-expressed with KCNQ1, and significantly reduced the time constant of rundown. From a structure obtained by a NMR approach, it appears that these four residues are located on an α -helix, following the TMD (Kang et al., 2008). Kang et al. suggested that the C-terminal end of KCNE1 sits near S4S5_L and S6_T, which may explain the changes exerted by KCNE1 on the gating of KCNQ1 (see Part 1:

Role of the S4–S5 Linker in Channel Voltage Dependency). Moreover, basic residues in the S4S5_L and in the proximal C-terminus of KCNQ1 have been shown to interact with PIP₂ (Park et al., 2005; Thomas et al., 2011), suggesting that PIP₂ and KCNE1 modulate I_{Ks} through interaction with the same region of KCNQ1. Thus, PIP₂ interacts with amino-acids in the KCNQ1/KCNE1 channel complex, and its capacity to modulate I_{Ks} is regulated by KCNE1, through mechanisms that remain to be clearly identified by crystallographic approach.

Impact of PKA and PKC on PIP₂ sensitivity of I_{Ks}. Neurotransmitter and hormone receptor stimulations activate different signaling pathways that adjust the protein phosphorylation status. Among others, Gq/G11-protein coupled receptors, like muscarinic acetylcholine (ACh) receptors (M1), stimulate the PLC which hydrolyzes PIP₂ (Berridge, 1981) as explained above. The DAG produced by PIP₂ hydrolysis activates protein kinase C (PKC), which has been suggested to regulate I_{Ks} channels. Matavel and Lopes (2009) showed that Gq-coupled receptors regulate I_{Ks} in a biphasic manner: (i) downstream activation of PLC leads to PIP₂ depletion and underlines channel inhibition and (ii) PKC-mediated phosphorylation is responsible for the activation phase.

Protein kinase A (PKA) is another well-characterized kinase that regulates I_{Ks} through receptor-activated signaling pathways (Walsh and Kass, 1988; Marx et al., 2002). Stimulation of the β 1-adrenergic receptor leads to activation of adenylyl cyclase (AC) that catalyzes the conversion of ATP to cAMP and activates PKA. This β -adrenergic stimulation activates KCNQ1 via direct phosphorylation by PKA. More recently, Lopes et al. (2007) showed a crosstalk between KCNQ1 phosphorylation by PKA and its regulation by G-proteins of the Gq/G11 family. This study demonstrated that ACh inhibition of KCNQ1/KCNE1 currents in injected *Xenopus laevis* oocytes was lower in activated-PKA conditions and higher in inhibited-PKA conditions as compared to control. Furthermore, invalidation of the KCNQ1 S92 consensus phosphorylation site completely abolished the PKA effect on M1 inhibition of KCNQ1/KCNE1 currents. These results suggest that direct PKA phosphorylation of KCNQ1 is responsible for the PKA modulation of the observed PLC-dependent inhibition. A direct effect of PKA phosphorylation on channel regulation by PIP₂ was suggested by the use of wortmannin, which blocks the PI4-kinase intervening in the PIP₂ synthesis. PKA modulation of wortmannin inhibition was similar to the PKA modulation of M1 inhibition of KCNQ1. All these results suggest that the KCNQ1 sensitivity to PIP₂ is modulated by PKA (Figure 3).

More recently, Matavel et al. (2010) gave some new insights on KCNQ1 regulation by PKA and PKC. They tested four point mutations of putative PIP₂ interaction sites of the channel (R174C, R243C, R366Q, and R555C) and observed that mutations located in the proximal and distal C-terminus (R366Q and R555C, respectively), enhance the channel sensitivity to variations of membrane PIP₂ level, suggesting a decrease in the apparent affinity of these mutant channels to PIP₂. This was not the case for two mutations located in the S2–S3 loop (R174C) and in the S4S5_L (R243C). For the latter, this is in contradiction with the enhanced sensitivity to PIP₂ level variation observed by Park et al. (2005) for the R243H

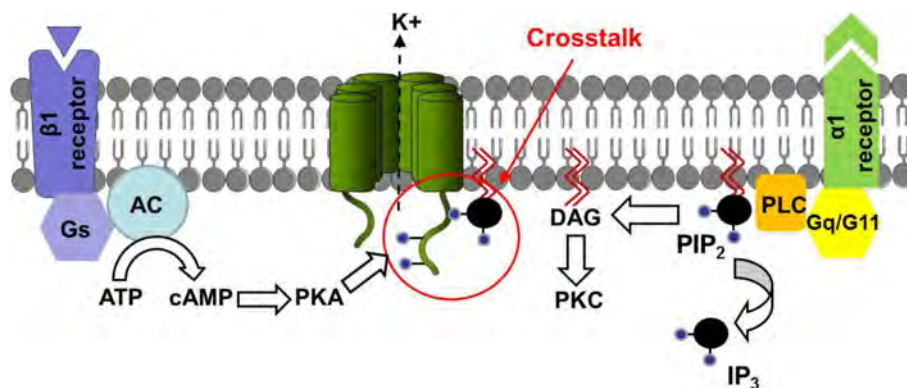


FIGURE 3 | Model of the regulation of channel-PIP₂ interactions by PKA.

β1-adrenergic receptor regulates channel-PIP₂ interaction through PKA phosphorylation, and simultaneously regulates Gq/G11-protein coupled

modulation of the channel. Lopes et al. showed that this model is transposable to KCNQ1 and TREK1 channels. Adapted from Lopes et al. (2007).

mutant. Such discrepancy can be explained by the difference in the nature of the substituted amino-acid (cysteine in one case and histidine in the other) or by differences in experimental conditions (whole-cell configuration on oocytes and giant-patch configuration on COS-7 cells, respectively). Furthermore, Matavel et al. showed that R174C and R243C mutants exhibited an impaired activation by both PKA and PKC, whereas C-terminal KCNQ1 mutants presented an increased activation. Thus, for R366Q and R555C mutant channels, regulation of the channel by PIP₂ was potentiated, suggesting that PKA and PKC activate the channel by strengthening KCNQ1 interactions with PIP₂.

Other KCNQ channels

Five members have been identified in the KCNQ channel family (KCNQ1–5), each with a specific tissue distribution. In the heart, intestine, and inner ear, KCNQ1 subunits, assembling with auxiliary KCNE subunits, are important for repolarization and K⁺ transport (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Neyroud et al., 1997; Wang et al., 1998b). KCNQ2, KCNQ3, and KCNQ5 participate to “M-type” K⁺ currents in a variety of neurons (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000; Cooper et al., 2001; Roche et al., 2002; Shah et al., 2002) and play a dominant role in regulating neuronal excitability (Jones et al., 1995; Cooper et al., 2001). KCNQ4 primarily localizes to the inner ear (Kubisch et al., 1999). Zhang et al. (2003) studied the PIP₂ dependency of all KCNQ family members. They used various approaches for homomeric KCNQ2 and heteromeric KCNQ2/KCNQ3 channels and showed that PIP₂ application in inside-out macropatches leads to an increase in channel activity, even after an almost complete rundown. Following channel reactivation by PIP₂, they observed that application of polylysine, which was described to act as a PIP₂ scavenger (Lopes et al., 2002; Rohács et al., 2002), results in fast and complete block of the current. Application of PIP₂ antibody to the internal surface of inside-out macropatches also suppresses the current. KCNQ1/KCNE1, KCNQ4, and KCNQ5 channels are also reactivated by PIP₂ after inhibition by polylysine, showing that all KCNQ family members are PIP₂ sensitive.

Similar to KCNQ1 (Loussouarn et al., 2003), PIP₂ may increase the current via a stabilization of the open state of KCNQ2–4

channels (Li et al., 2005). In their study, Li et al. (2011) showed that the maximal single-channel open probability (P_o) of KCNQ2–KCNQ4 and specifically KCNQ2/3 channels is highly governed by diC8-PIP₂ concentration. Furthermore, they observed a strong increase in maximal channel open probability (P_o) of KCNQ2/3 and KCNQ2 in cell-attached patches from cells overexpressing PI5-kinase, which has been shown to increase membrane PIP₂ (Bender et al., 2002; Winks et al., 2005). Conversely, a decrease in free membrane PIP₂ induced by muscarinic stimulation strongly lowers channel P_o . The apparent affinity of the channels for diC8-PIP₂ is strongly different and parallels the differential maximal P_o in cell-attached patches, suggesting that P_o of channels is mainly governed by their sensitivity to membrane PIP₂ (Li et al., 2005). Although not sufficient to nail down the point, these experiments are consistent with PIP₂ stabilizing the open state of all KCNQ channels.

In addition to PIP₂, several kinds of phosphoinositides but also other phospholipids are present in the plasma membrane and are capable of regulating the “M-type” K⁺ current (Telezhkin et al., 2012). However, the fact that the current decreases when using tools that specifically decrease PIP₂ (Suh et al., 2006; Lindner et al., 2011) plus consideration of the concentration for half activation for the different phospholipids and their abundance in the membrane suggest a predominant role of PIP₂ for the regulation of KCNQ channels (Telezhkin et al., 2012).

Human ether-a-go-go related gene

The hERG or KCNH2 encodes the pore-forming subunit of the channel that is responsible for the rapid delayed rectifier K⁺ current, I_{Kr} , in cardiac cells and several other cell types (cf. Part 1: Role of the S4–S5 Linker in Channel Voltage Dependency). This was the first voltage-gated ion channel described to be sensitive to PIP₂ (Bian et al., 2001). Consistent with this PIP₂ sensitivity, the muscarinic receptor M1, which stimulates enzymatic hydrolysis of PIP₂ by PLC, has been shown to suppress rat ERG currents in a heterologous system (Hirdes et al., 2004). As opposed to KCNQ1/KCNE1 (Loussouarn et al., 2003), Bian et al. (2001) showed that PIP₂ addition on hERG channel led to an accelerated activation with no effect on deactivation. But more recently, we

observed that PIP₂ effects on hERG are very close to those observed on KCNQ1/KCNE1: increased current, slowed deactivation, and no effect on activation kinetics (Rodríguez et al., 2010). This difference could be due to the use of divergent patch-clamp configurations in these studies: whole-cell in Bian et al. versus inside-out in our study. Furthermore, as for KCNQ1/KCNE1 channel complex, a kinetic model showed that PIP₂ effects on hERG can be explained by modifying the late transition rates only, corresponding to pore opening. In addition, we observed that hERG channels present a PIP₂ sensitivity similar to KCNQ1/KCNE1, estimated by (i) polylysine-induced rundown kinetics, (ii) PIP₂ induced run-up kinetics, and (iii) sensitivity to intracellular Mg²⁺, which is known to screen the PIP₂ negative charges. All these data support the idea that hERG and KCNQ1/KCNE1 channels have a similar affinity to PIP₂. However, the experiments we performed also showed the persistence of a fraction of hERG current at low PIP₂ levels, which may underlie differences in response to physiological decrease in membrane PIP₂ levels.

Other voltage-sensitive channels

In addition to the delayed rectifiers KCNQ1 and hERG, other voltage-gated channels are regulated by PIP₂: the voltage-gated Ca²⁺ channels (Ca_v) channels (Wu et al., 2002), HCN channels (Pian et al., 2006), and also K_v channels (Oliver et al., 2004). At least for Ca_v channels, accessory subunits can regulate the modulation of the current by PIP₂, similar as the β-subunit KCNE1 modulating the PIP₂ sensitivity of KCNQ1 (Suh et al., 2012). Another article of this Frontiers Research topic is focusing on the effect of PIP₂ on these channels (Menchaca et al., under revision).

IMPLICATION OF PIP₂ IN SIGNALING PATHWAYS

Depletion of PIP₂ by activation of the Gq signaling pathway

Many studies have investigated the role of PIP₂ in the regulation of voltage-gated KCNQ channels activity. Recovery of KCNQ2/KCNQ3 current following muscarinic stimulation requires re-synthesis of PIP₂ (Suh and Hille, 2002) and channels activity decreases quickly upon patch excision but is restored upon cytoplasmic addition of PIP₂ (Zhang et al., 2003). In addition, fluorescent PIP₂-sensitive probes showed close correlation between PIP₂ hydrolysis and channel current suppression by muscarinic agonists (Winks et al., 2005). Similar effects of PIP₂ were found for KCNQ1 channels, in recombinant systems (Loussouarn et al., 2003; Zhang et al., 2003; Matavel and Lopes, 2009). Surprisingly, one study shows the opposite effect of PIP₂ on I_{Ks} in guinea-pig cardiomyocytes which would deserve a closer look (Ding et al., 2004).

A decrease in PIP₂ may be the major determinant for a decrease in a KCNQ current upon activation of some Gq/11-coupled receptors, but the mechanism may also be more complex for other Gq/11-coupled receptors. Regarding regulation of the M-current, two distinct pathways following PLC activation and IP₃ and DAG production have been described (Figure 4).

The first pathway, for which the decrease in PIP₂ is the major determinant of M-current depression, is induced by the activation of M1 muscarinic ACh and AT1 angiotensin II receptors (Zaika et al., 2006; Suh and Hille, 2007; Matavel and Lopes, 2009; Figure 4A).

The second pathway, activated by bradykinin B2 and purinergic P2Y receptors (Figure 4B), induces PIP₂ hydrolysis, but also PIP₂ re-synthesis preventing a decrease in PIP₂ abundance. PIP₂ re-synthesis is triggered by the increase of IP₃ concentration leading to calcium release from intracellular stores (Cruzblanca et al., 1998; Boffill-Cardona et al., 2000; Delmas et al., 2002; Zaika et al., 2007). This release is modulated by a IP₃ receptor-binding protein, IRBIT, which leaves and unmask some IP₃ binding sites at a high enough IP₃ concentration, and increases the IP₃ receptor sensitivity (Zaika et al., 2011). The released Ca²⁺ binds to the calcium sensitive neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) that activates PI4-kinase, leading to PIP₂ re-synthesis compensating the hydrolysis of PIP₂ by PLC (Zaika et al., 2007). Ca²⁺ also binds to calmodulin (CaM; Gamper et al., 2005) and Ca²⁺-CaM binding to the channel might decrease the affinity of channels for PIP₂ (Kwon et al., 2007; Sarria et al., 2011) as their putative binding modules seem to overlap (Hernandez et al., 2008). This decrease in the affinity for PIP₂ may be the cause for current depression in the second pathway (Figure 4B).

Binding/unbinding of PIP₂

Localization of PIP₂-binding sites. The location of presumed PIP₂-binding sites and the characteristic of their motifs have been investigated in several channels. For KCNQ channels, evidence support the idea that the PIP₂-binding site(s) is (are) located mainly within the C-terminus. For instance, the H328C mutation in helix A within the C-terminus of KCNQ2 (residue in green in Figure 5) renders channels less sensitive to PIP₂ (Zhang et al., 2003). In addition, Shapiro and co-workers localized a cluster of basic residues within the linker connecting helices A and B in the C-terminus of KCNQ2–4 as the primary site of PIP₂ action (Hernandez et al., 2008). Based on the crystal structure of Kir2.1, homology modeling of KCNQ2 has suggested three residues (R459, R461, and R463) to form hydrogen bonds with phosphates of the PIP₂ head group (Hernandez et al., 2008).

Because all KCNQ channels share a common structure and are up-regulated by PIP₂ (Loussouarn et al., 2003; Zhang et al., 2003), PIP₂-binding site may be located at the analogous position in KCNQ1. However, a sequence alignment shows that the putative amino-acids binding to PIP₂ identified by Shapiro and co-workers (blue frame in Figure 5) are highly conserved in KCNQ2–5 but not in KCNQ1, suggesting different PIP₂-binding site(s) in this latter. A recent study has identified a cluster of basic residues (K354, K358, R360, and K362) in helix A of KCNQ1 as being involved in PIP₂-binding (Thomas et al., 2011). Three of these residues are conserved in other KCNQ channels (red frame in Figure 5), suggesting a potential role of those amino-acids in PIP₂-channel interactions in KCNQ2–4. Other residues, that are located in the S4–S5 linker (R243), downstream of the CaM binding domain (R539) and in helix C of KCNQ1 C-terminus (R555), have also been proposed to interact with PIP₂ (Park et al., 2005). As a result, and especially for KCNQ1, PIP₂ seems to interact with multiple parts of the channel. The crystal structures of Kir2.2 and GIRK 2, corresponding to S4–S5 linker + S5–S6 + C-terminus in KCNQ channels, illustrate such networks of interaction, and may give insights on the nature of PIP₂ regulation of KCNQ channels, as exposed above (Hansen et al., 2011; Whorton and Mackinnon,

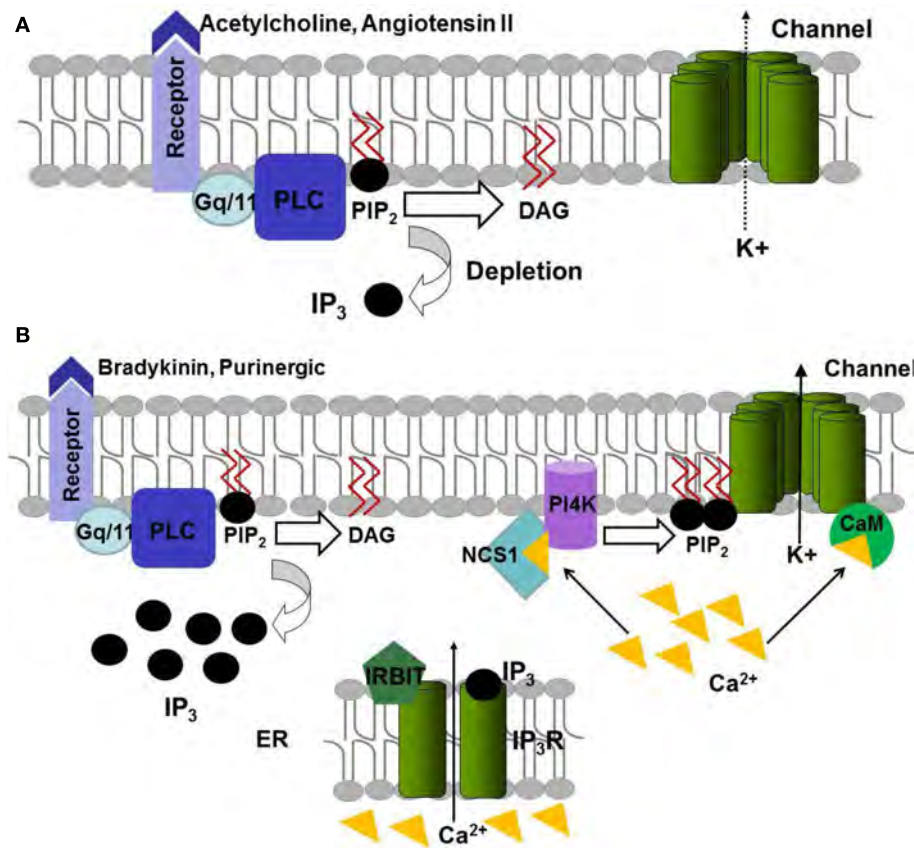


FIGURE 4 | Model of regulation of KCNQ channels function by the Gq signaling pathway. (A) Activation of the PLC by ACh and angiotensin II induces the hydrolysis of PIP₂ to DAG and IP₃. **(B)** Activation of bradykinin and purinergic receptors leads to depletion of PIP₂ by PLC but also its

re-synthesis. IP₃ allows releasing Ca²⁺ from endoplasmic reticulum via IP₃R receptor. The released Ca²⁺ can bind to NCS-1 that induces the synthesis of PIP₂ via PI4K or bind to CaM and modulate the channel sensitivity to PIP₂.



FIGURE 5 | Alignment of human KCNQ C-terminus and potential PIP₂ interacting residues. The residues in KCNQ1, framed in red and indicated in red and italic, are those identified by Thomas et al. (2011) and Park et al.

(2005), respectively. The H328 residue identified in KCNQ2 is indicated in green and in italic (Zhang et al., 2003). The region identified in KCNQ2–4 by Shapiro and co-workers is framed in blue (Hernandez et al., 2008).

2011). A more precise mapping and robust structural data remain to be established in KCNQ channels to understand the underlying mechanism.

In hERG also, a PIP₂-binding site seems to be located in the C-terminus. Deletion of a segment (883–894) in the C-terminus of hERG abolished the effects of PIP₂ on channel amplitude and voltage dependence of activation (Bian et al., 2004). However, the exact position remains elusive.

Role of Ca²⁺-CaM. We described above that activation of Gq/11 signaling pathways leads to PIP₂ depletion and consequently to decreased channel current. However, several works suggest that unbinding of PIP₂ due to decreased affinity for KCNQ channels, rather than PIP₂ depletion, can underlie Gq/11-mediated depression of KCNQ current (Delmas and Brown, 2005). In agreement with this, Ca²⁺-CaM binding site is very close to the putative binding site for PIP₂: helix A and B for Ca²⁺-CaM and the A-B helix linker for PIP₂ (Wen and Levitan, 2002; Gamper and Shapiro, 2003; Hernandez et al., 2008). This proximity indicates that occupation of this site by Ca²⁺-CaM might reduce the binding of PIP₂ to the channel, leading to a down-regulation of channels. Consistent with this, a recent study (Sarria et al., 2011) showed an increase of the open probability by PIP₂ of another six-segment channel, TRPM8, to be reversed by Ca²⁺-CaM. Conversely, Kwon and co-workers have found that PIP₂ reduced Ca²⁺-CaM binding to several channels including TRPC1, TRPC5–7, and TRPV1 (Kwon et al., 2007). Interestingly, similar effects are observed in KCNQ1 and Cav1.2, supporting the idea that PIP₂- and Ca²⁺-CaM binding sites overlap in these channels (Kwon et al., 2007). However, mechanisms by which Ca²⁺-CaM and PIP₂ antagonize each other effects remain unclear. Does this reduction result from a direct competition or from allosteric conformational changes?

Do phospholipids affect the voltage sensor S4 movement? As previously described in this review, mutagenesis studies have identified clusters of positively charged residues, mainly located in the cytosolic C-terminus of channels that may interact with the negatively charged PIP₂. The S4 segment possesses several positively charged residues, suggesting that PIP₂ might also affect its movement by interacting with some of these residues.

Several studies are consistent with the idea that lipids can interact with the voltage sensor and modulate its motion; although most of these studies focus on interactions in the outer leaflet (PIP₂ is situated in the inner leaflet). Structural studies on KvAP and on a Kv1.2-Kv2.1 chimeric channel show that some residues of S4 are exposed to lipids (Lee et al., 2005; Long et al., 2007). Chimeric Kv2.1 in which the “paddle” motif (S3b and S4) is replaced by one of the paddle motifs of Nav1.4 or of the voltage-dependent phosphatase, Ci-VSP, can be used to evaluate the contribution of the paddle motif to a specific property of the voltage sensor. Hydrolysis of the outer-leaflet lipid sphingomyelin to ceramide-1-phosphate by sphingomyelinase D alters the S4 movement differently in the different chimeric channels, suggesting an interaction between outer-leaf lipids and the paddle motif (Milescu et al., 2009). The sphingomyelin phosphate that persists in ceramide-1-phosphate is critical for their interaction with S4 since sphingomyelinase C, an enzyme which removes this phosphate group, strongly reduced the

gating current of Shaker and Kv1.3 (Xu et al., 2008). The importance of the phosphate group of lipids in the S4 movement has also been highlighted in KvAP channels (Schmidt et al., 2006; Zheng et al., 2011). Expression of KvAP in membranes, in which lipids have a positively charged group instead of a phosphate group, renders the channels not functional (Schmidt et al., 2006). This effect would arise from a disruption of the interaction between the arginines of the S4 segment and the phosphate groups of the membrane lipids. Consistent with this, Zheng et al., 2011) showed that the switch of the S4 from the resting to the activated conformation requires more energy in a membrane without phospholipids.

According to those studies, S4 is stabilized in the activated position by interaction with outer-leaflet phospholipids. The structure of the Kv1.2-Kv2.1 chimeric channel suggests that an inner-leaflet phospholipid may also interact with the S4–S5 linker (Long et al., 2007). We suppose that the negatively charged phosphate groups of PIP₂ may bind to positively charged residues at the bottom of S4 or in S4–S5 linker and regulate S4 motions. However, no direct evidence exists for such an interaction.

IMPAIRED CHANNEL-PIP₂ INTERACTION UNDERLIES HUMAN DISEASES

As mentioned above, the importance of PIP₂ regulation of voltage-gated ion channels is now proven and clear. Thus, one might ask how far this crucial factor affects the physiological functions of these channels. Is it limited to a biophysical/regulatory effect, or does it have major impact; for instance, can an impaired interaction with PIP₂ lead to human disease? While this issue was partly answered for non-voltage-gated ion channels (Logothetis et al., 2010), the relationship between PIP₂ and channelopathies implying voltage-gated ion channels is less clear, probably since the study of their regulation is more recent and less developed.

The KCNQ1-KCNE1 potassium channel complex underlies the I_{Ks} repolarizing cardiac current. We showed that this channel function is dependent on PIP₂ regulation, which allows stabilization of the open state (Loussouarn et al., 2003). Importantly, we also demonstrated that residues in intracellular part of KCNQ1 channels (S4S5_L and C-terminus) are important for PIP₂ regulation, and that their substitution, occurring in some LQT1 patients, leads to channel with decreased PIP₂ sensitivity, suggesting a direct connection between channels-PIP₂ interactions and the LQT syndrome (Park et al., 2005).

The KCNE1 beta-subunit is critical for a proper activity of KCNQ1 in the heart, and KCNE1 mutations are also associated with a LQT (type 5 LQT syndrome, LQT5). It was shown that neutralization of positive charges located in KCNE1 C-terminus is associated with LQT5 (Lai et al., 2005; Hedley et al., 2009; Kapplinger et al., 2009). A recent study highlighted the importance of PIP₂ interaction with KCNE1 and suggested that such interaction is critical for a proper function of KCNQ1/KCNE1 in the heart. This study went further by reporting that LQT5 syndrome is directly related to PIP₂-KCNE1 association, since WT channel complex properties were restored by using higher than normal doses of PIP₂, thus also confirming the PIP₂-dependence of LQT5 disease (Li et al., 2011).

Regulation of hERG channels by PIP₂ has been described in Section “Part 2: Human Ether-a-go-go Related Gene.” PIP₂

stabilizes hERG open state changing the amplitude and deactivation kinetics (Bian et al., 2001; Rodriguez et al., 2010). In the putative PIP₂-binding sites, phospholipid anionic heads may interact with intracellular positively charged residues separated by, at least, one aromatic residue (Rosenhouse-Dantsker and Logothetis, 2007; Hernandez et al., 2008). One PIP₂ interacting site of hERG is localized to the C-terminal part of S6 (residues 883–864; Bian et al., 2004). Interestingly, three type 2 (hERG-related) LQT mutations that lead to substitution or deletion of arginines (at positions 885, 887, and 892) are localized in this area (Napolitano et al., 2005; Tester et al., 2005; Arnestad et al., 2007). It would thus be informative to investigate the activity of these LQT mutant channels to determine a potential PIP₂ involvement with the LQT2 syndrome.

The importance of PIP₂ regulation for proper voltage-gated ion channels function deserves thus all our attention. Although no direct connection between the phospholipid and channelopathies has been proven, apart from the LQT studies, the data obtained

so far open a wide range of possibilities. An impressive list of phosphoinositide-sensitive channels has been presented in a recent review (Logothetis et al., 2010), and many of them are involved in pathologies (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999). Following the example of hERG above, and knowing that several studies brought further details into the PIP₂-binding sites on voltage-gated ion channels (Zhang et al., 2003; Oliver et al., 2004; Hernandez et al., 2008; Flynn and Zagotta, 2011; Thomas et al., 2011), we can certainly imagine that other mutations lead to impaired channels-PIP₂ interaction and thus lead to disease.

ACKNOWLEDGMENTS

Fayal Abderemane-Ali and Fabien C. Coyan are recipients of a grant from the French Ministère de la Recherche. Zeineb Es-Salah-Lamoureux is supported by fellowships from the Lefoulon Delalande foundation and the French Foundation for Medical Research (FRM).

REFERENCES

- Adams, P. J., and Snutch, T. P. (2007). Calcium channelopathies: voltage-gated calcium channels. *Subcell. Biochem.* 45, 215–251.
- Alonso-Ron, C., de la Peña, P., Miranda, P., Domínguez, P., and Barros, F. (2008). Thermodynamic and kinetic properties of amino-terminal and S4-S5 loop hERG channel mutants under steady-state conditions. *Biophys. J.* 94, 3893–3911.
- Armstrong, C. M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* 61, 644–683.
- Arnestad, M., Crotti, L., Rognum, T. O., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Wang, D. W., Rhodes, T. E., George, A. L. Jr., Schwartz, P. J. (2007). Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115, 361–367.
- Bähring, R. (2012). Voltage sensor inactivation in potassium channels. *Front. Pharmacol.* 3:100. doi:10.3389/fphar.2012.00100
- 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.
- 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.
- Barros, F., Domínguez, P., and de la Peña, P. (2012). Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front. Pharmacol.* 3:49. doi:10.3389/fphar.2012.00049
- Batulan, Z., Haddad, G. A., and Blunck, R. (2010). An intersubunit interaction between S4–S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in shaker K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 285, 14005–14019.
- Bender, K., Wellner-Kienitz, M.-C., and Pott, L. (2002). Transfection of a phosphatidyl-4-phosphate 5-kinase gene into rat atrial myocytes removes inhibition of GIRK current by endothelin and alpha-adrenergic agonists. *FEBS Lett.* 529, 356–360.
- Berridge, M. J. (1981). Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 24, 115–140.
- Bezanilla, F., Perozo, E., and Stefani, E. (1994). Gating of shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation. *Biophys. J.* 66, 1011–1021.
- Bian, J., Cui, J., and McDonald, T. V. (2001). hERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circ. Res.* 89, 1168–1176.
- Bian, J.-S., Kagan, A., and McDonald, T. V. (2004). Molecular analysis of PIP₂ regulation of hERG and IKr. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2154–H2163.
- Bofill-Cardona, E., Vartian, N., Nanoff, C., Freissmuth, M., and Boehm, S. (2000). Two different signaling mechanisms involved in the excitation of rat sympathetic neurons by uridine nucleotides. *Mol. Pharmacol.* 57, 1165–1172.
- Börjesson, S. I., and Elinder, F. (2008). Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels. *Cell Biochem. Biophys.* 52, 149–174.
- 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. (Lond.)* 585, 325–337.
- Broomand, A., Männikkö, R., Larsson, H. P., and Elinder, F. (2003). Molecular movement of the voltage sensor in a K channel. *J. Gen. Physiol.* 122, 741–748.
- Catterall, W. A. (1986). Voltage-dependent gating of sodium channels: correlating structure and function. *Trends Neurosci.* 9, 7–10.
- Cha, A., Snyder, G. E., Selvin, P. R., and Bezanilla, F. (1999). Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402, 809–813.
- 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.
- 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.
- Chen, J., Zou, A., Splawski, I., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1999). Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of hERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J. Biol. Chem.* 274, 10113–10118.
- 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.
- Cheng, Y. M., and Claydon, T. W. (2012). Voltage-dependent gating of hERG potassium channels. *Front. Pharmacol.* 3:83. doi:10.3389/fphar.2012.00088
- Choveau, F. S., Rodriguez, N., Abderemane-Ali, F., Labro, A. J., Rose, T., Dahimène, S., Boudin, H., Le Hénaff, C., Escande, D., Snyders, D. J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2011). KCNQ1 channels voltage dependence through a voltage-dependent binding of the S4–S5 linker to the pore domain. *J. Biol. Chem.* 286, 707–716.
- Cooper, E. C., Harrington, E., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001). M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J. Neurosci.* 21, 9529–9540.
- Cruzblanca, H., Koh, D. S., and Hille, B. (1998). Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP3-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7151–7156.
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., and Keating, M. T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: hERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795–803.
- de la Peña, P., Alonso-Ron, C., Machín, A., Fernández-Trillo, J., Carretero, L., Domínguez, P., and Barros, F. (2011). Demonstration of physical proximity between the N terminus and the S4–S5 linker of the human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel. *J. Biol. Chem.* 286, 19065–19075.

- Delemotte, L., Tarek, M., Klein, M. L., Amaral, C., and Treptow, W. (2011). Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6109–6114.
- Delmas, P., and Brown, D. A. (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 850–862.
- Delmas, P., Wanaverbecq, N., Abogadie, F. C., Mistry, M., and Brown, D. A. (2002). Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron* 34, 209–220.
- DiFrancesco, D. (1981). A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 314, 359–376.
- DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 455–472.
- DiFrancesco, D., Noma, A., and Trautwein, W. (1979). Kinetics and magnitude of the time-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node: effect of external potassium. *Pflugers Arch.* 381, 271–279.
- Ding, W.-G., Toyoda, F., and Matsuura, H. (2004). Regulation of cardiac IKs potassium current by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 279, 50726–50734.
- Dougherty, K., De Santiago-Castillo, J. A., and Covarrubias, M. (2008). Gating charge immobilization in Kv4.2 channels: the basis of closed-state inactivation. *J. Gen. Physiol.* 131, 257–273.
- Durell, S. R., and Guy, H. R. (1992). Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.* 62, 238–247; discussion 247–250.
- Enkvetchakul, D., Loussouarn, G., Makhina, E., Shyng, S. L., and Nichols, C. G. (2000). The kinetic and physical basis of K(ATP) channel gating: toward a unified molecular understanding. *Biophys. J.* 78, 2334–2348.
- 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-à-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 281, 12858–12864.
- Flynn, G. E., and Zagotta, W. N. (2011). Molecular mechanism underlying phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced inhibition of SpIH channels. *J. Biol. Chem.* 286, 15535–15542.
- Gamper, N., Li, Y., and Shapiro, M. S. (2005). Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K⁺ channels to modulation by Ca²⁺/calmodulin. *Mol. Biol. Cell* 16, 3538–3551.
- Gamper, N., and Shapiro, M. S. (2003). Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 122, 17–31.
- Gamper, N., and Shapiro, M. S. (2007). Regulation of ion transport proteins by membrane phosphoinositides. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 921–934.
- Gandhi, C. S., Clark, E., Loots, E., Pralle, A., and Isacoff, E. Y. (2003). The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain. *Neuron* 40, 515–525.
- Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393, 583–587.
- 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.
- Guy, H. R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 508–512.
- Haddad, G. A., and Blunck, R. (2011). Mode shift of the voltage sensors in shaker K⁺ channels is caused by energetic coupling to the pore domain. *J. Gen. Physiol.* 137, 455–472.
- Hansen, S. B., Tao, X., and MacKinnon, R. (2011). Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature* 477, 495–498.
- Hedley, P. L., Jørgensen, P., Schlamowitz, S., Wangari, R., Moolman-Smook, J., Brink, P. A., Kanters, J. K., Corfield, V. A., and Christiansen, M. (2009). The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum. Mutat.* 30, 1486–1511.
- Hernandez, C. C., Zaika, O., and Shapiro, M. S. (2008). A carboxy-terminal inter-helix linker as the site of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate action on Kv7 (M-type) K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 132, 361–381.
- Hirdes, W., Horowitz, L. F., and Hille, B. (2004). Muscarinic modulation of erg potassium current. *J. Physiol. (Lond.)* 559, 67–84.
- Hoffman, D. A., Magee, J. C., Colbert, C. M., and Johnston, D. (1997). K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387, 869–875.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1994). Shaker potassium channel gating. I: transitions near the open state. *J. Gen. Physiol.* 103, 249–278.
- Hu, L., Shi, J., Ma, Z., Krishnamoorthy, G., Sieling, F., Zhang, G., Horrigan, F. T., and Cui, J. (2003). Participation of the S4 voltage sensor in the Mg²⁺-dependent activation of large conductance (BK) K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10488–10493.
- Huang, C. L., Feng, S., and Hilgemann, D. W. (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 391, 803–806.
- Jensen, M. Ø., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2012). Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* 336, 229–233.
- Jerng, H. H., Pfaffinger, P. J., and Covarrubias, M. (2004). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 343–369.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33–41.
- Jones, S., Brown, D. A., Milligan, G., Willer, E., Buckley, N. J., and Caulfield, M. P. (1995). Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B2 receptors and G alpha q/11. *Neuron* 14, 399–405.
- Kang, C., Tian, C., Sönnichsen, F. D., Smith, J. A., Meiler, J., George, A. L. Jr, Vanoye, C. G., Kim, H. J., and Sanders, C. R. (2008). Structure of KCNE1 and implications for how it modulates the KCNQ1 potassium channel. *Biochemistry* 47, 7999–8006.
- Kapplinger, J. D., Tester, D. J., Salisbury, B. A., Carr, J. L., Harris-Kerr, C., Pollevick, G. D., Wilde, A. A. M., and Ackerman, M. J. (2009). Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 6, 1297–1303.
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., and Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437–446.
- Kwon, Y., Hofmann, T., and Montell, C. (2007). Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol. Cell* 25, 491–503.
- Labro, A. J., Boulet, I. R., Choveau, F. S., Mayeur, E., Bruyns, T., Loussouarn, G., Raes, A. L., and Snyders, D. J. (2011). The S4–S5 linker of KCNQ1 channels forms a structural scaffold with the S6 segment controlling gate closure. *J. Biol. Chem.* 286, 717–725.
- Lai, L.-P., Su, Y.-N., Hsieh, F.-J., Chiang, F.-T., Juang, J.-M., Liu, Y.-B., Ho, Y.-L., Chen, W.-J., Yeh, S.-J., Wang, C.-C., Ko, Y. L., Wu, T. J., Ueng, K. C., Lei, M. H., Tsao, H. M., Chen, S. A., Lin, T. K., Wu, M. H., Lo, H. M., Huang, S. K., and Lin, J. L. (2005). Denaturing high-performance liquid chromatography screening of the long QT syndrome-related cardiac sodium and potassium channel genes and identification of novel mutations and single nucleotide polymorphisms. *J. Hum. Genet.* 50, 490–496.
- Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S., and Isacoff, E. Y. (1996). Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4. *Neuron* 16, 387–397.
- Ledwell, J. L., and Aldrich, R. W. (1999). Mutations in the S4 region isolate the final voltage-dependent cooperative step in potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* 113, 389–414.
- Lee, S.-Y., Banerjee, A., and MacKinnon, R. (2009). Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K(+) channels. *PLoS Biol.* 7, e47. doi:10.1371/journal.pbio.1000047
- Lee, S.-Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005). Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15441–15446.
- Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* 79, 1317–1372.
- Lerche, C., Scherer, C. R., Seeböhm, G., Derst, C., Wei, A. D., Busch, A. E., and Steinmeyer, K. (2000). Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J. Biol. Chem.* 275, 22395–22400.
- Lewis, A., Jogini, V., Blachowicz, L., Lainé, M., and Roux, B. (2008). Atomic constraints between the voltage sensor and the pore domain in a voltage-gated K⁺ channel of

- known structure. *J. Gen. Physiol.* 131, 549–561.
- Li, Y., Gamper, N., Hilgemann, D. W., and Shapiro, M. S. (2005). Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25, 9825–9835.
- Li, Y., Zaydman, M. A., Wu, D., Shi, J., Guan, M., Virgin-Downey, B., and Cui, J. (2011). KCNE1 enhances phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) sensitivity of IKs to modulate channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9095–9100.
- Lindner, M., Leitner, M. G., Halaszovich, C. R., Hammond, G. R. V., and Oliver, D. (2011). Probing the regulation of TASK potassium channels by PI4,5P with switchable phosphoinositide phosphatases. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 3149–3162.
- Logothetis, D. E., Petrou, V. I., Adney, S. K., and Mahajan, R. (2010). Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflugers Arch.* 460, 321–341.
- Long, S. B., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent shaker family K⁺ channel. *Science* 309, 897–903.
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382.
- Lopes, C. M. B., Remon, J. I., Matavel, A., Sui, J. L., Keselman, I., Medei, E., Shen, Y., Rosenhouse-Dantsker, A., Rohacs, T., and Logothetis, D. E. (2007). Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP₂-sensitivity of K⁺ channels. *Channels (Austin)* 1, 124–134.
- Lopes, C. M. B., Zhang, H., Rohacs, T., Jin, T., Yang, J., and Logothetis, D. E. (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* 34, 933–944.
- Loussouarn, G., Park, K.-H., Bellocq, C., Baró, I., Charpentier, F., and Escande, D. (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J.* 22, 5412–5421.
- Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413, 809–813.
- Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 663–676.
- Marx, S. O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A. R., and Kass, R. S. (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 295, 496–499.
- Matavel, A., and Lopes, C. M. B. (2009). PKC activation and PIP₂ depletion underlie biphasic regulation of IKs by Gq-coupled receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 704–712.
- Matavel, A., Medei, E., and Lopes, C. M. B. (2010). PKA and PKC partially rescue long QT type 1 phenotype by restoring channel-PIP₂ interactions. *Channels (Austin)* 4, 3–11.
- McCusker, E. C., D'Avanzo, N., Nichols, C. G., and Wallace, B. A. (2011). Simplified bacterial “pore” channel provides insight into the assembly, stability, and structure of sodium channels. *J. Biol. Chem.* 286, 16386–16391.
- Miceli, F., Vargas, E., Bezanilla, F., and Taglialatela, M. (2012). Gating currents from Kv7 channels carrying neuronal hyperexcitability mutations in the voltage-sensing domain. *Biophys. J.* 102, 1372–1382.
- Milescu, M., Bosmans, F., Lee, S., Alabi, A. A., Kim, J. I., and Swartz, K. J. (2009). Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1080–1085.
- Miller, A. G., and Aldrich, R. W. (1996). Conversion of a delayed rectifier K⁺ channel to a voltage-gated inward rectifier K⁺ channel by three amino acid substitutions. *Neuron* 16, 853–858.
- Moroni, A., Gazzarrini, S., Cerana, R., Colombo, R., Sutter, J. U., DiFrancesco, D., Gradmann, D., and Thiel, G. (2000). Mutation in pore domain uncovers cation- and voltage-sensitive recovery from inactivation in KAT1 channel. *Biophys. J.* 78, 1862–1871.
- Napolitano, C., Priori, S. G., Schwartz, P. J., Bloise, R., Ronchetti, E., Nastoli, J., Bottelli, G., Cerrone, M., and Leonardi, S. (2005). Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 294, 2975–2980.
- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Lebovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Fauré, 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.
- Oliver, D., Lien, C.-C., Soom, M., Baukrowitz, T., Jonas, P., and Fakler, B. (2004). Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science* 304, 265–270.
- Pape, H. C. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 299–327.
- Park, K.-H., Piron, J., Dahimene, S., Mérot, J., Baró, 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.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.
- Pian, P., Bucchi, A., Robinson, R. B., and Siegelbaum, S. A. (2006). Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *J. Gen. Physiol.* 128, 593–604.
- Pietrobon, D. (2007). Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* 4, 274–284.
- 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.
- Restier, L., Cheng, L., and Sanguinetti, M. C. (2008). Mechanisms by which atrial fibrillation-associated mutations in the S1 domain of KCNQ1 slow deactivation of IKs channels. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 4179–4191.
- Roche, J. P., Westenbroek, R., Sorom, A. J., Hille, B., Mackie, K., and Shapiro, M. S. (2002). Antibodies and a cysteine-modifying reagent show correspondence of M current in neurons to KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1173–1186.
- Rodriguez, N., Amarouch, M. Y., Montnach, J., Piron, J., Labro, A. J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2010). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) stabilizes the open pore conformation of the Kv11.1 (hERG) channel. *Biophys. J.* 99, 1110–1118.
- Rohács, T., Lopes, C., Mirshahi, T., Jin, T., Zhang, H., and Logothetis, D. E. (2002). Assaying phosphatidylinositol bisphosphate regulation of potassium channels. *Meth. Enzymol.* 345, 71–92.
- Rosenhouse-Dantsker, A., and Logothetis, D. E. (2007). Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Pflugers Arch.* 455, 45–53.
- Ruta, V., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005). Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell* 123, 463–475.
- 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.
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81, 299–307.
- Sanguinetti, M. C., and Tristani-Firouzi, M. (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 440, 463–469.
- 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. (Lond.)* 514(Pt 3), 667–675.
- Sarria, I., Ling, J., Zhu, M. X., and Gu, J. G. (2011). TRPM8 acute desensitization is mediated by calmodulin and requires PIP₂: distinction from tachyphylaxis. *J. Neurophysiol.* 106, 3056–3066.
- Schmidt, D., Jiang, Q.-X., and MacKinnon, R. (2006). Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* 444, 775–779.
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., and Jentsch, T. J. (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J. Biol. Chem.* 275, 24089–24095.
- Shah, M. M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A., and Delmas, P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 544, 29–37.
- Shapiro, M. S., Roche, J. P., Kaftan, E. J., Cruzblanca, H., Mackie, K., and Hille, B. (2000). Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K(+) channels that underlie the neuronal M-current. *J. Neurosci.* 20, 1710–1721.
- Shaya, D., Kreir, M., Robbins, R. A., Wong, S., Hammon, J., Brüggemann,

- A., and Minor, D. L. Jr. (2011). Voltage-gated sodium channel (NaV) protein dissection creates a set of functional pore-only proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12313–12318.
- Smith, J. A., Vanoye, C. G., George, A. L. Jr., Meiler, J., and Sanders, C. R. (2007). Structural models for the KCNQ1 voltage-gated potassium channel. *Biochemistry* 46, 14141–14152.
- Smith, P. L., Baukrowitz, T., and Yellen, G. (1996). The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 379, 833–836.
- Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., and Bezanilla, F. (1994). Gating of shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66, 996–1010.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2002). Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35, 507–520.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2007). Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides. *J. Physiol. (Lond.)* 582, 911–916.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2008). PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu. Rev. Biophys.* 37, 175–195.
- Suh, B.-C., Inoue, T., Meyer, T., and Hille, B. (2006). Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P₂ gate KCNQ ion channels. *Science* 314, 1454–1457.
- Suh, B.-C., Kim, D.-I., Falkenburger, B. H., and Hille, B. (2012). Membrane-localized β -subunits alter the PIP₂ regulation of high-voltage activated Ca²⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3161–3166.
- Telezkhin, V., Reilly, J. M., Thomas, A. M., Tinker, A., and Brown, D. A. (2012). Structural requirements of membrane phospholipids for M-type potassium channel activation and binding. *J. Biol. Chem.* 287, 10001–10012.
- Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237, 770–775.
- Tester, D. J., Will, M. L., Haglund, C. M., and Ackerman, M. J. (2005). Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2, 507–517.
- Thomas, A. M., Harmer, S. C., Khambra, T., and Tinker, A. (2011). Characterization of a binding site for anionic phospholipids on KCNQ1. *J. Biol. Chem.* 286, 2088–2100.
- 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.
- Tristani-Firouzi, M., Chen, J., and Sanguinetti, M. C. (2002). Interactions between S4–S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 277, 18994–19000.
- Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B., and Robertson, G. A. (1995). HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science* 269, 92–95.
- Wall-Lacelle, S., Hossain, M. I., Sauvé, R., Blunck, R., and Parent, L. (2011). Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)_{2.3} calcium channel. *J. Biol. Chem.* 286, 27197–27205.
- Walsh, K. B., and Kass, R. S. (1988). Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C. *Science* 242, 67–69.
- Wang, J., Trudeau, M. C., Zappia, A. M., and Robertson, G. A. (1998a). Regulation of deactivation by an amino terminal domain in human ether-à-go-go-related gene potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 112, 637–647.
- Wang, W., Xia, J., and Kass, R. S. (1998b). MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled IsK channel. *J. Biol. Chem.* 273, 34069–34074.
- Warmke, J. W., and Ganetzky, B. (1994). A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3438–3442.
- Wen, H., and Levitan, I. B. (2002). Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *J. Neurosci.* 22, 7991–8001.
- Whorton, M. R., and Mackinnon, R. (2011). Crystal structure of the mammalian GIRK2 K(+) channel and gating regulation by G proteins, PIP(2), and sodium. *Cell* 147, 199–208.
- Winks, J. S., Hughes, S., Filippov, A. K., Tatulian, L., Abogadie, F. C., Brown, D. A., and Marsh, S. J. (2005). Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J. Neurosci.* 25, 3400–3413.
- Wu, L., Bauer, C. S., Zhen, X., Xie, C., and Yang, J. (2002). Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P₂. *Nature* 419, 947–952.
- Xu, Y., Ramu, Y., and Lu, Z. (2008). Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature* 451, 826–829.
- Yang, N., and Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* 15, 213–218.
- 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.
- Yarov-Yarovoy, V., DeCaen, P. G., Westenberg, R. E., Pan, C.-Y., Scheuer, T., Baker, D., and Catterall, W. A. (2012). Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E93–E102.
- Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1994a). Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* 103, 321–362.
- Zagotta, W. N., Hoshi, T., Dittman, J., and Aldrich, R. W. (1994b). Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J. Gen. Physiol.* 103, 279–319.
- Zaika, O., Lara, L. S., Gamper, N., Hilgemann, D. W., Jaffe, D. B., and Shapiro, M. S. (2006). Angiotensin II regulates neuronal excitability via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent modulation of Kv7 (M-type) K⁺ channels. *J. Physiol. (Lond.)* 575, 49–67.
- Zaika, O., Tolstyk, G. P., Jaffe, D. B., and Shapiro, M. S. (2007). Inositol triphosphate-mediated Ca²⁺ signals direct purinergic P2Y receptor regulation of neuronal ion channels. *J. Neurosci.* 27, 8914–8926.
- Zaika, O., Zhang, J., and Shapiro, M. S. (2011). Combined phosphoinositide and Ca²⁺ signals mediating receptor specificity toward neuronal Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 286, 830–841.
- Zhang, H., Craciun, L. C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, C. M. B., Jin, T., and Logothetis, D. E. (2003). PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37, 963–975.
- Zhang, X., Chen, X., Jia, C., Geng, X., Du, X., and Zhang, H. (2010). Depolarization increases phosphatidylinositol (PI) 4,5-bisphosphate level and KCNQ currents through PI 4-kinase mechanisms. *J. Biol. Chem.* 285, 9402–9409.
- Zheng, H., Liu, W., Anderson, L. Y., and Jiang, Q.-X. (2011). Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. *Nat. Commun.* 2, 250.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 23 April 2012; accepted: 14 June 2012; published online: 05 July 2012.

Citation: Choveau FS, Abderemane-Ali F, Cayan FC, Es-Salah-Lamoureux Z, Baró I and Loussouarn G (2012) Opposite effects of the S4–S5 linker and PIP₂ on voltage-gated channel function: KCNQ1/KCNE1 and other channels. *Front. Pharmacol.* 3:125. doi: 10.3389/fphar.2012.00125

This article was submitted to *Frontiers in Pharmacology of Ion Channels and Channelopathies*, a specialty of *Frontiers in Pharmacology*.

Copyright © 2012 Choveau, Abderemane-Ali, Cayan, Es-Salah-Lamoureux, Baró and Loussouarn. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

DISCUSSION GENERALE

A- conclusion

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes moléculaires à la base de :

- la régulation des canaux potassiques voltage-dépendants par le PIP_2
- la régulation des canaux potassique (KCNQ1) et sodiques (Nav1.4 et NavSp1) par le potentiel membranaire

Ces études ont contribué à éclaircir un peu plus les mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux ioniques par le PIP_2 d'une part, et par le potentiel membranaire, via la boucle S4-S6 (B4-5) d'autre part. Ces deux mécanismes de régulation ont des effets opposés et semblent avoir des implications physiologiques majeures.

1- Complexité de la régulation de la porte d'activation

- **Effets opposés du PIP_2 et de B4-5 sur les canaux ioniques voltage-dépendants**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, les canaux ioniques voltage-dépendants fonctionnent sous forme d'homotétramère ou de monomère formé de quatre domaines différents. Dans les deux cas, chaque domaine ou sous-unité présente la même architecture, à savoir six segments transmembranaires (S1-S6) avec les segments S1-S4 constituant le domaine voltage-sensor (VSD) et l'association des S5-S6 formant le pore à travers lequel les ions traversent le canal. Grâce à ses nombreux résidus positifs, le segment S4 se déplace au sein de la bicouche lipidique membranaire en fonction des variations du potentiel de part et d'autre de cette membrane. Ces mouvements du S4 à l'origine des changements conformationnels du module VSD contrôlent l'ouverture-fermeture voltage-dépendante de la porte d'activation située au niveau du module pore (PD) du canal.

Des structures cristallographiques de canaux potassiques ou sodiques voltage-dépendants (Jiang et al., 2003; Long et al., 2005a, 2005b; Payandeh et al., 2011a, 2012; Zhang et al., 2012) et de nombreuses études biophysiques et de mutagenèse, ont mis en évidence le rôle important de l'interaction entre B4-5 et la partie C-terminale de S6 (TS6) dans le couplage entre les modules VSD et PD. Plusieurs mécanismes ont été proposés dans ce couplage et la plupart d'entre eux s'accordent à dire que cette interaction entre B4-5 et TS6 stabilise l'état fermé des canaux activés par la dépolarisation (Kv, Nav, Cav) et l'état ouvert des canaux activés par l'hyperpolarisation (HCN, KAT1). Les résultats présentés dans mes projets 2 et 3 de ma thèse démontrent que B4-5 agirait comme un ligand qui se fixerait de

façon voltage-dépendante, à son récepteur TS6 au niveau du pore, pour stabiliser les canaux Kv et Nav à l'état fermé.

Par ailleurs, le phospholipide membranaire phosphatidyl inositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂) régule l'activité de nombreux canaux ioniques voltage-dépendants ou non-voltage-dépendants (Flynn and Zagotta, 2011b; Logothetis et al., 2010a; Rodriguez-Menchaca et al., 2012; Wu et al., 2002). Des études biophysiques sur les canaux Kir à deux domaines transmembranaires et les canaux Kv à six domaines transmembranaire, ont suggéré que ce PIP₂ active ces canaux via une stabilisation de leur état ouvert (Loussouarn et al., 2003; Rodriguez et al., 2010b; Shyng and Nichols, 1998). Les résultats de mon projet 1 de thèse confirment ce rôle activateur du PIP₂ et proposent, grâce à des outils de modélisation, les mécanismes moléculaires impliqués.

Pris ensemble, toutes ces études mettent en évidence deux régulateurs majeurs avec des effets opposés sur plusieurs canaux ioniques voltage-dépendants. D'une part, B4-5 jouant un rôle inhibiteur via son interaction avec TS6 qui stabilise la fermeture du canal, et d'autre part le PIP₂ qui a un rôle activateur via une stabilisation de l'ouverture de la porte d'activation. Des études biophysiques, y compris mon projet 1, ont montré l'implication de résidus positifs de B4-5 dans la régulation des canaux par le PIP₂ (Park et al., 2005; Rodriguez-Menchaca et al., 2012; Zaydman et al., 2013). L'interaction entre ces deux régulateurs à effets opposés reflète la complexité de la régulation des canaux ioniques. Ces mécanismes complexes font intervenir également des sous-unités régulatrices.

- **Rôle des sous-unités auxiliaires dans ces régulations : le cas de KCNE1**

Comme décrit dans l'introduction, KCNE1 est une sous-unité auxiliaire qui s'associe à KCNQ1 dans le cœur pour former le complexe KCNQ1-KCNE1 responsable du courant repolarisant cardiaque I_{Ks}. KCNE1 est d'autant plus importante dans l'activité du canal KCNQ1 que les propriétés biophysiques de ce canal sont modifiées en absence de KCNE1 (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). L'utilisation de la fluorimétrie à potentiel imposé a permis de montrer le rôle de KCNE1 sur le mouvement des segments S4 à la base du couplage entre les modules VSD et PD. En effet, grâce à cette technique permettant de mesurer simultanément le mouvement des S4 et le courant ionique à travers le PD, il a été montré que KCNE1 modifie le couplage entre ces deux modules. En présence de KCNE1, les cinétiques et voltage-dépendances sont différentes entre le mouvement des S4 et l'ouverture du pore, tandis que ces deux mécanismes ont les mêmes cinétiques et la même voltage-dépendance lorsque KCNQ1 est exprimé seul (Osteen et al., 2010). Cette étude suggère que la régulation du courant I_{Ks} par KCNE1 implique un rôle de cette sous-unité

auxiliaire dans le couplage entre le mouvement des S4 et l'ouverture du pore. Toutefois, nous avons été surpris de voir que KCNE1 n'a aucun effet sur la modulation de KCNQ1 par les peptides exogènes. Cela suggère que KCNE1 jouerait un rôle plus en amont, par exemple sur la cinétique du mouvement de S4, comme proposé par Ruscic et al. (2013). Par ailleurs, cette même sous-unité a été montrée comme étant impliquée dans la régulation de KCNQ1 par le PIP₂ (Li et al., 2011). Cette étude a utilisé une approche de mutagenèse consistant à neutraliser individuellement les résidus positifs de l'extrémité C-terminale de KCNE1 et à mesurer la cinétique de la diminution du courant à travers KCNQ1-KCNE1 causée par la réduction du niveau de PIP₂ membranaire. Les résultats de cette étude ont montré que la sous-unité KCNE1 augmente la sensibilité du canal au PIP₂, lequel se fixerait essentiellement sur des résidus positifs de son extrémité C-terminale (Li et al., 2011). Une étude structurale avait suggéré auparavant une proximité entre cette extrémité C-terminale de KCNE1 et la zone d'interface B4-5 – TS6 (Kang et al., 2008) où des sites de fixation du PIP₂ ont déjà été identifiés (Park et al., 2005; Rodriguez-Menchaca et al., 2012). Ces résultats incitent à émettre l'hypothèse d'une coordination des molécules du PIP₂ par des résidus positifs situés sur B4-5, TS6 et la partie C-terminale de KCNE1, au niveau de la zone de couplage entre les modules VSD et PD. Cette hypothèse, méritant d'être vérifiée par une approche cristallographique, expliquerait le rôle majeur de cette sous-unité sur les propriétés biophysiques de KCNQ1.

2- Régulation des canaux ioniques par le PIP₂

- **Dualité des effets du PIP₂**

Deux études précédentes ont montré une dualité des effets du PIP₂ sur les canaux Cav2.1 et HCN (Flynn and Zagotta, 2011a; Wu et al., 2002), mais sans précision du mécanisme. Notre étude de la régulation des canaux potassiques par le PIP₂, en utilisant le canal *Shaker* comme modèle, suggère que cette dualité des effets du PIP₂ fait intervenir deux mécanismes d'action distincts : d'une part, en se fixant du côté intracellulaire du pore, le PIP₂ stabilise le canal à l'état ouvert, ce qui se traduit par une augmentation de l'amplitude du courant (gain de fonction). Un tel effet du PIP₂ a été montré auparavant sur les canaux Kir6.2, KCNQ1 et hERG (Loussouarn et al., 2003; Rodriguez et al., 2010b; Shyng and Nichols, 1998) comme décrit dans l'introduction générale. D'autre part, le PIP₂ se fixe au niveau de B4-5, près du côté intracellulaire des segments voltage-sensor S4 et stabilise ces derniers en position de repos, ce qui rend le canal activable seulement à des potentiels plus dépolarisants. Cette perte-de-fonction est illustrée par les mêmes décalages vers la droite des courbes d'activation du courant ionique et du courant de porte, en présence de ce phospholipide. Ces

deux effets opposés sur le courant ionique (gain et perte de fonction) présentent des cinétiques différentes, ce qui est incompatible avec l'hypothèse émise par Zaydman et al. (2013) selon laquelle le PIP₂ aurait un rôle unique de médiateur du couplage entre le mouvement du S4 et l'ouverture de la porte d'activation. De façon intéressante, une étude publiée deux semaines avant la notre, a aussi montré une dualité des effets du PIP₂ sur le canal potassique neuronal Kv1.2, homologue de *Shaker* chez les mammifères (Rodriguez-Menchaca et al., 2012).

- **Sites de fixation du PIP₂ sur le canal**

Grâce à une approche de modélisation par dynamique moléculaire, nous avons simulé les états fermé et ouvert du canal Kv1.2 en présence de molécules de PIP₂. Ces simulations nous ont permis de suggérer deux régions du canal dont des résidus positifs sont susceptibles d'interagir de façon électrostatique avec les charges négatives du PIP₂. Il s'agit de B4-5 (résidus K312, R326 et K322) et TS6 (résidu R419). Une interaction du PIP₂ avec des résidus positifs de ces régions a déjà été montrée auparavant sur le canal potassique cardiaque KCNQ1, et ce grâce à une approche de mutagenèse associée à des études fonctionnelles (Loussouarn et al., 2003; Park et al., 2005). Notre modèle moléculaire suggérant deux sites de fixation du PIP₂ sur le canal (B4-5 et TS6) est cohérent avec la dualité des effets fonctionnels, à savoir gain et perte de fonction, de ce phospholipide sur le canal *Shaker* (notre étude) et Kv1.2 (Rodriguez-Menchaca et al., 2012).

De façon intéressante, le laboratoire de Logothetis à l'origine de cette autre étude sur Kv1.2, a démontré que ces effets opposés du PIP₂ sur le canal (gain-de-fonction sur l'amplitude du courant et perte-de-fonction sur la voltage-dépendance de l'activation) ont des différences de cinétiques et de sensibilité. Grâce à des approches de « Docking » et de mutagenèse dirigée, ils ont suggéré que l'interaction du PIP₂ sur le canal fait intervenir des résidus positifs de B4-5 (K322 et R326) et de l'extrémité N-terminale (R147) du canal, et non TS6. Cette étude confirme l'implication de deux résidus positifs B4-5 dans cette interaction PIP₂-canal, comme le prédit notre modèle moléculaire, mais pas du résidu R419 de TS6. Cependant la concentration d'anticorps anti-PIP₂ utilisée dans cette étude ne permet pas de réduire de façon considérable la quantité de PIP₂ membranaire, suggérant que l'effet de la mutation sur la sensibilité du canal au PIP₂ n'a peut être pas été détecté. Par conséquent, il serait intéressant de réétudier le rôle de ce résidu mais en utilisant une approche alternative comme la Ci-VSP ou la polylysine, pour diminuer de façon drastique le PIP₂. De plus, de nombreux autres résidus positifs de la partie C-terminale du canal peuvent interagir avec le PIP₂ et mériteraient d'être testés. Pour ce faire, une approche de mutagenèse systématique

associée à une étude fonctionnelle sera nécessaire, étant donné que la structure cristallographique de cette région n'est pas connue dans aucun Kv, ce qui empêche de sélectionner des résidus candidats en fonction de leur proximité avec la membrane.

En cohérence avec l'hypothèse de Zaydman et al. (2013) citée ci-dessus, D. Logothetis et son équipe proposent que les effets du PIP_2 sur l'amplitude du courant sont liés à un renforcement du couplage entre les modules VSD et PD via l'interaction entre PIP_2 et B4-5 (Rodriguez-Menchaca et al., 2012). Mais encore une fois, ce modèle de renforcement du couplage n'est pas compatible avec les différentes cinétiques des deux effets du PIP_2 sur le canal, à savoir le gain de fonction sur l'amplitude du courant et la perte de fonction sur la voltage-dépendance de l'activation. Ces observations semblent plutôt suggérer deux sites de fixation du PIP_2 , un sur le VSD, un sur le PD. L'étude de D. Logothetis a montré que le diC8- PIP_2 , un PIP_2 à chaîne courte, a les mêmes effets que le PIP_2 sur la voltage-dépendance du canal, mais reste sans effet sur l'amplitude du courant. Ces résultats confirment la présence de deux sites de fixation, l'un associé à l'amplitude et insensible au diC8- PIP_2 (PD), l'autre associé à la voltage-dépendance et sensible au diC8- PIP_2 (VSD). On peut facilement émettre l'hypothèse selon laquelle le site de fixation du PIP_2 associé aux effets sur l'amplitude du courant, est suffisamment éloigné de la membrane pour que le groupement phosphate du diC8- PIP_2 ne puisse pas l'atteindre.

En somme, la dualité des effets du PIP_2 sur les paramètres du courant ionique (amplitude et voltage-dépendance) d'une part, et les effets distincts du diC8- PIP_2 sur ces mêmes paramètres d'autre part, sont cohérents avec notre modèle de deux sites distincts de fixation du PIP_2 .

Enfin, l'implication de l'extrémité N-terminale dans l'interaction PIP_2 -canal n'est pas complètement surprenante car cette région a déjà été montrée comme étant impliquée dans le couplage entre les modules VSD et PD. En effet, une étude récente sur hERG a démontré une proximité entre cette extrémité N-terminale et B4-5. Des cystéines introduites dans ces deux régions sont capables de former un pont disulfure stabilisant le canal à l'état fermé (de la Peña et al., 2011). De plus, cette extrémité N-terminale interagit avec le côté intracellulaire du pore, très proche de B4-5, pour induire l'inactivation rapide (type N) des canaux ioniques de la famille *Shaker* (Hoshi et al., 1991). Ainsi, étant donné le rôle de B4-5 dans la voltage-dépendance des canaux ioniques, il est facile de comprendre que la fixation du PIP_2 dans cette région aura un impact sur l'interaction entre cette extrémité N-terminale et B4-5, ce qui conduirait à un effet de ce phospholipide sur la voltage-dépendance du canal. Toutefois, une telle proximité entre l'extrémité N-terminale et B4-5 n'a pas encore été démontrée sur les canaux de la sous-famille *Shaker* (Kv1.X).

3- Régulation des canaux ioniques par le potentiel membranaire : de la biophysique à la thérapeutique ?

- **Elaboration de peptides modulateurs spécifiques des canaux KCNQ1 et Nav1.4**

Nos études sur les mécanismes de régulation des canaux ioniques KCNQ1 et Nav1.4 par le potentiel membranaire, nous ont permis d'établir un nouveau modèle de couplage entre les modules VSD et PD. Selon ce modèle, B4-5 joue le rôle de ligand qui, au potentiel de repos, se fixe sur son récepteur TS6 pour stabiliser le canal à l'état fermé. Lorsque la membrane est dépolarisée, le S4 se déplace vers le côté extracellulaire et tire sur B4-5, permettant ainsi l'ouverture du canal. Ce modèle a été mis en évidence grâce à l'utilisation de minigènes codant pour des peptides B4-5 ou TS6, lesquels modulent l'activité du canal étudié. Ainsi, au-delà de l'amélioration des connaissances sur les mécanismes de voltage-dépendance des canaux ioniques, nos études ont permis d'élaborer des peptides modulateurs spécifiques des canaux KCNQ1 et Nav1.4. De façon intéressante, les peptides modulateurs de KCNQ1 n'ont aucun effet sur un autre canal potassique cardiaque à six domaines transmembranaire, hERG, ce qui suggère une certaine spécificité de ces peptides vis-à-vis de KCNQ1. Cette spécificité a été confirmée par une approche de mutagenèse grâce à laquelle nous avons montré que des mutations ponctuelles sur B4-5 ou TS6 du canal annulent les effets des peptides, tandis que l'introduction de mutations complémentaires sur les peptides exogènes restaure les effets de modulation sur les canaux mutants. Par ailleurs, notre étude sur KCNQ1 montre que les effets activateurs et inhibiteurs de ces peptides sont réversibles. Il sera donc intéressant d'évaluer, *in-vivo*, cette réversibilité et la spécificité des effets de ces peptides vis-à-vis du canal ciblé.

- **Enjeux du modèle « ligand-récepteur »**

Le modèle « ligand-récepteur » à l'origine de l'élaboration des peptides modulateurs de canaux ioniques KCNQ1 et Nav1.4 présente des enjeux à la fois sur le plan fondamental et sur le plan thérapeutique.

Enjeu fondamental

Au vu des similarités structurales entre les canaux Kv, Nav et Cav, les résultats obtenus sur les canaux potassiques KCNQ1 et sodiques Nav1.4 et NavSp1, suggèrent que le modèle « ligand-récepteur » est généralisable à de nombreux canaux ioniques voltage-dépendants si ce n'est tous. Bien que cette généralisation nécessite des études supplémentaires, il est

intéressant de mentionner l'impact que pourrait avoir un tel modèle sur la compréhension de la dépendance au potentiel des canaux ioniques en général. De plus, il est possible d'établir, pour les canaux régis par ce modèle, des peptides activateurs et inhibiteurs spécifiques. Ces peptides pourraient être des outils puissants pour étudier la pharmacologie des canaux ioniques au lieu d'utiliser des agents pharmacologiques plus ou moins spécifiques.

Enjeu thérapeutique

De nombreuses canalopathies cardiaques et neurologiques sont associés à une perturbation de l'interaction entre B4-5 et TS6. Par exemple, plusieurs mutations sur KCNQ1 associées au syndrome du QT-long de type 1 (LQT1) sont regroupées sur un côté de l'hélice de B4-5, partie interagissant avec TS6 (Boulet et al., 2007; Labro et al., 2011), et de nombreuses autres mutations liées au LQT1 sont elles, localisées au niveau de TS6 (<http://www.fsm.it/cardmoc/>), ce qui conforte l'opinion selon laquelle l'interaction entre B4-5 et TS6 est nécessaire à un rythme cardiaque normal.

Un autre exemple est la mutation gain-de-fonction S140G de KCNQ1, impliquée dans la fibrillation auriculaire (Chen et al., 2003). Signalons que cette mutation située sur le segment S1 reflète le rôle important que peut jouer les autres segments du VSD, en plus du S4, sur l'activité du canal. La caractérisation fonctionnelle de cette mutation a montré un ralentissement drastique de la désactivation, rendant le canal KCNQ1 mutant toujours ouvert et presque voltage-indépendant à des potentiels membranaires entre -80 et +80 mV (Restier et al., 2008). De façon intéressante, nous avons montré que les peptides « inhibiteurs » B4-5 inhibent ce mutant tandis que les peptides « activateurs » TS6 n'y induisent aucun effet (Figure 6 de l'article 2). Ces résultats suggèrent que l'interaction entre B4-5 et TS6 est fortement diminuée dans cette pathologie, probablement du fait que B4-5 endogène n'arrive pas à atteindre sa cible (TS6) sur le canal muté.

Une autre mutation de KCNQ1, R555C, impliquée dans le syndrome du QT-long se trouve sur la région C-terminale proche de TS6 (Donger et al., 1997). La présence de cette mutation entraîne une perte de fonction du canal qui se traduit par une diminution de l'amplitude du courant et un décalage de la voltage-dépendance de l'activation vers des potentiels plus positifs (Chouabe et al., 1997). De façon intéressante, des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe montrent qu'un peptide « activateur » TS6 est capable de restaurer l'activité de ce mutant via des effets gain-de-fonction à la fois sur l'amplitude du courant et sur la voltage-dépendance de l'activation (Figure 35).

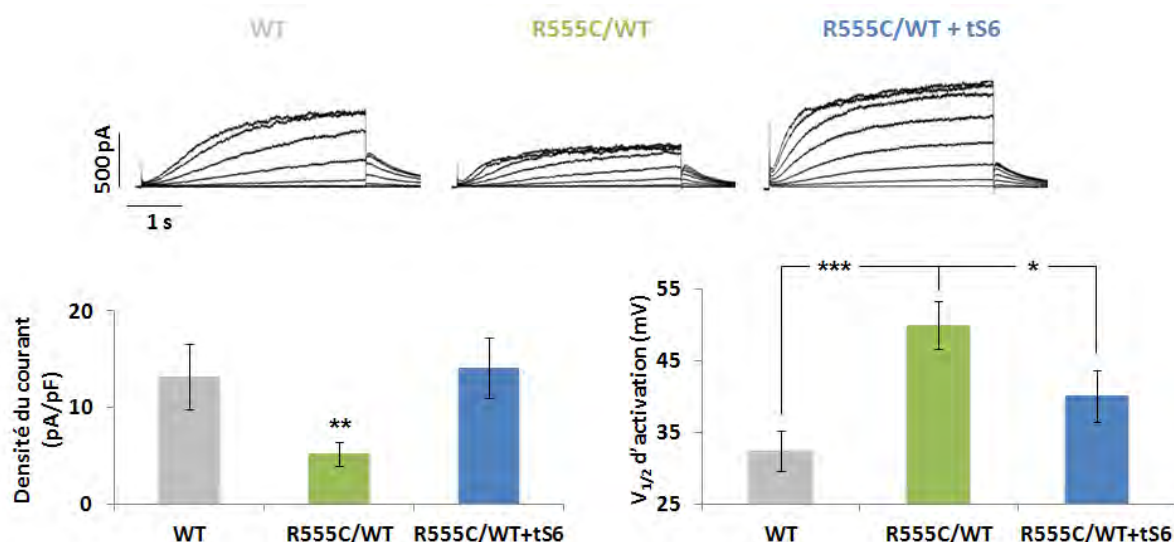


Figure 35 : Modulation du mutant R555C par un peptide activateur TS6.

(A) Traces représentatives du courant potassique à travers le canal KCNQ1 WT (gauche), KCNQ1 mutant R555C (centre) ou KCNQ1 mutant R555C en présence d'un peptide TS6 (droite). **(B)** Moyennes de la densité du courant (gauche) et du potentiel de demi-activation (droite) pour les trois conditions. * p < 0,05. ** p < 0,01. *** p < 0,001.

Enfin, il a été récemment montré que des mutations des régions B4-5 et TS6 du domaine II du canal calcique voltage-dépendant $Ca_v2.3$ provoquent un gain de fonction et que ces deux régions sont énergétiquement couplées, ce qui est cohérent avec l'interaction B4-5/TS6 stabilisant l'état fermé de la porte d'activation (Wall-Lacelle et al., 2011). Puisque les canaux Cav sont impliqués dans plusieurs pathologies telles que l'ataxie épisodique, les migraines hémiplegiques familiales et les épilepsies idiopathiques généralisées (Adams and Snutch, 2007), on pourrait facilement imaginer qu'une altération de l'interaction entre B4-5 et TS6 dans ces canaux pourrait aussi être à la base de certaines pathologies, sachant que des mutations dans ces régions ont déjà été retrouvées chez des patients (Adams and Snutch, 2007; Pietrobon, 2007). Ainsi, il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure des peptides B4-5 et TS6 élaborés pour ces canaux, seraient capables de restaurer *in-vitro*, l'activité des canaux mutants.

Plusieurs molécules sont actuellement utilisées en thérapie contre les canalopathies en général. Citons par exemple le méxiletine qui est un anti-arythmique de classe I et qui aurait un effet inhibiteur sur le canal sodique musculaire (Mohammadi et al, 2005). Il est très utilisé contre des pathologies causées par des mutations gain-de-fonction du canal Nav1.4. D'autres molécules, comme le dichlorophénamide ou encore l'acétazolamide, deux inhibiteurs des anhydrases carboniques, sont également utilisées contre différentes formes de paralysie périodique. Leur efficacité a été prouvée (Tawil et al, 2000), cependant leur mécanisme d'action est très mal connu (Cleland et al, 2008). Une des principales limites de

ces traitements est leur faible spécificité au canal ciblé. En effet, ces moléculaires auraient des effets sur des cibles exprimées de façon ubiquitaire, ce qui entraîne les effets secondaires et indésirables associés.

L'efficacité des peptides modulateurs B4-5 et TS6 sur les canaux étudiés (KCNQ1, Nav1.4 et NavSp1) constitue un élément prometteur sur l'utilisation potentielle de ces peptides dans certaines formes de canalopathie, d'autant plus que l'étude menée sur KCNQ1 a démontré une spécificité de ces peptides sur le canal ciblé. Cependant, l'efficacité et la spécificité de ces peptides modulateurs de KCNQ1 et Nav1.4 restent à étudier *in-vivo* en utilisant des modèles animaux du syndrome du QT-long ou de la paralysie périodique hypo-kaliémique, deux pathologies respectivement liées à des mutations des gènes codant pour ces canaux. Enfin, si le modèle « ligand récepteur » s'applique à tous les canaux ioniques voltage-dépendants, il sera possible d'élaborer des peptides thérapeutiques contre de nombreuses canalopathies. Mais l'utilisation à long terme, de ces peptides comme agents thérapeutiques, nécessite une étape d'amélioration de leur efficacité, étape faisant appel à une meilleure connaissance des bases moléculaires et structurales de l'interaction peptides-canal.

B- Perspectives

1- Rôle physiologique de l'interaction PIP₂-canaux ioniques

Le PIP₂ régule de nombreux canaux ioniques ayant des rôles physiologiques très importants (Logothetis et al., 2010a). Pour certains de ces canaux, comme KCNQ1-KCNE1, des mutations à l'origine d'une pathologie diminuent l'affinité du canal pour le PIP₂, suggérant une implication physiopathologique de ce phospholipide (Li et al., 2011; Park et al., 2005). Etant donné que certains de ces canaux sensibles au PIP₂ ont des fonctions physiologiques différentes (exemple dépolarisation et repolarisation) et peuvent être exprimés dans les mêmes cellules, on peut imaginer qu'un rôle physiologique du PIP₂ passerait par une modulation différentielle de ces canaux ioniques. Et dans ce cas, il y a deux hypothèses pouvant expliquer une telle régulation différentielle : soit la sensibilité au PIP₂ est différente d'un canal à l'autre, soit les concentrations de PIP₂ sont différentes d'une région à l'autre de la membrane de façon à réguler différemment les différents types de canaux ioniques réunis en différents clusters au niveau membranaire (Jacobson et al., 2007; Zilly et al., 2011). Ainsi, il serait intéressant de vérifier laquelle de ces deux hypothèses permet d'expliquer comment le PIP₂ peut réguler spécifiquement et efficacement des fonctions physiologiques. Pour ce faire, il conviendrait de réaliser des courbes dose-réponse de l'effet du PIP₂ sur différents canaux naturellement exprimés sur les mêmes cellules, pour étudier la première hypothèse.

D'autre part, une étude a évalué la diffusion latérale de différents phosphoinositides associés à une sonde fluorescente, en les introduisant dans une fine région de la membrane d'une myocyte cardiaque grâce à une pipette de patch (Cho et al., 2005). Cette étude a montré que, contrairement au phosphatidyl inositol 4-monophosphate et au phosphatidyl inositol qui, tous les deux, diffusent rapidement le long de la membrane, le PIP_2 est confiné dans la portion membranaire sous la pointe de la pipette de patch. Ce confinement membranaire du PIP_2 a été interrompu après traitement des cellules avec la cytochalasine D, une toxine altérant spécifiquement la polymérisation de l'actine et l'organisation des filaments d'actines, principaux composant du cytosquelette (Wakatsuki et al., 2001). Ce résultat suggère que le cytosquelette est responsable de la faible diffusion du PIP_2 le long de la membrane plasmique (Cho et al., 2005). Une telle faible diffusion du PIP_2 est indispensable pour une sous-régionalisation du PIP_2 dans la membrane. Ainsi, cette étude est cohérente avec l'hypothèse selon laquelle la régulation différentielle des canaux ioniques par le PIP_2 se ferait via une répartition non-homogène de ce PIP_2 le long de la membrane de façon à avoir une régulation différentielle des différents clusters de canaux ioniques. Reste donc à vérifier cette hypothèse en évaluant l'impact de cette diffusion sur l'activité de différents canaux endogènes exprimés sur des tissus natifs. Pour les lecteurs intéressés, les mécanismes de régionalisation du PIP_2 membranaire ont déjà été discutés auparavant dans une revue d'articles (Hilgemann, 2007).

Une autre question qui se pose sur la pertinence physiologique de notre étude est la dualité des effets du PIP_2 sur l'activité des canaux ioniques de la famille *Shaker* (Kv1.X) exprimés principalement dans le système nerveux central et ayant des rôles physiologiques et pathologiques majeurs (Brew et al., 2007; Wang et al., 1993). En d'autres termes, il serait intéressant d'évaluer d'un point de vue physiologique, lequel des deux effets opposés (gain et perte de fonction) est prédominant. Pour ce faire, il conviendrait d'étudier si une diminution du PIP_2 d'ordre physiologique dans des cellules neuronales conduit à une augmentation du courant potassique via un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus négatifs, ou à une diminution de ce courant via une déstabilisation de l'état ouvert du pore. Mais au-delà des mécanismes de régulation des canaux ioniques par le PIP_2 , c'est la sensibilité même de ces canaux à des variations physiologiques du PIP_2 qui est importante d'éclaircir. Une étude récente s'est intéressée aux effets d'une diminution du PIP_2 sur des canaux *Shaker* exprimés chez l'homme (Kv1.1 , Kv1.3 , Kv1.4 , et Kv1.5), en utilisant des enzymes provoquant une diminution du PIP_2 dans un intervalle physiologique, telles qu'une phospholipase couplé à un récepteur via une protéine G, une phosphatase voltage-dépendante ou encore une phosphatase dont l'export à la membrane est inductible par ajout de rapamycine. Les résultats de cette étude montrent qu'une diminution physiologique du

PIP₂ n'a aucun effet sur l'activité de ces canaux (Kruse et al., 2012). Cependant, il est important de noter que ces résultats ont été obtenus sur des systèmes de réexpression (cellules tsA-201) qui peuvent ne pas contenir l'environnement cytosolique approprié pour que ces canaux détectent des faibles variations du PIP₂. Par conséquent, il serait de faire une étude similaire en utilisant des cellules exprimant naturellement les canaux d'intérêt (comme les neurones) afin d'établir ou non l'impact physiologique de la régulation des canaux ioniques par le PIP₂.

2- Controverses sur la nature de l'interaction entre B4-5 et TS6

Comme décrit dans l'introduction générale, différents modèles d'interaction entre B4-5 et TS6 ont été proposés comme étant à la base de la voltage-dépendance des canaux ioniques :

1. le modèle de « levier mécanique » selon lequel l'interaction entre B4-5 et TS6 est permanente, non-spécifique et fait intervenir une action mécanique de S4 jouant le rôle de levier permettant l'ouverture-fermeture du pore via B4-5.
2. le modèle d'interaction labile selon lequel l'interaction entre B4-5 et TS6 est spécifique et non-permanente. Cette interaction stabilise un état bien précis du canal (ouvert ou fermé).
3. le modèle consensuel selon lequel B4-5 et TS6 interagissent en permanence mais que cette interaction fait intervenir des résidus bien précis et différents en fonction de l'état du canal.

A ces modèles s'ajoute celui que nous avons établi sur les canaux potassiques KCNQ1 et sodiques Nav1.4 et NavSp1 :

- le modèle « ligand récepteur » selon lequel B4-5 jouerait le rôle d'un ligand qui se fixerait sur TS6 (son récepteur) pour stabiliser le canal à un état bien précis. Ce modèle exclut une action purement mécanique de S4 sur B4-5, et inclut à la fois les notions de spécificité et d'affinité entre B4-5 et TS6. Ainsi, ce modèle « ligand récepteur » est parfaitement cohérent avec le modèle 2 mais ne permet pas d'exclure le modèle 3. En effet, l'utilisation des minigènes codant pour B4-5 de KCNQ1 n'a pu être mise en évidence que l'aspect inhibiteur sous l'hyperpolarisation et pas l'éventuel aspect activateur sous la dépolarisation. De façon intéressante, les expériences menées sur NavSp1 montrent un peptide B4-5 inhibiteur et un autre potentiellement activateur (voir résultats projet 3). Ces résultats suggèrent un double effet de B4-5, cohérent avec le modèle 3. Cette hypothèse spéculative nécessite d'être confirmée ou infirmée par des études supplémentaires plus approfondies.

La proposition de tous ces modèles supportés par de nombreuses études structurales et/ou fonctionnelles, reflètent la forte controverse qui existe sur la nature de l'interaction entre B4-5 et TS6. Etant donné que ces modèles ont été établis sur des canaux différents, il est possible qu'ils soient tous vrais et que les mécanismes de voltage-dépendance soient différents d'un canal à l'autre. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, de nombreuses expériences seront nécessaires, et en voici quelques exemples :

- Afin de vérifier le rôle de levier mécanique des S4, on pourrait construire deux plasmides, l'un codant uniquement pour le module VSD avec B4-5 et l'autre pour le module PD sans B4-5. Il conviendrait ensuite de faire exprimer ces deux plasmides dans un système de réexpression et mener des études fonctionnelles en utilisant la technique de patch clamp. Cette démarche présente le risque que les deux parties tronquées du canal ne se rassemblent jamais. En revanche, si malgré le fait que ces deux modules soient exprimés indépendamment, le canal possède une activité voltage-dépendante, cela signifiera que ces deux parties peuvent s'associer et que le squelette polypeptidique n'est pas indispensable au couplage électromécanique entre les deux modules VSD et PD. Et dans ce cas, le modèle de « levier mécanique » serait invalidé.
- Une récente étude a montré que la fusion entre le VSD de Ci-VSP et le canal potassique viral voltage-indépendant Kcv permet de former un canal potassique chimérique voltage-dépendant regroupant les caractéristiques de ses composantes, à savoir les propriétés de sélectivité et d'ouverture-fermeture de Kcv d'une part, et la voltage-dépendance de Ci-VSP de l'autre (Arrigoni et al., 2013). Ces résultats suggèrent que le couplage entre les modules VSD et PD ne requiert pas nécessairement une spécificité. Cependant, d'autres études ont au contraire, montré que la coopération entre ces modules nécessite des séquences d'acides aminés bien spécifiques dans ces deux régions. En effet, il a été montré que l'association du VSD *Shaker* avec le PD de KcsA, forme une protéine chimérique non-fonctionnelle malgré son expression et son trafic à la membrane plasmique (Caprini et al., 2001). Cette chimère devient fonctionnelle uniquement lorsque la partie C-terminale du PD de KcsA est remplacée par celle de *Shaker*, suggérant la nécessité d'une compatibilité entre le VSD et une région du PD (Lu et al., 2001). La notion de spécificité des résidus de B4-5 et TS6 impliqués dans l'interaction entre les modules VSD et PD a également été démontrée par de nombreuses études fonctionnelles décrites dans l'introduction générale. Donc, il serait intéressant de vérifier cette notion de spécificité dans la chimère Ci-VSP – Kcv. Pour ce faire, il conviendrait d'étudier les effets fonctionnels de mutations ponctuelles des résidus susceptibles d'être impliqués dans

l'interaction entre B4-5 et TS6 de cette chimère. Si aucune spécificité n'est requise dans l'interaction entre B4-5 et TS6 dans cette chimère, ces mutations ponctuelles n'auront aucun effet sur les paramètres biophysiques du canal.

- Enfin, il serait intéressant d'étudier le modèle « ligand récepteur » sur des canaux tels que Kv1.2 et hERG pour lesquels d'autres modèles de couplage (« levier mécanique » et consensuel, respectivement) ont été proposés. Cela permettra de vérifier si les modèles d'interaction entre B4-5 et TS6 sont bien différents d'un canal à l'autre.

En plus des études fonctionnelles et biophysiques, des approches de biologie structurale et bioinformatiques seront nécessaires pour préciser les bases structurales du couplage entre les modules VSD et PD. Ces approches structurales permettront peut-être d'apporter des réponses définitives sur les mécanismes de voltage-dépendance des canaux ioniques.

3- Importance des approches structurales

Les approches structurales réunissent des approches expérimentales et de modélisation. Ensembles, ces approches permettent de mieux comprendre les bases structurales des macromolécules en général. De telles approches sont utilisées pour déterminer les mécanismes moléculaires à la base du fonctionnement des canaux ioniques, et plus particulièrement les mécanismes de couplage électromécanique entre les modules VSD et PD. L'intérêt que je porte à ces nouveaux outils très puissants m'a amené à passer ma dernière année de thèse au « Cardiovascular Research Institute » à l'Université de Californie, San Francisco (UCSF), dans le laboratoire du Professeur Daniel L. Minor spécialisé en Biologie structurale des canaux ioniques.

➤ Approches expérimentales

Cristallographie

La cristallographie est l'une des techniques de biologie structurale les plus utilisées pour étudier la structure des canaux ioniques. L'importance de cette technique a été reconnue entre autres, par l'attribution du prix Nobel de Chimie en 2003 au Pr Roderick Mackinnon pour la détermination de la première structure cristallographique d'un canal ionique en entier (Doyle et al., 1998). L'étude cristallographique d'une protéine en général, consiste à faire exprimer cette protéine en très grande quantité, à la purifier et à la laisser cristalliser dans des conditions physico-chimiques très particulières. Les cristaux de protéines sont ensuite diffractés aux rayons-X pour obtenir un profil de diffraction à partir duquel une étape de

phasage permet de déterminer sa carte de densité électronique. Cette dernière permet d'inférer la position et l'orientation spatiales des atomes.

Les structures cristallographiques de nombreux canaux ioniques (sauvages ou mutants) ont été déterminées (Cuello et al., 2010; Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2002a; Long et al., 2005a; McCusker et al., 2012; Payandeh et al., 2011a, 2012; Zhang et al., 2012). Ces données structurales ont apporté des informations capitales sur les mécanismes d'activation et de désactivation de ces protéines, ainsi que sur les processus de conduction et de sélectivité des ions à travers le module PD. Du fait de la difficulté des canaux eucaryotes à être exprimés en grande quantité et à cristalliser, la plupart des structures canalaires déterminées à ce jour sont issues de canaux procaryotes. La première structure cristallographique d'un canal ionique voltage-dépendant a été obtenue sur le canal potassique bactérien KvAP naturellement exprimé par *Aeropyrum pernix* (Jiang et al., 2003). Cette structure a été à l'origine d'une meilleure compréhension des mécanismes de fonctionnement des modules VSD et PD ainsi que du couplage entre ces deux modules. Cette première photographie atomique d'un Kv a par exemple été à l'origine du modèle de « voltage-sensor paddle » proposé comme étant à la base des changements conformationnels du VSD. Deux années plus tard, la première et seule structure d'un canal voltage-dépendant mammifère a été déterminée sur le canal potassique neuronal Kv1.2 à l'état ouvert (Long et al., 2005a). Cette structure a apporté des informations sur les mécanismes de fonctionnement du couplage électromécanique entre les modules VSD et PD ainsi que sur le fonctionnement même de ces modules. Cette étude structurale a été par exemple à l'origine du modèle de « levier mécanique » qui a été suggéré comme étant à la base du couplage entre B4-5 et TS6 dans les canaux Kv de la famille *Shaker*.

La comparaison de ces deux structures de Kv a permis de montrer que les segments S4 sur la structure de KvAP étaient à l'état de repos alors qu'au contraire, le pore du canal est à l'état ouvert. Ce résultat suggère que cette structure de KvAP avec des S4 à l'état de repos représente une conformation non-native et que par conséquent, son interprétation doit être faite avec beaucoup de précaution.

En 2011, la première structure cristallographique d'un canal sodique voltage-dépendant a été déterminée (Payandeh et al., 2011a). Cette structure du canal sodique NavAb, naturellement exprimé par la bactérie *Acrobacter butzleri*, montre un module PD fermé et quatre VSDs activés (Figure 35). Cette structure est parfaitement cohérente avec notre modèle « ligand récepteur » dans la mesure où il y a un découplage mécanique entre l'activation des S4 et l'ouverture du pore. Cependant, du fait de la position activée des segments S4, cette structure ne permet pas de mieux comprendre les bases de l'interaction entre B4-5 et TS6.

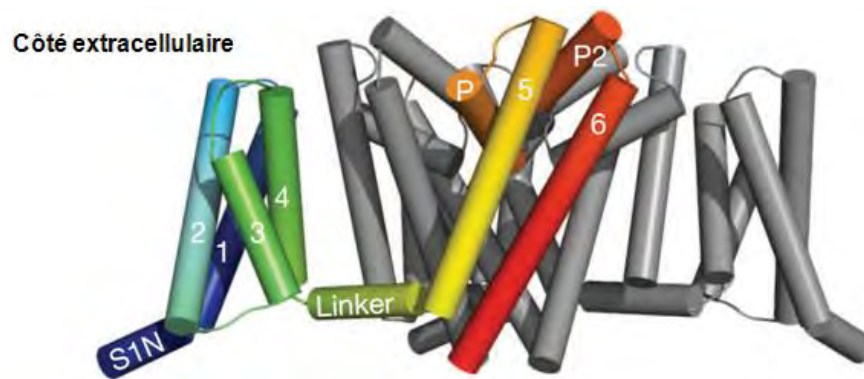


Figure 36 : Structure du canal sodique NavAb avec le pore fermé et les VSDs activés.

Pour plus de clarté, seule une sous-unité sur les quatre est mise en premier plan et le VSD voisin à cette sous-unité a été supprimé. Sur cette structure, on peut voir l'orientation des segments transmembranaires (S1 à S6) ainsi que les boucles intra et extracellulaires qui les relient. D'après (Payandeh et al., 2011a).

Une étude récente vient de déterminer les structures cristallographiques de deux états différents d'un canal sodique voltage-dépendant procaryote, naturellement exprimé par *Caldalkalibacillus thermarum* (Tsai et al., accepté dans J. Mol. Biol.). Ces nouvelles données structurales montrent que contrairement à la structure du canal à l'état fermé, celle reflétant l'état ouvert montre un B4-5 avec une densité électronique beaucoup moins nette. Ces résultats suggèrent une certaine instabilité de B4-5 lorsque le canal est à l'état ouvert. Cette étude est donc cohérente avec le modèle de « ligand récepteur » suggérant qu'à l'état ouvert, B4-5 est libre et ne se fixe pas à TS6. Mais du fait de la faible résolution (9 Å) de ces structures, leurs interprétations restent tout de même spéculatives. De nouvelles structures à haute résolution seront nécessaires pour répondre aux interrogations sur les bases de l'interaction entre B4-5 et TS6.

Ainsi, il serait intéressant de déterminer des nouvelles structures cristallographiques de canaux avec des S4 en position de repos. Pour cela, il conviendrait d'introduire des cystéines dans les régions B4-5 et TS6 et de faire cristalliser la protéine mutant en conditions oxydantes permettant de créer un pont disulfure entre les cystéines introduites. Cette approche permettrait de forcer l'interaction entre B4-5 et TS6. Une autre approche consisterait à introduire des résidus Histidine et des cystéines dans ces régions B4-5 et TS6 et ensuite faire cristalliser les protéines en présence d'ions cadmium (Cd^{2+}) ou argent (Ag^{2+}) permettant de former des ponts métalliques entre ces deux régions. Ces deux approches permettraient peut-être d'obtenir pour la première fois des cristaux de protéines avec les S4 en position de repos. La détermination de la structure du canal à partir de tels cristaux apporterait des informations précises sur les bases structurales de l'interaction entre B4-5 et TS6. De telles données pourraient peut-être, être transposées à d'autres canaux, afin

d'améliorer l'efficacité des peptides modulateurs que nous avons développés pour les canaux KCNQ1, Nav1.4 et NavSp1. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue l'importance de valider par des études fonctionnelles, toutes les hypothèses issues de données structurales en général.

Autres approches expérimentales

D'autres techniques de biologie structurale sont utilisées pour caractériser la structure des canaux ioniques ou la dynamique de leurs interactions. Citons par exemple les techniques de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), dichroïsme circulaire ou encore la résonance électronique paramagnétique. Toutes ces techniques permettent d'obtenir des données structurales sur toute ou partie de la protéine en solution.

A titre d'exemple, une étude récente a utilisé la technique de RMN pour déterminer la structure d'un peptide B4-5 du canal potassique hERG (Ng et al., 2012). A partir de ces données structurales, les auteurs de cette étude ont émis des hypothèses sur les résidus de B4-5 susceptibles d'interagir avec TS6. Ensuite, grâce à une approche de mutagenèse dirigée associée à des études fonctionnelles, les auteurs ont puis établi des résultats à la base du modèle 3 (modèle consensuel) de couplage entre les modules VSD et PD. La démarche utilisée dans cette étude montre l'importance de cette approche de RMN dans l'étude des bases moléculaires des interactions protéiques. Ainsi, dans le cadre des peptides mimétiques B4-5 et TS6, il serait intéressant d'utiliser cette technique pour déterminer la structure du peptide B4-5 exogène d'un canal dont la structure du pore est connue et de faire ensuite du « Docking » (modélisation bioinformatique) entre les structures du peptide et du canal afin de prédire les zones d'interaction de ce peptide B4-5 sur le pore. Du fait du caractère prédictif d'une telle approche, les résultats de ce « Docking » doivent être confirmés par une approche de mutagenèse associée à des études fonctionnelles. Toutefois, il est important de préciser que la structure d'un peptide B4-5 seul en solution ne reflète pas forcément sa conformation native.

La principale limite de la cristallographie pour l'étude des canaux ioniques voltage-dépendants (à six domaines transmembranaires) réside sur la difficulté pour ces grosses protéines membranaires à être exprimées de façon abondante par des systèmes de réexpression, ainsi que leur difficulté à cristalliser. C'est la raison pour laquelle la majorité des structures cristallographiques ont été obtenues à partir de canaux à deux domaines transmembranaires ou à partir de mutant « pore only » possédant uniquement les segments S5 et S6 (Cuello et al., 2010; Doyle et al., 1998; McCusker et al., 2012; Whorton and MacKinnon, 2011, 2013). Ces mutants « pore only » étant correctement exprimés, exportés

à la membrane et fonctionnels (McCusker et al., 2011; Santos et al., 2008; Shaya et al., 2011), il serait intéressant de déterminer la structure d'un tel mutant possédant la région B4-5 (que je nomme ici canal « pore only » contenant l'extension B4-5). La structure de B4-5 dans une telle approche dans laquelle le peptide est contraint d'un côté de sa chaîne polypeptidique, serait probablement plus proche de la conformation native (contraint des deux côtés), comparée à la structure d'un peptide B4-5 en solution (pas contraint du tout).

Nous avons donc privilégié cette dernière approche pour mieux comprendre les bases structurales de l'interaction entre B4-5 et TS6. La démarche consiste à déterminer la structure cristallographique d'un mutant « pore only » contenant l'extension B4-5 sur son extrémité N-terminale. Les caractérisations structurale et fonctionnelle du mutant (sans B4-5) a fait l'objet d'une récente étude (annexe 1) dont je suis co-auteur. La détermination de la structure de ce mutant avec l'extension B4-5 ainsi que sa caractérisation fonctionnelle seront réalisées dans le cadre de mon prochain post doctorat à UCSF.

Le laser à électrons libres : une approche structurale révolutionnaire

Le laser à électrons libres constitue une nouvelle technologie permettant de produire des rayons-X 10^9 fois plus intenses que ceux produits par un synchrotron classique, et avec une durée d'émission de l'ordre de la femto seconde (Boutet et al., 2012; Chapman et al., 2011; Neutze et al., 2000). Ces rayons-X très puissants permettent de produire des diffractions de très bonne qualité tandis que leur courte durée d'émission permet une diffraction complète avant la destruction de l'échantillon (macromolécule) par la radiation (Lomb et al., 2011; Neutze et al., 2000). Les échantillons en question peuvent être des protéines en solution ou des très petits cristaux de protéines de l'ordre de 200 nm à 2 μ m (Chapman et al., 2011). La radiation suivie de la diffraction complète avant destruction, de plusieurs molécules identiques et orientées différemment en solution, permet d'établir un profil de diffraction, puis une carte de densité électronique à partir de laquelle la structure de la protéine est déterminée avec une très forte résolution, inférieure à 2 Å (Boutet and Williams, 2010). Ainsi, cette technique permet de s'affranchir de l'étape la plus difficile de la cristallographie traditionnelle à savoir obtenir des cristaux suffisamment gros et solides pour résister aux rayons-X d'un synchrotron classique.

A ce jour, trois installations permettant de produire de tels rayons-X à partir de laser à électrons libres, sont déjà opérationnelles en Allemagne, en Californie et au Japon (Ayvazyan et al., 2006; Emma et al., 2010; Ishikawa et al., 2012), tandis que nombreuses autres sont en construction (Schlichting and Miao, 2012). Cette nouvelle approche révolutionnaire ouvre la voie vers de nouvelles structures des protéines, et des canaux

ioniques en particulier. Elle contribuera sans doute, dans les années à venir, à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à la base du fonctionnement et de la modulation des canaux ioniques.

Cependant, des outils de modélisations sont nécessaires pour tirer profits au maximum des données issues des approches structurales expérimentales. Ces approches de modélisation bioinformatique permettent également de répondre à la difficulté d'obtenir des structures de par des approches expérimentales.

➤ **Approches de modélisation**

Les approches de modélisation utilisées dans l'étude de la structure et la dynamique des canaux ioniques regroupent principalement deux méthodes à savoir la modélisation par homologie et la simulation par dynamique moléculaire. Face à la rareté de structure 3D issues d'approches expérimentales, ces méthodes structurales basées sur des outils informatiques ont permis d'augmenter les connaissances sur les relations structure-fonction des canaux ioniques et de déterminer les expériences les plus cohérentes à réaliser dans ce domaine. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue le fait que ces approches de modélisation restent prédictives.

Modélisation par homologie

La modélisation par homologie consiste à construire un modèle structural à haute résolution, d'une macromolécule appelée « cible » à partir de sa séquence d'acides aminés et d'une structure 3D expérimentale d'une protéine « matrice » homologue de la protéine « cible ». Cette technique est basée sur le fait que les structures tertiaires et quaternaires des protéines homologues sont plus conservées que leurs séquences d'acides aminés (Chothia and Lesk, 1986). Par conséquent, des protéines ayant des fortes similarités dans leurs séquences d'acides aminés sont susceptibles d'avoir des structures 3D assez similaires. Les principales étapes d'une telle approche *in-silico* sont l'identification d'une protéine « matrice » convenable dont la structure a été expérimentalement déterminée, l'alignement entre les séquences d'acides aminés des protéines « cible » et « matrice », la construction du modèle et sa validation (Ravna and Sylte, 2012). Du fait de la forte similarité entre certains canaux ioniques de la même famille tels que les Kv, Nav, Cav ou encore Kir, cette méthode bioinformatique a permis d'obtenir un certain nombre de données structurales sur les canaux ioniques dont la structure cristallographique est inconnue. Néanmoins, la précision d'une telle approche n'est pas toujours satisfaisante dans la mesure où elle dépend

à la fois de l'identité de séquence entre les protéines « cible » et « matrice », et de la résolution de la structure 3D de la protéine « matrice ». Enfin, les données fournies par cette approche structurale nécessitent une validation fonctionnelle par des approches expérimentales comme le Cystéine scanning associé à une mesure d'accessibilité à un anion bivalent ou un agent réducteur (Loussouarn et al., 2000).

Simulations par dynamique moléculaire

La simulation par dynamique moléculaire est aussi une approche *in-silico* permettant d'apporter des informations sur les mécanismes de fonctionnement et d'interaction protéiques. Cette technique consiste à appliquer *in-silico* des contraintes physico-chimiques sur une structure protéique déjà connue et à observer les changements conformationnels conséquents à différents états thermodynamiquement stables de la protéine. En ce qui concerne l'étude des canaux ioniques voltage-dépendants, cette technique permet par exemple d'étudier les différentes conformations prises par la structure d'un canal après avoir simulé des variations de potentiel membranaire. Elle permet également de prédire les bases structurales de l'interaction entre le canal et ses régulateurs. Par exemple, une telle approche de dynamique moléculaire nous a permis de proposer les déterminants moléculaires impliqués dans la régulation du canal potassique *Shaker* par le PIP₂ (projet 1). Bien que les résultats issus de ces simulations bioinformatiques soient prédictifs et non pas issus de mesures expérimentales, ce domaine a connu beaucoup d'améliorations visant à réduire au maximum les erreurs de prédiction. C'est ainsi qu'une équipe a construit un supercalculateur très puissant, capable de réaliser des simulations et d'étudier les événements moléculaires qui ont lieu à l'échelle de la milliseconde, contre la dizaine de microsecondes avec les systèmes précédents (Shaw et al., 2009). Ce nouvel outil associé à de nombreux algorithmes très complexes a été récemment utilisé pour proposer un modèle d'ouverture-fermeture des canaux potassiques voltage-dépendants cohérent avec le modèle de levier mécanique (Jensen et al., 2012).

Ainsi, dans le cadre de mes projets 2 et 3, il serait intéressant de réaliser des simulations par dynamique moléculaires sur les structures des canaux Kv1.2 et NavAb afin de mieux prédire les bases structurales de l'interaction entre B4-5 et TS6. Ces prédictions permettront d'émettre des hypothèses sur les types d'interaction et les déterminants moléculaires impliqués dans cette interaction. Il conviendra ensuite de mener des études fonctionnelles pour confirmer ou infirmer ces hypothèses. Cette démarche permettra *in-fine*, d'atteindre un objectif clé de ces projets 2 et 3, à savoir l'amélioration de l'efficacité des peptides modulateurs (activateurs et inhibiteurs) des canaux ioniques cardiaque KCNQ1 et musculaire Nav1.4, à des fins de recherche et thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, P.J., and Snutch, T.P. (2007). Calcium channelopathies: voltage-gated calcium channels. *Subcell. Biochem.* 45, 215–251.
- Akabas, M.H., Stauffer, D.A., Xu, M., and Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 258, 307–310.
- Arnestad, M., Crotti, L., Rognum, T.O., Insolia, R., Pedrazzini, M., Ferrandi, C., Vege, A., Wang, D.W., Rhodes, T.E., George, A.L., Jr, et al. (2007). Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115, 361–367.
- Arrigoni, C., Schroeder, I., Romani, G., Van Etten, J.L., Thiel, G., and Moroni, A. (2013). The voltage-sensing domain of a phosphatase gates the pore of a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 141, 389–395.
- Ayvazyan, V., Baboi, N., Bähr, J., Balandin, V., Beutner, B., Brandt, A., Bohnet, I., Bolzmann, A., Brinkmann, R., Brovko, O.I., et al. (2006). First operation of a free-electron laser generating GW power radiation at 32 nm wavelength. *Eur. Phys. J. - At. Mol. Opt. Plasma Phys.* 37, 297–303.
- Balser, J.R., Nuss, H.B., Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M.T., Marban, E., and Tomaselli, G.F. (1996). External pore residue mediates slow inactivation in μ 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J. Physiol.* 494 (Pt 2), 431–442.
- 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.
- 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.
- Barlow, D.J., and Thornton, J.M. (1988). Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.* 201, 601–619.
- Batulan, Z., Haddad, G.A., and Blunck, R. (2010). An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 285, 14005–14019.
- Bendahhou, S., Cummins, T.R., Kwiecinski, H., Waxman, S.G., and Ptáček, L.J. (1999a). Characterization of a new sodium channel mutation at arginine 1448 associated with moderate Paramyotonia congenita in humans. *J. Physiol.* 518 (Pt 2), 337–344.
- Bendahhou, S., Cummins, T.R., Kwiecinski, H., Waxman, S.G., and Ptáček, L.J. (1999b). Characterization of a new sodium channel mutation at arginine 1448 associated with moderate Paramyotonia congenita in humans. *J. Physiol.* 518 (Pt 2), 337–344.
- Bénitah, J.P., Chen, Z., Balser, J.R., Tomaselli, G.F., and Marbán, E. (1999). Molecular dynamics of the sodium channel pore vary with gating: interactions between P-segment motions and inactivation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 1577–1585.

- Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80, 555–592.
- Bezanilla, F., and Stefani, E. (1998). Gating currents. *Methods Enzymol.* 293, 331–352.
- Bezanilla, F., Perozo, E., and Stefani, E. (1994). Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation. *Biophys. J.* 66, 1011–1021.
- Bian, J., Cui, J., and McDonald, T.V. (2001a). HERG K(+) channel activity is regulated by changes in phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate. *Circ. Res.* 89, 1168–1176.
- Bian, J., Cui, J., and McDonald, T.V. (2001b). HERG K⁺ Channel Activity Is Regulated by Changes in Phosphatidyl Inositol 4,5-Bisphosphate. *Circ. Res.* 89, 1168–1176.
- Bian, J.-S., Kagan, A., and McDonald, T.V. (2004). Molecular analysis of PIP₂ regulation of HERG and IKr. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2154–2163.
- Biswas, S., Deschênes, I., Disilvestre, D., Tian, Y., Halperin, V.L., and Tomaselli, G.F. (2008). Calmodulin regulation of Nav1.4 current: role of binding to the carboxyl terminus. *J. Gen. Physiol.* 131, 197–209.
- Börjesson, S.I., Hammarström, S., and Elinder, F. (2008). Lipoelectric modification of ion channel voltage gating by polyunsaturated fatty acids. *Biophys. J.* 95, 2242–2253.
- 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.
- Boutet, S., and Williams, G.J. (2010). The Coherent X-ray Imaging (CXI) instrument at the Linac Coherent Light Source (LCLS). *New J. Phys.* 12, 035024.
- Boutet, S., Lomb, L., Williams, G.J., Barends, T.R.M., Aquila, A., Doak, R.B., Weierstall, U., DePonte, D.P., Steinbrener, J., Shoeman, R.L., et al. (2012). High-Resolution Protein Structure Determination by Serial Femtosecond Crystallography. *Science* 337, 362–364.
- Brew, H.M., Gittelman, J.X., Silverstein, R.S., Hanks, T.D., Demas, V.P., Robinson, L.C., Robbins, C.A., McKee-Johnson, J., Chiu, S.Y., Messing, A., et al. (2007). Seizures and Reduced Life Span in Mice Lacking the Potassium Channel Subunit Kv1.2, but Hypoexcitability and Enlarged Kv1 Currents in Auditory Neurons. *J. Neurophysiol.* 98, 1501–1525.
- Bulman, D.E., Scoggan, K.A., van Oene, M.D., Nicolle, M.W., Hahn, A.F., Tollar, L.L., and Ebers, G.C. (1999). A novel sodium channel mutation in a family with hypokalemic periodic paralysis. *Neurology* 53, 1932–1936.
- Del Camino, D., Holmgren, M., Liu, Y., and Yellen, G. (2000). Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature* 403, 321–325.
- Capes, D.L., Arcisio-Miranda, M., Jarecki, B.W., French, R.J., and Chanda, B. (2012). Gating transitions in the selectivity filter region of a sodium channel are coupled to the domain IV voltage sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2648–2653.
- Caprini, M., Ferroni, S., Planells-Cases, R., Rueda, J., Rapisarda, C., Ferrer-Montiel, A., and

- Montal, M. (2001). Structural compatibility between the putative voltage sensor of voltage-gated K⁺ channels and the prokaryotic KcsA channel. *J. Biol. Chem.* 276, 21070–21076.
- Catterall, W.A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K., and Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 49, 124–141.
- Cha, A., and Bezanilla, F. (1997). Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence. *Neuron* 19, 1127–1140.
- Cha, A., Snyder, G.E., Selvin, P.R., and Bezanilla, F. (1999). Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 402, 809–813.
- 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.
- Chapman, H.N., Fromme, P., Barty, A., White, T.A., Kirian, R.A., Aquila, A., Hunter, M.S., Schulz, J., DePonte, D.P., Weierstall, U., et al. (2011). Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature* 470, 73–77.
- 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.
- 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., et al. (2003). KCNQ1 Gain-of-Function Mutation in Familial Atrial Fibrillation. *Science* 299, 251–254.
- Cherny, V.V., Markin, V.S., and DeCoursey, T.E. (1995). The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient. *J. Gen. Physiol.* 105, 861–896.
- Cherny, V.V., Murphy, R., Sokolov, V., Levis, R.A., and DeCoursey, T.E. (2003). Properties of single voltage-gated proton channels in human eosinophils estimated by noise analysis and by direct measurement. *J. Gen. Physiol.* 121, 615–628.
- Cho, H., Kim, Y.A., Yoon, J.-Y., Lee, D., Kim, J.H., Lee, S.H., and Ho, W.-K. (2005). Low mobility of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate underlies receptor specificity of Gq-mediated ion channel regulation in atrial myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15241–15246.
- Chothia, C., and Lesk, A.M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5, 823–826.
- Chouabe, C., Neyroud, N., Guicheney, P., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1997). Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J.* 16, 5472–5479.
- Coronel, R., Wilms-Schopman, F.J.G., Den Ruijter, H.M., Belterman, C.N., Schumacher, C.A., Opthof, T., Hovenier, R., Lemmens, A.G., Terpstra, A.H.M., Katan, M.B., et al. (2007).

Dietary n-3 fatty acids promote arrhythmias during acute regional myocardial ischemia in isolated pig hearts. *Cardiovasc. Res.* 73, 386–394.

Cuello, L.G., Romero, J.G., Cortes, D.M., and Perozo, E. (1998). pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 3229–3236.

Cuello, L.G., Jogini, V., Cortes, D.M., and Perozo, E. (2010). Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. *Nature* 466, 203–208.

D'Avanzo, N., McCusker, E.C., Powl, A.M., Miles, A.J., Nichols, C.G., and Wallace, B.A. (2013). Differential Lipid Dependence of the Function of Bacterial Sodium Channels. *PLoS One* 8.

Decoursey, T.E. (2003). Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol. Rev.* 83, 475–579.

DeCoursey, T.E. (2010). Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes. *Physiol. Bethesda Md* 25, 27–40.

DeCoursey, T.E., and Cherny, V.V. (1998). Temperature dependence of voltage-gated H⁺ currents in human neutrophils, rat alveolar epithelial cells, and mammalian phagocytes. *J. Gen. Physiol.* 112, 503–522.

Donger, C., Denjoy, I., Berthet, M., Neyroud, N., Cruaud, C., Bennaceur, M., Chivoret, G., Schwartz, K., Coumel, P., and Guicheney, P. (1997). KVLQT1 C-terminal missense mutation causes a forme fruste long-QT syndrome. *Circulation* 96, 2778–2781.

Doyle, D.A., Morais Cabral, 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⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.

Durell, S.R., and Guy, H.R. (1992). Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.* 62, 238–247; discussion 247–250.

Ebers, G.C., George, A.L., Barchi, R.L., Ting-Passador, S.S., Kallen, R.G., Lathrop, G.M., Beckmann, J.S., Hahn, A.F., Brown, W.F., and Campbell, R.D. (1991). Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis are linked to the adult muscle sodium channel gene. *Ann. Neurol.* 30, 810–816.

Emma, P., Akre, R., Arthur, J., Bionta, R., Bostedt, C., Bozek, J., Brachmann, A., Bucksbaum, P., Coffee, R., Decker, F.-J., et al. (2010). First lasing and operation of an ångstrom-wavelength free-electron laser. *Nat. Photonics* 4, 641–647.

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⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 281, 12858–12864.

Flynn, G.E., and Zagotta, W.N. (2001). Conformational changes in S6 coupled to the opening of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 30, 689–698.

Flynn, G.E., and Zagotta, W.N. (2011a). Molecular mechanism underlying phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced inhibition of SpIH channels. *J. Biol. Chem.*

286, 15535–15542.

Flynn, G.E., and Zagotta, W.N. (2011b). Molecular mechanism underlying phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced inhibition of SpIH channels. *J. Biol. Chem.* 286, 15535–15542.

Fontaine, B., Khurana, T.S., Hoffman, E.P., Bruns, G.A., Haines, J.L., Trofatter, J.A., Hanson, M.P., Rich, J., McFarlane, H., and Yasek, D.M. (1990). Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science* 250, 1000–1002.

Gandhi, C.S., and Isacoff, E.Y. (2002). Molecular models of voltage sensing. *J. Gen. Physiol.* 120, 455–463.

Gilchrist, A., Li, A., and Hamm, H.E. (2002). G alpha COOH-terminal minigene vectors dissect heterotrimeric G protein signaling. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2002, p11.

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.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175–182.

Gosselin-Badaroudine, P., Keller, D.I., Huang, H., Pouliot, V., Chatelier, A., Osswald, S., Brink, M., and Chahine, M. (2012). A proton leak current through the cardiac sodium channel is linked to mixed arrhythmia and the dilated cardiomyopathy phenotype. *PloS One* 7, e38331.

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.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74.

Grieco, T.M., Malhotra, J.D., Chen, C., Isom, L.L., and Raman, I.M. (2005). Open-channel block by the cytoplasmic tail of sodium channel beta4 as a mechanism for resurgent sodium current. *Neuron* 45, 233–244.

Guy, H.R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 508–512.

Haddad, G.A., and Blunck, R. (2011). Mode shift of the voltage sensors in Shaker K⁺ channels is caused by energetic coupling to the pore domain. *J. Gen. Physiol.* 137, 455–472.

Halaszovich, C.R., Schreiber, D.N., and Oliver, D. (2009). Ci-VSP Is a Depolarization-activated Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5'-Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 284, 2106–2113.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 391, 85–100.

- Hansen, S.B., Tao, X., and MacKinnon, R. (2011). Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature* 477, 495–498.
- Hayward, L.J., Kim, J.S., Lee, M.-Y., Zhou, H., Kim, J.W., Misra, K., Salajegheh, M., Wu, F., Matsuda, C., Reid, V., et al. (2008). Targeted mutation of mouse skeletal muscle sodium channel produces myotonia and potassium-sensitive weakness. *J. Clin. Invest.* 118, 1437–1449.
- Hedley, P.L., Jørgensen, P., Schlamowitz, S., Wangari, R., Moolman-Smook, J., Brink, P.A., Kanters, J.K., Corfield, V.A., and Christiansen, M. (2009). The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum. Mutat.* 30, 1486–1511.
- Hernandez, C.C., Zaika, O., and Shapiro, M.S. (2008). A carboxy-terminal inter-helix linker as the site of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate action on Kv7 (M-type) K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 132, 361–381.
- Hilgemann, D.W. (2007). Local PIP(2) signals: when, where, and how? *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 455, 55–67.
- Hilgemann, D.W., and Ball, R. (1996). Regulation of Cardiac Na⁺,Ca²⁺ Exchange and KATP Potassium Channels by PIP₂. *Science* 273, 956–959.
- Hilgemann, D.W., Feng, S., and Nasuhoglu, C. (2001). The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2001, re19.
- Hille, B. (1992) *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd ed., Sinauer, Sunderland, MA.
- Holmgren, M., Shin, K.S., and Yellen, G. (1998). The activation gate of a voltage-gated K⁺ channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge. *Neuron* 21, 617–621.
- Hoshi, T., and Armstrong, C.M. (2013). C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels: Pore constriction or dilation? *J. Gen. Physiol.* 141, 151–160.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250, 533–538.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1991). Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7, 547–556.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1994). Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state. *J. Gen. Physiol.* 103, 249–278.
- Hossain, M.I., Iwasaki, H., Okochi, Y., Chahine, M., Higashijima, S., Nagayama, K., and Okamura, Y. (2008). Enzyme Domain Affects the Movement of the Voltage Sensor in Ascidian and Zebrafish Voltage-sensing Phosphatases. *J. Biol. Chem.* 283, 18248–18259.
- Huang, C.L., Feng, S., and Hilgemann, D.W. (1998a). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 391, 803–806.
- Huang, C.L., Feng, S., and Hilgemann, D.W. (1998b). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 391, 803–806.

- Ishikawa, T., Aoyagi, H., Asaka, T., Asano, Y., Azumi, N., Bizen, T., Ego, H., Fukami, K., Fukui, T., Furukawa, Y., et al. (2012). A compact X-ray free-electron laser emitting in the sub-angstrom region. *Nat. Photonics* 6, 540–544.
- Jacobson, K., Mouritsen, O.G., and Anderson, R.G.W. (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat. Cell Biol.* 9, 7–14.
- Jensen, M.Ø., Jogini, V., Borhani, D.W., Leffler, A.E., Dror, R.O., and Shaw, D.E. (2012). Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* 336, 229–233.
- Jespersen, T., Grunnet, M., and Olesen, S.-P. (2005). The KCNQ1 Potassium Channel: From Gene to Physiological Function. *Physiology* 20, 408–416.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002a). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417, 515–522.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002b). The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417, 523–526.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 33–41.
- Jurkat-Rott, K., and Lehmann-Horn, F. (2007). Do hyperpolarization-induced proton currents contribute to the pathogenesis of hypokalemic periodic paralysis, a voltage sensor channelopathy? *J. Gen. Physiol.* 130, 1–5.
- Jurkat-Rott, K., Holzherr, B., Fauler, M., and Lehmann-Horn, F. (2010). Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 460, 239–248.
- Kang, J.X., and Leaf, A. (1996). Evidence that free polyunsaturated fatty acids modify Na⁺ channels by directly binding to the channel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3542–3546.
- Kang, C., Tian, C., Sönnichsen, F.D., Smith, J.A., Meiler, J., George, A.L., Jr, Vanoye, C.G., Kim, H.J., and Sanders, C.R. (2008). Structure of KCNE1 and implications for how it modulates the KCNQ1 potassium channel. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 7999–8006.
- Kapplinger, J.D., Tester, D.J., Salisbury, B.A., Carr, J.L., Harris-Kerr, C., Pollevick, G.D., Wilde, A.A.M., and Ackerman, M.J. (2009). Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 6, 1297–1303.
- Keating, M.T., and Sanguinetti, M.C. (2001). Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104, 569–580.
- Kontis, K.J., Rounaghi, A., and Goldin, A.L. (1997). Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J. Gen. Physiol.* 110, 391–401.
- Kruse, M., Hammond, G.R.V., and Hille, B. (2012). Regulation of voltage-gated potassium channels by PI(4,5)P₂. *J. Gen. Physiol.* 140, 189–205.

- Kuno, M., Kawawaki, J., and Nakamura, F. (1997). A highly temperature-sensitive proton current in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Gen. Physiol.* *109*, 731–740.
- Kuno, M., Ando, H., Morihata, H., Sakai, H., Mori, H., Sawada, M., and Oiki, S. (2009). Temperature dependence of proton permeation through a voltage-gated proton channel. *J. Gen. Physiol.* *134*, 191–205.
- Kurejová, M., Lacinová, L., Pavlovicová, M., Eschbach, M., and Klugbauer, N. (2007). The effect of the outermost basic residues in the S4 segments of the Ca(V)_{3.1} T-type calcium channel on channel gating. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* *455*, 527–539.
- Kurokawa, J., Motoike, H.K., Rao, J., and Kass, R.S. (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16374–16378.
- Kürz, L.L., Zühlke, R.D., Zhang, H.J., and Joho, R.H. (1995). Side-chain accessibilities in the pore of a K⁺ channel probed by sulfhydryl-specific reagents after cysteine-scanning mutagenesis. *Biophys. J.* *68*, 900–905.
- Kwan, D.C.H., Prole, D.L., and Yellen, G. (2012). Structural changes during HCN channel gating defined by high affinity metal bridges. *J. Gen. Physiol.* *140*, 279–291.
- Labro, A.J., Boulet, I.R., Choveau, F.S., Mayeur, E., Bruyns, T., Loussouarn, G., Raes, A.L., and Snyders, D.J. (2011). The S4-S5 linker of KCNQ1 channels forms a structural scaffold with the S6 segment controlling gate closure. *J. Biol. Chem.* *286*, 717–725.
- Lai, L.-P., Su, Y.-N., Hsieh, F.-J., Chiang, F.-T., Juang, J.-M., Liu, Y.-B., Ho, Y.-L., Chen, W.-J., Yeh, S.-J., Wang, C.-C., et al. (2005). Denaturing high-performance liquid chromatography screening of the long QT syndrome-related cardiac sodium and potassium channel genes and identification of novel mutations and single nucleotide polymorphisms. *J. Hum. Genet.* *50*, 490–496.
- Larsson, H.P., Baker, O.S., Dhillon, D.S., and Isacoff, E.Y. (1996). Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4. *Neuron* *16*, 387–397.
- Leaf, A., Xiao, Y.F., Kang, J.X., and Billman, G.E. (2003). Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol. Ther.* *98*, 355–377.
- Lee, S.-Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005a). Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15441–15446.
- Lee, S.-Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005b). Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15441–15446.
- Lefevre, F., and Aronson, N. (2000). Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy in children: A systematic review of efficacy. *Pediatrics* *105*, E46.
- Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol. Rev.* *79*, 1317–1372.

- Lewis, A., Jogini, V., Blachowicz, L., Lainé, M., and Roux, B. (2008). Atomic constraints between the voltage sensor and the pore domain in a voltage-gated K⁺ channel of known structure. *J. Gen. Physiol.* *131*, 549–561.
- Li, Y., Zaydman, M.A., Wu, D., Shi, J., Guan, M., Virgin-Downey, B., and Cui, J. (2011). KCNE1 enhances phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) sensitivity of IKs to modulate channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9095–9100.
- Lindner, M., Leitner, M.G., Halaszovich, C.R., Hammond, G.R.V., and Oliver, D. (2011). Probing the regulation of TASK potassium channels by PI(4,5)P₂ with switchable phosphoinositide phosphatases. *J. Physiol.* *589*, 3149–3162.
- Liu, Y., Jurman, M.E., and Yellen, G. (1996). Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* *16*, 859–867.
- Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M.E., and Yellen, G. (1997). Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* *19*, 175–184.
- Logothetis, D.E., Petrou, V.I., Adney, S.K., and Mahajan, R. (2010a). Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* *460*, 321–341.
- Logothetis, D.E., Petrou, V.I., Adney, S.K., and Mahajan, R. (2010b). Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* *460*, 321–341.
- Lomb, L., Barends, T.R.M., Kassemeyer, S., Aquila, A., Epp, S.W., Erk, B., Foucar, L., Hartmann, R., Rudek, B., Rolles, D., et al. (2011). Radiation damage in protein serial femtosecond crystallography using an x-ray free-electron laser. *Phys. Rev. B* *84*, 214111.
- Long, S.B., Campbell, E.B., and Mackinnon, R. (2005a). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* *309*, 897–903.
- Long, S.B., Campbell, E.B., and Mackinnon, R. (2005b). Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* *309*, 903–908.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* *450*, 376–382.
- López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.H., and Aldrich, R.W. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels* *1*, 61–71.
- Loussouarn, G., Makhina, E.N., Rose, T., and Nichols, C.G. (2000). Structure and dynamics of the pore of inwardly rectifying K(ATP) channels. *J. Biol. Chem.* *275*, 1137–1144.
- Loussouarn, G., Park, K.-H., Bellocq, C., Baró, I., Charpentier, F., and Escande, D. (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J.* *22*, 5412–5421.
- Lu, Z., Klem, A.M., and Ramu, Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* *413*, 809–813.

- Lu, Z., Klem, A.M., and Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 663–676.
- Makita, N., Bennett, P.B., Jr, and George, A.L., Jr (1994). Voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* 269, 7571–7578.
- Makita, N., Bennett, P.B., and George, A.L., Jr (1996). Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 7117–7127.
- Mannuzzu, L.M., Moronne, M.M., and Isacoff, E.Y. (1996). Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* 271, 213–216.
- Marbán, E. (2002). Cardiac channelopathies. *Nature* 415, 213–218.
- Marionneau, C., Carrasquillo, Y., Norris, A.J., Townsend, R.R., Isom, L.L., Link, A.J., and Nerbonne, J.M. (2012). The sodium channel accessory subunit Navβ1 regulates neuronal excitability through modulation of repolarizing voltage-gated K⁺ channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 5716–5727.
- Marx, S.O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D’Armiento, J., Marks, A.R., and Kass, R.S. (2002). Requirement of a Macromolecular Signaling Complex for β Adrenergic Receptor Modulation of the KCNQ1-KCNE1 Potassium Channel. *Science* 295, 496–499.
- Matthews, E., Fialho, D., Tan, S.V., Venance, S.L., Cannon, S.C., Sternberg, D., Fontaine, B., Amato, A.A., Barohn, R.J., Griggs, R.C., et al. (2010). The non-dystrophic myotonias: molecular pathogenesis, diagnosis and treatment. *Brain J. Neurol.* 133, 9–22.
- McCrossan, Z.A., and Abbott, G.W. (2004). The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 47, 787–821.
- McCusker, E.C., D’Avanzo, N., Nichols, C.G., and Wallace, B.A. (2011). Simplified Bacterial “Pore” Channel Provides Insight into the Assembly, Stability, and Structure of Sodium Channels. *J. Biol. Chem.* 286, 16386–16391.
- McCusker, E.C., Bagnéris, C., Naylor, C.E., Cole, A.R., D’Avanzo, N., Nichols, C.G., and Wallace, B.A. (2012). Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat. Commun.* 3, 1102.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., and Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 151–175.
- Milescu, M., Bosmans, F., Lee, S., Alabi, A.A., Kim, J.I., and Swartz, K.J. (2009). Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1080–1085.
- Moroni, A., Barbuti, A., Altomare, C., Viscomi, C., Morgan, J., Baruscotti, M., and DiFrancesco, D. (2000). Kinetic and ionic properties of the human HCN2 pacemaker channel. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 439, 618–626.

- Murata, Y., and Okamura, Y. (2007). Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP2. *J. Physiol.* 583, 875–889.
- Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., and Okamura, Y. (2005). Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435, 1239–1243.
- Nakanishi, S., Catt, K.J., and Balla, T. (1995). A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5317–5321.
- Napolitano, C., Priori, S.G., Schwartz, P.J., Bloise, R., Ronchetti, E., Nastoli, J., Bottelli, G., Cerrone, M., and Leonardi, S. (2005). Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 294, 2975–2980.
- Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E., and Hajdu, J. (2000). Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses. *Nature* 406, 752–757.
- Ng, C.A., Perry, M.D., Tan, P.S., Hill, A.P., Kuchel, P.W., and Vandenberg, J.I. (2012). The S4-S5 linker acts as a signal integrator for HERG K⁺ channel activation and deactivation gating. *PloS One* 7, e31640.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., and Minamino, N. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121–127.
- Oliver, D., Lien, C.-C., Soom, M., Baukrowitz, T., Jonas, P., and Fakler, B. (2004). Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science* 304, 265–270.
- Ong, B.H., Tomaselli, G.F., and Balser, J.R. (2000). A structural rearrangement in the sodium channel pore linked to slow inactivation and use dependence. *J. Gen. Physiol.* 116, 653–662.
- Osteen, J.D., Gonzalez, C., Sampson, K.J., Iyer, V., Rebolledo, S., Larsson, H.P., and Kass, R.S. (2010). KCNE1 alters the voltage sensor movements necessary to open the KCNQ1 channel gate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22710–22715.
- Park, K.-H., Piron, J., Dahimene, S., Mérot, J., Baró, 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.
- Pascual, J.M., Shieh, C.-C., Kirsch, G.E., and Brown, A.M. (1995). K⁺ pore structure revealed by reporter cysteines at inner and outer surfaces. *Neuron* 14, 1055–1063.
- Pavlov, E., Bladen, C., Winkfein, R., Diao, C., Dhaliwal, P., and French, R.J. (2005). The pore, not cytoplasmic domains, underlies inactivation in a prokaryotic sodium channel. *Biophys. J.* 89, 232–242.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011a). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.

- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011b). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.
- Payandeh, J., Gamal El-Din, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486, 135–139.
- De la Peña, P., Alonso-Ron, C., Machín, A., Fernández-Trillo, J., Carretero, L., Domínguez, P., and Barros, F. (2011). Demonstration of physical proximity between the N terminus and the S4-S5 linker of the human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel. *J. Biol. Chem.* 286, 19065–19075.
- Peretz, A., Schottelndreier, H., Aharon-Shamgar, L.B., and Attali, B. (2002). Modulation of homomeric and heteromeric KCNQ1 channels by external acidification. *J. Physiol.* 545, 751–766.
- Perozo, E. (2002). New structural perspectives on K(+) channel gating. *Struct. Lond. Engl.* 1993 10, 1027–1029.
- Perozo, E., MacKinnon, R., Bezanilla, F., and Stefani, E. (1993). Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels. *Neuron* 11, 353–358.
- Perozo, E., Cortes, D.M., and Cuello, L.G. (1999). Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating. *Science* 285, 73–78.
- Pietrobon, D. (2007). Familial hemiplegic migraine. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 4, 274–284.
- Pincin, C., Ferrera, L., and Moran, O. (2005). Minimal sodium channel pore consisting of S5-P-S6 segments preserves intracellular pharmacology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 140–144.
- Piron, J., Choveau, F.S., Amarouch, M.Y., Rodriguez, N., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2010). KCNE1-KCNQ1 osmoregulation by interaction of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate with Mg²⁺ and polyamines. *J. Physiol.* 588, 3471–3483.
- Potet, F., Scott, J.D., Mohammad-Panah, R., Escande, D., and Baró, I. (2001). AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2038–2045.
- Prendergast, F.G., and Mann, K.G. (1978). Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskålea*. *Biochemistry (Mosc.)* 17, 3448–3453.
- 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.
- Ratzan, W.J., Evsikov, A.V., Okamura, Y., and Jaffe, L.A. (2011). Voltage sensitive phosphoinositide phosphatases of *Xenopus*: their tissue distribution and voltage dependence. *J. Cell. Physiol.* 226, 2740–2746.

- Ravna, A.W., and Sylte, I. (2012). Homology modeling of transporter proteins (carriers and ion channels). *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 857, 281–299.
- Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q., and Clapham, D.E. (2001). A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science* 294, 2372–2375.
- Restier, L., Cheng, L., and Sanguinetti, M.C. (2008). Mechanisms by which atrial fibrillation-associated mutations in the S1 domain of KCNQ1 slow deactivation of IKs channels. *J. Physiol.* 586, 4179–4191.
- Rodriguez, N., Amarouch, M.Y., Montnach, J., Piron, J., Labro, A.J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2010a). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP(2)) stabilizes the open pore conformation of the Kv11.1 (hERG) channel. *Biophys. J.* 99, 1110–1118.
- Rodriguez, N., Amarouch, M.Y., Montnach, J., Piron, J., Labro, A.J., Charpentier, F., Mérot, J., Baró, I., and Loussouarn, G. (2010b). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP(2)) stabilizes the open pore conformation of the Kv11.1 (hERG) channel. *Biophys. J.* 99, 1110–1118.
- Rodriguez-Menchaca, A.A., Adney, S.K., Tang, Q.-Y., Meng, X.-Y., Rosenhouse-Dantsker, A., Cui, M., and Logothetis, D.E. (2012). PIP2 controls voltage-sensor movement and pore opening of Kv channels through the S4-S5 linker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2399–2408.
- Rohács, T., Lopes, C.M.B., Michailidis, I., and Logothetis, D.E. (2005). PI(4,5)P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8, 626–634.
- Rojas, C.V., Wang, J.Z., Schwartz, L.S., Hoffman, E.P., Powell, B.R., and Brown, R.H., Jr (1991). A Met-to-Val mutation in the skeletal muscle Na⁺ channel alpha-subunit in hyperkalaemic periodic paralysis. *Nature* 354, 387–389.
- Rosenhouse-Dantsker, A., and Logothetis, D.E. (2007). Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 455, 45–53.
- Ruscic, K.J., Miceli, F., Villalba-Galea, C.A., Dai, H., Mishina, Y., Bezanilla, F., and Goldstein, S.A.N. (2013). IKs channels open slowly because KCNE1 accessory subunits slow the movement of S4 voltage sensors in KCNQ1 pore-forming subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E559–566.
- Ruta, V., Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2003). Functional analysis of an archaeobacterial voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 422, 180–185.
- Ruta, V., Chen, J., and MacKinnon, R. (2005). Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell* 123, 463–475.
- 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.
- 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.

Santos, J.S., Grigoriev, S.M., and Montal, M. (2008). Molecular template for a voltage sensor in a novel K⁺ channel. III. Functional reconstitution of a sensorless pore module from a prokaryotic Kv channel. *J. Gen. Physiol.* 132, 651–666.

Sasaki, N., Mitsuiye, T., Wang, Z., and Noma, A. (1994). Increase of the delayed rectifier K⁺ and Na⁽⁺⁾-K⁺ pump currents by hypotonic solutions in guinea pig cardiac myocytes. *Circ. Res.* 75, 887–895.

Schlichting, I., and Miao, J. (2012). Emerging opportunities in structural biology with X-ray free-electron lasers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 613–626.

Schmidt, D., Jiang, Q.-X., and MacKinnon, R. (2006). Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* 444, 775–779.

Schrempf, H., Schmidt, O., Kümmerlen, R., Hinnah, S., Müller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995). A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 14, 5170–5178.

Schwartz, P.J., Stramba-Badiale, M., Segantini, A., Austoni, P., Bosi, G., Giorgetti, R., Grancini, F., Marni, E.D., Perticone, F., Rosti, D., et al. (1998). Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N. Engl. J. Med.* 338, 1709–1714.

Schwartz, P.J., Priori, S.G., Bloise, R., Napolitano, C., Ronchetti, E., Piccinini, A., Goj, C., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E., Wedekind, H., et al. (2001). Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet* 358, 1342–1343.

Shaw DE, Dror RO, Salmon JK, Grossman JP, Mackenzie KM, Bank JA, Young C, Deneroff MM, Batson B, Bowers KJ, Chow E, Eastwood MP, Ierardi DJ, Klepeis JL, Kuskin JS, Larson RH, Lindorff-Larsen K, Maragakis P, Moraes MA, Piana S, Shan Y, Towles B (2009) Millisecond-scale molecular dynamics simulations on Anton. In: Proceedings of the ACM/IEEE conference on supercomputing (SC09). IEEE Computer Society Press, Washington.

Shaya, D., Kreir, M., Robbins, R.A., Wong, S., Hammon, J., Brüggemann, A., and Minor, D.L. (2011). Voltage-gated sodium channel (NaV) protein dissection creates a set of functional pore-only proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12313–12318.

Shyng, S.-L., and Nichols, C.G. (1998). Membrane Phospholipid Control of Nucleotide Sensitivity of KATP Channels. *Science* 282, 1138–1141.

Sokolov, S., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2005). Ion permeation through a voltage-sensitive gating pore in brain sodium channels having voltage sensor mutations. *Neuron* 47, 183–189.

Sokolov, S., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2007). Gating pore current in an inherited ion channelopathy. *Nature* 446, 76–78.

Sokolov, S., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2010). Ion permeation and block of the gating pore in the voltage sensor of NaV1.4 channels with hypokalemic periodic paralysis mutations.

J. Gen. Physiol. 136, 225–236.

Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Atkinson, D.L., and Keating, M.T. (1997). Molecular Basis of the Long-QT Syndrome Associated with Deafness. *N. Engl. J. Med.* 336, 1562–1567.

Starace, D.M., and Bezanilla, F. (2001). Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker k⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* 117, 469–490.

Starace, D.M., and Bezanilla, F. (2004). A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature* 427, 548–553.

Starace, D.M., Stefani, E., and Bezanilla, F. (1997). Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 19, 1319–1327.

Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., and Bezanilla, F. (1994). Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* 66, 996–1010.

Struyk, A.F., and Cannon, S.C. (2007). A Na⁺ channel mutation linked to hypokalemic periodic paralysis exposes a proton-selective gating pore. *J. Gen. Physiol.* 130, 11–20.

Suh, B.-C., Inoue, T., Meyer, T., and Hille, B. (2006). Rapid chemically induced changes of PtdIns(4,5)P₂ gate KCNQ ion channels. *Science* 314, 1454–1457.

Sutton, K.A., Jungnickel, M.K., Jovine, L., and Florman, H.M. (2012). Evolution of the voltage sensor domain of the voltage-sensitive phosphoinositide phosphatase VSP/TPTE suggests a role as a proton channel in eutherian mammals. *Mol. Biol. Evol.* 29, 2147–2155.

Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237, 770–775.

Terrenoire, C., Clancy, C.E., Cormier, J.W., Sampson, K.J., and Kass, R.S. (2005). Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circ. Res.* 96, e25–34.

Tester, D.J., Will, M.L., Haglund, C.M., and Ackerman, M.J. (2005). Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 2, 507–517.

Thomas, A.M., Harmer, S.C., Khambra, T., and Tinker, A. (2011a). Characterization of a binding site for anionic phospholipids on KCNQ1. *J. Biol. Chem.* 286, 2088–2100.

Thomas, A.M., Harmer, S.C., Khambra, T., and Tinker, A. (2011b). Characterization of a binding site for anionic phospholipids on KCNQ1. *J. Biol. Chem.* 286, 2088–2100.

Todt, H., Dudley, S.C., Jr, Kyle, J.W., French, R.J., and Fozzard, H.A. (1999). Ultra-slow inactivation in mul Na⁺ channels is produced by a structural rearrangement of the outer vestibule. *Biophys. J.* 76, 1335–1345.

Tombola, F., Pathak, M.M., and Isacoff, E.Y. (2005). Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores. *Neuron* 45, 379–388.

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.

Tristani-Firouzi, M., Chen, J., and Sanguinetti, M.C. (2002). Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 277, 18994–19000.

Tsai, C.-J., Tani, K., Irie, K., Hiroaki, Y., Shimomura, T., McMillan, D.G., Cook, G.M., Schertler, G., Fujiyoshi, Y., and Li, X.-D. Two alternative conformations of a voltage-gated sodium channel. *J. Mol. Biol.*

Tsujino, A., Maertens, C., Ohno, K., Shen, X.-M., Fukuda, T., Harper, C.M., Cannon, S.C., and Engel, A.G. (2003). Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7377–7382.

Unsöld, B., Kerst, G., Brousos, H., Hübner, M., Schreiber, R., Nitschke, R., Greger, R., and Bleich, M. (2000). KCNE1 reverses the response of the human K⁺ channel KCNQ1 to cytosolic pH changes and alters its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 441, 368–378.

Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T., and Balla, T. (2006). Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J. Cell Biol.* 175, 377–382.

Vicart, S., Sternberg, D., Fontaine, B., and Meola, G. (2005). Human skeletal muscle sodium channelopathies. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 26, 194–202.

Vilin, Y.Y., Fujimoto, E., and Ruben, P.C. (2001). A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na⁺ channel slow inactivation. *Biophys. J.* 80, 2221–2230.

Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C., and Elson, E.L. (2001). Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J. Cell Sci.* 114, 1025–1036.

Wall-Lacelle, S., Hossain, M.I., Sauvé, R., Blunck, R., and Parent, L. (2011). Double mutant cycle analysis identified a critical leucine residue in the IIS4S5 linker for the activation of the Ca(V)2.3 calcium channel. *J. Biol. Chem.* 286, 27197–27205.

Wang, H., Kunkel, D.D., Martin, T.M., Schwartzkroin, P.A., and Tempel, B.L. (1993). Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365, 75–79.

Watanabe, I., Zhu, J., Sutachan, J.J., Gottschalk, A., Recio-Pinto, E., and Thornhill, W.B. (2007). The glycosylation state of Kv1.2 potassium channels affects trafficking, gating, and simulated action potentials. *Brain Res.* 1144, 1–18.

West, J.W., Patton, D.E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10910–10914.

Whorton, M.R., and MacKinnon, R. (2011). Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺

- channel and gating regulation by G proteins, PIP2, and sodium. *Cell* 147, 199–208.
- Whorton, M.R., and MacKinnon, R. (2013). X-ray structure of the mammalian GIRK2- $\beta\gamma$ G-protein complex. *Nature* 498, 190–197.
- Wu, F., Mi, W., Burns, D.K., Fu, Y., Gray, H.F., Struyk, A.F., and Cannon, S.C. (2011). A sodium channel knockin mutant (NaV1.4-R669H) mouse model of hypokalemic periodic paralysis. *J. Clin. Invest.* 121, 4082–4094.
- Wu, L., Bauer, C.S., Zhen, X., Xie, C., and Yang, J. (2002). Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4,5)P2. *Nature* 419, 947–952.
- Xiong, W., Farukhi, Y.Z., Tian, Y., Disilvestre, D., Li, R.A., and Tomaselli, G.F. (2006). A conserved ring of charge in mammalian Na⁺ channels: a molecular regulator of the outer pore conformation during slow inactivation. *J. Physiol.* 576, 739–754.
- Xu, Y., Ramu, Y., and Lu, Z. (2008). Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature* 451, 826–829.
- Yang, N., and Horn, R. (1995). Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* 15, 213–218.
- Yang, T., Suhail, Y., Dalton, S., Kernan, T., and Colecraft, H.M. (2007). Genetically encoded molecules for inducibly inactivating CaV channels. *Nat. Chem. Biol.* 3, 795–804.
- Yarov-Yarovoy, V., DeCaen, P.G., Westenbroek, R.E., Pan, C.-Y., Scheuer, T., Baker, D., and Catterall, W.A. (2012). Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E93–102.
- Yue, L., Navarro, B., Ren, D., Ramos, A., and Clapham, D.E. (2002). The cation selectivity filter of the bacterial sodium channel, NaChBac. *J. Gen. Physiol.* 120, 845–853.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T., Dittman, J., and Aldrich, R.W. (1994a). Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J. Gen. Physiol.* 103, 279–319.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T., and Aldrich, R.W. (1994b). Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* 103, 321–362.
- Zaydman, M.A., Silva, J.R., Delaloye, K., Li, Y., Liang, H., Larsson, H.P., Shi, J., and Cui, J. (2013). Kv7.1 ion channels require a lipid to couple voltage sensing to pore opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Zhang, H., He, C., Yan, X., Mirshahi, T., and Logothetis, D.E. (1999). Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P2 interactions. *Nat. Cell Biol.* 1, 183–188.
- Zhang, H., Craciun, L.C., Mirshahi, T., Rohács, T., Lopes, C.M.B., Jin, T., and Logothetis, D.E. (2003). PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37, 963–975.
- Zhang, X., Ren, W., DeCaen, P., Yan, C., Tao, X., Tang, L., Wang, J., Hasegawa, K., Kumasaka, T., He, J., et al. (2012). Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* 486, 130–134.

Zhang, X., Xia, M., Li, Y., Liu, H., Jiang, X., Ren, W., Wu, J., DeCaen, P., Yu, F., Huang, S., et al. (2013). Analysis of the selectivity filter of the voltage-gated sodium channel Na(v)Rh. *Cell Res.* 23, 409–422.

Zhao, Y., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2004a). A gating hinge in Na⁺ channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* 41, 859–865.

Zhao, Y., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2004b). Reversed voltage-dependent gating of a bacterial sodium channel with proline substitutions in the S6 transmembrane segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17873–17878.

Zheng, H., Liu, W., Anderson, L.Y., and Jiang, Q.-X. (2011). Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel. *Nat. Commun.* 2, 250.

Zilly, F.E., Halemani, N.D., Walrafen, D., Spitta, L., Schreiber, A., Jahn, R., and Lang, T. (2011). Ca²⁺ induces clustering of membrane proteins in the plasma membrane via electrostatic interactions. *EMBO J.* 30, 1209–1220.

ANNEXE 1

Structure of a prokaryotic sodium channel pore reveals essential gating elements and an outer ion binding site common to eukaryotic channels

David Shaya^{1*}, Felix Findeisen^{1*}, Fayal Abderemane-Ali^{5,6,7}, Cristina Arrigoni¹, Stephanie Wong¹, Shailika Reddy Nurva¹, Gildas Loussouarn^{5,6,7}, and Daniel L. Minor, Jr.^{1,2,3,4†}

¹Cardiovascular Research Institute

²Departments of Biochemistry and Biophysics, and Cellular and Molecular Pharmacology

³California Institute for Quantitative Biomedical Research
University of California, San Francisco, California 94158-9001

⁴Physical Biosciences Science Division
Lawrence Berkeley National Laboratory
Berkeley, CA 94720 USA

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1087, Nantes, France

⁶Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6291, Nantes, France

⁷l'institut du thorax, L'UNAM Université, Université de Nantes, Nantes, France

* These authors contributed equally

†Correspondence: daniel.minor@ucsf.edu

Running title: A prokaryotic sodium channel pore structure

Voltage-gated sodium channels (Na_vs) are central elements of cellular excitation. Notwithstanding advances from recent bacterial Na_v (BacNa_v) structures, key questions about gating and ion selectivity remain. Here, we present a closed conformation of Na_vAe1p, a pore-only BacNa_v derived from Na_vAe1, a BacNa_v from the arsenite oxidizer *Alkalilimnicola ehrlichei* found in Mono Lake, California, that provides insight into both fundamental properties. The structure reveals a pore domain in which the pore-lining S6 helix connects to a helical cytoplasmic tail. Electrophysiological studies of full-length BacNa_vs show that two elements defined by the Na_vAe1p structure, an S6 activation gate position and the cytoplasmic tail 'neck', are central to BacNa_v gating. The structure also reveals the selectivity filter ion entry site, termed the 'outer ion' site. Comparison with mammalian voltage-gated calcium channel (Ca_v) selectivity filters, together with functional studies shows that this site forms a previously unknown determinant of Ca_v high affinity calcium binding. Our findings underscore commonalities between BacNa_vs and eukaryotic voltage-gated channels and provide a framework for understanding gating and ion permeation in this superfamily.

Introduction

Voltage-gated sodium channels (Na_VS) are large, multipass membrane proteins that are critical for cellular excitation^{1; 2}. These channels are targets for drugs directed at neuropathic pain, migraine, arrhythmias, and epilepsy^{3; 4}, as well as environmental toxins⁵. Na_VS belong to the voltage-gated ion channel (VGIC) superfamily and are most closely related to voltage-gated calcium channels (Ca_VS)^{6; 7}. Despite ion selectivity differences, mutational studies^{8; 9; 10} and sequence similarities^{6; 7} have suggested that Na_VS and Ca_VS share similar selectivity filter architectures². However, details of this presumed commonality are unknown.

Discovery of a large family of bacterial Na_VS (BacNa_VS)^{11; 12; 13} that may be ancestors of eukaryotic Na_VS and Ca_VS¹⁴ has enabled delineation of structural principles shared by this VGIC superfamily branch. BacNa_VS are tetramers. Each subunit has six transmembrane segments that comprise a voltage-sensing domain (VSD) composed of the S1-S4 segments and a pore domain (PD) formed from the S5-S6 segments^{15; 16; 17}. This subunit architecture is recapitulated in eukaryotic Na_VS and Ca_VS where four homologous six transmembrane repeats occur in a single polypeptide^{2; 6; 7}. Protein dissection studies have demonstrated a further modular aspect of BacNa_V architecture within the membrane domains. BacNa_V 'pore-only' constructs lacking the VSD have been demonstrated to fold^{18; 19; 20}, assemble^{18; 19; 20}, and form functional, selective ion channels¹⁹. These demonstrations of BacNa_V modularity are in accord with various lines of evidence that support the independence of the VSDs and PDs. These include: the fact that within the VGIC family potassium channels occur in forms that encompass a PD alone (Kir and K_{2P} channels) and forms having a VSD attached to the PD^{6; 7}, results from VSD-PD chimera studies^{21; 22; 23; 24}, and structural evidence indicating that VSDs and PDs lack extensive contacts^{15; 16; 17; 25; 26; 27}. Although recent BacNa_V structures have revealed the basic transmembrane architecture^{15; 16; 17; 20}, fundamental questions about gating, ion permeation, and ion selectivity have remained unanswered.

BacNa_VS have a conserved ~40 residue C-terminal cytoplasmic tail^{28; 29} that is important for assembly²⁸ and function^{29; 30}. However, this domain is either unresolved^{15; 16} or absent from the crystallized constructs^{17; 20} of prior BacNa_V structures. Hence, its structure, relationship to the PD, and key functional elements have remained enigmatic.

Ion permeation is fundamental ion channel property². Original descriptions of the BacNa_V Na_VAb suggested a single ion pore model¹⁵. In contrast, functional studies of Na_VS^{2; 31} and

Ca_vS^{2; 32} support the presence of multi-ion pores as a means to affect ion selectivity and permeation^{33; 34}. To date, only a single BacNa_v ion binding site has been observed at the inner vestibule of the Na_vRh selectivity filter¹⁷. Recent computational studies have suggested the possibility of other ion binding sites^{35; 36}, but the absence of experimental data have left unresolved questions regarding the existence of such sites, their exact locations, and residues involved in ion binding.

Here, we present the structure of Na_vAe1p, a pore-only sodium channel derived from the *Alkalilimnicola ehrlichei* BacNa_v Na_vAe1¹⁹. The structure shows a closed conformation of a complete PD and cytoplasmic tail. Functional tests of key structural elements suggest that BacNa_v opening involves changes at an S6 activation gate residue and a structural rearrangement in the neck region of the cytoplasmic tail. The structure also reveals an ion binding site in the selectivity filter that we term the 'outer ion' site. We demonstrate that the ion coordination residue comprising this site has a previously unrecognized counterpart in mammalian Ca_vS that is crucial to high-affinity calcium binding, a result that lends support to long-standing proposals regarding the presence of multiple ion binding sites in Ca_vS^{32; 33; 34}. Together, our results emphasize the deep evolutionary links between BacNa_vs and mammalian channels and suggest that channels sharing this selectivity filter architecture have multiple ion binding sites.

Results

Structure of the pore-only channel Na_vAe1p

We determined the structure of Na_vAe1p, a 'pore-only' protein bearing the PD and cytoplasmic tail of the BacNa_v Na_vAe1¹⁹ (Supplementary Table S1) using X-ray diffraction data obtained from a I222 crystal that diffracted to a resolution of 4.00Å based on traditional measures such as R_{pim} or $I\sigma/I$. However, as it has been shown recently that adding weak high-resolution data beyond the commonly arbitrarily defined cutoffs used to judge resolution limits may be beneficial^{37; 38}, we used data to a resolution of 3.46Å based on correlation coefficient (CC) evaluation ($CC > 0.1$)³⁷. Molecular replacement using a PD ensemble from the *Acrobacter butzleri* (Na_vAb)^{15; 16} and *Rickettsia sp.* (Na_vRh)¹⁷ BacNa_vS revealed electron density spanning from the beginning of the transmembrane segment S5 (Ile150) through the end of the cytoplasmic coiled-coil domain (Ser285) (Supplementary Figure S1A). Na_vAe1p shows the funnel-shaped architecture found in other BacNa_vS^{15; 16; 17; 20} (Figure 1A, B). Each tetramer subunit is comprised of S5 and S6 transmembrane helices that form the outer and inner parts of the PD, respectively. The P1 and P2 pore helices bridge S5 and S6 and are connected by the selectivity filter (Figure 1).

Initial electron density maps (Supplementary Figure S1A) revealed an element absent from prior BacNa_v structures, a long helical cytoplasmic tail (Figures 1A and 2A). The Na_vAe1p tetramer forms the asymmetric unit and is packed in the crystal lattice such that the crystallographic axes are not coincident with the channel four-fold symmetry axis (Supplementary Figure S1B, Supplementary Table S1). Model building and refinement ($R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ 21.6 / 26.3, Table S1) showed that the pore-lining S6 helix continues for one turn after Met241, the intracellular pore constriction point (Figure 2A). A 40° bend at His245 follows and leads to a continuous helix that terminates with a four-stranded, parallel coiled-coil encompassing residues Leu265-Ser285 (Supplementary Table S2). The clear quality differences between electron density maps calculated using data resolution cutoffs based on traditional (Supplementary Figure S1C) versus CC metrics (Supplementary Figure S1D) strongly support the choice of resolution cutoff based on CC values. The obvious differences in map quality reinforce the assertion that adherence to traditional metrics for defining resolution limits can result in the omission of useful diffraction data^{37; 38}.

The cytoplasmic tail is considerably longer than the pore-forming region (~65Å vs. ~40Å, respectively). Consequently, Na_vAe1p spans ~110Å in the axial dimension and resembles the general architecture of a NaK-Na_vSulP chimera²⁹ and the full-length KcsA potassium channel³⁹ (Figure 2B and 2C, respectively). The coiled-coil is common among BacNa_vS²⁸ and is thought to participate in channel assembly^{28; 30}. Its location, C-terminal to a segment that trails S6, is reminiscent of similar domains from eukaryotic Kv7 (KCNQ)^{40; 41} and TRP channels⁴² and agrees with predictions²⁸ and a similar structure in the NaK-Na_vSulP chimera²⁹ (Figure 2B).

The cytoplasmic tail arrangement resembles the stems of a flower bouquet. Individual helices interact extensively at the C-terminal base throughout the eighteen-residue coiled-coil but splay apart above Met267 into individual helical stems that connect the coiled-coil to S6 (Figure 2D). This region, termed the 'neck' (Figures 1A and 2A), extends over six helical turns. The distance between the C α positions and the superhelix axis widens from ~7Å in the coiled-coil to ~9Å in the neck (Figure 2D). The neck showed another unexpected feature, a large electron density that anomalous scattering indicated as a metal ion (Supplementary Figure S2A). B-factors indicate that the neck is as well ordered as other parts of the structure with the exception of the region near the neck ion (Supplementary Figure S2B).

Comparison of Na_vAe1p with a chimera between the nonselective NaK channel and the BacNa_v Na_vSulP coiled-coil²⁹ shows good agreement in the coiled-coils (Figure 2B and E, Table S3) (RMSD C α = 1.2 Å for the tetramer). Contrastingly, the corresponding KcsA region, where there is no superhelical coil (Supplementary Table S2), poorly matches the Na_vAe1p coiled-coil (Figures 2C and 2F, Supplementary Table S3) and reveals an unexpected diversity in how seemingly similar cytoplasmic domains can assemble. The essentially continuous helical conformation from S6 to the coiled-coil is contrary to predictions from circular dichroism and sequence analysis suggesting that this BacNa_v region is disordered²⁸. Notably, the neck has an abundance of charged and polar residues (15/20 residues) (Figures 1C and 2G). This density of hydrophilic residues may be important for neck function.

Comparison of Na_vAe1p pore region with other BacNa_v structures

Na_vAe1p conforms to expectations for a closed conformation as the selectivity filter is not collapsed and the intracellular gate is closed (Figure 3A-B, Figure S2C). Overall, the PD

superposes well with other BacNa_Vs (Figure 3C, Table S3). Despite the VSD absence, S5 has position similar to that seen in Na_VAb and is only substantially different than S5 of Na_VRh, which is the outlier of currently known BacNa_V structures. The main variations from other BacNa_Vs lie in the C-terminal ends of S6 from the putative inactivated Na_VAb conformation¹⁶ and Na_VMs pore²⁰ (Figure 3C, and Figure S3).

Na_VAe1p has a wide extracellular funnel that connects through the selectivity filter to the central cavity (Figure 3A). Side chain oxygens of selectivity filter residue Ser198 form the narrowest extracellular constriction (pore radius, 1.6Å) (Figure 3B). This is larger than that seen at the analogous Na_VRh position (pore radius, 1.1Å), where the filter is closed¹⁷, but is not as wide as in Na_VAb (pore radius, 2.3Å)¹⁵ (Figure 3B, Figure S4). It is important to point out that the structure of Na_VMs has a diameter that is close to that of the other BacNa_Vs (Figure 3B) due the similarity of its backbone positions with the other BacNa_V structures (Supplementary Table S3). The remaining differences for Na_VMs are largely due to the fact that the Na_VMs structure has incomplete sidechains at seven out of eight of the positions that correspond to the Na_VAe1p residues that constrict the inner cavity, Phe233 and Ile 237 (Figure 3A), and truncates in three of the subunits before the portion that corresponds to Na_VAe1p Met241. The inner diameter of all of the solved structures contrasts to that of the open state model Na_VMs_{OM} that is generated from the most deviant subunit in the Na_VMs structure (Figure 3B)²⁰.

The inside of the selectivity filter abuts an aqueous cavity that includes lateral openings to the membrane and that ends in a constriction formed by S6 residues Phe223, Ile237, and Met241 (Figure 3A-B), positions largely conserved among BacNa_Vs (Figure 1C). Both the presence of Fo-Fc electron density (Figure 3D) and a sidechain sulfur difference anomalous signal (Supplementary Figure S2A) support the placement of Met241 as the site of intracellular pore closure. This position corresponds to the suggested Na_VAb activation gate¹⁵ and strikingly, forms a closure point further along S6 than in all but the initial Na_VAb structure (Figure 2B). It is notable that evaluation of possible boundaries of the lipid bilayer hydrophobic portion⁴³ suggests that unlike other BacNa_V structures, the Na_VAe1p activation gate region protrudes from the bilayer core into the zone comprising phospholipid head groups (Supplementary Figure S5).

Identification of the ‘outer ion’ binding site

We found a large positive electron density peak perched on the four-fold axis of the channel at the selectivity filter outer mouth (Figure 3E). Calculation of anomalous difference maps at 6.5Å revealed a strong peak (11σ) indicating the presence of a non-protein anomalous scatterer (Figure 3F, Supplementary Figure S6A-S6C). Recognizing there could be challenges in identifying this peak due to the data resolution, we searched for other evidence that it represented an ion and not noise or some other possibility. We found a similar non-protein anomalous scatterer at the exact same location in a second lower resolution (3.8Å) data set (Na_vAe1p, Crystal II, Supplementary Table S1, Supplementary Figure S6B) obtained from a crystal grown using the same high calcium (200 mM CaCl₂) conditions as the crystal that yielded the 3.46Å resolution data set. By contrast, there was no anomalous peak at this location in maps calculated from crystals grown without calcium (Supplementary Figures S1E and S6B). In all three cases, the maps, which are all calculated at the same resolution (6.5Å), showed strong evidence for the neck ion. Finally, structural studies of the H245G mutant, in which crystals were grown in the absence of calcium and in the identical spacegroup as Na_vAe1p Crystal I and Crystal II (Supplementary Figure S6B), gave no evidence for the selectivity filter ion. Given these multiple lines of evidence that the anomalous peak at the selectivity filter outer mouth depends on the presence of calcium, we assigned this density as a calcium ion.

Inclusion of the ion alone in the refinement left substantial unaccounted electron density. Taking into account the ion position and likelihood that it is partly solvated, we modeled four waters using standard calcium coordination geometry (Figure 3E). We also found additional positive difference ($F_o - F_c$) electron density extending from the outer ion position through the selectivity filter along the four-fold channel axis; however, we were unable to model whether this arises from ions or solvent (Supplementary Figure S6C). The refined structure shows a partially hydrated calcium ion coordinated by four Na_vAe1p serine oxygens and four water molecules, giving a coordination number common to protein-Ca²⁺ complexes⁴⁴ and serine oxygen-Ca²⁺ distances (2.9Å -3.5Å) that are within those for calcium ions partially coordinated by protein ligands^{44; 45}.

We denote the calcium ion position as the ‘outer ion’ because it is separated from the previously reported selectivity filter inner ion position^{17; 35} by 10.7Å (Figure 3C). The outer ion site also does not correspond to the position of the unassigned selectivity filter density reported for Na_vMs²⁰. Observation of the outer ion binding site, together with the strong structural

(Figure 3C) and sequence similarity (Figure 1C) of the region and previous identification of an inner ion site establishes that BacNa_v selectivity filters have more than one ion binding site. Sodium and calcium ions have similar radii (0.95Å vs. 0.99Å, respectively) and coordination geometries². Hence, the outer ion position appears to mark the site of entry and partial dehydration as the ion passes into the selectivity filter.

To facilitate comparison among Na_v, Ca_v, and BacNa_v selectivity filters, we denote the residue corresponding to the mammalian Na_v 'DEKA' motif² and the conserved glutamates in Ca_vs^{2; 33} and BacNa_vs (Figure 1C) as position '0'. Other residues are numbered positively or negatively relative to this residue (Figure 4A). Hence, the Na_vAe1p Ser198 (+1) sidechain oxygens coordinate the outer ion (Figure 3E). Comparison of BacNa_v and Ca_v selectivity filter sequences revealed that the (+1) position is strictly conserved as an acidic residue in Ca_v domain II selectivity filters (Figure 4B). This (+1) position had not been previously implicated in Ca_v selectivity. As it plays a role in BacNa_v calcium selectivity^{19; 46}, the compelling similarities together with the observation of a bound calcium ion prompted us to examine the role of the (+1) position in a mammalian Ca_v.

Outer ion site is important for mammalian Ca_v ion binding

Calcium selectivity in Ca_vs is thought to arise from the interaction of permeant calcium ions with a ring of selectivity filter (0) position glutamates^{33; 47}. Following experiments that first demonstrated the importance of the (0) position glutamates³³, we used two-electrode voltage clamp to measure calcium block of lithium currents through human cardiac Ca_v1.2 channels expressed in *Xenopus* oocytes and examined how (+1) position mutations in domain II affect the high affinity calcium site. In contrast to previous reports³³, we found that D707N channels exhibited a reduction in the apparent calcium affinity relative to wild type (IC₅₀ 11.3 ± 2.0 μM, and 1.9 ± 0.2 μM, D707N and wild-type, respectively) (Figure 4C-D). This change was equivalent to that caused by the charge neutralization E1115Q (IC₅₀ 15.1 ± 1.9 μM), the (0) position glutamate neutralization having the largest reported impact on the high affinity site^{33; 47}. Changing D707 to alanine to mimic the corresponding Ca_v domain IV position caused a reduction in apparent affinity similar to D707N (IC₅₀ 13.6 ± 2.1 μM). Complete removal of the D707 sidechain by D707G to mimic the equivalent position of Ca_v domains I and III caused an even greater reduction in calcium binding (IC₅₀ 22.8 ± 6.7 μM). The magnitude of the effects of the D707 neutralizations are striking as this position is much more exposed to bulk solvent

than the (0) position glutamate and strongly suggest that the effects of the D707 mutation are through direct interaction with Ca^{2+} rather than a indirect consequence of electrostatic environment alteration. These data demonstrate the importance of a previously unrecognized calcium binding determinant of mammalian Ca_v s. These findings underscore the similarities between selectivity filters of homomeric BacNa_v s and their more distant eukaryotic relatives, which have four non-identical selectivity filter repeats.

S6 activation gate residue and neck are important for BacNa_v gating

Observation of a complete BacNa_v cytoplasmic domain connected to a closed pore prompted us to test how the newly described channel elements (Figure 5A) contribute to function. In line with the low success rate of BacNa_v functional expression^{12; 17}, our initial attempts to measure currents from full-length $\text{Na}_v\text{Ae1}$ using transfected mammalian cells or mRNA injected *Xenopus* oocytes failed. Therefore, we turned to $\text{Na}_v\text{Sp1}$, a previously characterized *Silicibacter pomeroyi* homolog¹² (Figures 1C and 5B).

As prior structural studies have not achieved consensus regarding which S6 residues close the intracellular side of the pore (Figure 3B), we first examined the $\text{Na}_v\text{Sp1}$ S6 positions equivalent to those that narrow the $\text{Na}_v\text{Ae1p}$ intracellular side (Figure 3A). Alanine substitution in each of the two helical turns above the constriction site, $\text{Na}_v\text{Ae1p}$ F233 and I237 ($\text{Na}_v\text{Sp1}$ L212A and I216A) (Figures 3A and 5A, Supplementary Figure S7A), did not affect the voltage-dependence of activation ($V_{1/2,\text{act}}$) ($\Delta V_{1/2,\text{act}} = -1.0 \pm 4.5$ and -0.4 ± 4.8 mV, respectively) (Figure 5C, Table 1). However, these mutants did shift the voltage-dependence of inactivation ($V_{1/2,\text{inact}}$) to more negative potentials ($\Delta V_{1/2,\text{inact}} = -14.8 \pm 4.3$ and -14.0 ± 3.8 mV, respectively) (Figure 5C, Table 1), decreased the inactivation time constants, and accelerated recovery from inactivation (Supplementary Figures S7B and S7C). By contrast, alanine substitution of the position equivalent to the pore occlusion point, $\text{Na}_v\text{Ae1p}$ Met241 ($\text{Na}_v\text{Sp1}$, M220A) (Figures 3A and 5A) caused dramatic negative shifts in both $V_{1/2,\text{act}}$ and $V_{1/2,\text{inact}}$ ($\Delta V_{1/2,\text{act}} = -49.8 \pm 3.3$ mV and $\Delta V_{1/2,\text{inact}} = -40.0 \pm 3.5$ mV)(Figure 5D, Table 1), but left the inactivation time constants and recovery from inactivation unaltered (Supplementary Figures S7B-C). The major effect of $\text{Na}_v\text{Sp1}$ M220A on $V_{1/2,\text{act}}$ contrasted against the absence of $V_{1/2,\text{act}}$ changes from mutation of residues further into the central cavity suggests a critical role for this position in stabilizing the closed state of the channel and indicates that the more distal positions are important for inactivation only.

Because of its direct structural connection to the activation gate, we next examined how the helical structure of the neck affected channel behavior by using a strategy of glycine substitutions to destabilize the helical conformation^{48; 49; 50}. Because BacNa_v necks have variable lengths, we focused on the most conserved region (Figure 1C). Similar to the S6 mutant Na_vSp1 M220A, single glycine substitutions at each of the three residues below the bend Na_vAe1p Ala248, Glu249, Asp250 (Na_vSp1, A226G, E227G, and D228G) caused a significant negative shift in $V_{1/2,act}$ (Figure 5E, Table 1, Figures S7D-E). By contrast, alanine substitutions at Na_vSp1 E227 and D228 yielded essentially wild-type channels (Figure 5E, Table 1, Supplementary Figures S7D-E), indicating that the glycine impact comes from increased flexibility rather than sidechain deletion. Increasing the consecutive numbers of Na_vSp1 neck glycines to two (residues 227-228), three (residues 226-228), and seven (residues 226-232) further facilitated activation gate opening that was coupled to negative shifts in $V_{1/2,inact}$ ($\Delta V_{1/2,act} = -25.3 \pm 2.6$, -35.0 ± 3.8 , and -40.7 ± 3.9 mV and $\Delta V_{1/2,inact} = -4.5 \pm 3.2$, -18.1 ± 3.6 and -22.1 ± 5.2 mV, for 2Gly, 3Gly and 7Gly, respectively)(Figures 5E and F, Table 1). The 2Ala mutant revealed that part of the shift caused by the 2Gly mutant arises from a synergistic effect of removing Na_vSp1 E227 and D228 simultaneously ($\Delta V_{1/2,act} = -15.7 \pm 3.4$ versus -25.3 ± 2.6 mV, for 2Ala and 2Gly, respectively (Figure 5E, Table 1) that indicates an additional role for these charges. Nevertheless, the 7Ala mutant had activation properties similar to wild-type and that strongly contrasted the large negative shifts in $V_{1/2,act}$ and $V_{1/2,inact}$ caused by 7Gly ($\Delta V_{1/2,act} = 4.7 \pm 4.4$ versus -40.7 ± 3.9 mV for 7Ala and 7Gly, respectively). The major negative shifts in $V_{1/2,act}$ produced by neck substitutions that are detrimental to helix formation strongly supports the idea that a structured neck is critical for closed state stabilization.

The majority of neck mutants causing negative shifts in $V_{1/2,act}$ also elicited negative shifts in $V_{1/2,inact}$ (Figure 5E, Table 1). However, unlike previously reported mutations in the Na_vSuP coiled-coil that slowed τ_{inact} by an order of magnitude or more²⁹, most of the neck mutants left τ_{inact} unperturbed (Supplementary Figures S7F-G). Of the few that did not (E227G, D228G, 2G, 7G, $P < 0.001$), none caused a perturbation larger than a factor of three. To examine this discrepancy further, we characterized Na_vSp1 R242E (Supplementary Figure S8), a substitution at a conserved position at the N-terminal end of the coiled-coil region that was reported cause a negative shift in $V_{1/2,act}$ and slow Na_vSuP inactivation by ~37-fold²⁹. Although Na_vSp1 R242E did cause a negative shift in $V_{1/2,act}$ (Table 1), unlike its Na_vSuP

counterpart, this change caused only a modest (~2.7-fold, $P = 0.04$) slowing of inactivation (Supplementary Figure S8D).

Finally, we tested the consequences of alanine and glycine substitutions at the bend, Na_vAe1p His245 (Na_vSp1, H224) (Figure 5G, Supplementary Figure S9A). Na_vSp1 H224A did not affect $V_{1/2,act}$ or $V_{1/2,inact}$ ($\Delta V_{1/2,act} = 2.8 \pm 4.2$, $\Delta V_{1/2,inact} = -5.4 \pm 4.8$ mV) (Figure 5G, Table 1), but did slow inactivation (~2-fold, $P < 0.001$) (Supplementary Figure S9B). In contrast, Na_vSp1 H224G spared $V_{1/2,act}$ and caused a large negative shift in $V_{1/2,inact}$ ($\Delta V_{1/2,act} = -4.5 \pm 3.9$ mV, $\Delta V_{1/2,inact} = -25.0 \pm 4.0$ mV) (Figure 5G, Table 1). Although local disorder (Supplementary Figure S2B) precluded us from modeling the Na_vAe1p His245 sidechain, this residue could co-ordinate the neck ion. To test the structural consequence of loss of this potential ligand, we determined a 5.8Å resolution structure of Na_vAe1p H245G crystallized from a low calcium condition (Supplementary Table S1). The structure showed no major changes from wild-type except for the loss of anomalous density for the neck ion and outer ion (Supplementary Figure S8C)(RMSD $C\alpha = 0.5$ Å for the tetramer relative to wild-type). Hence, the bend residue appears to be important for neck ion coordination but the neck ion is not essential for the bend structure or helical character of the neck.

Our structure-based mutational studies uncovered two functional phenotypes. Mutations in the activation gate and neck having negative shifts in $V_{1/2,act} \geq -20$ mV also caused negative shifts in $V_{1/2,inact}$, suggesting that the two processes are strongly coupled. Mutations at S6 residues above the activation gate and bend residue H224, selectively impacted $V_{1/2,inact}$ (Table 1). Together, these data support the ideas that (i) the Na_vAe1p structure represents a closed state, (ii) destabilization of the neck facilitates channel opening, and (iii) residues in S6 above the constriction site and at the bend are important for the molecular transitions underlying inactivation.

Neck destabilization allows Na_vAe1 functional characterization

Having established the importance of the neck helical structure for closed state stabilization, we revisited Na_vAe1 functional studies to test whether glycine substitution in the neck would permit us to record from full-length channels. Indeed, Na_vAe1 channels bearing the 3Gly mutation (residues 248-250) produced voltage-dependent channels (Figure 6A-B). These had a $V_{1/2,act}$ similar to Na_vSp1 but ~40 mV more positive than the equivalent Na_vSp1 3Gly mutant

($V_{1/2,act} = 32.1 \pm 2.8$, 27.4 ± 1.1 , and -7.6 ± 2.1 mV for Na_vAe1 3Gly, Na_vSp1, and Na_vSp1 3Gly, respectively). These results further support the idea that the neck helical structure is important for closed state stabilization and suggest that wild-type Na_vAe1 has a very positive $V_{1/2,act}$ of activation that had prevented functional characterization.

The ability to record from Na_vAe1 3Gly allowed us to test the functional properties of the Na_vAe1 selectivity filter defined by our structure. In agreement with the strong selectivity filter conservation (Figure 1C), biionic recording experiments (Figures 6C-D) showed that Na_vAe1 has selectivity properties similar to other BacNa_vs including Na_vSp1p¹⁹, the ‘pore-only’ version of Na_vSp1 ($P_{Ca}/P_{Na} = 0.07 \pm 0.02$ and 0.08 ± 0.01 , for Na_vAe1 3Gly and Na_vSp1p, respectively), and Na_vBh1 (NachBac)⁴⁶. Due the relatively low expression level of Na_vAe1 3Gly, we were restricted to this method of examining the permeability ratio. Hence, we validated the bionic measurement by determining the ion selectivity of full-length Na_vSp1 3Gly, which expresses much better than Na_vAe1 3Gly, by two methods, the biionic protocol used to examine Na_vAe1 3Gly and a tail current protocol (Supplementary Figure S10). Both methods gave the same P_{Ca}/P_{Na} ratio (0.05 ± 0.02 and 0.07 ± 0.02 , respectively) and agree with the values for Na_vAe1 3Gly and the ‘pore only’ Na_vSp1p. These results support the idea that the 3Gly mutation has minimal influence on selectivity. Thus, Na_vAe1 is a sodium selective channel.

Discussion

Structure determination of the 'pore-only' BacNa_v Na_vAe1p revealed previously uncharacterized BacNa_v architectural features that are important for function. The presence of the long, helical intracellular domain allowed the complete definition of S6, which extends into the intracellular side of the membrane (Supplementary Figure S5). Relative to all but the initial Na_vAb structure¹⁵, which contained pore-lining cysteine mutants near the activation gate that may have influenced S6 positioning, this structure places the intracellular gate more towards the S6 C-terminus (Figure 3B). It seems likely that the absence of a consensus among the prior BacNa_v structures in defining the site of this important channel element arises from the fact that they lack the intracellular domain. The structural plasticity of the intracellular gate seems a likely consequence of it being the central point of structural changes required for gating and inactivation. Our observations are not unlike those described for KcsA in which the full-length structure³⁹ showed that the activation gate closure point was more intracellular than defined from a structure lacking the intracellular domain⁵¹. The Na_vAe1p activation gate and subsequent helical extension of S6 should protrude beyond the boundaries of the hydrophobic portion of the lipid bilayer into the lipid headgroups (Supplementary Figure S5). This location may have important consequences as, based on voltage-gated potassium channel studies²⁶, it could allow the C-terminal portion of S6 to interact directly with the phospholipid headgroups in a way that could influence function. It might also permit interactions with the proposed S4-S5 linker closed state pose²⁶.

Our studies demonstrate that destabilizing the helical structure of the neck causes negative shifts in $V_{1/2,act}$. The largest perturbation, 7Gly in which two full helical turns of the neck are glycines, has effects that are of the same magnitude as activation gate disruption (Table 1). In both cases, there are parallel shifts in $V_{1/2,inact}$ that indicate that activation and inactivation are tightly coupled. Previous work with Na_vSulP showed that coiled-coil disruption slowed inactivation kinetics by more than an order of magnitude, suggesting that this structure as a role in accelerating inactivation²⁹. Unlike these effects, which were caused by disruption further from the pore, destabilization of the Na_vSp1 neck had minimal impact on inactivation time constants (Supplementary Figures S7F-G). Moreover, examination of a coiled-coil mutation, R242E, equivalent to one from Na_vSulP that caused a dramatic slowing of inactivation, negatively shifted $V_{1/2,act}$ but failed to produce a similar effect on Na_vSp1 inactivation kinetics (Figure S8D). Thus, the major role of the neck is to stabilize the channel closed state.

Our studies lead us to propose the following model for BacNa_v gating (Figure 7). In the closed state, represented by the Na_vAe1p structure (Figure 1), the intracellular side of the channel central pore is occluded by the activation gate residue constriction (Na_vAe1p M241). Opening would proceed with a radial expansion of this region¹⁵ accompanied by an order→disorder transition in the neck. The neck region is a site of potential disorder²⁸. The abundance of polar and charged neck residues (Figure 2G) may aid the transition to this state and assist in permeant ion escape into the cytoplasm (Figure 7). Whether such a state resembles the proposed BacNa_v open state model²⁰ is unclear, as much of the end of S6, including the activation gate equivalent of Na_vAe1p Met241 is absent from the Na_vMs structure. Eukaryotic Na_vs and Ca_vs lack an equivalent of the C-terminal tail; however, the prevalence of similarly located C-terminal coiled-coil domains among diverse eukaryotic VGICs^{40; 41; 42} and the importance of the intervening region that connects S6 to the coiled-coils for channel regulation by a diverse factors^{52; 53} suggests that the essence of this proposed BacNa_v mechanism has parallels in eukaryotic VGICs.

The ionic radii and coordination geometries of sodium and calcium ions are similar². Hence, the Na_vAe1p outer ion position, revealed by calcium, appears to mark the site of entry and partial dehydration as the permeant ion interacts with the (+1) residues and passes into the selectivity filter. This role in ion coordination agrees with the observation that a single S→D change at the NaChBac (Na_vBh1) (+1) position alters selectivity for calcium over sodium by ~200 fold⁴⁶ and with simulations suggesting that residues forming the outer ion site may be involved in ion recruitment³⁵. The outer ion site may also participate in the divalent ion block described for NaChBac (Na_vBh1)^{11; 17} and the NaChBac/Na_vRh selectivity filter chimera¹⁷ as it corresponds well with the predicted 'site 1' blocking site from molecular dynamics simulations³⁵. It is also striking that structural changes at the (+1) serine cause substantial alterations to the size of the selectivity filter entrance in the putative inactivated conformation of Na_vAb¹⁶ and in Na_vRh, where the (+1) serine occludes the pore (Figure S4). Thus, this outer ion site may not only be important for engagement of permeant and blocking ions but may participate in rearrangements leading to slow inactivation⁵⁴.

Observation of an outer ion binding site in the selectivity filter together with the prior discovery of a selectivity filter inner ion site¹⁷ (Figure 3C) and strong sequence and structural conservation of this region (Figures 1C and 3C) shows that BacNa_v selectivity filters possess more than one ion binding site. It seems possible, especially given the ~10Å separation

between outer and inner ion sites, that multiple ions may occupy the selectivity filter simultaneously. This situation would be tantalizingly close to accepted ideas regarding multi-ion pores in mammalian Na_v and Ca_v counterparts^{2; 31; 32; 34}, not unlike that of potassium channels⁵⁵, in line with recent computational studies of BacNa_v filters⁵⁶, and argues against the single ion pore model suggested in the initial BacNa_v structure analysis¹⁵.

Identification of the outer ion binding site uncovered a previously unknown role for the analogous conserved (+1) position in mammalian Ca_vs as an important determinant for calcium selectivity. Notably, despite its more exposed location, the impact of neutralization of the (+1) position is equivalent to that of neutralization of the (0) position glutamate that resides deeper in the selectivity filter (Figure 4D), strongly suggesting that it may interact directly with the permeant ion. These results demonstrate a deep commonality between BacNa_vs and eukaryotic voltage-gated channels that should facilitate understanding ion permeation and gating in the superfamily.

Materials and methods

Crystallization

Na_vAe1p was expressed and purified in β -dodecyl maltoside (DDM) as described¹⁹. For high calcium-condition crystals, purified protein was concentrated to 15 mg ml⁻¹ by centrifugal filtration (Amicon® Ultra-15 100-kDa MW cutoff, Millipore) and mixed with 5M trimethylamine oxide (TMAO^{57; 58}) creating a solution of 13.5 mg ml⁻¹ protein, 0.25 mM DDM, 0.5M TMAO, 200 mM NaCl, 20 mM Na-HEPES, pH8.0. The protein was crystallized using hanging-drop vapor diffusion at 4°C over a reservoir of 200 mM CaCl₂, 30% PEG 400, 100 mM Na-acetate, pH 5.0. 0.7 μ l of protein-TMAO solution was laid on a 0.7 μ l drop of mother liquor that had been mixed with agarose to a final concentration of 0.25% and left to solidify at room temperature for 1 min. 1222 crystals grew from precipitate to a final size of ~200x 70 x 15 μ m after three weeks.

For low calcium condition crystals, protein was concentrated to 13.5 mg ml⁻¹ (Amicon® Ultra-15 100-kDa MW cutoff, Millipore) following exchange into 0.25 mM DDM, 200 mM NaCl, 20 mM Na-HEPES, pH 8.0, during the last size exclusion chromatography purification step. P4₂ crystals were grown by hanging drop vapor diffusion at 4°C from equal volumes of protein reservoir solution of 200 mM MgCl₂, 30% polyethylene glycol (PEG) 400, 100 mM MES, pH 6.5. Crystals appeared in 2 days, grew to ~200 x 50 x 50 μ m in ~two weeks.

Na_vAe1p H245G was expressed and was purified as Na_vAe1p¹⁹ using a final size-exclusion chromatography buffer of 0.3 mM DDM, 200 mM NaCl, 2mM MgCl₂, 20 mM Na-HEPES, pH 8.0. Purified protein was concentrated to 13.5 mg ml⁻¹ (Amicon® Ultra-15 100-kDa MW cutoff, Millipore). 1 μ l hanging drops were set-up at 4°C using a 24 well VDX Plate™ (Hampton Research) over a reservoir of 28% PEG 400, 100 mM Na acetate, pH 4.5. 1222 crystals grew overnight and reached maximal proportions of ~300 X 75 X 15 μ m after two weeks.

Data collection, structure determination and refinement

Crystals were frozen directly into liquid N₂ for data collection. Diffraction data were collected at Advanced Light Source Beamline 8.3.1, Lawrence Berkeley National Laboratory, integrated with MOSFLM 7.0.4⁵⁹, and scaled with SCALA (3.3.20)⁶⁰. Phase information was obtained by molecular replacement with an ensemble model based on the 3RVY, 4DXW, and 4EKW pore domains using Phaser (2.1.4)⁶¹. Model was improved using cycles of manual rebuilding, Coot (0.7)⁶², and refinement, Refmac (5.7.32)⁶³. NCS-averaged maps improved apparent electron

density and allowed placing of most of the side chains. For the high calcium structure, initial tight NCS restraints were employed and later relaxed for all segments except for residues 183-208 and 214-220. For both the low calcium structure and the Na_vAe1p H245G mutant tight NCS restraints were employed throughout.

Two electrode voltage-clamp electrophysiology

Human Ca_v1.2 (α_1 C77, GenBank CAA84346), rat Ca_v β_{2a} (GenBank NP 446303), and Ca_v $\alpha_2\delta$ -1 (GenBank NM_00182276) were used for two-electrode voltage clamp experiments in *Xenopus* oocytes. Mutations were introduced using Quikchange (Stratagene). Linearized cDNA was translated into capped mRNA using the T7 mMessage kit (Ambion). 50 nl of Ca_v1.2 α_1 , Ca_v β_{2a} , and Ca_v $\alpha_2\delta$ -1 mRNA at a 1:1:1 molar ratio were injected into *Xenopus* oocytes. Two-electrode voltage-clamp experiments were performed 2 to 3 days post-injection. Oocytes were injected with 50 nl of 100 mM BAPTA 4' before recording to minimize calcium-activated chloride currents. Recording solutions contained 100mM LiOH, Ca(NO₃)₂ at the concentration indicated, and 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.4 using HNO₃. Ca²⁺ concentrations were verified using a Ca²⁺ electrode. The solution with a nominal free Ca²⁺ concentration of 3nM contained 170 μ M Ca(NO₃)₂ and 15 mM EGTA. Buffered solutions with nominal free Ca²⁺ concentrations of 100nM, 300 nM, and 1 μ M were also tested and gave results similar to the corresponding solutions in which Ca²⁺ was not buffered by EGTA. Electrodes were filled with 3M KCl and had resistances of 0.3-1.0 M Ω . Recordings were conducted at room temperature from a holding potential of -90 mV. Leak currents were subtracted using a P/4 protocol. Currents were analyzed with Clampfit 8.2 (Axon Instruments). All results are from at least two independent oocyte batches. Dose-response curves were calculated as follows: $I_x/I_{3nM\text{Ca}} = 1/(1+x/IC_{50})$, where I_x is current at the Ca²⁺ concentration x and IC₅₀ is the half-maximal inhibitory concentration.

Patch-Clamp electrophysiology

BacNa_vs from *Silicibacter pomeroyi*, NavSp1, and *Alkalilimnicola ehrlichei*, Na_vAe1, were cloned into the pIRES2-EGFP vector (Clontech, Mountain View, CA). All the Na_vSp1 mutants were made using the QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) and sequenced before recordings. Human embryonic kidney cells (HEK 293) were grown at 37 °C under 5% CO₂, in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 10% L-glutamine and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin), (UCSF Cell Culture Facility). HEK 293 cells were transfected (in 35 mm

diameter wells) with LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA and plated onto coverslips coated with Matrigel (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). 2 µg of DNA was used except for the L212A and I216A for which 4 µg of DNA was used to increase current amplitude.

Transfected cells were identified visually enhanced green fluorescent protein (EGFP) expression. Whole cell patch-clamp⁶⁴ was used to record Na⁺ current at room temperature (23 ± 2 °C) 48-72 h post-transfection. Acquisition and analysis were performed using pCLAMP 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (TW150F-3, WPI, Sarasota, USA) and polished (MF-900 microforge, Narishige, Tokyo, Japan) to obtain 2-3 MΩ resistances. Sixty to eighty percent of the voltage error due to the series resistance was compensated. Unless stated otherwise, pipette solution contained, in mM: 120 Cs-methane sulfonate, 8 NaCl, 10 EGTA, 2 Mg-ATP, and 20 HEPES (pH 7.4 with CsOH). Bath solution contained, in mM: 155 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 KCl, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.4 with NaOH).

For reversal potential measurements to determine the Na⁺ and Ca²⁺ relative permeabilities, pipette solution contained, in mM: 100 Na-Gluconate, 10 NaCl, 10 EGTA, 20 HEPES (pH 7.4 adjusted with NaOH, [Na] total 130). External solution was, in mM: 5 NMDG-Cl, 100 CaCl₂, 20 HEPES (pH 7.4 adjusted with CaOH, [Ca] total 107.5). The permeability ratio of Ca²⁺ over Na⁺ was estimated using the following equation:

$$P_{Ca} / P_{Na} = a_{si} [\exp (E_{rev}F / RT)] [\exp(E_{rev}F/RT) + 1] / (4a_{se}),$$

where R, T, F, and E_{rev} are the gas constant, absolute temperature, Faraday constant, and reversal potential, respectively (i, internal; e, external)². Ca²⁺ and Na⁺ activity coefficients were estimated as follows:

$$a_s = \gamma_s [X_s],$$

where activity, a_s, is the effective concentration of an ion in solution, s related to the nominal concentration [X_s] by the activity coefficient γ_s. γ_s was calculated from the Davies equation. The calculated activity coefficients were γ_{(Na)i} = 0.76 and γ_{(Ca)e} = 0.33. The liquid junction potentials

were calculated by the JPCalc program (P. Barry) within Clampex (Molecular Devices) and taken into account to determine E_{rev} .

Accession codes

Crystallographic coordinates and structure factors are deposited with the PDB will be released immediately upon publication: 4LTO, Na_vAe1p, crystal I, high calcium; 4LTP, Na_vAe1p, crystal II, high calcium; 4LTQ, Na_vAe1p, low calcium; 4LTR, Na_vAe1p H245G, low calcium.

Acknowledgements

We thank Christine Rumpf for expert molecular biology assistance and J. Holton and G. Meigs at ALS 8.3.1 for data collection assistance. We thank K. Brejc, L. Jan, and E. Reuveny for helpful manuscript comments, and Minor lab members for support throughout these studies. This work was supported by grants to D.L.M. from NIH R01-HL080050, R01-DC007664, and U54-GM094625 and the American Heart Association 0740019N, an American Heart Association Postdoctoral Fellowship to D.S., and Fulbright Scholarship and a Monahan Foundation Fellowship to F. A.-A. G. L. was supported by a Marie Curie International Outgoing Fellowship within the 7th European Community Framework Programme. D.L.M. is an AHA Established Investigator.

Author contributions

D.S, F.F., and D.L.M. conceived the study and designed the experiments. D.S., F.F., F.A.-A., S.W., and S.R. performed the experiments. D.S. S.W. and S.R. purified the proteins. D.S. grew the crystals and collected diffraction data. D.S. and F.F. solved and refined the structures and analyzed the data. F.F. F.A.-A., and C.A. designed and performed electrophysiological experiments and analyzed the data. G. L. and D.L.M. supervised the electrophysiology and analyzed data. D.L.M. analyzed data and provided guidance and support throughout. D.S., F.F., F.A.-A., C.A., G.L. and D.L.M. wrote the paper.

Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

References

1. Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**, 13-25.
2. Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd edit, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
3. Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D. S. & Avoli, M. (2010). Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* **9**, 413-24.
4. Bhattacharya, A., Wickenden, A. D. & Chaplan, S. R. (2009). Sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics* **6**, 663-78.
5. Etheridge, S. M. (2010). Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* **56**, 108-22.
6. Yu, F. H. & Catterall, W. A. (2004). The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* **2004**, re15.
7. Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A. & Catterall, W. A. (2005). Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev* **57**, 387-95.
8. Heinemann, S. H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K. & Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **356**, 441-3.
9. Favre, I., Moczydlowski, E. & Schild, L. (1996). On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel. *Biophys J* **71**, 3110-25.
10. Tang, S., Mikala, G., Bahinski, A., Yatani, A., Varadi, G. & Schwartz, A. (1993). Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel. *J Biol Chem* **268**, 13026-9.
11. Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q. & Clapham, D. E. (2001). A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science* **294**, 2372-5.
12. Koishi, R., Xu, H., Ren, D., Navarro, B., Spiller, B. W., Shi, Q. & Clapham, D. E. (2004). A superfamily of voltage-gated sodium channels in bacteria. *J Biol Chem* **279**, 9532-8.
13. Irie, K., Kitagawa, K., Nagura, H., Imai, T., Shimomura, T. & Fujiyoshi, Y. (2010). Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* **285**, 3685-94.
14. Charalambous, K. & Wallace, B. A. (2011). NaChBac: the long lost sodium channel ancestor. *Biochemistry* **50**, 6742-52.
15. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353-8.
16. Payandeh, J., Gamal El-Din, T. M., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W. A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* **486**, 135-9.
17. Zhang, X., Ren, W., DeCaen, P., Yan, C., Tao, X., Tang, L., Wang, J., Hasegawa, K., Kumasaka, T., He, J., Clapham, D. E. & Yan, N. (2012). Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* **486**, 130-4.
18. McCusker, E. C., D'Avanzo, N., Nichols, C. G. & Wallace, B. A. (2011). A simplified bacterial "Pore" provides insight into the assembly, stability and structure of sodium channels. *J Biol Chem* **286**, 16386-91.

19. Shaya, D., Kreir, M., Robbins, R. A., Wong, S., Hammon, J., Bruggemann, A. & Minor, D. L., Jr. (2011). Voltage-gated sodium channel (NaV) protein dissection creates a set of functional pore-only proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12313-8.
20. McCusker, E. C., Bagneris, C., Naylor, C. E., Cole, A. R., D'Avanzo, N., Nichols, C. G. & Wallace, B. A. (2012). Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nat Commun* **3**, 1102.
21. Caprini, M., Ferroni, S., Planells-Cases, R., Rueda, J., Rapisarda, C., Ferrer-Montiel, A. & Montal, M. (2001). Structural compatibility between the putative voltage sensor of voltage-gated K⁺ channels and the prokaryotic KcsA channel. *J Biol Chem* **276**, 21070-6.
22. Lu, Z., Klem, A. M. & Ramu, Y. (2001). Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* **413**, 809-13.
23. Lu, Z., Klem, A. M. & Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol* **120**, 663-76.
24. Arrigoni, C., Schroeder, I., Romani, G., Van Etten, J. L., Thiel, G. & Moroni, A. (2013). The voltage-sensing domain of a phosphatase gates the pore of a potassium channel. *J Gen Physiol* **141**, 389-95.
25. Long, S. B., Campbell, E. B. & Mackinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897-903.
26. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* **450**, 376-82.
27. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* **423**, 33-41.
28. Powl, A. M., O'Reilly, A. O., Miles, A. J. & Wallace, B. A. (2010). Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy-defined structure of the C-terminal domain of NaChBac and its role in channel assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14064-9.
29. Irie, K., Shimomura, T. & Fujiyoshi, Y. (2012). The C-terminal helical bundle of the tetrameric prokaryotic sodium channel accelerates the inactivation rate. *Nat Commun* **3**, 793.
30. Mio, K., Mio, M., Arisaka, F., Sato, M. & Sato, C. (2010). The C-terminal coiled-coil of the bacterial voltage-gated sodium channel NaChBac is not essential for tetramer formation, but stabilizes subunit-to-subunit interactions. *Prog Biophys Mol Biol* **103**, 111-21.
31. Begenisich, T. (1987). Molecular properties of ion permeation through sodium channels. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **16**, 247-63.
32. Tsien, R. W., Hess, P., McCleskey, E. W. & Rosenberg, R. L. (1987). Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **16**, 265-90.
33. Yang, J., Ellinor, P. T., Sather, W. A., Zhang, J. F. & Tsien, R. W. (1993). Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature* **366**, 158-61.
34. Hess, P. & Tsien, R. W. (1984). Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* **309**, 453-6.
35. Zhang, X., Xia, M., Li, Y., Liu, H., Jiang, X., Ren, W., Wu, J., Decaen, P., Yu, F., Huang, S., He, J., Clapham, D. E., Yan, N. & Gong, H. (2012). Analysis of the selectivity filter of the voltage-gated sodium channel Na(v)Rh. *Cell Res*.

36. Carnevale, V., Treptow, W. & Klein, M. L. (2011). Sodium Ion Binding Sites and Hydration in the Lumen of a Bacterial Ion Channel from Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2**, 2504-2508.
37. Karplus, P. A. & Diederichs, K. (2012). Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**, 1030-3.
38. Evans, P. R. & Murshudov, G. N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 1204-14.
39. Uysal, S., Vasquez, V., Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F. A., Sidhu, S. S., Koide, S., Perozo, E. & Kossiakoff, A. (2009). Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6644-9.
40. Howard, R. J., Clark, K. A., Holton, J. M. & Minor, D. L., Jr. (2007). Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy. *Neuron* **53**, 663-75.
41. Wiener, R., Haitin, Y., Shamgar, L., Fernandez-Alonso, M. C., Martos, A., Chomsky-Hecht, O., Rivas, G., Attali, B. & Hirsch, J. A. (2008). The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multitiered scaffold for subunit assembly and protein interaction. *J Biol Chem* **283**, 5815-30.
42. Tsuruda, P. R., Julius, D. & Minor, D. L., Jr. (2006). Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* **51**, 201-12.
43. Lomize, M. A., Lomize, A. L., Pogozheva, I. D. & Mosberg, H. I. (2006). OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* **22**, 623-5.
44. Pidcock, E. & Moore, G. R. (2001). Structural characteristics of protein binding sites for calcium and lanthanide ions. *J Biol Inorg Chem* **6**, 479-89.
45. Zheng, H., Chruszcz, M., Lasota, P., Lebioda, L. & Minor, W. (2008). Data mining of metal ion environments present in protein structures. *J Inorg Biochem* **102**, 1765-76.
46. Yue, L., Navarro, B., Ren, D., Ramos, A. & Clapham, D. E. (2002). The cation selectivity filter of the bacterial sodium channel, NaChBac. *J Gen Physiol* **120**, 845-53.
47. Parent, L. & Gopalakrishnan, M. (1995). Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca²⁺ channel. *Biophys J* **69**, 1801-13.
48. Findeisen, F. & Minor, D. L., Jr. (2009). Disruption of the IS6-AID Linker Affects Voltage-gated Calcium Channel Inactivation and Facilitation. *J Gen Physiol* **133**, 327-43.
49. Bagriantsev, S. N., Clark, K. A. & Minor, D. L., Jr. (2012). Metabolic and thermal stimuli control K(2P)2.1 (TREK-1) through modular sensory and gating domains. *EMBO J* **31**, 3297-308.
50. O'Neil, K. T. & DeGrado, W. F. (1990). A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* **250**, 646-51.
51. Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
52. Xu, Q., Chang, A., Tolia, A. & Minor, D. L., Jr. (2013). Structure of a Ca(2+)/CaM:Kv7.4 (KCNQ4) B-helix complex provides insight into M current modulation. *J Mol Biol* **425**, 378-94.
53. Haitin, Y. & Attali, B. (2008). The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *J Physiol* **586**, 1803-10.
54. Pavlov, E., Bladen, C., Winkfein, R., Diao, C., Dhaliwal, P. & French, R. J. (2005). The pore, not cytoplasmic domains, underlies inactivation in a prokaryotic sodium channel. *Biophys J* **89**, 232-42.

55. Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. & MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43-8.
56. Chakrabarti, N., Ing, C., Payandeh, J., Zheng, N., Catterall, W. A. & Pomes, R. (2013). Catalysis of Na⁺ permeation in the bacterial sodium channel NaVA_B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 11331-6.
57. Jiang, J., Lafer, E. M. & Sousa, R. (2006). Crystallization of a functionally intact Hsc70 chaperone. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**, 39-43.
58. Clarke, O. B., Caputo, A. T., Hill, A. P., Vandenberg, J. I., Smith, B. J. & Gulbis, J. M. (2010). Domain reorientation and rotation of an intracellular assembly regulate conduction in Kir potassium channels. *Cell* **141**, 1018-29.
59. Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter of Protein Crystallography* **26**.
60. Evans, P. R. (2011). An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 282-92.
61. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674.
62. Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-32.
63. Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-763.
64. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.
65. Chovancova, E., Pavelka, A., Benes, P., Strnad, O., Brezovsky, J., Kozlikova, B., Gora, A., Sustr, V., Klvana, M., Medek, P., Biedermannova, L., Sochor, J. & Damborsky, J. (2012). CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002708.

Figure 1 Structure of the *Alkalilimnicola ehrlichei* pore-only sodium channel protein Na_vAe1p **A**, Side view showing two transmembrane region subunits and four cytoplasmic tail subunits. Transmembrane helices S5 and S6 are colored in green and blue, respectively. P1 and P2 pore-helices are colored in olive. Selectivity filter is violet. Neck and coiled-coil are tan and orange, respectively. Calcium ion is a white sphere. Grey lines show approximate lipid bilayer boundaries. **B**, Na_vAe1p tetramer extracellular view. Colors are as in 'A'. **C**, Na_vAe1p secondary structure and alignment with BacNa_v pore domain sequences. Na_vAe1p secondary structure elements are indicated and colored as in 'A'. Selectivity filter position numbers are indicated relative to position '0', Na_vAe1p Glu197. '+' indicates the activation gate residue. '*' indicates position of the Na_vAe1p His245 bend. Vertical black dashed line indicates division between 'Neck' and 'Coiled-coil'. Colored bars indicate: selectivity filter (+1) position, red; S6 pore lining, blue; and coiled-coil core residues, orange. Positions of 3Gly and 7Gly neck mutants are indicated in brown. Grey letters show Na_vSuLP portion used in the NaK chimera ²⁹. Red vertical lines show crystallized Na_vMs pore-only construct boundaries ²⁰. Other sequences are: Na_vSp1p, *Silicibacter pomeroyi* ¹⁹; Na_vAb1p, *Alcanivorax borkumensis* ¹⁹; Na_vBh1 (NaChBac), *Bacillus halodurans* ¹¹; Na_vAb *Acrobacter butzleri* (GI 157737984)¹⁵; Na_vRh, *Rickettsiales sp.* (GI: 262276647)¹⁷, Na_vSuLP *Sulfitobacter pontiacus* (GI ZP_00961826.1)²⁹; and Na_vMs, *Magnetococcus sp.* (Uniprot ID A0L5S6)²⁰.

Figure 2 Na_vAe1p structure comparison and analysis **A**, Side view of a single Na_vAe1p monomer. Secondary structure elements are labeled and colored as in Figure 1. Select residue positions are indicated. **B**, C α superposition of the tetrameric Na_vSulP region of the NaK-Na_vSulP chimera ²⁹ (Na_vSulP portion, red; NaK portion, wheat) with equivalent parts of the Na_vAe1p neck and coiled-coil (colored as in Figure 1). One Na_vAe1p and NaK-Na_vSulP chimera monomer is shown in cartoon representation in front of the surface of three remaining Na_vAe1p subunits. **C**, C α superposition of the Na_vAe1p coiled-coil tetramer with the equivalent KcsA residues. One Na_vAe1p (colored as in Fig. 1) and KcsA (wheat) monomer is shown in cartoon representation in front of the surface of three remaining Na_vAe1p subunits. **D**, Plot of Na_vAe1p coiled-coil superhelix radius versus residue number. Neck and coiled-coil elements are shaded as in 'A'. **E**, Close-up of the coiled-coil regions of Na_vAe1p (orange) and Na_vSulP (red) used for superposition in 'B'. **F**, Close-up of the cytoplasmic parts of KcsA (left panel, wheat) and Na_vAe1p (neck, sand; coiled-coil, orange). **G**, Na_vAe1p electrostatic surface potential (+4kT (blue) to -4kT (red)) mapped on the channel van der Waals surface. Grey lines show approximate lipid bilayer boundaries.

Figure 3 Na_vAe1p pore region analysis **A**, Na_vAe1p Pore volume represented as a teal mesh calculated by CAVER⁶⁵. In order to show the central cavity, dummy atoms closed the side vestibules. S6 residues forming the narrow constriction are shown as sticks and labeled. Na_vAe1p elements are labeled as in Figure 1. **B**, Plot of channel radius versus distance along the central channel axis for closed Na_vAb¹⁵ (black), inactivated Na_vAb_{A/B}¹⁶ (light grey), Na_vRh¹⁷ (wheat), Na_vMs (dark red)²⁰, Na_vMs_{OM} (orange) open state model following²⁰, and Na_vAe1p (blue). Na_vAe1p constriction points caused by selectivity filter residue Ser198 and S6 residue Met241 are indicated. **C**, Backbone superposition of PDs of Na_vAb¹⁵ (black), Na_vAb_{A/B}¹⁶ (light grey), Na_vAb_{C/D}¹⁶ (medium grey), Na_vRh¹⁷ (wheat), Na_vMs²⁰ (dark red), and Na_vAe1p (colored as in 'A'). Outer ion from Na_vAe1p and inner ion from Na_vRh are shown as white and wheat spheres, respectively. Two subunits are shown. **D**, View from the intracellular side showing M241 sidechain Fo-Fc density. **E**, Outer ion site side view. Ca²⁺ (white sphere) is surrounded by four water molecules (red spheres), and Ser198 (+1) shown in sticks with 2F_O-F_C density surrounding the Ca²⁺ ion as a 1.0σ contoured blue mesh. **F**, Side view of outer ion anomalous difference density (blue mesh) calculated at 6.5 Å and contoured at 6.5σ. Glu197 (0) and Ser198 (+1) are indicated. Ca²⁺ is shown as a white sphere. The front channel monomer is removed for clarity.

Figure 4 Selectivity filter (+1) position is conserved in mammalian Ca_v s and important for ion binding **A**, Cartoon depiction of a single $\text{Na}_v\text{Ae1p}$ subunit selectivity filter colored as in Figure 1. Selectivity filter residues are shown and indicated relative to the (0) position glutamate. Dashed line shows the central pore axis approximate position. **B**, Selectivity filter and pore helices sequence alignment for selected BaCa_v s, mammalian Ca_v subtype exemplars, and mammalian $\text{Na}_v1.4$. $\text{Ca}_v\text{Bh1}$ and $\text{Ca}_v\text{Sp1p}$ are calcium selective mutants of $\text{Na}_v\text{Bh1}$ (NaChBac)⁴⁶ and $\text{Na}_v\text{Sp1p}$ ¹⁹, respectively. Selectivity filter numbering is indicated. **C**, Two-electrode voltage-clamp recordings from *Xenopus* oocyte expressing wild-type $\text{Ca}_v1.2$ or the indicated mutants recorded in a buffer containing 100 mM Li^+ and either 3 nM or 10 μM free Ca^{2+} and normalized to the 3 nM trace. Currents were elicited by a voltage step from -90 mV to -20 mV. **D**, Dose-response curves for calcium block of lithium currents for $\text{Ca}_v1.2$ (grey), E1115Q (black), D707N (blue), D707A (green), and D707G (red). Each data point at each calcium concentration is normalized to the current at 3 nM Ca^{2+} and averaged for $n = 5-7$ oocytes. Error bars are s.e.m.

Figure 5 Functional studies of NavSp1 structure-based mutants **A**, NavAe1p cartoon depicting positions investigated by patch-clamp. S6, bend, and neck positions are colored yellow, red, and light blue, respectively and indicated using the corresponding NavSp1 residues. **B**, Left panel, exemplar NavSp1 Na⁺ currents in response to the activation protocol shown in the middle panel (300 ms depolarizations to -60 to +70 mV in 10 mV steps from a holding potential of -90 mV, sweep to sweep interval = 10 s). Right panel, protocol for examining steady state inactivation voltage dependence (5 s pre-pulse depolarization from 0 to -130 mV in 10 mV steps, followed by a 300 ms step to +30 mV, and repolarization to the holding potential, -90 mV. Sweep to sweep interval = 5 s). **C**, Left panel, exemplar NavSp1 L212A Na⁺ currents. Activation (middle panel) and inactivation curves (right panel) of: NavSp1 (open circles), L212A (black triangle) and I216A (inverted black triangle). **D**, Left panel, exemplar NavSp1 M220A Na⁺ currents. Activation (middle panel) and inactivation curves (right panel) of: NavSp1 (open circles) and M220A (black squares). **E**, V_{1/2} act and V_{1/2} inact for NavSp1 and indicated neck mutants. **F**, Left panel, exemplar NavSp1 3Gly Na⁺ currents. Activation (middle panel) and inactivation curves (right panel) of: NavSp1 (open circles), 2Gly (open diamonds), 3Gly (open squares), 7Gly (filled open squares), 3Ala (black diamonds), and 7Ala (black triangles). **G**, Left panel, exemplar NavSp1 H224G Na⁺ currents. Activation (middle panel) and inactivation curve (right panel) of: NavSp1 (open circles), H224G (black circles), and H224A (black squares). Activation curves are obtained by normalizing maximal amplitudes divided by the driving force. Inactivation curves are obtained by normalizing maximum amplitudes upon second pulse. NavSp1 activation and inactivation curve Boltzmann fits are shown in 'C', 'D', 'F', and 'G'.

Figure 6 Na_vAe1 functional properties **A**, Left panel, exemplar NavAe1 3Gly Na⁺ currents in response to an activation protocol, right panel (600 ms depolarizations to 0 to +70 mV in 10 mV steps from a holding potential of -90 mV, sweep to sweep interval = 5 s). **B**, Left panel, protocol for examining steady state inactivation voltage dependence (5 s pre-pulse depolarization from to 50 to -30 mV in 10 mV steps, followed by a 300 ms step to +30 mV, and repolarization to the holding potential, -90 mV. Sweep to sweep interval = 10 s). Right panel, Na_vAe1 3Gly activation and inactivation curves. Boltzmann fits are indicated. **C**, Left panel, exemplar Na_vAe1 3Gly currents in presence of 130 mM intracellular Na⁺ and 107.5 mM extracellular Ca²⁺, in response to an activation protocol, right panel (600 ms depolarizations to 10 to +100 mV in variable steps (10 mV and then 5 mV after 70 mV) from a holding potential of -90 mV, sweep to sweep interval = 5 s). **D**, Normalized current-voltage curve from 'C'. Reversal potential can be obtained by linear regression, as indicated. The averaged value obtained by this method (n=5) gives $E_{rev} = -52.1 \pm 10.3$ mV, which corresponds to $P_{Ca}/P_{Na} = 0.07 \pm 0.02$ (n=5) when corrected for the liquid junction potential (-17mV).

Figure 7 Cartoon model of BacNa_v gating Activation of BacNa_vs is proposed to involve the expansion of the pore at the activation gate (Met 241) and an order→disorder transition in the neck region. Ions can escape into the cytoplasm through spaces created by the neck region. Channel elements are colored as in Figure 1. VSDs are not shown.

Figure 1

Shaya *et al.*

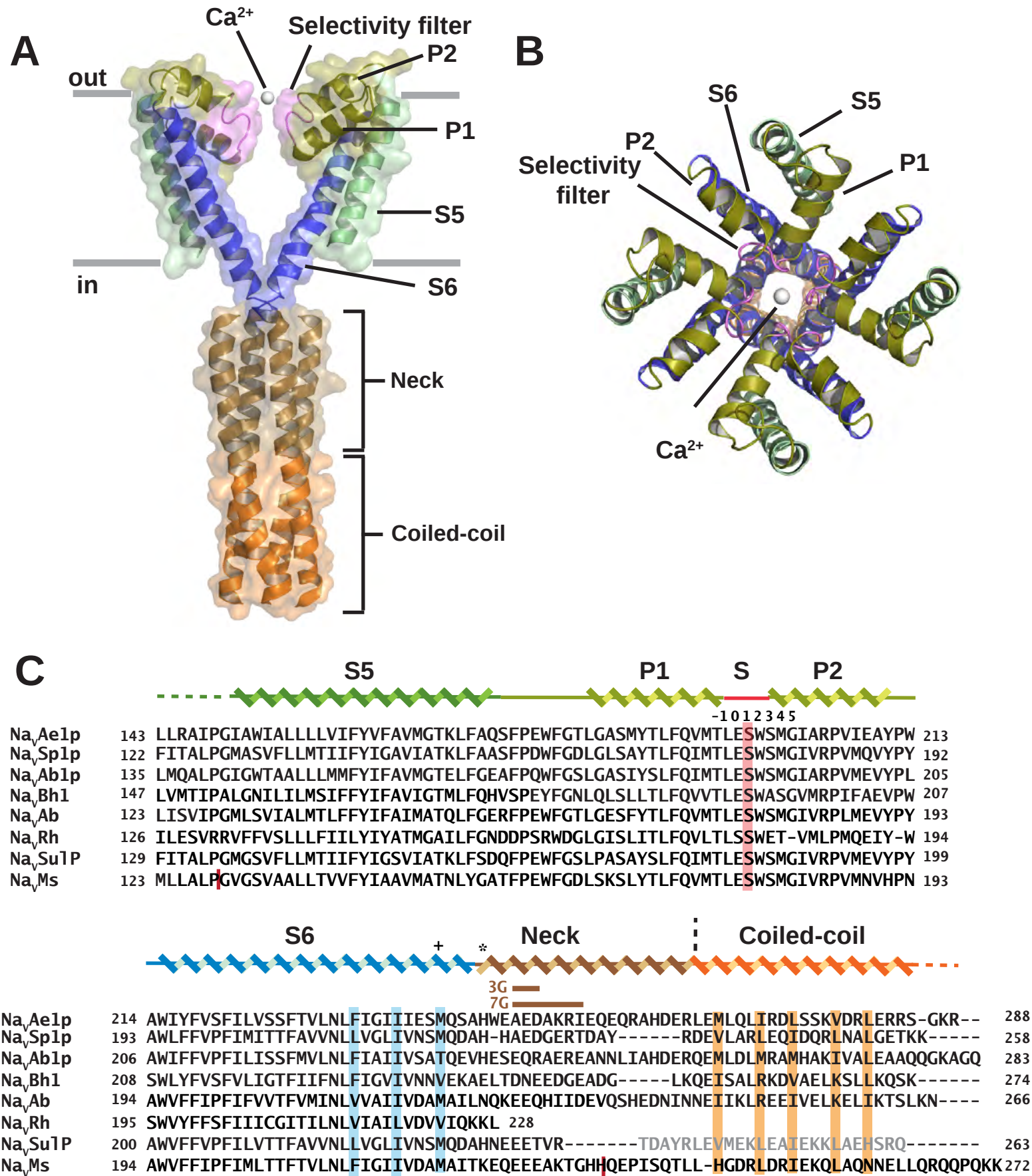


Figure 2

Shaya *et al.*

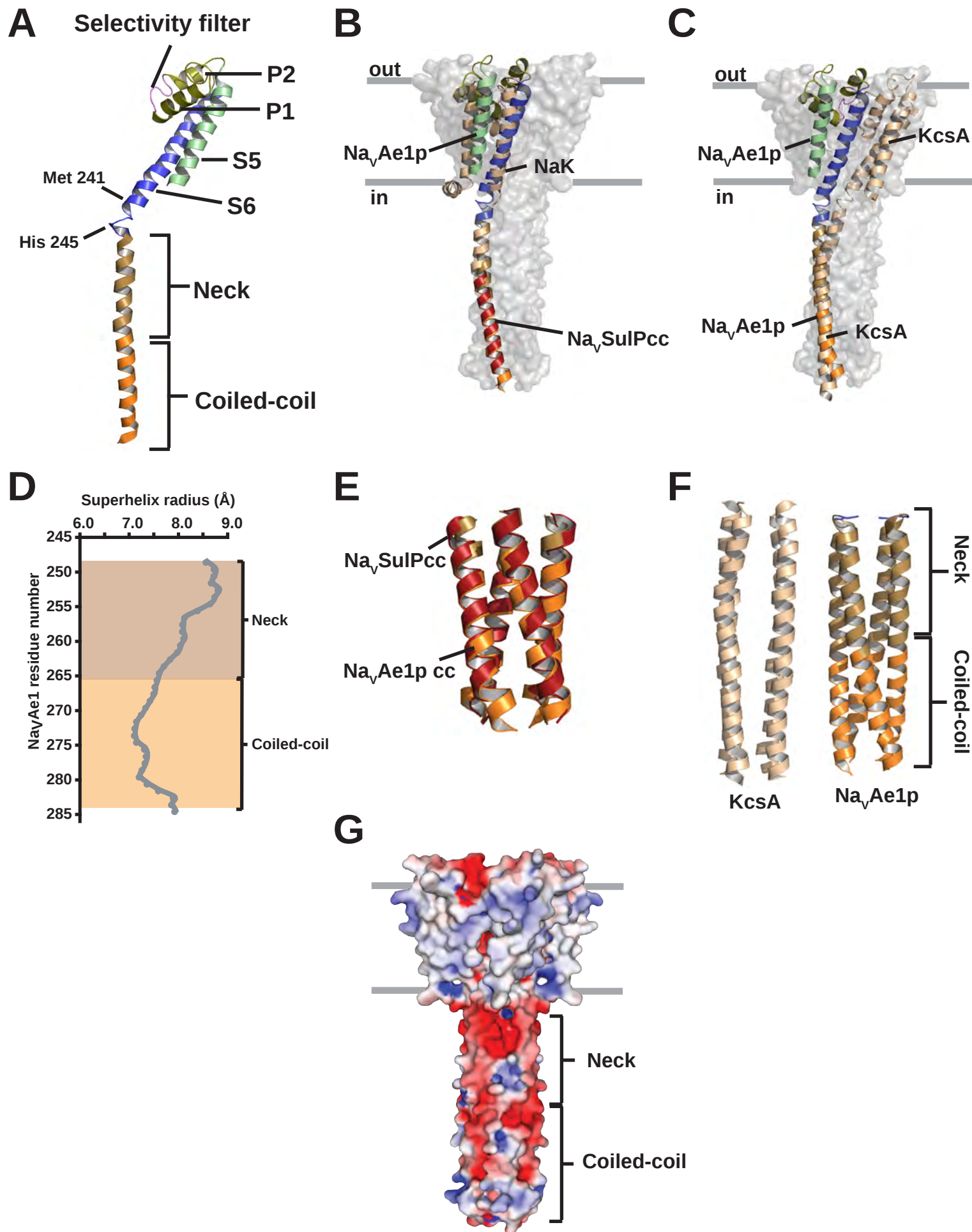


Figure 3

Shaya et al.

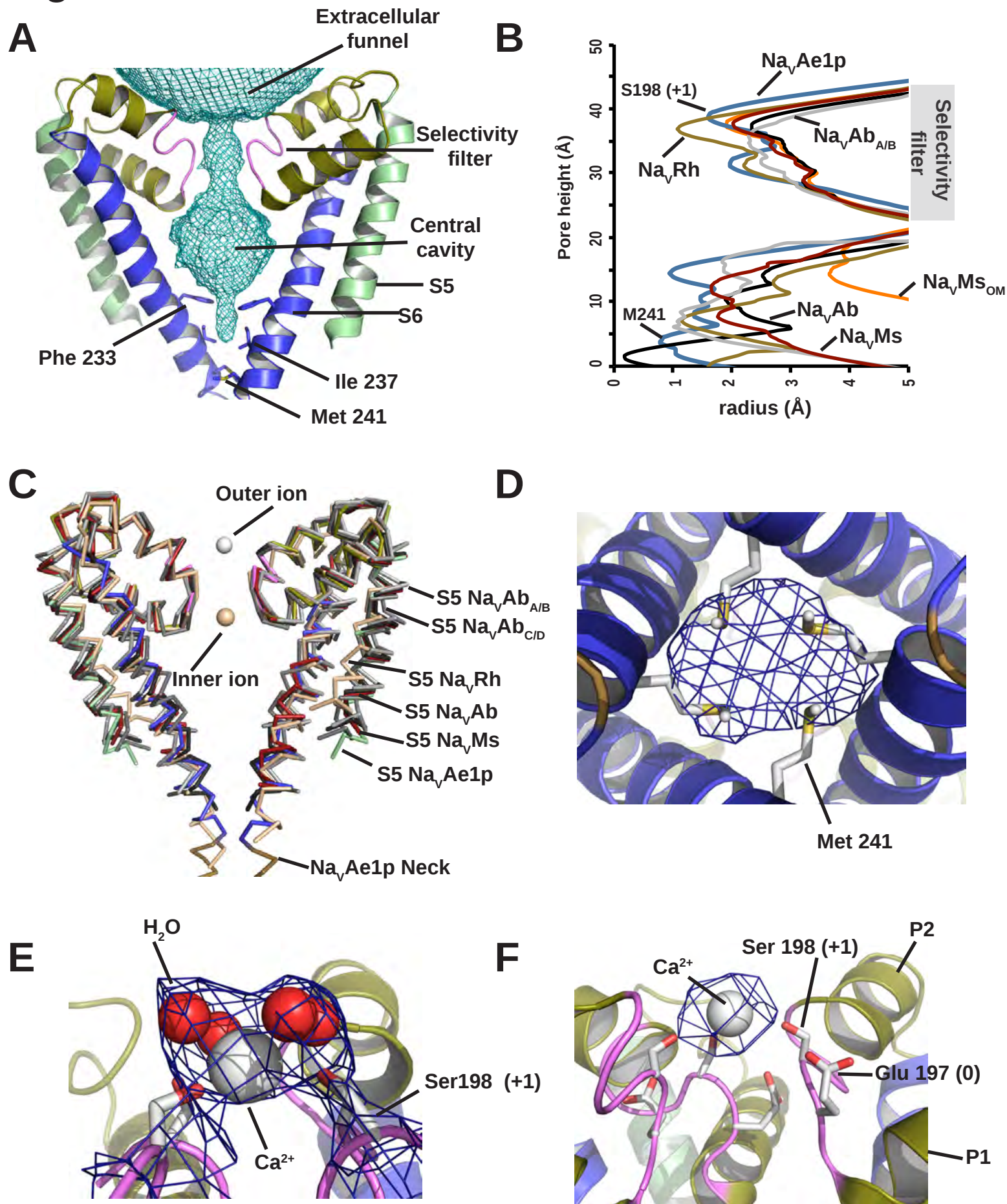


Fig. 4

Shaya *et al.*

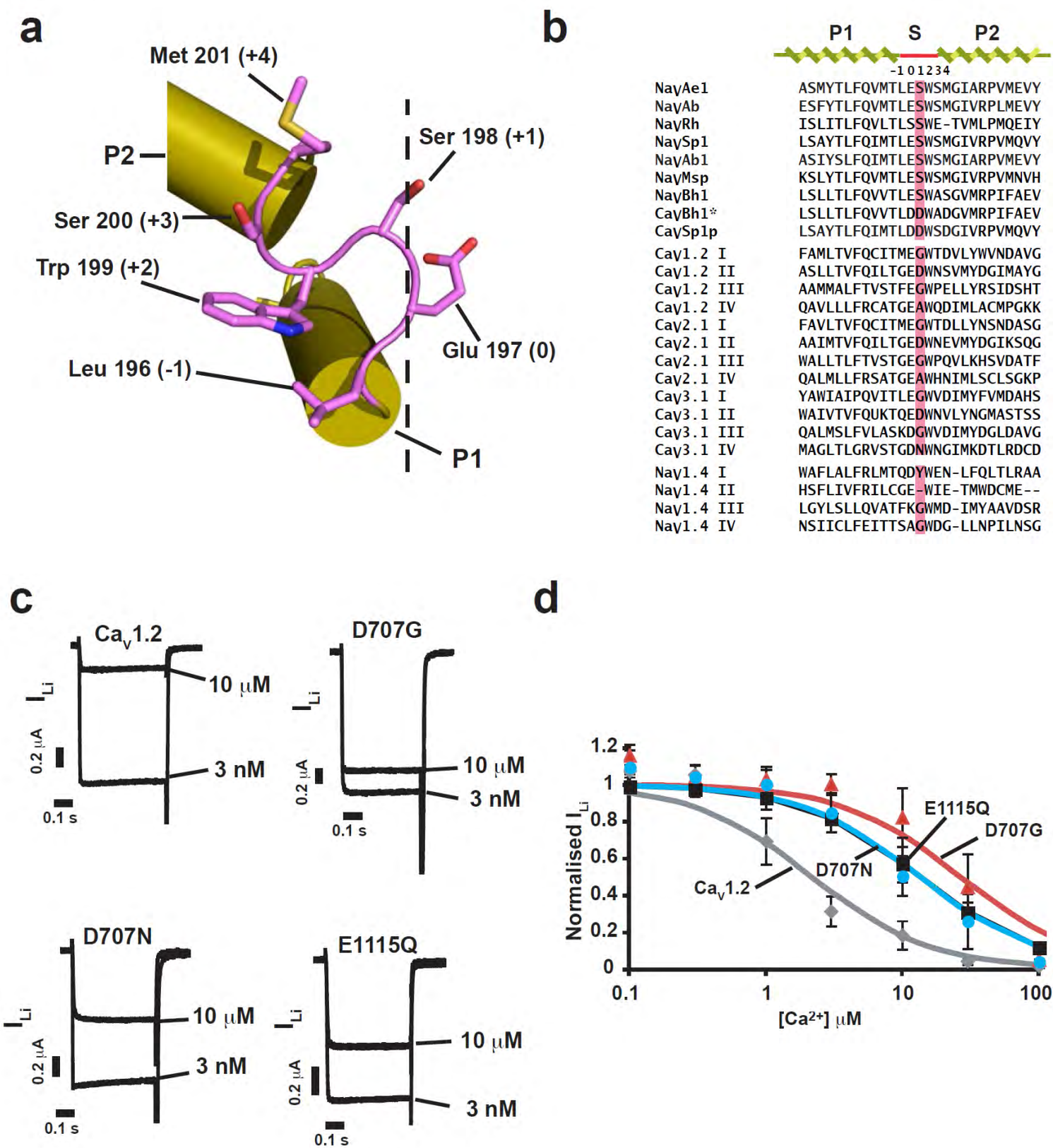


Figure 5

Shaya et al.

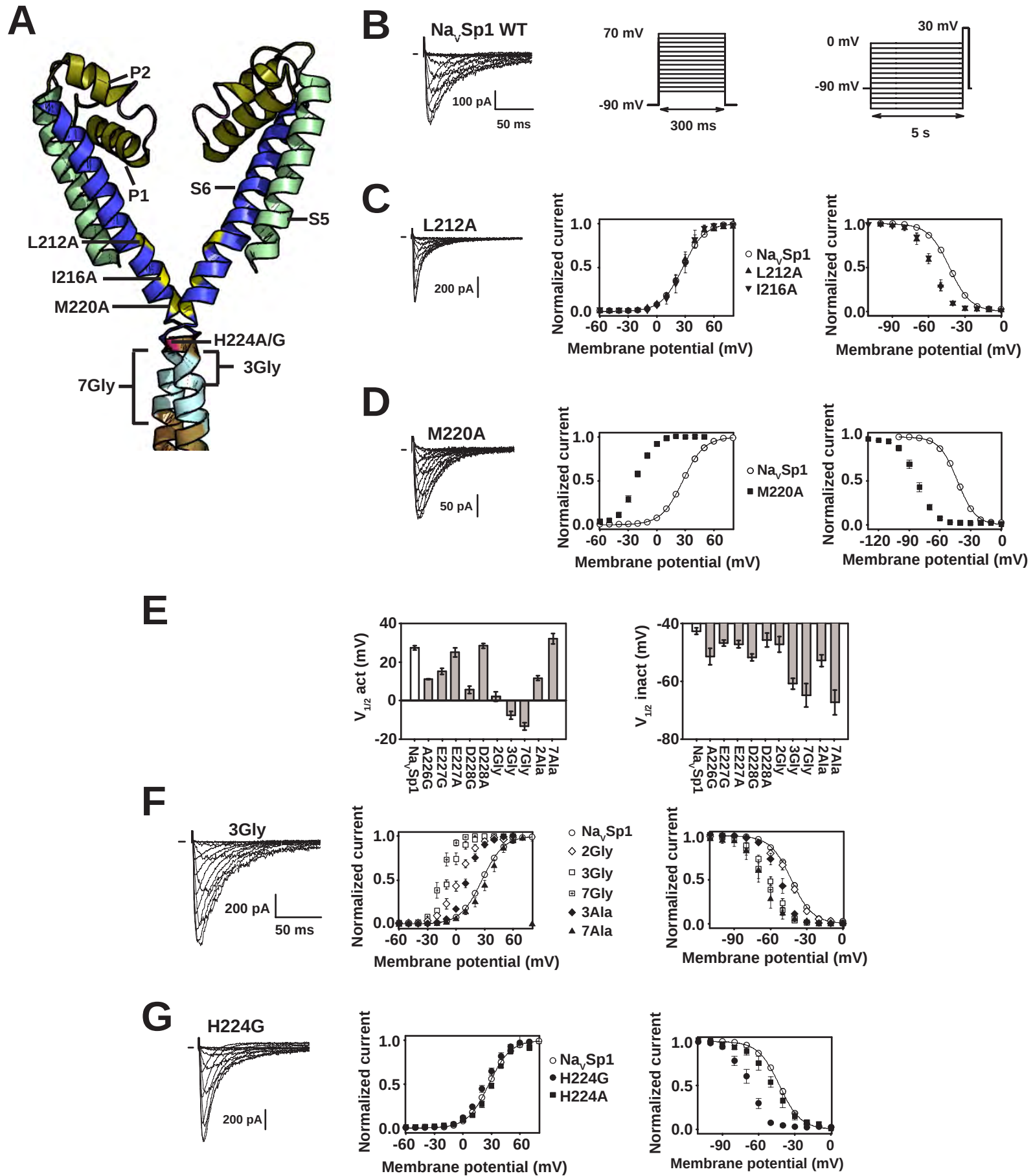
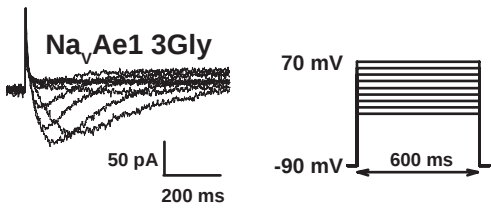


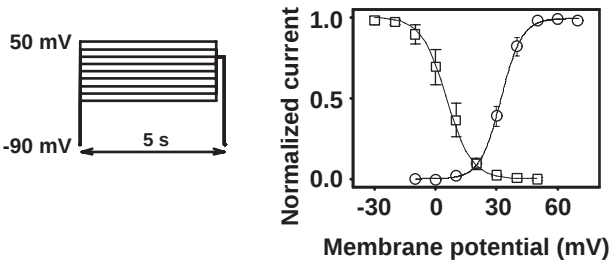
Figure 6

Shaya *et al.*

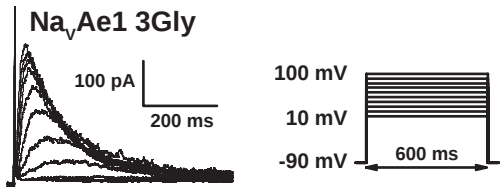
A



B



C



D

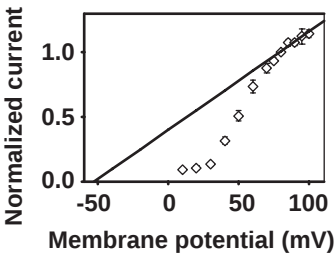


Figure 7

Shaya *et al.*

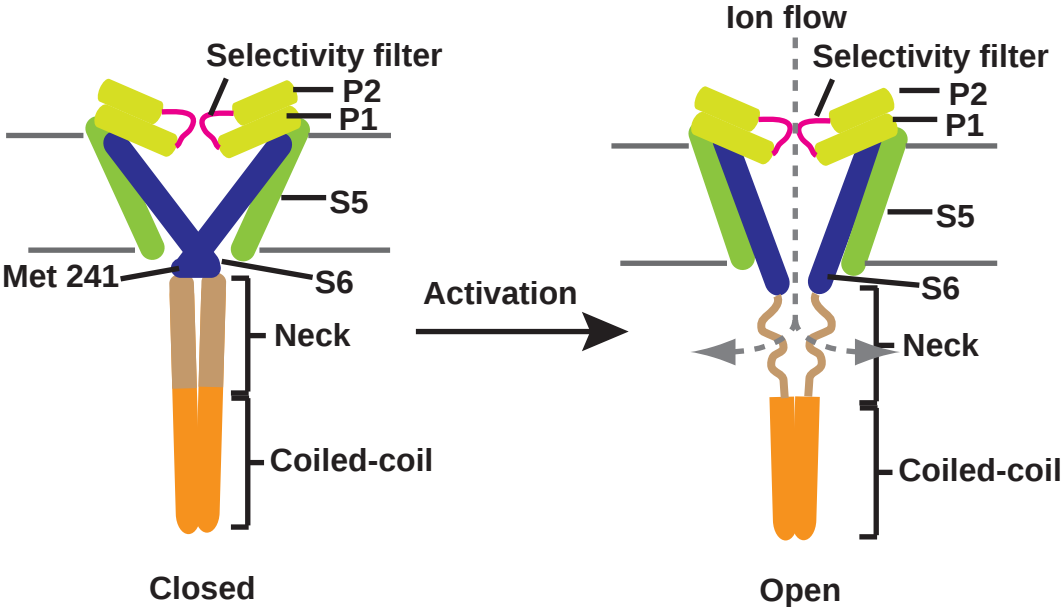


Table 1 Activation and inactivation properties of BacNa_vs and mutants

	$V_{1/2, \text{act}}$	$\Delta V_{1/2, \text{act}}$	n	P-Value	$V_{1/2, \text{inact}}$	$\Delta V_{1/2, \text{inact}}$	n	P-Value
Na_vSp1	27.4 ± 1.1	-	13	n.a.	-42.7 ± 1.1	-	12	n.a.
S6								
L212A	26.4 ± 3.1	-1.0 ± 4.5	5	n.s.	-57.5 ± 2.7	-14.8 ± 4.3	6	***
I216A	27.0 ± 3.4	-0.4 ± 4.8	3	n.s.	-56.7 ± 1.6	-14.0 ± 3.8	4	***
M220A	-22.4 ± 1.6	-49.8 ± 3.3	7	***	-82.7 ± 1.8	-40.0 ± 3.5	7	***
Bend								
H224A	30.2 ± 1.1	2.8 ± 4.2	3	n.s.	-48.1 ± 3.5	-5.4 ± 4.8	3	n.s.
H224G	22.9 ± 1.7	-4.5 ± 3.9	4	n.s.	-67.7 ± 2.3	-25.0 ± 4.0	4	***
Neck								
A226G	11.1 ± 0.2	-16.3 ± 4.2	3	***	-51.4 ± 2.8	-8.7 ± 4.3	4	***
E227G	15.2 ± 1.5	-12.2 ± 3.3	6	***	-46.8 ± 1.1	-4.1 ± 3.6	4	n.s.
E227A	25.1 ± 2.3	-2.3 ± 4.1	4	n.s.	-47.1 ± 1.3	-4.4 ± 3.2	6	*
D228G	5.7 ± 1.9	-21.7 ± 3.9	4	***	-51.7 ± 1.2	-9.0 ± 3.6	4	***
D228A	28.4 ± 1.3	1.0 ± 4.3	3	n.s.	-45.7 ± 2.5	-3.0 ± 4.2	4	n.s.
2G	2.1 ± 2.4	-25.3 ± 2.6	6	***	-47.2 ± 2.6	-4.5 ± 3.2	4	n.s.
2A	11.7 ± 1.3	-15.7 ± 3.4	5	***	-52.8 ± 2.0	-10.1 ± 3.9	4	***
3G	-7.6 ± 2.1	-35.0 ± 3.8	5	***	-60.8 ± 1.9	-18.1 ± 3.6	10	***
7G	-13.3 ± 1.9	-40.7 ± 3.9	4	***	-64.8 ± 4.1	-22.1 ± 5.2	4	***
7A	32.1 ± 2.8	4.7 ± 4.4	4	n.s.	-67.3 ± 4.2	-24.6 ± 5.2	4	***
Coiled-coil								
R242E	7.8 ± 0.8	-19.6 ± 3.3	5	***	-44.4 ± 2.5	-1.7 ± 4.2	4	n.s.
Na_vAe1								
3G	32.1 ± 1.1	n.a.	6		5.3 ± 3.1		4	

Data are mean $\pm$ s.e.m.

$\Delta V_{1/2}$ '±' denotes 90% confidence interval

P values are calculated relative to wild-type Na_vSp1

n.s., Not significant, $P > 0.05$

'*' indicates $0.001 < P < 0.05$

'***' indicates, $P < 0.001$

23 Jul 13

Supplementary Material for:

Structure of a prokaryotic sodium channel pore reveals essential gating elements and an outer ion binding site common to eukaryotic channels

David Shaya^{1*}, Felix Findeisen^{1*}, Fayal Abderemane-Ali^{5,6,7}, Cristina Arrigoni¹, Stephanie Wong¹, Shailka Reddy Nurva¹, Gildas Loussouarn^{5,6,7}, and Daniel L. Minor, Jr.^{1,2,3,4†}

¹Cardiovascular Research Institute, ²Departments of Biochemistry and Biophysics, and Cellular and Molecular Pharmacology, ³California Institute for Quantitative Biomedical Research, University of California, San Francisco, California 94158-2330

⁴Physical Biosciences Science Division
Lawrence Berkeley National Laboratory
Berkeley, CA 94720 USA

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1087, Nantes, France

⁶Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6291, Nantes, France

⁷l'institut du thorax, L'UNAM Université, Université de Nantes, Nantes, France

* These authors contributed equally

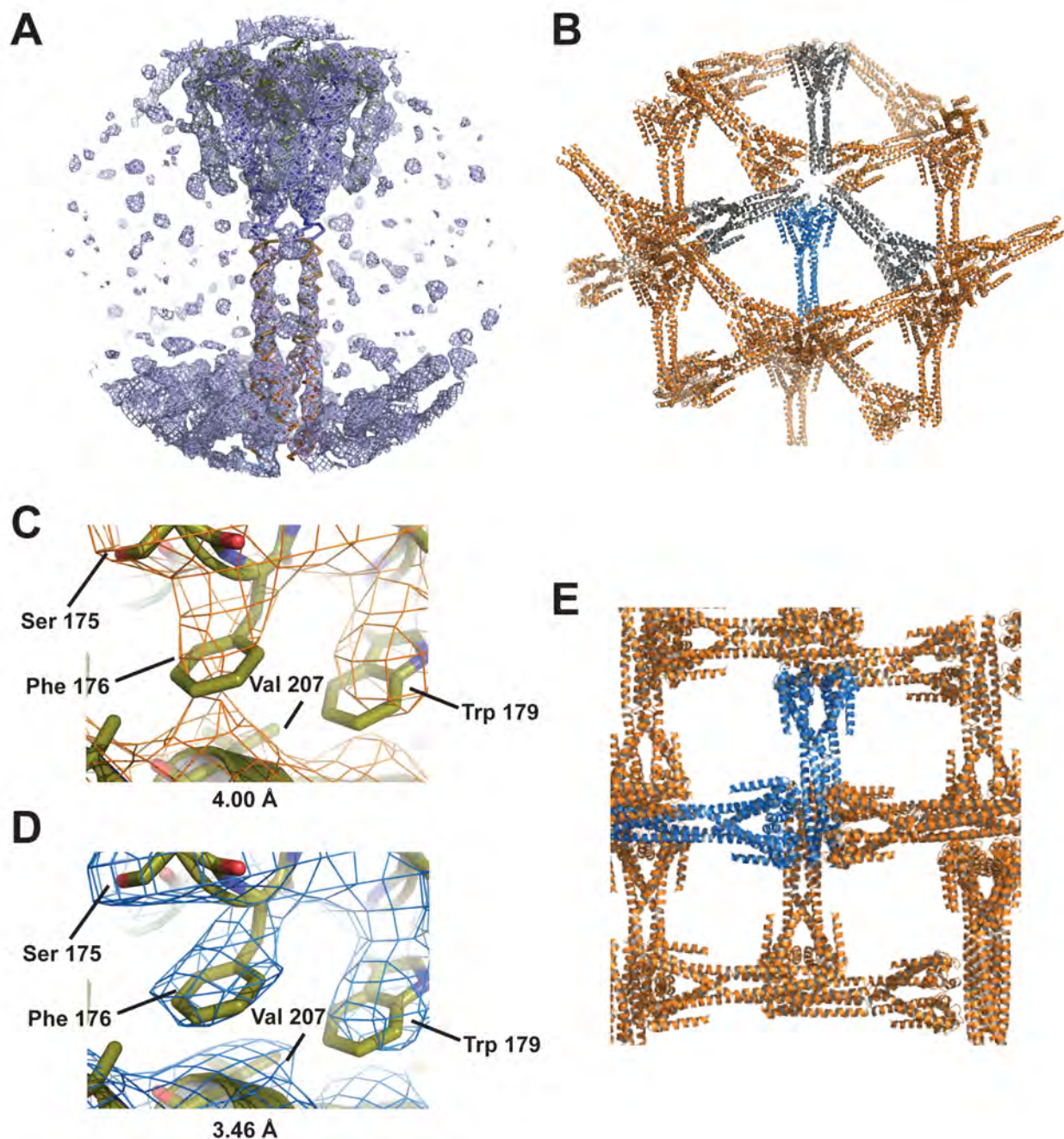
†Correspondence: daniel.minor@ucsf.edu

Inventory of Supplementary Material:

Supplementary Figures S1-S10

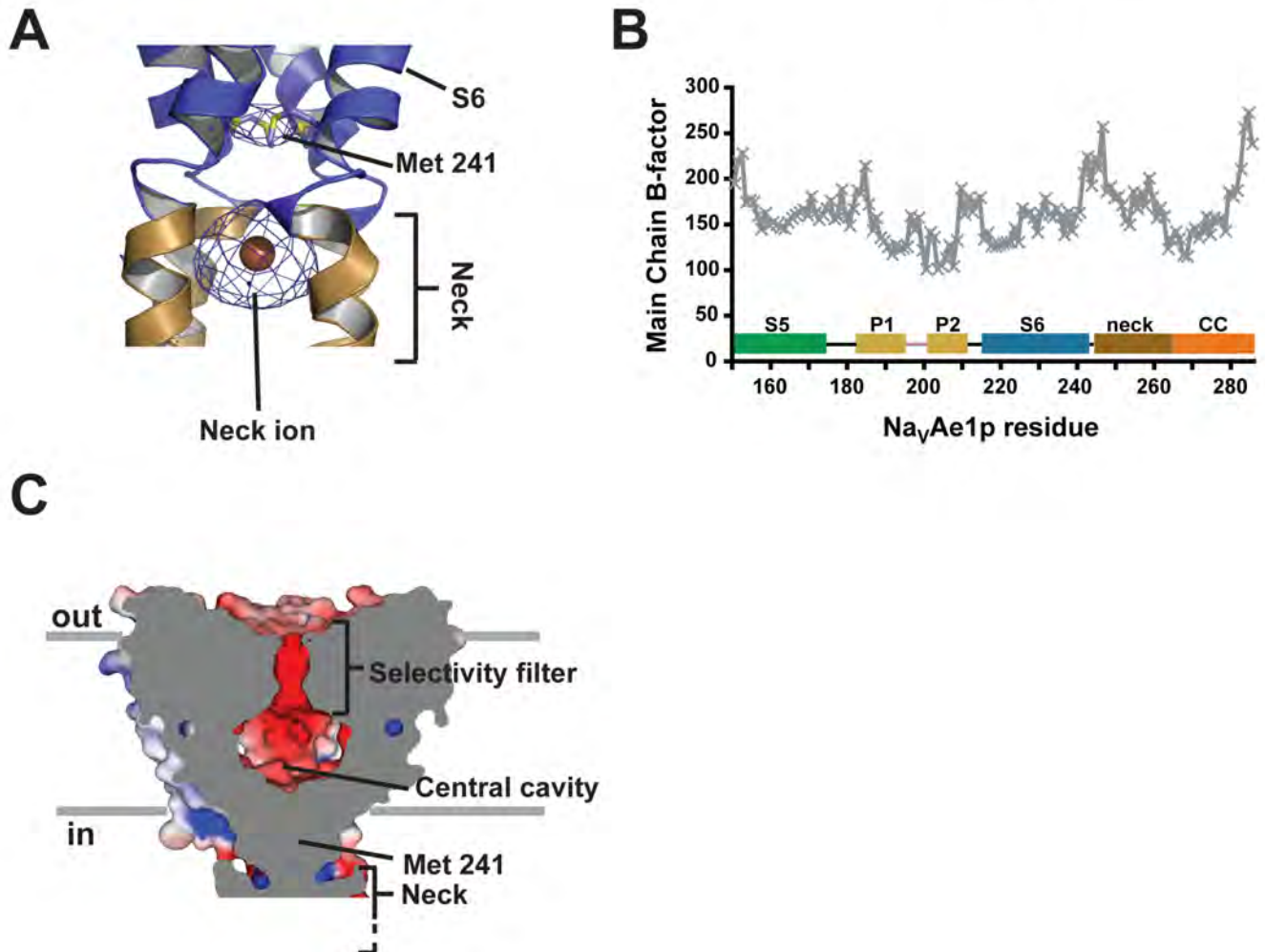
Supplementary Tables S1-S3

Supplementary References



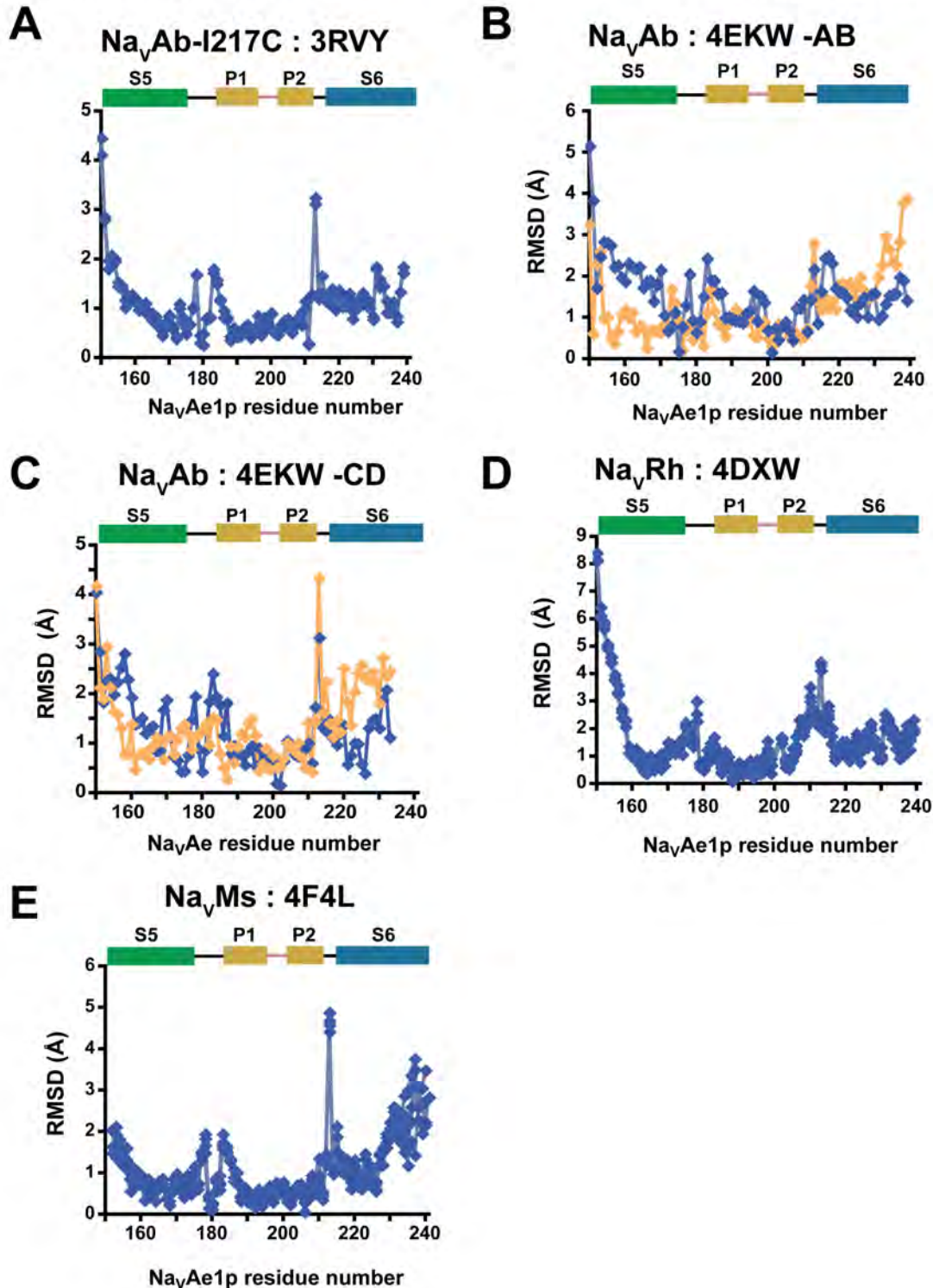
Supplementary Figure S1 **A**, Initial electron density map following molecular replacement using a model that only included the transmembrane domains. Map is contoured at 1.5σ . **B**, Na_vAe1p I222 crystal packing. The asymmetric unit, a channel tetramer, is shown in marine. Three tetramers are shown in grey to aid in lattice visualization. Remaining molecules are shown in orange. **C, and D**, Representative 2Fo-Fc electron density contoured at 1σ for a portion of the electron density map including the P1 and P2 helices using data to **C**, 4.00Å and **D**, 3.46Å. **E**, Na_vAe1p P4₂ crystal packing. The asymmetric unit, two channel tetramers, is shown in marine. Symmetry related molecules are shown in orange.

Supplementary Figure S2

Shaya *et al.*

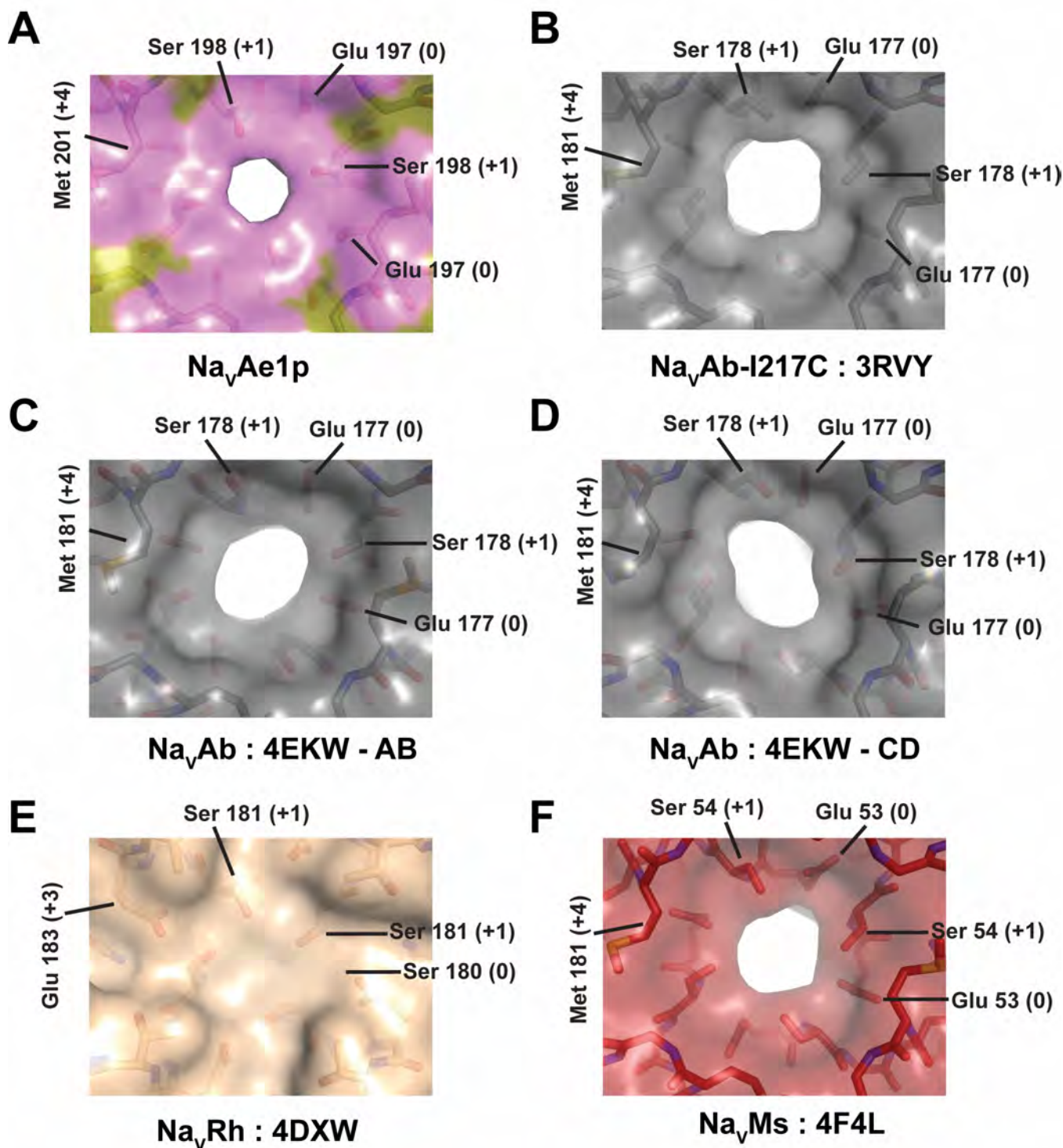
Supplementary Figure S2 Na_vAe1p structure details **A**, Na_vAe1p NCS-averaged anomalous difference map calculated at 6.5Å and contoured at 2.5σ. S6 and neck are colored blue and tan, respectively. Positions of Met241 and neck ion densities are indicated. Met241 sidechains are shown as sticks. **B**, Averaged Na_vAe1p main chain B-factors. Secondary structure elements are indicated: S5 (green), S6 (blue), P1 and P2 (tan), neck (brown), and coiled-coil (orange). **C**, Electrostatic surface potential mapped on the Na_vAe1p van der Waals surface, sliced open to show the central cavity and colored from -4 kT to +4 kT (red to blue). Grey lines indicate approximate lipid bilayer boundaries.

Supplementary Figure S3

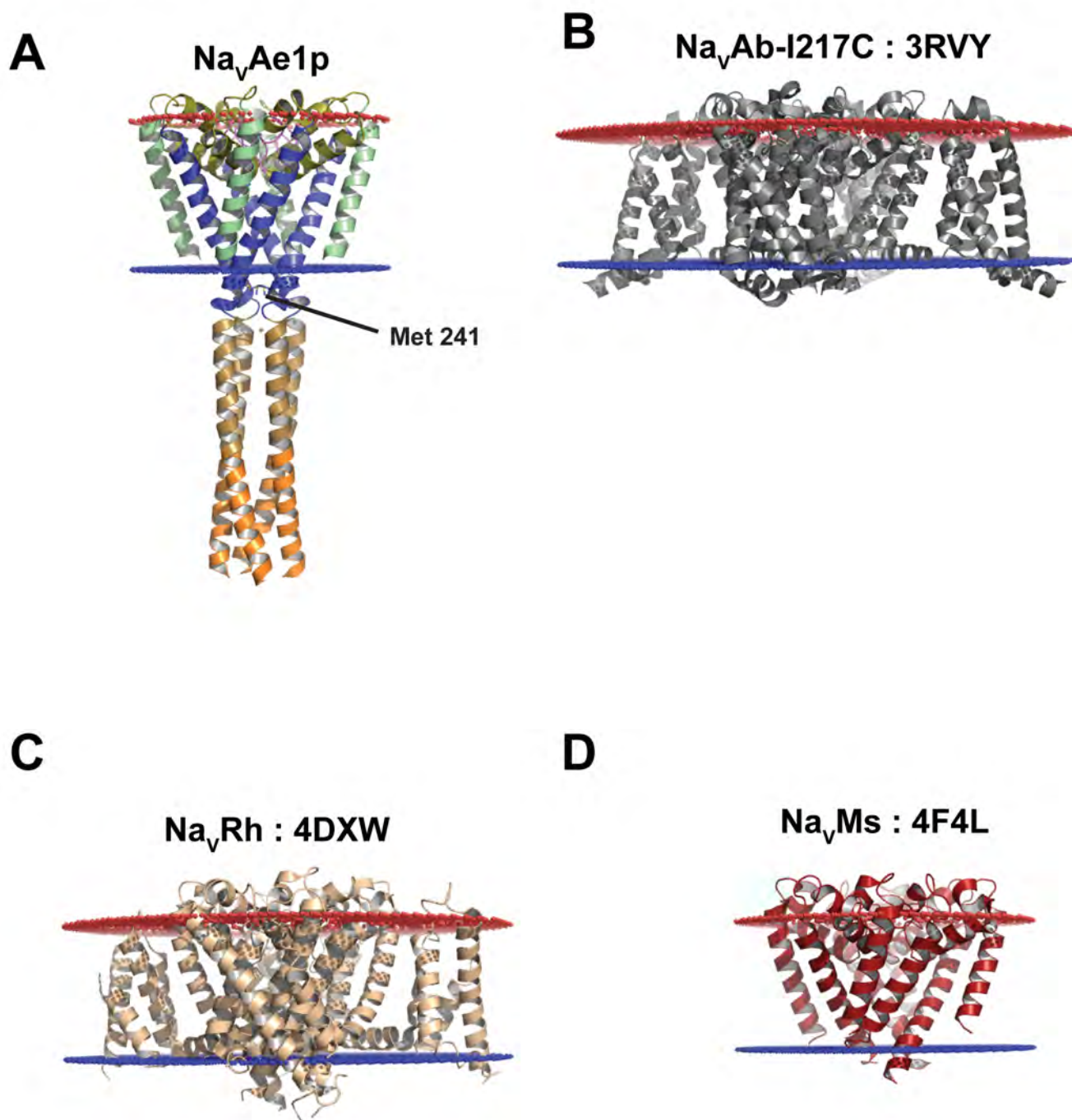
Shaya *et al.*

Supplementary Figure S3 $\text{Na}_V\text{Ae1p}$ and BacNa_V pore domain comparisons Residue by residue C α RMSD plots comparing the $\text{Na}_V\text{Ae1p}$ pore with the pore domains from: **A**, $\text{Na}_V\text{Ab-I217C}$ (3RVY)(Payandeh et al., 2011), **B**, Na_VAb , chains A (blue) and B (orange) (Payandeh et al., 2012), **C**, Na_VAb , chains C (blue) and D (orange) (Payandeh et al., 2012), **D**, Na_VRh (Zhang et al., 2012), and **E**, Na_VMs (McCusker et al., 2012). Secondary structure elements are indicated as S5 (green), S6 (blue), P1 and P2 (tan). Boundaries used in the superpositions are listed in Supplementary Table S3.

Supplementary Figure S4

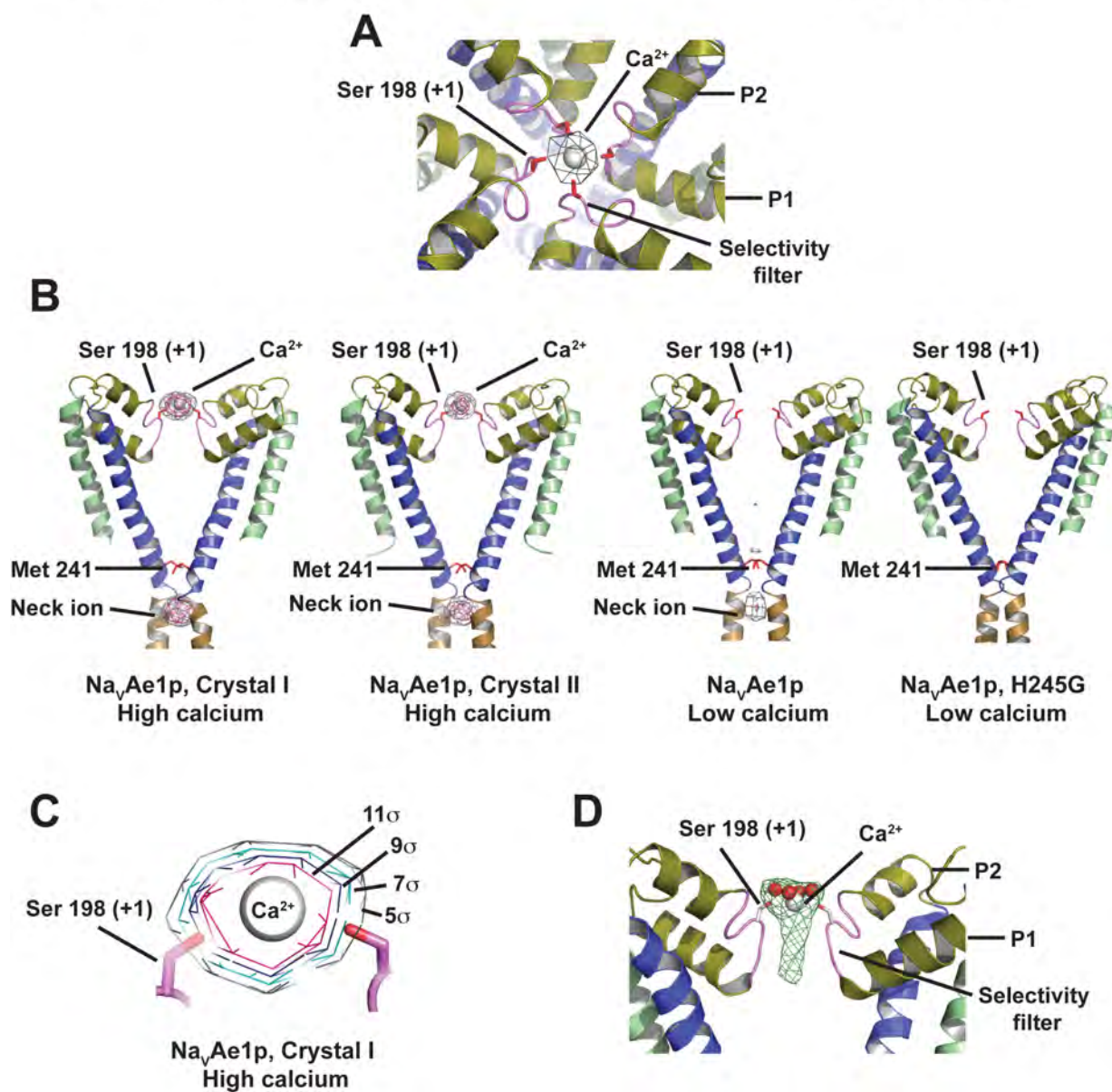
Shaya *et al.*

Supplementary Figure S4 Semitransparent surfaces showing the selectivity filter extracellular side for: **A**, Na_vAe1p, **B**, Na_vAb (Payandeh et al., 2011), **C**, Na_vAb 'inactivated' conformation of chains A/B (Payandeh et al., 2012), **D**, Na_vAb 'inactivated' conformation of chains C/D (Payandeh et al., 2012), **E**, Na_vRh (Zhang et al., 2012), and **F**, Na_vMs (McCusker et al., 2012). In all cases, select residues are labeled according to the scheme shown in Figure 4. Na_vAe1p is colored violet (selectivity filter) and olive (P2 helix) as in Figure 1. Na_vAb is grey, Na_vRh is wheat, and Na_vMs is dark red.



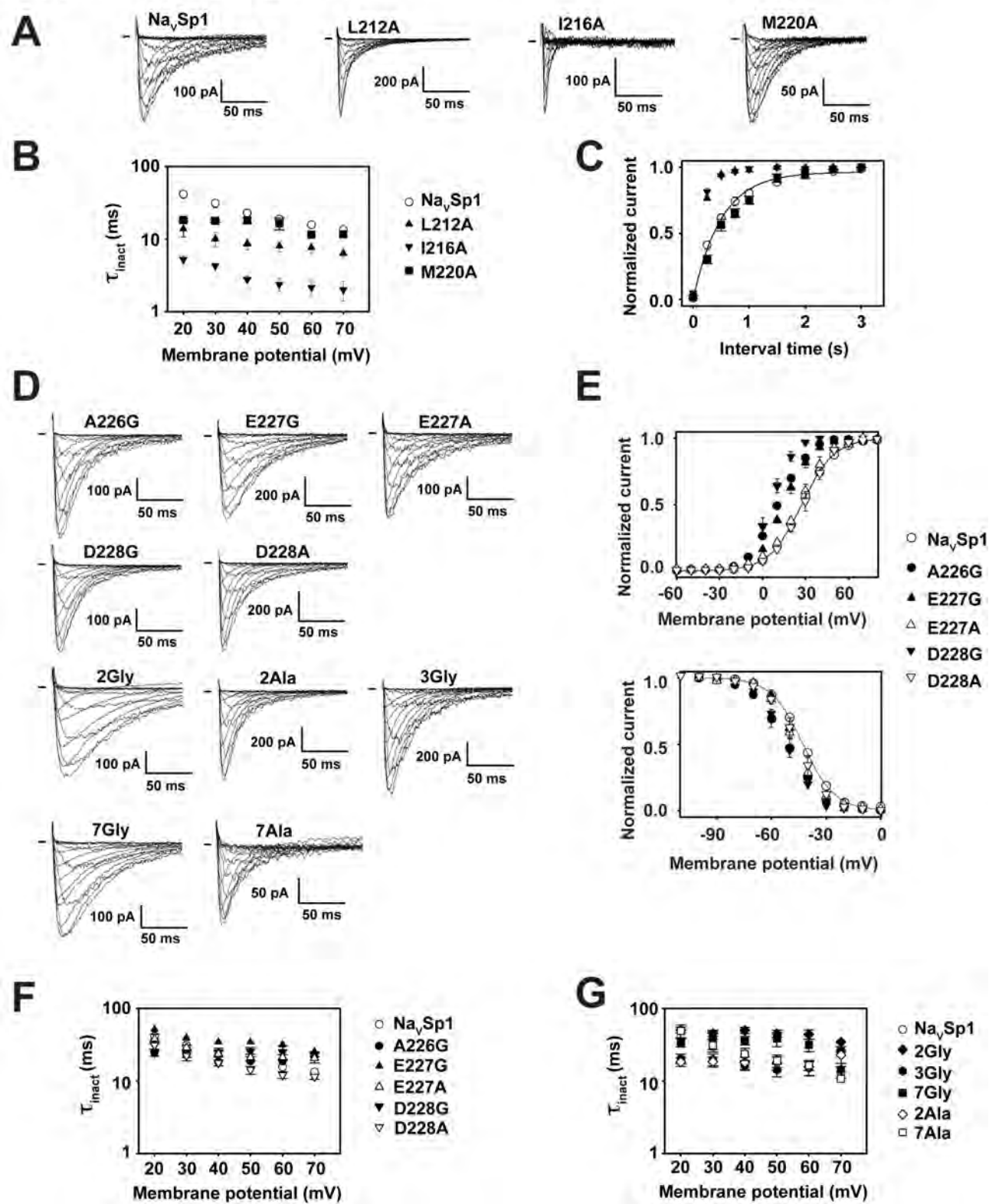
Supplementary Figure S5 Predicted membrane hydrophobic layer boundaries. Transmembrane layers were calculated for: **A**, $\text{Na}_v\text{Ae1p}$, **B**, $\text{Na}_v\text{Ab I217C}$ (3RVY)(Payandeh et al., 2011), **C**, Na_vRh (4DXW)(Zhang et al., 2012), and **D**, Na_vMs (4F4L)(McCusker et al., 2012), using the OPM server (<http://opm.phar.umich.edu>)(Lomize et al., 2006) and are represented by a red disk (boundary between hydrophobic layer and extracellular lipid head groups) and a blue disk (boundary between hydrophobic layer and intracellular lipid head groups).

Supplementary Figure S6

Shaya *et al.*

Supplementary Figure S6 *Na_vAe1p* difference maps **A**, High calcium *Na_vAe1p* anomalous difference map calculated at 6.5Å and contoured at 6.5σ showing a strong peak at the pore center close to the side chains of *Na_vAe1p* Ser198. **B**, NCS-averaged anomalous difference maps calculated for the indicated datasets at 6.5Å. Contours show 5σ (grey) and 10σ (pink). The anomalous signal at the site for the pore metal is present in both high Ca^{2+} -structures but is absent in both low Ca^{2+} -structures. Anomalous signal at the neck ion site is present in all but the H245G structure. Select residues are indicated for orientation purposes. **C**, Closeup of the anomalous signal for the outer ion site in the *Na_vAe1p*, Crystal I, High calcium dataset. Contour levels are indicated. **D**, Fo-Fc map (green) of *Na_vAe1p* selectivity filter region calculated using a protein model but lacking the outer ion and waters contoured at 3.0σ. Map shows electron density for the Ca^{2+} ion and extends through the entire selectivity filter length. Ca^{2+} is indicated as a white sphere, four water molecules are shown as red spheres. *Na_vAe1p* is colored as in Figure 1.

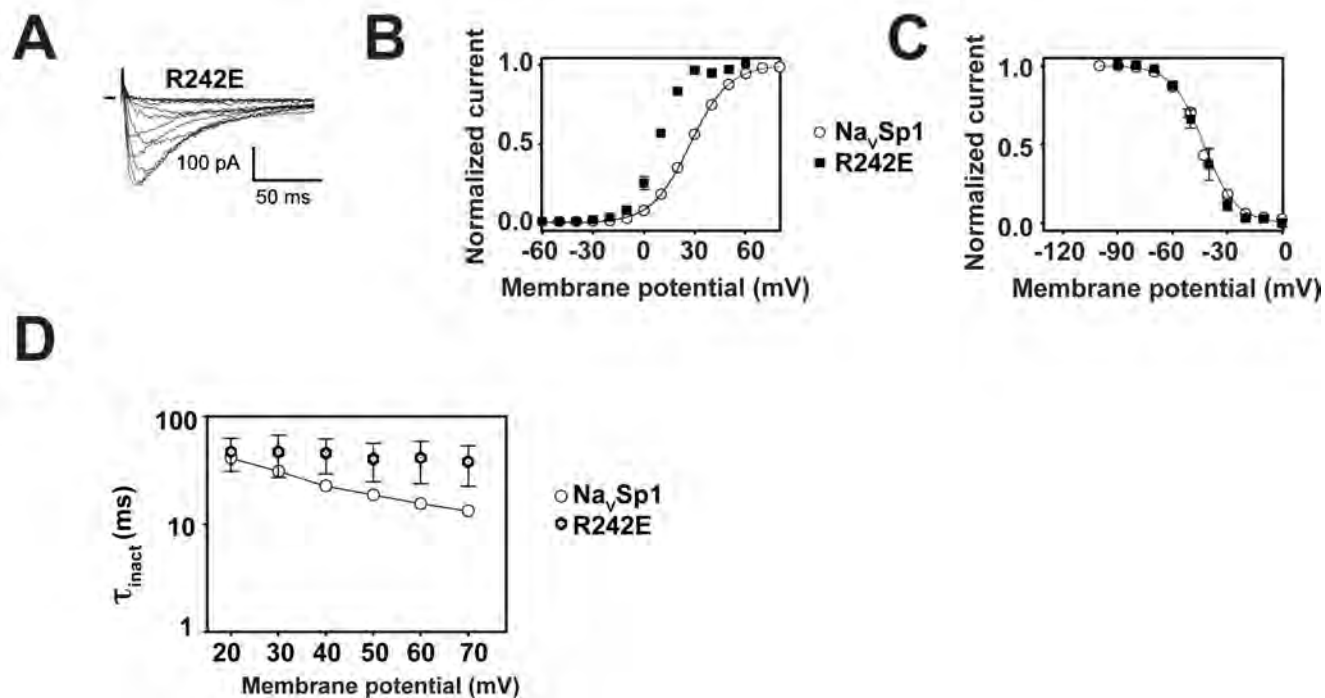
Supplementary Figure S7

Shaya *et al.*

23 Jul 13

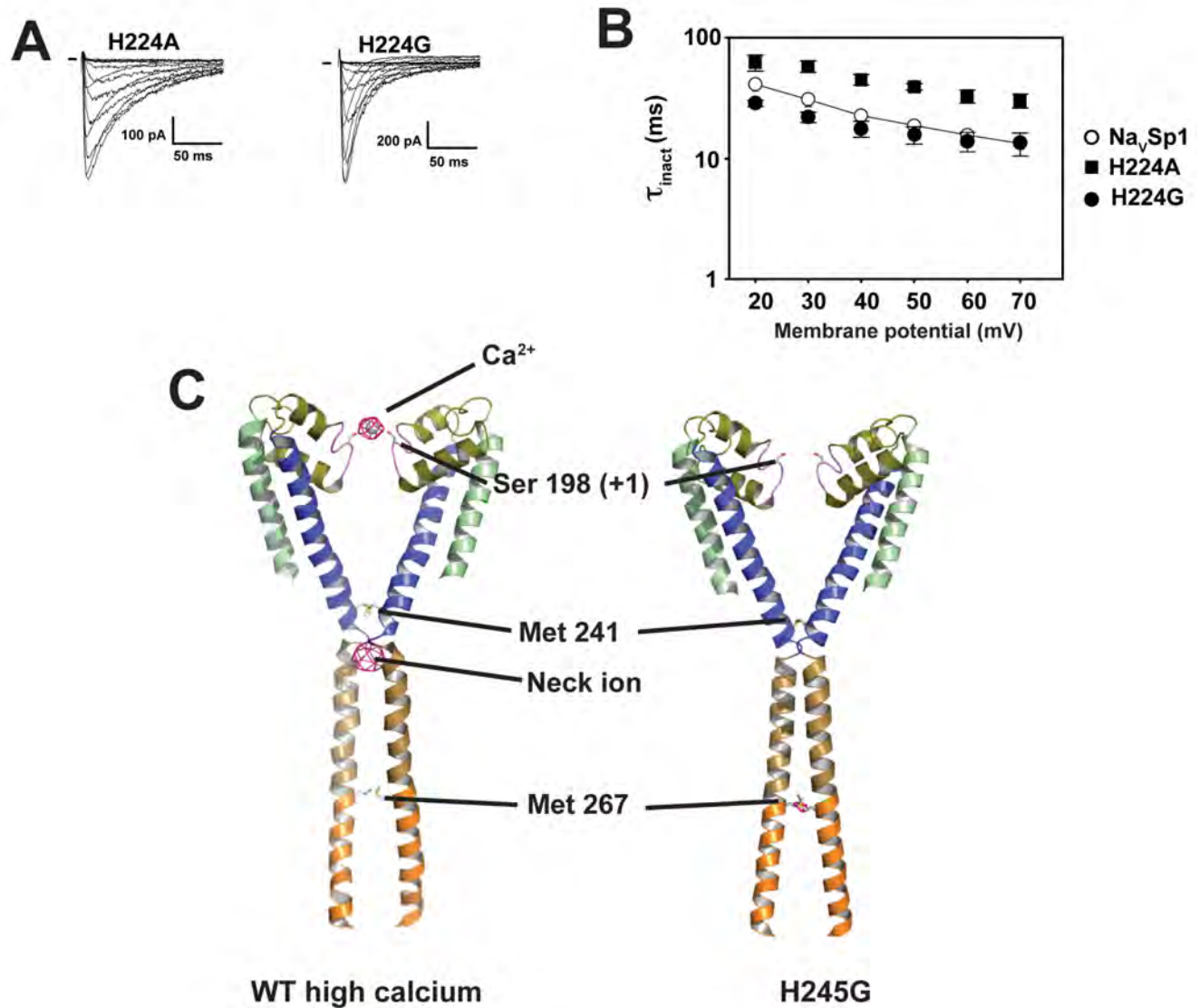
Supplementary Figure S7 Functional studies of Na_vSp1, S6 mutants, and neck mutants
A, Representative Na⁺ currents from Na_vSp1, L212A, I216A, and M220A in response to an activation protocol from -60 to +70 mV in 10 mV steps (cf. Figure 5B middle panel). **B**, Inactivation time constants for Na_vSp1, L212A, I216A, and M220A (n =3-8; error bars are ± s.e.m.). **C**, Recovery from inactivation for Na_vSp1, L212A, I216A, and M220A. Time interval between the pre-pulse (+30 mV, 300 ms) and the test-pulse (+30 mV, 300 ms) was varied from 0.25 to 3 s. The ratios between currents elicited by the two pulses were used to construct the recovery from inactivation curve. (n =3 to 7; ± s.e.m.). Recovery curve of Na_vSp1 is highlighted with a single exponential fit. **D**, Representative Na⁺ currents from the indicated Na_vSp1 neck mutants in response to an activation protocol of -60 to +70 mV in 10 mV steps (cf. Figure 5B middle panel). **E**, Voltage dependences of activation (top) and inactivation (bottom) for Na_vSp1 and indicated mutants. **F and G**, Inactivation time constants for Na_vSp1 and indicated mutants (n = 4-8; error bars are ± s.e.m.).

Supplementary Figure S8

Shaya *et al.*

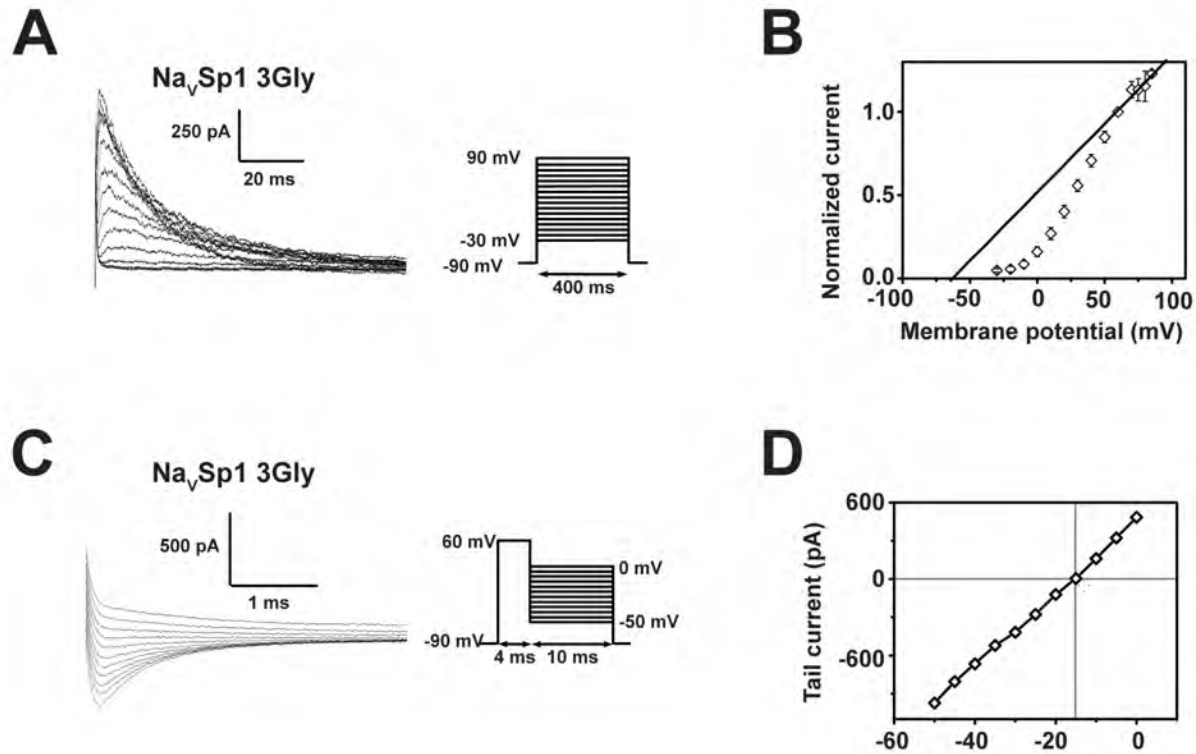
Supplementary Figure S8 A, Representative Na⁺ currents from NavSp1 R242E in response to an activation protocol of -60 to +70 mV in 10 mV steps. **B**, Voltage dependence of activation and **C**, Voltage dependence of inactivation for NavSp1 and R242E. **D**, Inactivation time constants for NavSp1 and R242E (n = 3-8; error bars are $\pm$ S.E.M).

Supplementary Figure S9

Shaya *et al.*

Supplementary Figure S9 Functional and structural characterization of bend position mutants
A, Representative Na⁺ currents from Na_vSp1, H224G, and H224A in response to an activation protocol of -60 to +70 mV in 10 mV steps. **B**, Comparison of inactivation time constants of Na_vSp1 and indicated mutants ($n = 3-8$; error bars are $\pm$ s.e.m.) **C**, Na_vAe1p (left) and Na_vAe1p H245G (right) NCS-averaged anomalous difference maps calculated at 6.5 Å contoured at 7 σ (high calcium) or at 7.5 Å contoured at 4.5 σ (H245G). The H245G structure shows no anomalous peak for either the neck ion or the pore Ca²⁺ ion site.

Supplementary Figure S10

Shaya *et al.*

Supplementary Figure S10 Ion selectivity measurements for $\text{Na}_v\text{Sp1 3Gly}$ **A**, Exemplar $\text{Na}_v\text{Sp1 3Gly}$ current trace in presence of 130 mM intracellular Na^+ and 107.5 mM extracellular Ca^{2+} , in response to an activation protocol, (400 ms depolarizations to -30 to +90 mV in variable steps (10 mV and then 5 mV after 60 mV) from a holding potential of -90 mV, sweep to sweep interval = 5 s). **B**, Normalized current-voltage curve from experiments performed as in 'A'. Reversal potential can be obtained by linear regression, as indicated. The averaged value obtained by this method ($n=5$) yields $E_{\text{rev}} = -77.6 \pm 8.1$ mV, which gives $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 0.05 \pm 0.02$ ($n=5$) when corrected for the liquid junction potential (-17mV). **C**, Exemplar $\text{Na}_v\text{Sp1 3Gly}$ tail currents in presence of 40 mM intracellular Na^+ and 10mM extracellular Ca^{2+} , evoked by a step protocol (10 ms from -50 to 0 mV in 10 mV steps, after a 4 ms depolarizing step to 60 mV from a holding potential of -90 mV, sweep to sweep interval = 5 s). **D**, Tail current-voltage curve from 'C'. Linear regression of data points from different experiments shows a reversal potential of -33.0 ± 0.9 mV, when corrected for liquid junction potential (-18mV), which gives a permeability ratio $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$ of 0.07 ± 0.02 . All values are mean $\pm$ s.e..

Supplementary Table S1 Crystallographic data collection and refinement statistics

	Na _v Ae1p – Crystal I High calcium* [§]	Na _v Ae1p –Crystal I High calcium * [†]	Na _v Ae1p –Crystal II High calcium * [§]	Na _v Ae1p Low calcium** [§]	Na _v Ae1p – H245G Low calcium** [§]
Data Collection					
Space group	I222	I222	I222	P4 ₂	I222
Cell dimensions a/b/c (Å)	147.83 / 161.73 / 162.27	147.83 / 161.73 / 162.27	147.27 / 161.50 / 161.69	181.14 / 181.14 / 94.02	157.20 / 161.38 / 165.45
$\alpha/\beta/\gamma$ (°)	90 / 90 / 90	90 / 90 / 90	90 / 90 / 90	90 / 90 / 90	90 / 90 / 90
Collection wavelength (Å)	1.11587	1.11587	1.11587	1.11587	1.70192
Resolution (Å)	115 – 3.46 (3.65-3.46)	115-4 (4.22-4.00)	115-3.8 (4.01 – 3.80)	120 – 5.50 (5.80 – 5.50)	75 – 5.80 (6.11 – 5.80)
R _{pim} (%)	4.4 (213.4)	3.5 (47.0)	6.7 (138.1)	3.5 (222.1)	3.7 (115.3)
Mn (I/σI)	8.7 (0.3)	12.2 (1.9)	6.0 (0.5)	9.8 (0.7)	8.7 (0.7)
Correlation Coefficient	0.999 (0.144)	0.999 (0.784)	0.999 (0.129)	0.999 (0.092)	0.999 (0.136)
Completeness (%)	94.2 (72.3)	99.9 (100.0)	99.4 (97.0)	97.3 (86.1)	98.7 (98.7)
Redundancy	10.5 (2.8)	12.6 (11.8)	8.2 (6.4)	4.0 (3.7)	13.1 (13.6)
Unique reflections	24208	16743	19162	9811	5978
Refinement					
R _{work} / R _{free} (%)	21.6 / 26.3		22.5 / 27.3	26.7 / 29.4	26.2 / 31.8
Resolution (Å)	15.0 – 3.46		15.0 – 3.80	15.0 – 5.50	15.0 – 5.80
No. of chains in AU	4		4	8	4
No. of protein atoms	4016		4016	8086	4043
No. of ligand atoms	11		9	0	0
RMSD bond lengths (Å)	0.0119		0.0114	0.0103	0.0070
RMSD angles (°)	1.671		1.624	1.216	0.966
Ramachandran	92.2 / 0.0		94.6 / 0.0	96.2 / 0.0	96.3 / 0.0
best/disallowed (%)					

[†] Na_vAe1p, Crystal I with data taken to the resolution having Mn (I/σI) = 1.9

* 200 mM calcium

** 0 mM calcium

[§] Resolution cutoff was defined by Correlation Coefficient > 0.1 (Karplus and Diederichs, 2012).

23 Jul 13

Supplementary Table S2 Coiled coil parameters

Channel and element (residue numbers)	NavAe1p CC (265-285)	NavAe1p neck + CC (247-285)	NavAe1p neck (247-264)	NaK-NavSulP CC (115-139)	NaK-NavSulP (104-139)	KcsA (118-160)	KcsA (142-160)
Superhelical parameters							
Radius (Å)	7.4	7.8	8.3	7.8	8.3	7.9	8.3
Residues / superhelix turn	103	153	317	126	160	816	160
Pitch (Å)	154.1	228	476	7.8	8.3	1200	8.3
α -helical parameters							
Radius (Å)	2.24	2.27	2.30	2.32	2.32	2.33	2.37
Residues/turn	3.57	3.59	3.61	3.68	3.67	3.69	3.76
Rise/residue (Å)	1.57	1.55	1.52	1.51	1.51	1.49	1.49

Comparison of coiled-coil parameters as determined using Twister(Strelkov and Burkhard, 2002)

Supplementary Table S3 Comparisons of Na_v pore structures

	PDB code	Monomer RMSD (Å)	Tetramer RMSD (Å)
Na_vAb I217C	3RVY	1.1	1.2
Na_vAb WT chains A/B	4EKW	1.2/1.2	1.6
Na_vAb WT chains C/D	4EKW	1.2/1.2	1.5
Na_vRh G208S	4DXW	1.5	2.1
Na_vMs	4F4L	1.0/1.0/1.1/1.1	1.3
Na_vSulP cc		1.0	1.2
KcsA four helix bundle		0.6	4.6

In cases where monomer/monomer superpositions deviated by more than 10%, values are shown for each independent chain.

For the Na_v superpositions residues Na_vAe1p residues 150-239 were compared with the equivalent positions from the indicated BacNa_v channels.

For Na_vSulP cc comparison Na_vSulP residues 115-139 are compared with Na_vAe1p 260-284.

For KcsA four helix bundle comparison, KcsA residues 137-151 were compared with compared with Na_vAe1p 266-280.

Supplementary References

Karplus, P.A., and Diederichs, K. (2012). Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**, 1030-1033.

Lomize, M.A., Lomize, A.L., Pogozheva, I.D., and Mosberg, H.I. (2006). OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* **22**, 623-625.

McCusker, E.C., Bagneris, C., Naylor, C.E., Cole, A.R., D'Avanzo, N., Nichols, C.G., and Wallace, B.A. (2012). Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nature communications* **3**, 1102.

Payandeh, J., Gamal El-Din, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* **486**, 135-139.

Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**, 353-358.

Strelkov, S.V., and Burkhard, P. (2002). Analysis of alpha-helical coiled coils with the program TWISTER reveals a structural mechanism for stutter compensation. *J Struct Biol* **137**, 54-64.

Zhang, X., Ren, W., DeCaen, P., Yan, C., Tao, X., Tang, L., Wang, J., Hasegawa, K., Kumasaka, T., He, J., *et al.* (2012). Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* **486**, 130-134.

Résumé

Les canaux ioniques voltage-dépendants sont des protéines membranaires permettant les échanges ioniques entre les cellules et leur environnement. Ces protéines régulent le passage des ions tels que potassium, sodium et calcium, et sont responsables de l'activité électrique notamment dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau. L'activité de ces canaux ioniques est régulée par le potentiel membranaire mais aussi par des composés extracellulaires, cytosolique ou membranaire comme le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂). Un défaut de régulation de ces canaux entraîne des pathologies cardiaques, musculaires ou neuronales appelées canalopathies dont les moyens de traitements actuels sont limités par leur manque de spécificité. La découverte de molécules thérapeutiques spécifiques et efficaces contre ces canalopathies nécessite une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à la base de la régulation de ces canaux ioniques. Par conséquent, mes travaux de recherche doctorale se sont focalisés sur trois principaux projets : 1) l'étude des mécanismes moléculaires à la base de la régulation des canaux potassiques voltage-dépendants par le PIP₂ et 2) l'étude des mécanismes de dépendance au potentiel du canal potassique cardiaque KCNQ1. Dans ce deuxième projet, nous avons établi un nouveau modèle moléculaire de la régulation de KCNQ1 par le potentiel membranaire, ce qui nous a permis de générer des peptides modulateurs (activateurs et inhibiteurs) spécifiques de ce canal. Par conséquent, je me suis intéressé à 3) l'étude de la généralisation de ce modèle sur les canaux sodiques dont le canal sodique musculaire Nav1.4 afin de générer des peptides régulateurs spécifiques de ce canal également. Afin d'améliorer l'efficacité de ces peptides modulateurs, les bases structurales de l'interaction peptide-canal sont en cours d'étude. En somme, ces études sur les mécanismes de régulation des canaux ioniques par le PIP₂ et par le potentiel membranaire présentent des enjeux à la fois fondamental et thérapeutique.

Mots clés : Canaux ioniques, KCNQ1, Nav1.4, Canalopathies, voltage dépendance, PIP₂.

Abstract

Voltage-dependent ion channels are plasma membrane proteins allowing ionic exchanges between cells and their environment. These proteins regulate the passage of ions such as potassium, sodium and calcium, and are responsible of the electrical activity in the heart, the skeletal muscles and the brain. The activity of these ion channels is regulated by the membrane potential as well as extracellular, cytosolic or membrane compounds such as the phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂). Impaired regulation of these channels triggers cardiac, muscular or neuronal pathologies called channelopathies, whose treatments are limited by their low specificity. Discovery of efficient and more specific pharmacological tools against these channelopathies requires a better understanding of the molecular mechanisms underlying ion channels regulation. Consequently, my thesis researches were focused on three main projects: 1) the study of the molecular mechanisms underlying voltage-gated potassium channels regulation by PIP₂ and 2) the study of the mechanisms of the cardiac potassium channel KCNQ1 voltage dependency. In this second project, we established a new molecular model of KCNQ1 regulation by the membrane potential, allowing us to generate KCNQ1-specific modulator peptides (activators and inhibitors). Consequently, I was interested to study (3) if this new model applies to other ion channels such as the muscular sodium channel Nav1.4, in order to generate specific modulator peptides for these channels. In order to improve the potency of these modulator peptides, the structural bases of peptide-channel interaction are under investigations. In short, these studies on the mechanisms of ion channels regulation by PIP₂ and by the membrane potential provide both basic and therapeutic insights.

Keywords: Ion channels, KCNQ1, Nav1.4, Channelopathies, Voltage dependence, PIP₂.